

ADMINISTRAÇÃO DE *Xylopia brasiliensis* Spreng. (Annonaceae) PREVINE A INIBIÇÃO DO COMPLEXO I DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL EM PULMÕES SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AGUDA DE CARVÃO MINERAL

Administration of Xylopia brasiliensis Spreng. (Annonaceae) prevents respiratory chain complex I inhibition in lungs of rats submitted to acute coal exposure

Isabela Casagrande Jeremias¹, Gabriela Kozuchovski Ferreira¹, Jordana Pezente Panatto¹, Giselli Scaini¹, Gislaine Tezza Rezin¹, Ricardo Aurino de Pinho², Patricia Aguiar Amaral³, Vanilde Citadini-Zanette⁴, Angela Erna Rossato^{1,3}, Emilio Luiz Streck^{1*}

¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 – Criciúma - SC, Brasil

²Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 – Criciúma - SC, Brasil

³G-FITO, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 – Criciúma - SC, Brasil

⁴Herbário Pe. Raulino Reitz, Unidade Acadêmica de Humanidades, Ciências e Educação, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 – Criciúma - SC, Brasil

Endereço para Correspondência:

*Prof. Emilio L. Streck, Laboratório de Bioenergética, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 – Criciúma - SC, Brasil. Fax: +55 48 3341 2644

E-mail: emiliostreck@gmail.com

Órgãos e instituições financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

Resumo

A exposição ao pó de carvão pode induzir uma inflamação alveolar, que leva a doenças como a pneumoconiose. Vários estudos já demonstraram importantes efeitos biológicos da *Xylopiã brasiliensis* (*X. brasiliensis*), popularmente conhecida para o tratamento de doenças respiratórias em mineiros. Neste trabalho, nós avaliamos os efeitos da instilação traqueal de carvão sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e efeito do tratamento com extratos da *X. brasiliensis* em pulmões de ratos expostos a poeira de carvão mineral. Os animais foram divididos em cinco grupos: (1) uma única instilação traqueal de solução de salina + tratamento com água, (2) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com água; (3) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com extrato hidroalcoólico de *X. brasiliensis*; (4) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com azeite extra virgem; (5) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com extrato oleóleo de *X. brasiliensis*. Todos os grupos foram realizados administrações por via oral, (gavagem). Nossos resultados demonstraram que houve uma diminuição significativa na atividade do complexo I e o tratamento com o extrato hidroalcoólico e oleóleo de *X. brasiliensis* foi capaz de prevenir tal inibição. Em conclusão nosso estudo indica que a *X. brasiliensis* é uma planta promissora para o tratamento adjuvante da pneumoconiose causada pela exposição aguda ao pó de carvão.

Palavras chaves: pneumoconiose; cadeia respiratória mitocondrial; *Xylopiã brasiliensis*.

Abstract

Coal dust exposure can induce alveolar inflammation as pneumoconiosis. Several studies report important biological effects of *Xylopiã brasiliensis* (*X. brasiliensis*), used in Brazilian folk medicine for respiratory diseases in miners. In this work, we evaluated the effect of acute coal dust intratracheal instillation on activity of complexes of mitochondrial respiratory chain and effect of treatment with *X. brasiliensis* extracts in lung of rats submitted to acute coal dust intratracheal instillation. The animals were divided into five groups: (1) treatment with gavage administration of water and a single tracheal instillation of saline; (2) treatment with gavage administration of water and a single tracheal instillation of coal dust; (3) treatment with gavage administration of *X. brasiliensis* hydroalcoholic extract and a single

X. brasiliensis e mitocôndria

tracheal instillation of coal dust; (4) treatment with gavage administration of extra virgin olive oil and a single tracheal instillation of coal dust; (5) treatment with gavage administration *X. brasiliensis* oil extract and a single tracheal instillation of coal dust. Our results showed that complex I activity was significantly inhibited and this inhibition was reversed by treatment with *X. brasiliensis*. In conclusion, our study indicates that *X. brasiliensis* is a promising plant to adjuvant treatment of the pneumoconiosis caused by acute exposition of mineral coal.

Key words: pneumoconiosis; mitochondrial respiratory chain; *Xylopia brasiliensis*.

INTRODUÇÃO

Mineradores de carvão são comumente expostos ao pó de carvão, e com a inalação do mesmo ocorre o transporte de diversas partículas para as vias respiratórias, gerando respostas fisiológicas e patológicas, como a pneumoconiose, uma doença caracterizada pela agregação de macrófagos nos bronquíolos respiratórios (Ghanem et al., 2006; Remzi et al., 2004; Rom et al., 1987). Além disso, a inflamação é uma característica consistente da resposta pulmonar a exposição ao pó de carvão mineral (Ghanem et al., 2006; Rom et al., 1987). Como indicado acima, esta resposta é mediada pela ativação de macrófagos e o recrutamento de células polimorfonucleares, que aumentam os mediadores inflamatórios e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Pinho et al., 2004). Neste contexto, Pinho e colaboradores (2005) demonstraram que a administração de antioxidantes pode desempenhar um efeito protetor importante sobre as lesões oxidativas induzidas pela exposição aguda ao carvão. Além disso, Donbak e colaboradores (2005) demonstraram que a exposição ocupacional de pó de carvão mineral induz danos citogenéticos em linfócitos periféricos de trabalhadores da mineração subterrânea de carvão.

Xylopia brasiliensis Spreng. (*X. brasiliensis*), pertencente à família Annonacea, é uma árvore de grande porte distribuída por todo o Brasil. É popularmente conhecida como “pindaíba”, “pindaubuna” e “bindaíba”. Esta planta medicinal é utilizada na medicina popular brasileira como um agente sedativo e analgésico (Moreira et al., 2003; Moreira et

X. brasiliensis e mitocôndria

al., 2005). Levantamentos etnobotânicos realizados pela Pastoral da Saúde da Diocese do município de Criciúma, Santa Catarina, mostraram que a *X. brasiliensis* é popularmente utilizada para o tratamento de pneumoconiose e enfisema pulmonar em mineradores (Marques, 2007). Estudos fitoquímicos demonstram a presença de alcalóides, amidas, lignóides, acetogeninas e terpenóides especialmente nas folhas (Moreira et al., 2005). As sementes são ricas em ácido caurenóico, um diterpeno com atividade *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* (Melo et al., 2001). Também foi detectada a presença de sesquiterpenos aromadendranos diidroxilados, que apresentaram atividade antifúngica frente à *Cladosporium cladosporioides* (Moreira et al., 2003) e monoterpénóides e diterpenóides no óleo volátil obtido das folhas de *X. brasilienses* (Lago et al., 2003).

As mitocôndrias são organelas intracelulares que desempenham um papel crucial na produção de adenosina trifosfato (ATP) (Calabrese et al., 2001). A maior parte da energia celular é gerada através da fosforilação oxidativa, um processo que requer a ação de vários complexos enzimáticos localizados na membrana mitocondrial interna, que constituem a cadeia transportadora de elétrons (Horn & Barrientos, 2008). Além da regeneração do ATP, a mitocôndria é a principal fonte de ERO nas células (Cadenas & Davies, 2000), gerando ânion superóxido no espaço intermembrana pelo vazamento de elétrons que se combinam com oxigênio molecular no complexo III, em um processo que é dependente do potencial de membrana, e na matriz, através do complexo I (Han et al., 2001). Neste contexto, alterações na função mitocondrial levam a uma rápida queda na produção de energia e morte celular (Ankarcrona et al., 1995).

Considerando que a instilação traqueal de carvão em pulmão de ratos conduz a uma resposta inflamatória e dano oxidativo, e que a *X. brasiliensis* é utilizada popularmente para o tratamento de várias condições inflamatórias do sistema respiratório, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da instilação traqueal de carvão sobre a atividade da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I, II, II-III e IV) e efeito do extrato hidroalcoólico e oleóleo da *X. brasiliensis* em pulmões de ratos expostos à poeira de carvão mineral.

MÉTODOS

Identificação e extração do material vegetal

Para este estudo foi utilizada *Xylopia brasiliensis* Spreng. planta coletada no município de Siderópolis, Santa Catarina, por uma das agentes da Pastoral da Saúde Regional de Criciúma (Santa Catarina) e identificada pelos botânicos do Herbário Padre Raulino Reitz – UNESC, onde consta em seu acervo com o registro: CRI 7594. Foram preparados extratos utilizando como farmacógeno a folha fresca, de acordo com o que preconiza a Pastoral da Saúde da Diocese do município de Criciúma, Santa Catarina. As folhas foram transferidas para secagem em estufa com circulação de ar (40°C) durante 3 dias. O pó resultante (aproximadamente 400 g) foi submetido à maceração dinâmica com 2 litros de uma solução de etanol/água (70:30 v/v) por um período de 3 horas. Os extratos foram filtrados, e este procedimento foi repetido duas vezes. O solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, e o resíduo foi utilizado para a preparação de dois extratos, uma tintura, com solvente hidroetanólico (70%) e um oleóleo, com óleo de oliva extravirgem (Galo®).

Análise farmacognóstica

As análises farmacognósticas foram realizadas utilizando o extrato hidroetanólico (70%) previamente preparado. Foram realizadas as reações com cloreto férrico, proteínas e sais de chumbo para confirmar a presença de grupamentos fenólicos (Simões et al., 2003).

Preparação do pó de carvão

O carvão mineral utilizado foi previamente coletado na Carbonífera Cooperminas, localizada no município de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. O mesmo foi triturado em um moinho de esferas por 3 horas, em uma frequência de 25 Hz, sendo, logo após, analisado pelo Laboratório de Análises de Solo e Fertilizantes da Universidade do Extremo Sul Catarinense, apresentando as seguintes características mineralógicas: cobre (0,003%), ferro (2,5%), zinco (0,003%) e sílica (27,3%). As partículas de carvão utilizadas nesse experimento apresentaram um diâmetro até 15 µm (Pinho et al., 2004).

Animais e desenho do estudo

Ratos Wistar, machos, pesando em média 400 g, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) e comida e água *ad libitum*, com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), foram submetidos a uma única instilação traqueal de carvão ou salina (controle). Vinte e quatro horas após a instilação traqueal os animais foram subdivididos em 5 grupos e submetidos ao tratamento com água, óleo de oliva extravirgem, extrato hidroalcoólico de *X. brasiliensis* e extrato oleóleo de *X. brasiliensis* por 60 dias consecutivos. Grupos: (1) uma única instilação traqueal de solução de salina + tratamento com água, (2) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com água; (3) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com extrato hidroalcoólico de *X. brasiliensis*; (4) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com óleo de oliva extravirgem; (5) uma única instilação traqueal de pó de carvão + tratamento com extrato oleóleo de *X. brasiliensis*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense de acordo com o protocolo número 466/2006.

Exposição ao carvão mineral

Para a instilação traqueal de carvão, os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg de massa corporal, i.p.) e xilazina (20mg/kg de massa corporal, i.p.). Uma pequena incisão na região cervical anterior foi realizada para uma exposição da traqueia, na qual foi administrado o carvão (instilação traqueal). Nos grupos 2, 3, 4 e 5 foi administrado uma única dose de 3 mg de carvão mineral dissolvido em 0,3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Já o grupo 1 recebeu apenas 0,3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). A escolha da dose e idade dos animais baseou-se em um estudo anterior realizado por Pinho e colaboradores (2004) mostrando que os animais submetidos à instilação traqueal de carvão mineral na dose de 3mg/mL apresentaram alterações pulmonares, como a indução a resposta inflamatória e dano oxidativo.

Tratamento com *Xylopi* *brasiliensis*

O tratamento foi realizado por gavagem, via oral, uma vez ao dia por um período de 60 dias, sem intervalos. Os animais do grupo 1 e 2 receberam a administração de água (1 mL); O grupo 3 recebeu a administração de extrato hidroalcoólico de *X. brasiliensis* (0,31 mg/kg de peso corporal diluído em 1 mL de água); o grupo 4 recebeu a administração de óleo de oliva extravirgem (1 mL) e o grupo 5 recebeu a administração do extrato oleóleo de *X. brasiliensis* (1 mL do extrato previamente preparado, com uma eficiência de 0,25% de extrato sólido). A escolha das doses utilizadas neste trabalho foi baseada nos dados da Pastoral da Saúde, Regional de Criciúma (Santa Catarina).

Preparação de tecido e homogeneizado

Sessenta dias após o início do tratamento, os animais foram mortos por decapitação, os pulmões foram removidos cirurgicamente e armazenado em -70°C para a realização dos ensaios bioquímicos. O pulmão foi homogeneizado (1:10 p/v) em tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trizma base 10 mM, heparina 50 IU/mL), pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 800 x *g* por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -70°C. As proteínas foram determinadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Atividade da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade da NADH desidrogenase (complexo I) foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. A atividade enzimática do succinato: 2,6-dicloroindofenol (DCIP) oxirredutase (complexo II) e succinato: citocromo c oxirredutase (complexo II-III) foram medidas pelo método descrito por Fischer e colaboradores (1985). A atividade do complexo II foi determinada pela diminuição da absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) em 600 nm. A atividade do complexo II-III é determinada pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo c em 550 nm. A atividade da citocromo c oxidase (complexo IV) foi determinada de acordo com o método descrito por Rustin e colaboradores (1994), através do decréscimo na absorbância, devido à oxidação de citocromo c previamente reduzido em 550 nm.

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey quando o F era significativo. Todas as análises foram realizadas por meio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). As diferenças foram consideradas significantes quando obtidos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Primeiramente, os extratos foram submetidos à avaliação farmacognóstica, confirmando a presença de grupamentos fenólicos nas folhas de *X. brasiliensis*. Posteriormente, nós avaliamos o efeito da instilação traqueal de carvão e da administração da *X. brasiliensis* sobre a atividade da dos complexos (I, II, II-III e IV) da cadeia respiratória mitocondrial em pulmões de ratos expostos de forma aguda ao carvão mineral.

Nossos resultados demonstraram que houve uma diminuição significativa na atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em pulmão de animais submetidos à instilação traqueal de carvão, e o tratamento com o extrato hidroalcoólico e oleóleo de *X. brasiliensis* foi capaz de prevenir tal inibição (Figura 1). Por outro lado, a exposição ao pó de carvão mineral e o tratamento com *X. brasiliensis* não afetaram a atividade dos complexos II, III e IV (Figuras 2, 3 e 4 respectivamente). É importante ressaltar que a administração de óleo de oliva sozinho, ou seja, sem a presença da *X. brasiliensis*, não apresentou efeito sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

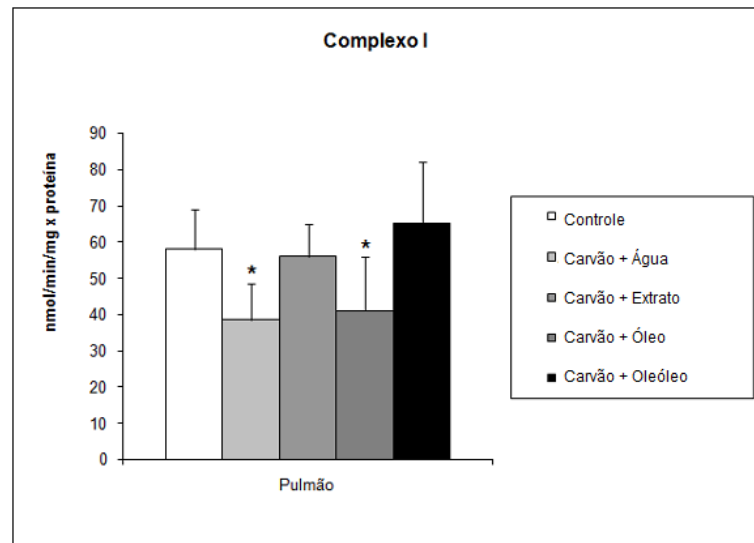


Figura 1. Atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em pulmão de ratos após exposição aguda ao carvão mineral tratados com *Xylopiá brasiliensis*. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=6). * Diferente do grupo controle, $p < 0,05$ (ANOVA seguida por teste de Tukey).

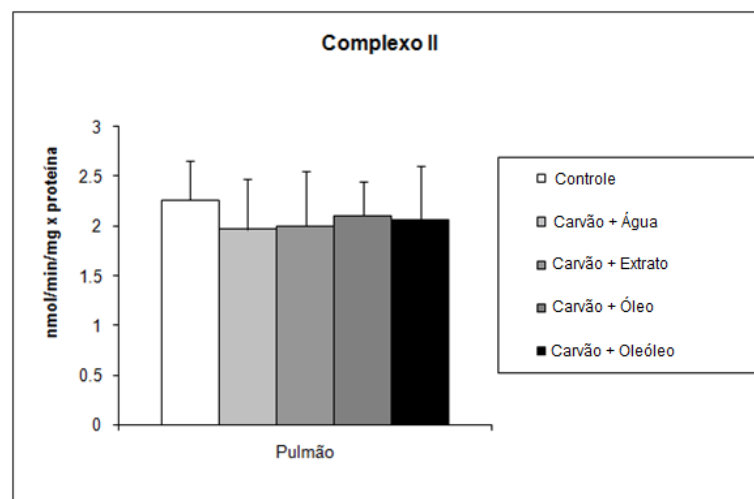


Figura 2. Atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em pulmão de ratos após exposição aguda ao carvão mineral tratados com *Xylopiá brasiliensis*. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=6).

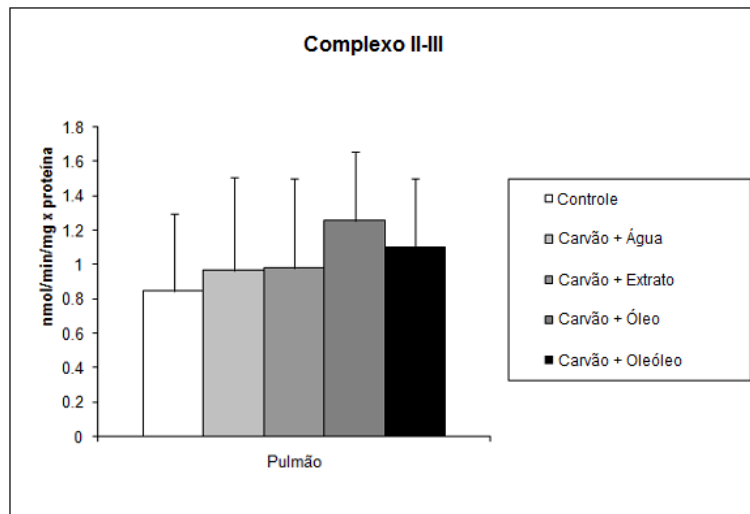


Figura 3. Atividade do complexo II-III da cadeia respiratória mitocondrial em pulmão de ratos após exposição aguda ao carvão mineral tratados com *Xylopiá brasiliensis*. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=6).

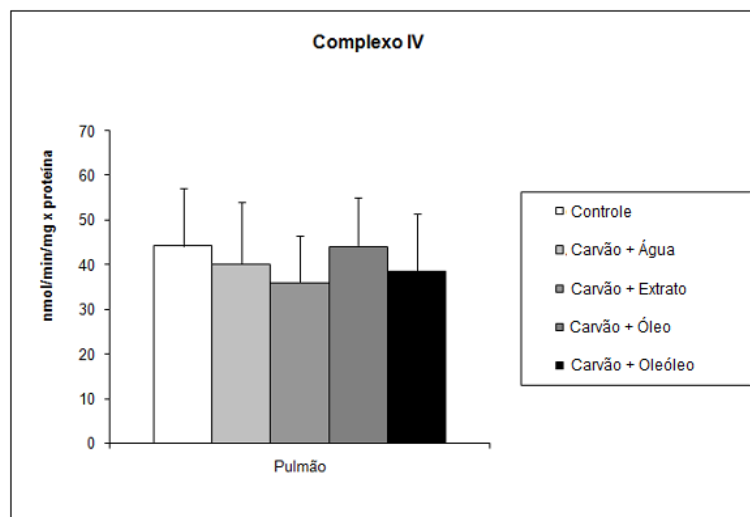


Figura 4. Atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial em pulmão de ratos após exposição aguda ao carvão mineral tratados com *Xylopiá brasiliensis*. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=6).

DISCUSSÃO

Meijers e colaboradores (1997) demonstraram que a exposição ao pó de carvão é a principal causa de pneumoconiose, bronquite crônica, perda de função pulmonar, enfisema e fibrose maciça progressiva. Embora a fisiopatologia das lesões ocasionadas pela inalação do pó de carvão ainda é pouco conhecida, evidências demonstram que a resposta pulmonar gerada por poluentes ocupacionais e atmosféricos, como o carvão, provoca um efeito inflamatório em cadeia, mediado pela ativação de macrófagos e recrutamento de células polimorfonucleares, citocinas, quimiocinas e ERO (Blackford et al, 1997;. Saldiva et al, 2002;. Tao et al, 2003;. Vallyathan et al, 2000; Pinho et al., 2004). Após a inalação desses poluentes, a produção de ERO pode ser aumentada significativamente, ocasionando danos nos constituintes celulares (Castranona et al., 2002). Pinho e colaboradores (2004) demonstraram que duas fases distintas caracterizam a resposta inflamatória nos pulmões após exposição aguda ao carvão, uma fase marcada pela infiltração de linfócitos e o influxo de neutrófilos, e outra caracterizada pela predominância de macrófagos alveolares. Além disso, os mesmos autores demonstraram um aumento significativo nos parâmetros de estresse oxidativo (Pinho et al., 2004).

Nós verificamos que nos animais submetidos à instilação traqueal de carvão houve uma diminuição na atividade do complexo I, e esta inibição foi prevenida pela administração do extrato hidroalcoólico e óleo de *X. brasiliensis*. Estudos tem demonstrado que a instilação traqueal de carvão é acompanhada por estresse oxidativo (Castranona et al., 2002; Pinho et al., 2004). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e a diminuição nas defesas antioxidantes podem causar defeitos no genoma mitocondrial, lipoperoxidação e dano oxidativo as proteínas (Delanty & Dichter, 1998; Halliwell, 2006). Assim, o excesso de espécies reativas de oxigênio pode causar um déficit na cadeia respiratória mitocondrial, resultando em um declínio da produção de ATP e em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Bailey et al., 2005; Dimauro & Hirano, 2005; Petrosillo et al., 2008). Além disso, o dano oxidativo pode ser causa ou consequência da disfunção mitocondrial, uma vez que o sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial gera ERO (Barja & Herrero, 1998; Gassner et al., 1997; Sherer et al., 2003). A formação de ERO na mitocôndria é em grande parte explicada pelo desvio de elétrons do

X. brasiliensis e mitocôndria

complexo I diretamente para o oxigênio via ubiquinona, formando superóxido. Além disso, as ERO poderiam ser formadas pelo fluxo inverso de elétrons através complexo I (Batandier et al., 2006). Neste contexto, é tentador especular que a inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial pode contribuir, pelo menos em parte, para a patogênese da pneumoconiose.

Além disso, o tratamento com *X. brasiliensis* foi capaz de prevenir tal inibição. Apesar do exato mecanismo através do qual a *X. brasiliensis* previne a inibição do complexo I ainda ser desconhecido, evidências na literatura mostram que os compostos fenólicos possuem a capacidade de doar moléculas de hidrogênio devido à presença de grupos hidroxil em sua molécula, assim apresentam um papel protetor frente às ERO (Simões et al., 2003; Souza et al., 2007). Estas características desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Souza et al., 2007). Considerando que a avaliação farmacognóstica realizada neste trabalho confirma a presença de grupamentos fenólicos nas folhas da *X. Brasiliensis*, e que sua atividade antioxidante deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a sua estrutura química, sugere-se que a provável classe química responsável pela prevenção da inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial causada pela exposição ao pó de carvão esteja relacionada com a presença de compostos fenólicos, que podem atuar como sequestradores de radicais livres. Neste contexto, Adaramove e colaboradores (2011) demonstraram que a *Xylopia aethiopica*, também da família Annonaceae, pode aumentar o sistema de defesa antioxidante em fígado e rins de animais expostos à radiação. Resultados do efeito antioxidante, com a presença de compostos fenólicos, também foram apresentados em outras plantas, como *Tabebuia heptaphylla* (Vell.), *Toledo* (ipê-roxo) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae) (Budni et al., 2007; Souza et al., 2007).

Em conclusão, foi demonstrado que o pó de carvão inibe a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e o tratamento com a *X. brasiliensis* foi capaz de impedir esta inibição. Desta forma nosso estudo indica que a *X. brasiliensis* é uma planta promissora para o tratamento adjuvante da pneumoconiose causada pela exposição aguda ao carvão mineral.

REFERÊNCIAS

- Adaramove OA, Okiti OO, Farombi EO. Dried fruit extract from *Xylopiia aethiopica* (Annonaceae) protects Wistar albino rats from adverse effects of whole body radiation. *Exp Toxicol Pathol*. 2011; 63:635-43.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton AS, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995; 15:961-73.
- Bailey SM, Landar A, Darley-Usmar V. Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38:175–88.
- Barja G, Herrero A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr*. 1998; 30:235–43.
- Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve X. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr*. 2006; 38:33–42.
- Blackford JR JA, Jones W, Dey RD, Castranova V. Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. *J Toxicol Environ Health*. 1997; 51:203–18.
- Budni P, Petronilho FC, Citadini-Zanette V, Marcondes C, Zoch NA, Reginatto FH, Dal-Pizzol F. Estudos Preliminares da Atividade Antioxidante do Extrato Hidroetanólico de Folhas Jovens e Adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). *Lat. Am J Pharm*. 2007; 26:394-98.
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29:222-30.
- Calabrese V, Scapanini G, Giuffrida-Stella AM, Bates TE, Clark JB. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res*. 2000; 26:739–64.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 328:309-16.
- Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect*. 2000; 4:75-84.
- Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand*. 1998; 98:145-53.

Dimauro S, Hiano M. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15:276–86.

Donbak L, Rencuzogullari E, Yavuz A, Topaktas M. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat Res.* 2005; 588:82-7.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153:23-6.

Gassner B, Wuthrich A, Scholtysik G, Solioz M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 281:855–60.

Ghanem MM, Battelli LA, Mercer RR, Scabilloni JF, Kashon ML, MA JY, Nath J, Hubbs AF. Apoptosis and Bax expression are increased by coal dust in the polycyclic aromatic hydrocarbon–exposed lung. *Environ Health Perspect.* 2006; 114:1367-73.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology.* 2006; 141:312-22.

Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J.* 2001; 353:411-16.

Horn D, Barrientos A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB life.* 2008; 60:421-29.

Lago JHG, Moreira IC, Tanizaki TM, Moreno PRH. Mono and sesquiterpenes from the leaf essential oil of *Xylopiya brasiliensis* Spreng. (Annonaceae). *J Essent Oil Res.* 2003; 15:406-7.
Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-7.

Marques AS. Estudos etnobotânico de plantas medicinais utilizados no tratamento de doenças respiratórias na região carbonífera sul catarinense. [Trabalho de Conclusão de Curso]. [Criciúma]: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2007. 203 p.

Meijers JM, Swaen GM, Slagen JJ. Mortality of Dutch coal miners in relation to pneumoconiosis, chronic obstructive pulmonary disease, and lung function. *J Occup Environ Med.* 1997; 54:708–13.

Melo AC, Cota BB, Oliveira AB, Braga FC. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopiya* species. *Fitoterapia.* 2001; 72:40-5.

Moreira IC, Lago JHG, Young MCM, Roque NF. Antifungal Aromadendrane sesquiterpenoids from the Leaves of *Xylopiya brasiliensis*. *J Braz Chem Soc.* 2003; 14:828-31.

Moreira IC, Lago JHG, Roque NF. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopia brasiliensis* Spreng (Annonaceae). *Biochem System Ecol.* 2005; 33:948-51.

Petrosillo G, Matera M, Casanova G, Ruggiero FM, Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochem Int.* 2008; 53:126–31.

Pinho RA, Bonatto F, Andrades M, Frota ML JR, Ritter C, Klamt F, Dal-Pizzol F, Uldrich-Kulczynski JM, Moreira JC. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ Res.* 2004; 96:290-97.

Pinho RA, Silveira PC, Silva LA, Streck EL, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res.* 2005; 99:355-60.

Remzi A, Armutcu F, Kart L, Gurel A, Savranlar A, Özdermir H. Antioxidant response at early stages and low grades of simple coal worker's pneumoconiosis diagnosed by high resolution computed tomography. *Intern J Hyg Environ Health.* 2004; 207:455-62.

Rom WN, Rennard SI, Cantin A, Crystal RG. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136:1429-34.

Rustin P, Cheretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994; 228:35-51.

Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GGK, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Resp Crit Care Med.* 2002; 165:1610–17.

Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol.* 2003; 179:9–16.

Simões CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5. ed. Porto Alegre: Rev Ampl; 2003. p. 1102.

Souza TM, Severil JA, Silva VYA, Santos E, Pietro RCLR. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007; 28:221-26.

Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary Inflammation by ambient particulates. *Free Radical Biol Med.* 2003; 35:327-340.

Vallyathan V, Goins M, Lapp LN, Pack D, Leonard S, Shi X, Castranova V. Associated with Radiographic Classification in Coal Miners. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:958-65.