

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS – PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Efeito da juliprosopina na bioenergética mitocondrial

Danilo Eduardo Costa Vieira Lemos

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS – PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Efeito da juliprosopina na bioenergética mitocondrial

Danilo Eduardo Costa Vieira Lemos  
Graduando

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Maria Trindade de Medeiros  
Orientadora

Patos – PB  
2011

Lemos, Danilo Eduardo Costa Vieira

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial  
para obtenção do grau de Médico Veterinário.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS – PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DANILO EDUARDO COSTA VIEIRA LEMOS  
**Graduando**

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

ENTREGUE EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/2011

NOTA GERAL \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

_____ Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Rosane Maria Trindade de Medeiros	_____ Nota
_____ Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Sara Vilar Dantas Simões	_____ Nota
_____ Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas	_____ Nota

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Absalão Azevedo (*in memoriam*),  
Pelo exemplo de pessoa, mãe,  
Amiga e profissional.  
Alguém que vou levar sempre comigo  
Nessa jornada acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as coisas que me foram proporcionadas durante tida vida e em especial por todas as conquistas e vitórias durante essa fase.

A minha mãe, Cristiane, por sempre estar do meu lado. Sempre me amparando e me guiando por todo caminho, mostrando os valores que realmente importam, por me apoiar quando preciso, por mostrar quando estou errado, por lutar sempre, por acreditar, pelas suas palavras de incentivo, conforto e amor. Pelas lágrimas durante o caminho. Pelo seu amor incondicional.

Ao meu pai, Rômulo, pelo carinho e apoio.

A Gustavo, filho amado, por me dar força diária para continuar e sempre querer mais. Agradeço por ser aquele que me mostrou o real sentido e valor das coisas. E a Nicolle, pela compreensão dos momentos ausentes, por ser uma boa mãe.

Aos Tios Julio e Janiny, por abrirem as portas de sua casa e me receber tão bem durante todos esses anos. Por me proporcionar sempre o melhor, nunca deixando faltar nada, por me tratar como um filho (com todos ônus e bônus). Por todos os momentos de brincadeiras, brigas, almoços e jantares. Por esse carinho, sempre serei grato.

Aos meus avós Givaldo e Nevinha, Edson e Glória, por sempre acreditarem, por todo incentivo e amor dedicado. Por me proporcionarem momentos inesquecíveis, por lutarem sempre pela família.

Aos tios e tias por sempre estarem fazendo parte da minha vida ativamente, sempre contribuindo, incentivando, dividindo os momentos especiais.

Ao meu padrasto, Ricardo, por toda paciência, contribuição e amor dedicado a minha mãe. Por ser a base dela quando ela precisa. Pelo apoio e respeito que tem por mim.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosane Maria Trindade de Medeiros, por toda paciência, confiança e conhecimento dedicado.

Ao Prof. Dr. Franklin Riet Correa, por todas as oportunidades concedidas, pela confiança, pelo exemplo de cientista a ser seguido.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Solange Absalão Azevedo, que sempre acreditou no meu potencial, sempre me deu força para sempre ir mais longe, pelo incentivo ao estudo, pelos papos em inglês, pelo exemplo de profissional e amor a bioquímica.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, do LTF, pelo auxílio na extração do alcalóide necessário e aos mestrandos e doutorandos do laboratório pela paciência e ensinamentos, especialmente a Gabriela e Fábio.

Ao Prof. Dr. Fábio Ermínio Mingatto, da UNESP, por toda paciência e disposição em me auxiliar nos experimentos nas mitocôndrias. Por todo ensinamento e explanação da técnica. Aos companheiros não só de laboratório Marcos, Hyllana, Atã e Mariana pela companhia não só nas horas intermináveis de experimento, que nos tirava o almoço e só chegávamos em casa as 10 da noite.

Aos amigos de infância, Guilherme, Luisa e Bia por toda amizade, todos os momentos bons, ruins, de sol, bicicletas, viagens, moitas, calçadinhas, bares e restaurantes. Por mais que a distância física possam nos separar nosso amor é maior que isso.

Aqueles que viveram comigo todos os momentos nessa jornada universitária, que rimos, mudamos, crescemos, sofremos, viajamos, brincamos, estudamos e mesmo assim ainda fomos pras provas finais: Raíssa, Bruna, Milenna, Gabi, Aline, Andrea, Nilberto, Amanda, Nayara, Thayse.

Aos amigos que chegaram durante essa fase e compartilharam momentos ótimos e conversas intermináveis, Yanne, Carol, Stella, Karla, Vanessa, Deyde, Ligi, Shel.

A Léo, por todas as brigas para terminar a monografia, por todas as viagens, momentos e ensinamentos para me tornar uma pessoa melhor.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 <i>Prosopis juliflora</i> .....	12
2.2 ALCALÓIDES.....	13
2.3 MITOCÔNDRIAS.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 COLETA DAS VAGENS DE ALGAROBA.....	16
3.2 EXTRAÇÃO DO ALCALÓIDE .....	16
3.3 TESTES NAS MITOCÔNDRIAS.....	16
4 RESULTADOS.....	18
5 DISCUSSÃO.....	20
6 CONCLUSÃO.....	21
7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Efeito da juliprosopina na respiração mitocondrial.....	18
Figura 2	Efeito da juliprosopina no potencial de membrana.....	18
Figura 3	Efeito da juliprosopina na síntese de ATP.....	19

## RESUMO

**LEMOS, D.E.C.V., Efeito da juliprosopina na bioenergética mitocondrial. Patos, UFCG, 2011.**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da Juliprosopina, alcalóide derivado da planta *Prosopis juliflora*, bastante comum no nordeste brasileiro que causa intoxicação em bovinos, na bioenergética mitocondrial utilizando mitocôndrias de fígado de rato. As vagens de Algaroba (*Prosopis juliflora*) foram coletadas no município de Patos-PB e, a juliprosopina foi isolada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB partindo de trinta quilos das vagens da planta. A fração de alcalóides totais passou por uma coluna de Sephadex e foram reunidas e aplicadas em uma placa preparativa de sílica gel 20x20cm para isolamento. O composto foi identificado através da análise de Ressonância Magnética Nuclear  $H^1$  e  $C^{13}$ . A bioenergética mitocondrial foi avaliada no Laboratório de Bioquímica da UNESP/Dracena-SP. Foram utilizados ratos Wistar machos com peso de aproximadamente 200g e para isolamento das mitocôndrias os animais foram eutanasiados por decaptação sob anestesia com éter etílico e o fígado retirado, homogeneizado e centrifugado a velocidades diferentes. Na bioenergética foram avaliados os parâmetros de respiração mitocondrial, potencial de membrana e síntese de ATP. As concentrações de juliprosopina utilizadas foram 5, 10, 25 e 50  $\mu M$ . A juliprosopina apresentou um aumento significativo no consumo de oxigênio, no estado IV da respiração mitocondrial a partir da concentração de 25  $\mu M$ . O potencial da membrana mitocondrial sofreu uma redução significativa na mesma faixa de concentração. O alcalóide também inibiu significativamente a síntese de ATP, no entanto, esse efeito foi observado a partir da adição de 10  $\mu M$ . Os resultados indicam que o alcalóide juliprosopina apresenta ação desacopladora, levando assim à diminuição na síntese de ATP pelas mitocôndrias, o que pode estar associado à sua toxicidade.

**ABSTRACT**

**LEMOS, D.E.C.V., Effect of juliprosopine at mitochondrial bioenergetics. Patos, UFCG, 2011.**

The objective of this work was to evaluate the effect of juliprosopina, an alkaloid from *Prosopis juliflora*, common plant from Brazilian Northeast that causes outbreaks in cattle using rat liver mitochondria for bioenergetics tests. Thirty kilogram of *Prosopis juliflora* pods were collected in Patos – PB and the juliprosopina were isolated at Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) from UFPB where a total alkaloid fraction went through a Sephadex column and fractions were united and put in a silica card 20X20 cm for extraction. The main compound was identified by Nuclear Magnetic Resonance H<sup>1</sup> and C<sup>13</sup>. Mitochondrial bioenergetics was assessed at Biochemistry Laboratory at UNESP/Dracena-SP. Male, 200g, Wistar rats were used for mitochondrial isolation. The animals were euthanized by decapitation under ethylic ether anesthesia. Rat liver were taken, homogenized and centrifuged under different speeds. Mitochondrial respiration, membrane potential and ATP synthesis were assessed. Juliprosopine was tested at 5, 10, 25 and 50 µM. The alkaloid raised oxygen consumption at state IV of mitochondrial respiration in 25 µM. Membrane potential was decreased at same concentration. The alkaloids inhibit ATP synthesis in 10 µM concentration. Results show that juliprosopine uncouples and decreases ATP synthesis which might be connected to its toxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

As intoxicações por plantas em animais de produção no Brasil são conhecidas desde que os portugueses introduziram as primeiras cabeças de gado em pastagens naturais da região (TOKARNIA et al., 2000). As perdas econômicas ocasionadas pelas intoxicações por plantas podem ser definidas como diretas ou indiretas. As perdas diretas são causadas pelas mortes de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã, e aumento à susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica. As perdas indiretas incluem os custos de controlar as plantas tóxicas nas pastagens, as medidas de manejo para evitar as intoxicações como a utilização de cercas e o pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem devido ao atraso na sua utilização, a redução do valor da terra, a compra de gado para substituir os animais mortos, e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e ao tratamento dos animais afetados (JAMES, 1994; RIET-CORREA et al., 1993; RIET-CORREA & MEDEIROS, 2001).

O número de plantas conhecidas como tóxicas para animais de produção aumenta anualmente e atualmente somam pelo menos 122 espécies, pertencentes a 71 gêneros. Entre elas 15 afetam o sistema nervoso de ruminantes e 4 de equinos. Podemos citar a *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*, *Ipomoea carnea* subs. *fistulosa*, *Ipomoea riedellii*, *Ipomoea sericophylla*, *Ipomoea asarifolia*, *Turbina cordata*, *Marsdenia* spp., *Ricinus communis* e *Prosopis juliflora* como sendo as mais comuns (RIET-CORREA et al., 2009).

Na região semiárida brasileira encontra-se *Prosopis juliflora*, conhecida vulgarmente como algaroba ou algarobeira. Devido sua boa aclimação, hoje está difundida em todos os estados nordestinos onde se adaptou bem ao clima seco. Suas vagens são produzidas durante os meses de Outubro, Novembro e Dezembro que devido à combinação de baixo custo, alta palatabilidade e valor nutricional, são usadas na alimentação de bovinos, ovinos, caprinos, suínos, frangos e coelhos. As vagens são utilizadas, também, para consumo humano através de pães, biscoitos, geléias e doces (RAVIKALA et al., 1995; SILVA et al., 2002a,b; TABOSA et al., 2004; MAHGOUB et al., 2005a,b; STEIN et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioenergética mitocondrial com um alcalóide isolado da *Prosopis juliflora*, a juliprosopina, para tentar comprovar a atuação deste no processo patológico da intoxicação ajudando, assim, a esclarecer a lesão característica da doença.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Prosopis juliflora*

Introduzida no Brasil na década de 40, a Algaroba é um arbusto da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, que chega atingir de 8 a 12 metros de altura e começa a produzir vagens a partir do segundo ano. Foi introduzida no Brasil, no estado de Pernambuco, proveniente do Peru (AZEVEDO, 1961). Vem sendo usada como suplemento ou parte integrante de rações, na alimentação de diversas espécies de animais domésticos (CÂMARA, 2009). Concentra seu valor nutritivo nas vagens, constituindo-se rica fonte de carboidratos e proteínas com valor energético bruto comparável ao milho (STEIN, 2005). Silva et al (2002) sugere que a produção brasileira de vagem de algaroba seja superior a 1 milhão de toneladas com rendimento bruto do produto “*in natura*” superior a 12 milhões de dólares e que toda essa produção está concentrada apenas na região Nordeste brasileira.

Nobre (1982) atribuiu ao uso de vagem de algaroba triturada, a maior produção de leite de vacas em substituição de até 60% ao farelo de trigo, na dieta de vacas em lactação. Silva et al (1982) observaram desempenho semelhante de ganho de peso de bovinos de corte em confinamento alimentados com até 100% de vagens de algaroba triturada em substituição ao farelo de trigo. Stein (2005) sugere que o farelo de vagem de algaroba pode substituir o milho desintegrado com palha e sabugo, em dieta para equinos em confinamento, sem afetar o consumo de matéria seca e energia digestível e os coeficientes de matéria orgânica, proteína bruta e hemicelulose. Já Silva (2002a) avaliando a conversão alimentar de codornas japonesas com farelo de algaroba sugeriu que até 15% de inclusão na dieta não causa alterações no desempenho.

A planta foi extensamente cultivada no semiárido e atualmente estima-se que uma área de 150 mil hectares esteja ocupada pela algarobeira, e suas vagens podem resultar tóxicas para bovinos e caprinos (TABOSA et al., 2004, 2006) quando os animais tem acesso a grande quantidade delas. A intoxicação por *Prosopis juliflora* foi descrita nos Estados Unidos (DOLLAHITE, 1957, 1964) e no Peru (BACA, 1966). No Brasil foi reportada no Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2006), Pernambuco (CÂMARA et al., 2009) e Paraíba (SILVA et al., 2006; ASSIS et al., 2010). Assis et al (2010) relatou três casos de intoxicação em bovinos e outros três em caprinos.

Esta doença é vulgarmente conhecida como “mau da cara torta”, devido ao desvio lateral da cabeça, posição que o animal adota para manter o alimento na boca durante a mastigação ou ruminção. Outros sinais característicos da doença são atrofia do masseter, protrusão de língua, relaxamento da mandíbula, salivação profusa, disfagia, lambadura contínua das narinas e dificuldade de apreensão de alimentos. Observa-se, também, inquietação, atonia ruminal, anemia, edema submandibular e emagrecimento progressivo (KINGSBURY, 1964; FIGUEIREDO et al., 1996; RIET-

CORREA et al., 2002, 2003; TABOSA et al., 2004, 2006). Assis et al (2010) relata ruminção prolongada, frequente e com um barulho característico ocasionado pela batidas dos dentes. Coloração amarelada ou esbranquiçada do músculo masseter é observada macroscopicamente e atrofia neurogênica e substituição de fibras musculares por tecido fibroso ou gorduroso nos músculos masseter, bucinador, temporal e pterigóideo medial, são observadas microscopicamente (ASSIS et al., 2010). Figueiredo et al (1996), reproduziu experimentalmente a intoxicação em bovinos mediante o fornecimento, durante seis meses, de ração que continha 50% e 100% de vagens de algaroba enquanto Tabosa et al (2006) obtiveram a intoxicação em bovinos após ingestão de dietas com 50% e 75% das vagens durante 45-75 dias. Os caprinos são mais resistentes e têm que ingerir concentrações de 60-90% de vagens na alimentação por um período de aproximadamente 210 dias para apresentar sinais clínicos (TABOSA et al., 2000). Já os ovinos não se intoxicaram após receber vagens de algaroba a 70-100% da alimentação por um ano (LIMA et al., 2004).

Todos esses sinais são devidos à disfunção dos nervos cranianos, principalmente devido à degeneração e desaparecimento dos neurônios do núcleo motor do trigêmeo (TABOSA et al., 2006). Essa degeneração caracteriza-se por fina vacuolização do pericário dos neurônios, que assumem aspecto espumoso com dissolução da substância de Nissl com degeneração axonal (RIET-CORREA et al., 2003; TABOSA et al., 2006). Na microscopia eletrônica, os neurônios dos núcleos do trigêmeo apresentam marcante aumento de volume das mitocôndrias, com a crista mitocondrial deslocada periféricamente, desintegrada e apresentando vacúolos (TABOSA et al., 2006). Tabosa (2000a) trabalhando experimentalmente com caprinos encontrou uma degeneração Walleriana do nervo trigêmeo e atrofia por denervação dos músculos da mastigação. Nos casos severos de aumento de tamanho, a mitocôndria se transforma em vacúolos estruturais que contribuem na aparência vacuolar dos neurônios (TABOSA et al., 2006). Tabosa et al (2000) isolou da *Prosopis juliflora* um alcalóide do núcleo piperidínico que posteriormente foi denominado juliprosopina, sendo este o componente majoritário presente na planta.

## 2.2 ALCALÓIDES

A maioria dos princípios ativos encontrados nos extratos vegetais, de modo geral é proveniente de uma variedade de metabólitos secundários que conferem as plantas, entre outras funções proteção a herbívoros, infecções por microrganismos e aos raios UV. Podemos destacar nessa classe de metabólitos secundários os alcalóides, que se encontram distribuídos em plantas Angiospermas.

Os alcalóides desenvolvem múltiplas atividades farmacológicas em vários sistemas do organismo, como por exemplo, no sistema nervoso pode ter atividade depressiva ou estimulante, podem ter atividade anestésica, antitumoral, antibacteriana, entre outras (BRUNETON, 1999).

Após o surgimento de técnicas eletrônicas, ocorreu um avanço na elucidação das estruturas, e recentemente foi feita uma análise em um banco de dados NAPRALERT, indicando 26.900 estruturas de alcalóides conhecidas de fontes variadas, que foram isoladas a partir de 150.000 produtos naturais caracterizados, onde deste total, 21.120 foram isolados de plantas (CORDELL, et al., 2001).

Quimicamente os alcalóides têm baixo peso molecular, com caráter básico com um ou mais átomos de nitrogênio em um sistema cíclico (HARBORNE, 1984). Formam um grupo heterogêneo podendo ser classificado como pirrolizidínicos, piperidínicos, piridínicos, quinoléicos, isoquinoléicos, indólicos, imidazólicos, e quinolizidínicos.

Seu metabolismo deriva da glicose onde são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Quando a glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico, estas seguem por duas vias diferentes. Uma das vias é através do ácido chiquímico onde forma os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinólicos, isoquinólicos, ligninas, etc.). e a outra por meio das moléculas de piruvato que continuam sendo oxidadas até a formação de Acetil Coenzima A (Acetil Co-A), onde seguem três vias diferentes: via do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os chamados derivados de acetato. Entrando na via do ácido cítrico serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenos e esteróis, já a condensação do acetato origina as acetogeninas (VICKERY & VICKERY, 1981).

### 2.3 MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias não tem tamanho fixo mas, geralmente são descritas como estruturas cilíndricas e alongadas com dimensões de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento e aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro (SCHEFFLER, 2008). São as organelas mais presentes nas células dos animais. Contém seu próprio DNA e RNA e estão diretamente ligadas a regulação de várias funções celulares dependentes de energia, como metabolismo intermediário, regulação iônica, motilidade e proliferação celular (PERDESEN, 1999).

Palade em 1952 e Sjostrand em 1956 foram os primeiros a descrever a organização interna da mitocôndria em um sistema duplo de membranas onde existem três classes de compartimentos: a membrana externa e interna, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. A membrana externa é permeável à maior parte dos íons e moléculas pequenas. Já a membrana interna é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares incluindo o hidrogênio e contém uma alta porcentagem de proteína (DAUM, 1985; NICHOLLS, 1982). Esta tem a função de mediar e regular o transporte de metabólitos. Na membrana interna também, encontra-se o sistema transportador de elétrons (cadeia respiratória), o sistema de fosforilação (ATP sintase) e os transportadores dos intermediários das vias metabólicas, que incluem enzimas mitocondriais. A matriz mitocondrial contém enzimas, principalmente as pertencentes ao Ciclo de Krebs, da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e o DNA mitocondrial. O espaço intermembranar possui proteínas com funções importantes no metabolismo energético

como o citocromo c, creatina-quinase e a adenilato-quinase (FREY & MANNELLA, 2000).

As células animais utilizam quase 90% de ATP proveniente da cadeia respiratória mitocondrial e transforma energia redutora em um potencial de prótons transmembranar (MITCHELL, 1961). A respiração celular ocorre em três estágios. No primeiro as moléculas de carboidratos, proteínas e lipídeos, tem seu metabolismo degradativo convergido em Acetil-CoA. No segundo estágio, esse grupo acetil é consumido durante o ciclo de Krebs, sendo oxidados totalmente a  $\text{CO}_2$  acompanhado da redução de grande quantidade de coenzimas oxidadas  $\text{NAD}^+$  e FAD gerando os transportadores de elétrons reduzidos NADH e  $\text{FADH}_2$ . No terceiro estágio a mitocôndria remove os elétrons oriundos dessas coenzimas reduzidas (NADH e  $\text{FADH}_2$ ) e os transfere para oxigênio molecular reduzindo-o a  $\text{H}_2\text{O}$ , por meio de complexos respiratórios especializados I, II, III e IV, localizados nas cristas da membrana mitocondrial interna. Durante esse processo de transferência de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, por meio da fosforilação oxidativa, que acontece no complexo V.

A fosforilação oxidativa pode ser inibida ou desacoplada em alguns estágios do processo. Quando utilizado um inibidor, a mitocôndria não utiliza algumas coenzimas reduzidas como substrato, mas o fluxo não é impedido, mas se mitocôndrias respirando ativamente forem expostas a um inibidor da ATP sintase, cessa de operar a cadeia de transporte de elétrons, mostrando que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão firmemente acoplados (BERG et al., 2004). Esse firme acoplamento pode ser rompido por substâncias que causam desacoplamento. Esses desacopladores estimulam a respiração no estado 4 ou basal minimizando a produção de ATP mitocondrial, agem na força próton-motriz que é dissipada na presença destes compostos mas o transporte de elétrons segue normalmente pela cadeia respiratória.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE VAGENS DE ALGAROBA

Foram coletados trinta quilos de vagens de *Prosopis juliflora* no município de Patos – PB, trituradas e colocadas em uma estufa de ar circulante a 50° C por 72 horas no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

#### 3.2 EXTRAÇÃO DO ALCALÓIDE

As amostras de *Prosopis juliflora* foram transferidas para o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde foi realizada a extração do alcalóide de *P. juliflora* de acordo com metodologia descrita por Tabosa et al (2000).

As vagens secas e trituradas foram maceradas com etanol a 95%, temperatura ambiente, por 72 horas. Esse processo foi repetido por três vezes. Em seguida, o material foi concentrado a vácuo, em rota-evaporador com temperatura de aproximadamente 50°C, e obtido uma substância viscosa castanho-escuro, pesando 1,8 kg, denominada Extrato Etanólico Bruto (EEB).

Uma solução de ácido clorídrico a 3% foi adicionada ao EEB, o qual foi agitado e filtrado em celite, fornecendo uma parte insolúvel que foi descartada por não apresentar positividade para alcalóides no teste de Dragendorff. Posteriormente a solução aquosa ácida foi extraída várias vezes com clorofórmio, a fase aquosa ácida desengordurada foi alcalinizada, a frio, com uma solução de hidróxido de amônia até pH 8,0. A fase clorofórmica obtida em pH alcalino depois de seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro foi denominada Fração dos Alcalóides Totais (FAT), pesando 4g.

Várias tentativas para purificação da FAT se mostraram infrutíferas como a aplicação em placas preparativas em gel de sílica. Então foi feita uma coluna em Sephadex e as frações foram agregadas de acordo com o peso molecular. As frações de número 7 a 10 foram reunidas e aplicadas sobre uma coluna preparativa de sílica em gel 20 x 20 e eluídas com uma mistura de clorofórmio:metanol:dietilamina (80:20:1), onde cinco faixas foram separadas e feito teste de C<sup>13</sup> e H<sup>1</sup>. A terceira faixa se mostrou o alcalóide principal denominado juliprosopina, semelhante ao descrito por Tabosa et al 2000.

#### 3.3 TESTES NAS MITOCÔNDRIAS

O teste na bioenergética mitocondrial foi realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), na cidade de Dracena – SP.

Para os testes nas mitocôndrias foram utilizados ratos Wistar, machos onde foram anestesiados com éter e eutanasiados por decaptação em guilhotina, o fígado foi retirado, picotado em uma solução de 50ml contendo 250mM de sacarose, 1mM de

EGTA e 10mM de HEPES-KOH e pH 7,2. Os fragmentos foram lavados no mesmo meio e homogeneizado três vezes por 15 segundos com intervalos de 1 minuto em homogeneizador tipo Potter-Elvehjen. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 770 g a 4°C e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9.800 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso com 10ml de meio contendo 250mM de sacarose, 0,3mM de EGTA e 10mM de HEPES-KOH, pH 7,2 e centrifugado a 4.500 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento mitocondrial foi suspenso com 1 ml de meio contendo 250mM de sacarose e 10mM de HEPES-KOH, pH 7,2. Os ensaios foram realizados dentro de um período máximo de 3 horas.

A respiração mitocondrial foi determinada pelo monitoramento do consumo de oxigênio utilizando um eletrodo medidor de oxigênio tipo Clark. As mitocôndrias (1mg de proteína/mL) foram incubadas em uma câmara termostática fechada sob agitação em um meio composto por 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4, volume final de 1 mL a 30°C. Foram utilizados os substratos glutamato (5 mM) e malato (5 mM) ou succinato (5 mM) e rotenona (2,5 mM). As velocidades de consumo foram determinadas pelo software Strahkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas em nmol O<sub>2</sub>. min<sup>-1</sup>. mg de proteína<sup>-1</sup>

O potencial de membrana mitocondrial (2 mg de proteína/mL) foi determinado espectrofluorimetricamente no meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 0,5 mM de EGTA, 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4 e volume final de 2 mL, com o indicador safranina-O (4 µM). As mitocôndrias foram energizadas com glutamato (5 mM) e malato (5 mM) ou com succinato (5 mM) e rotenona (2,5 mM) e a variação de fluorescência foi avaliada utilizando-se um espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão), nos comprimentos de onda 505 e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação à fluorescência das mitocôndrias controles.

A síntese de ATP foi determinada pelo método de quimioluminescência utilizando o sistema luciferina-luciferase de vaga-lume por meio de um kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Previamente a suspensão de mitocôndrias foi tratada nas condições de respiração com succinato (5 mM) e rotenona (2,5 µM) e centrifugada 9.000 g por 5 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi tratado com 1 mL de ácido percloracético 1 M gelado e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Foram aliqüotados 100 µL de cada amostra e as mesmas foram neutralizadas com KOH 2 M. Em seguida foi adicionado Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, sendo as amostras centrifugadas a 12.000 g, por 12 minutos a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram avaliados, em triplicata, no Luminômetro seguindo as recomendações do fabricante do kit.

A juliprosopina foi utilizada nos testes na concentração de 5, 10, 25 e 50 µM. Cada teste foi realizado três vezes com diferentes preparações mitocondriais.

## 4 RESULTADOS

### Respiração mitocondrial:

A juliprosopina induziu um aumento significativo no consumo de oxigênio no estado IV da respiração mitocondrial a partir da concentração de 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 1)

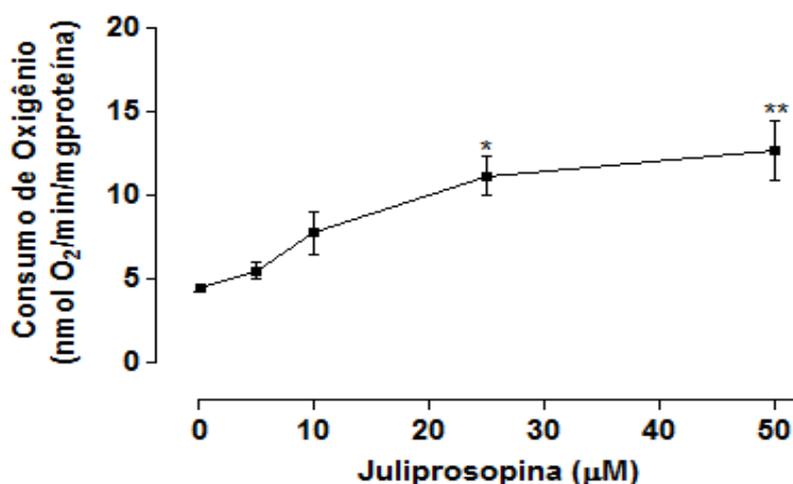


Fig. 1- Efeito da juliprosopina no estado IV da respiração mitocondrial conforme descrito em Material e Métodos. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ )

O estímulo da respiração do estado IV foi comprovado mesmo na presença da oligomicina, tanto em mitocôndrias energizadas com glutamato e malato como nas energizadas com succinato (resultados não apresentados).

### Potencial de Membrana

O potencial de membrana mitocondrial foi reduzido significativamente a partir da concentração de 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 2).

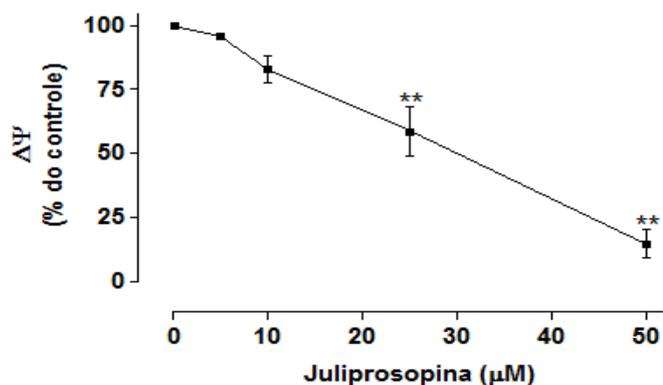


Fig. 2 - Efeito da juliprosopina no potencial de membrana mitocondrial conforme descrito em Material e Métodos. (\*\*P<0,01)

Ocorreu uma inibição do potencial de membrana, há uma dissipação desse potencial. Os resultados seguem a mesma linha dos obtidos na respiração mitocondrial, quando as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  apresentaram significância.

### Síntese de ATP:

Os efeitos do alcalóide na concentração mitocondrial de ATP também foram avaliados. Comprovando os resultados obtidos com a respiração mitocondrial e o potencial de membrana, a juliprosopina inibiu significativamente a síntese de ATP, no entanto, esse efeito foi observado a partir da adição de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 3).

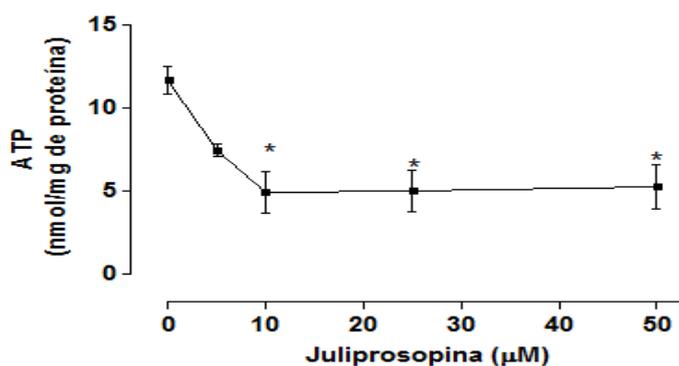


Fig. 3- Efeito da juliprosopina na síntese de ATP pelas mitocôndrias conforme descrito em Material e Métodos. (\*P<0,05)

## 5 DISCUSSÃO

A disfunção mitocondrial é um mecanismo patogênico fundamental de várias toxicidades significantes em mamíferos (AMACHER, 2005). A diminuição dos níveis de ATP é descrito na literatura como uma das formas para desenvolvimento da morte celular por necrose (NICOTERA et al., 1998; WOJTCZAK, 2002; WALLACE, 2000; STARKOV, 2000). Com o objetivo de avaliar a influência da mitocôndria nos achados histológicos e ultraestruturais descritos por Tabosa et al (2006), foram feitos testes na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. De acordo Tabosa et al (2000), a juliprosopina é o composto principal da *Prosopis juliflora* por ser encontrada em maior quantidade na planta. A partir daí, estudo feito por Tabosa et al (2006), a mitocôndria apresentou uma vacuolização observada microscopicamente e ultraestruturalmente, sendo esta, a causa desse estudo. A juliprosopina demonstrou ter significativo efeito na respiração mitocondrial, estimulando o estado IV nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$ . O estímulo da respiração no estado IV foi comprovado mesmo na presença da oligomicina (composto inibidor da ATP sintase), pois na presença da oligomicina as mitocôndrias param de fosforilar ADP em ATP e logo após a administração de juliprosopina elas voltam a consumir oxigênio porém, sem realizar o processo de fosforilação, indicando assim a ação desacopladora da juliprosopina. Esse estímulo ocorreu tanto em mitocôndrias energizadas com glutamato mais malato como com succinato, substratos para o transporte de elétrons a partir do complexo I e II, respectivamente. Este alcalóide também não inibiu a ação do CCCP (desacoplador clássico da fosforilação oxidativa), indicando que ele não atua como inibidor da cadeia respiratória.

A dissipação do potencial de membrana também ocorreu nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$ , transportando prótons para dentro da matriz mitocondrial sem passar pelo complexo V da cadeia respiratória. Achado esse consistente com os encontrados na síntese de ATP, onde a juliprosopina inibiu a síntese do mesmo a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$ , comprovando assim sua ação desacopladora.

A conservação da energia acoplada à respiração na forma de ATP é a mais importante função mitocondrial (SKULACHEV, 1999). A dissipação do potencial de membrana e a diminuição do conteúdo de ATP podem resultar em efeitos tóxicos (WU et al., 1990). Além da síntese de ATP ser dependente da integridade da membrana a sua diminuição pode estar envolvida com efeitos tóxicos que induzem a um desbalanço funcional.

O presente estudo mostra que a juliprosopina é potencialmente tóxica para a bioenergética mitocondrial, mostrando em particular que a síntese de ATP é afetada por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa, gerando assim uma permeabilização da membrana interna mitocondrial aos prótons, que por sua vez dissipa o potencial de membrana e afeta a respiração mitocondrial. Essa permeabilização da membrana interna mitocondrial afetando o acoplamento do transporte de elétrons com a síntese de ATP

(onde o produto final do complexo IV é H<sub>2</sub>O) e o retorno de prótons para a matriz mitocondrial sem passar pelo complexo V, podem ser responsáveis pela dilatação mitocondrial que ocorre na intoxicação por vagens de *Prosopis juliflora*.

## **6 CONCLUSÃO**

A juliprosopina é uma substância desacopladora da fosforilação oxidativa interferindo assim na síntese de ATP e desta forma, desbalanceando o fluxo de entrada e saída de elétrons pela membrana levando, provavelmente, a uma vacuolização mitocondrial.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, T.S., MEDEIROS, R.M.T., RIET-CORREA, F., GALIZA, G.J.N., DANTAS, A.F.M., OLIVEIRA, D.M., Intoxicação por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba, **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30 (1), p. 13-20, 2010.

AZEVEDO, G., Algaroba. 2ª ed. **Serviço de Informação Agrícola**, Rio de Janeiro. 32p, 1961.

BACA, S.F., VALLENAS, A., NOVOA, C., OCHOA, J., CUEVAS, S., Estudio experimental de la “Coquera” en caprinos. **Revista Facultad Medicina Veterinaria**, Lima, v. 18/ 20, p.131–159, 1966.

BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L., Fosforilação oxidativa. BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L. In: **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 509-540

CÂMARA, A.C.L., COSTA, N.A., RIET-CORREA, F., AFONSO, J.A.B., DANTAS, A.F.M., MENDONÇA, C.L., SOUZA M.I., Intoxicação espontânea por vagens de *Prosopis juliflora* (Leg. Mimosoideae) em bovinos em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n. 29(3) p. 233-240, 2009.

CORDELL, G.A., QUINN-BEATTIE, M.L., FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drugs discovery and development, **Phytotherapy Research**, v.15, p. 183-205, 2001.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 822, n. 1, p. 1-42, 1985.

DOLLAHITE, J.W., ANTHONY, W.V., Malnutrition in cattle on an unbalanced diet of mesquite beans. Agriculture Experimental Station, Texas, USA, **Progress Report** v.193, p.32, 1957.

DOLLAHITE, J.W., Management of the disease produced in cattle on an unbalanced diet of mesquite beans. **South Veterinary**. v. 17(4) p. 93-295, 1964.

FIGUEIREDO, L.J.C., TÁVORA, J.P.F., FERREIRA, M.M., SIMÕES, S.V.D., DANTAS, J., Estudo clínico e anátomo-patológico da doença “cara torta” em bovinos no Nordeste Brasileiro. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária**. UFBA, Salvador, v. 18(1) p.175-183, 1996

FREY, T.G., MANELLA, C.A., The internal structure of mitochondria. **Trends Biochemistry Science**, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.

- HARBORNE, J.B. **Plant chemosystematics**. Academic Press, p. 159-163, 1984.
- JAMES, L.F. Solving poisonous plant problems by a team approach, In: COLEGATE, S.M.; DORLING, P.R. (Ed.) **Plant associated toxins**. Wallingford: CAB International, p.1-6, 1994.
- KINGSBURY, J.M. **Poisonous Plants of the United States and Canada**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, p.349-351, 1964.
- LIMA, E., RIET-CORREA, F., AMORIN, S.L., SUCUPIRA-JÚNIOR, G., Intoxicação por favas de *Prosopis juliflora* (algaroba) em caprinos no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 24, p. 36-37, 2004.
- MAHGOUB O., KADIM I.T., JOHNSON E.H., SRIKANDAKUMAR A., AL-SAQRI N.M., AL-ABRI A.S., RITCHIE A., The use of a concentrate containing Meskit (*Prosopis juliflora*) pods and date palm byproducts to replace commercial concentrate in diets of Omani sheep. **Animal Feed Science Technology**. v. 120, p. 33-41, 2005a.
- MAHGOUB O., KADIM I.S., FORSBERG N.E., AL-AJMI D.S., AL-SAQRY N.M., AL-ABRI A.S., ANNAMALAI K., Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as a feed for goats **Animal Feed Science Technology**. v. 121, p. 319- 327, 2005b.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-148, 1961.
- NICHOLLS, D.G. **Bioenergetics**. An introduction to the chemiosmotic theory. London: Academic Press, 1982. p. 25-96.
- PEDERSEN, P. L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: A brief overview. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 31, p. 291-304, 1999.
- RAVIKALA K., PATEL A.M., MURTHY K.S., WADHWANI K.N., Growth efficiency in feedlot lambs on *Prosopis juliflora* based diets. **Small Ruminants Research**. v. 16. p. 227-231, 1995.
- RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M.C.; SCHILD, A. L. **Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos**. Montevideo: Hemisfério Sur do Brasil, 340 p., 1993.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.
- RIET-CORREA, F., RIET-CORREA, G., SCHILD A.L., Importância de exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22(4) p.161-168, 2002.

RIET-CORREA, F., TABOSA, I. M. , AZEVEDO, E.O., MEDEIROS, R.M.T., SIMOES, S.V.D., DANTAS, AA, ALVES, C.J., ; NOBRE, V.M.T. , ATHAYDE, A.C., GOMES, A.A., LIMA, E.F., Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. **Semi Árido Em Foco**, Patos, v. 1, p. 2-86, 2003.

RIET-CORREA, F. et al. **Poisoning by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock**. Campina Grande, PB: Editora da Universidade Federal de Campina Grande, 2009. 246p.

SCHEFFLER, I.E. **Mitochondria**. 2. ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2008. 462 p.

SILVA, D.S., LEITÃO, S.C., OLIVEIRA-FILHO, J.J., Substituição do farelo de trigo (*Triticum vulgare Komarnitzky*) pelo fruto triturado da algarobeira (*Prosopis juliflora* (S.w.) D.C.). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ALGAROBA, **Anais...** Natal: EMPARN, p.361-379, 1982.

SILVA J.H.V., OLIVEIRA J.N.C., SILVA E.L., JORDÃO FILHO J., RIBEIRO M.L.G., Uso da farinha integral de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) D.C.) na alimentação de codornas japonesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 31(3), p. 1789-1795, 2002a.

SILVA J.H.V., SILVA E.L., JORDÃO FILHO J., TOLEDO R.S., ALBINO L.F.T., RIBEIRO M.L.G. & COUTO H.P., Valores energéticos e efeitos da inclusão de farinha integral de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.) em rações de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 31(6), p. 2255-2264, 2002b.

SILVA, D.M., RIET-CORREA F., MEDEIROS, R.M.T., OLIVEIRA, O.D., Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26(4) p.223-236, 2006.

STEIN, R.B.S., TOLEDO, L.R.A, ALMEIDA, F.Q., ARNAUT, A.C., PATITUCCI, L.T., SOARES NETO, J., COSTA, V.T.M., Uso do farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Swartz) D.C.) em dietas para eqüinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34(4), p. 1240-1247, 2005.

TABOSA, I. M., QUINTANS JUNIOR, L. J., PAMPLONA, F. V., ALMEIDA, R. N., CUNHA, E.V.L., SILVA, M.S., BARBOSA-FILHO, J.M.,. Isolamento Biomonitorado de alcalóides tóxicos de *Prosopis juliflora* (Algaroba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, p. 11-22, 2000.

TABOSA, I.M., RIET-CORREA, F., SIMÕES, S.V.D., MEDEIROS, R.M.T., NOBRE, V.M.T.. Intoxication by *Prosopis juliflora* pods (mesquite beans) in cattle and goats in Northeastern Brazil. In: Acamovic T., Stewart C.S. & Pannycott T.W. (Ed.), **Toxic Plants and other Natural Toxicants**. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK. p.341-346, 2004.

TABOSA, I.M., RIET-CORREA, F., BARROS, S.S., SUMMERS, B.A., SIMÕES, S.V.D., MEDEIROS, R.M.T. NOBRE, V.M.T., Neurohistologic and ultrastructural lesions in cattle experimentally intoxicated with the plant *Prosopis juliflora*. **Veterinary Pathology**. v. 43 p. 695-701, 2006.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 310 p., 2000.

VICKERY, M. L. & VICKERY, B. **Metabolismo da planta Secundário**. A Macmillan Press Ltd., Hong Kong, 1981.