

Universidade de Ribeirão Preto

UNAERP

Mestrado em Biotecnologia

CAMILA CARLA GUIMARÃES

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
NEUROPROTETORA DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Serjania erecta* RADLK SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDO EM LINHAGEM CELULAR PC12

Ribeirão Preto-SP

2012

Camila Carla Guimarães

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
NEUROPROTETORA DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DO
EXTRATO METANÓLICO DE *Serjania erecta* RADLK SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO EM LINHAGEM CELULAR
PC12

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto
para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia
aplicada à saúde

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira

Co-orientadora: Prof^a Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

Ribeirão Preto – SP

2012

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Guimarães, Camila Carla, 1988 -.
G963a Avaliação das propriedades antioxidantes e neuroprotetora
de flavonoides do extrato metanólico de *Serjania erecta* RADLK
sobre o estresse oxidativo induzido em linhagem celular PC12 /
Camila Carla Guimarães. - Ribeirão Preto, 2012.
75f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Flavonóides. 3. *Serjania erecta*. I. Título.

*Dedico aos meus pais Sueli e Luiz,
por todo amor, incentivo e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

- *Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de me aventurar sobre o caminho fascinante da pesquisa científica.*
- *Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Sérgio, pela confiança no meu trabalho, paciência e exigência que sempre me fizeram amadurecer pessoalmente e profissionalmente.*
- *À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia, pela ajuda e disponibilidade nos momentos mais difíceis.*
- *Ao Prof. Dr. Mozart, pela paciência e ajuda das mais diversas formas no decorrer da realização deste trabalho.*
- *A todos os professores e a toda equipe do departamento da Biotecnologia de Plantas Medicinais que direta ou indiretamente contribuíram não só para a realização deste projeto, mas também para meu crescimento pessoal e profissional.*
- *Aos meus pais, a grande força motivadora nas horas mais difíceis, a minha imensa gratidão por entenderem meu sonho, por me ajudarem a vivê-lo, por nunca me deixarem esquecer o que realmente importa nesta vida, e por suportarem a minha ausência nas mais diversas situações.*
- *A toda minha família pela torcida. Em especial ao meu avô, que logo pode não lembrar-se mais de mim, mas certamente eu nunca esquecerei os momentos compartilhados, o apoio e preocupação referentes aos meus estudos e a minha vida. O senhor foi a força invisível que surgiu da forma mais inesperado para que eu nunca desistisse, e para que eu mantivesse a esperança de que um dia a luta contra o Alzheimer possa ser vencido.*
- *Ao meu namorado, Luis Fernando, pelo bom humor que tornou os dias mais turbulentos em calma. Nada do que eu diga será o suficiente para agradecê-lo pela paciência, cumplicidade e compreensão diante das inúmeras vezes que precisei me ausentar. Obrigada pelo carinho, pelo amor incondicional e por acreditar em mim nos momentos que eu mesmo duvidei.*

- À minha prima Vanessa pelo apoio e incentivo, por se manter sempre presente mesmo com a distância.

- As amigas Tamires e Denise que dividiram comigo não só um local para morar, mas também o conhecimento, dedicação e amor pela profissão que escolhemos. Obrigada por fazerem do nosso apartamento um lar, por estarem presentes em todos os momentos e por torcerem por mim nesta conquista.

- À Camila Hernandez, por se tornar uma amiga tão próxima e querida, pelo profissionalismo e paciência diante minhas inúmeras dívidas, pela ajuda e torcida.

- À Juliana Coppede, pela amizade, disponibilidade, incentivo e torcida. Por ser uma pessoa iluminada e sempre estar por perto com as palavras certas.

- À Sarazete, excelente profissional, agradeço não só pela indispensável ajuda na parte fitoquímica do trabalho, mas também por se tornar uma grande amiga, pelos momentos de descontração tão necessários, pela preocupação e por acreditar no meu potencial.

- À Elaine, pela amizade construída, e principalmente por compartilhar comigo seu conhecimento e amor a esta profissão.

- A todos os alunos da fitoquímica (Maicon, Dani, Jana, Tauany, Lucas, Laís, Jean e a todos que passaram por aquele setor), os quais tornaram meus dias mais felizes. Obrigada pela amizade, pelos cafés da tarde, pelas risadas e por sermos um grupo tão unido. Obrigada pela oportunidade de passar a maior parte da realização deste trabalho ao lado de vocês, espero que essa união e laço que criamos não sejam desfeitos jamais.

- Aos outros amigos que convivi e que da mesma forma se tornaram indispensáveis durante esta caminhada: Bruna Cestari, Giovana e Gabriel, obrigado pela companhia e amizade.

- Ao CNPq e a FAPESP pela bolsa e apoio financeiro concedidos.

*Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz
que realmente importa.
(Madre Teresa de Calcutá)*

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	acetato de etila
BAW	butanol:ácido acético:água
Aβ	beta-amilóide
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DA	doença de Alzheimer
DAD	<i>diode array detector</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhanced Polarization Transfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modificado Eagle's</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	Food and Drug Administration
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDH	Lactato desidrogenase
MeOH	Metanol
mL	mililitro
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- difeniltetrazólio

NO	óxido nítrico
NP/PEG	<i>Difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol</i>
PC12	Células de feocromocitoma 12
PPA	Proteína precursora da amilóide
RL	Radicais livres
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema nervoso central
UV/Vis	Ultra violeta/visível
μM	micromolar
μg	micrograma
μL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clivagem da proteína precursora da amilóide. Via amiloidogénica e não amiloidogénica	16
Figura 2. <i>Serjania erecta</i>	24
Figura 3. Fluxograma das etapas do processo de extração e purificação dos flavonoides presentes no extrato metanólico de <i>Serjania erecta</i>	35
Figura 4. Reação enzimática da conversão reversível do piruvato a lactato pela enzima lactato desidrogenase na presença de NADH.....	39
Figura 5. Cromatograma e espectro UV/visível das substâncias padrões isovitexina e vitexina.....	41
Figura 6. Cromatograma e espectros UV/visível das substâncias presentes no extrato MeOH de <i>Serjania erecta</i>	42
Figura 7. Estruturas química dos flavonoides purificados do extrato MeOH de <i>Serjania erecta</i>	43
Figura 8. Efeito citotóxico das diferentes concentrações de A β ₂₅₋₃₅	45
Figura 9. Efeito protetor do flavonóide quercetrina frente a citotoxicidade induzida por A β ₂₅₋₃₅	46
Figura 10. Efeito protetor do flavonóide isovitexina frente a citotoxicidade induzida por A β ₂₅₋₃₅	47
Figura 11. Efeito protetor do flavonóide vitexina frente a citotoxicidade induzida por A β ₂₅₋₃₅	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito protetor da vitexina sob os danos causados na membrana pelo $A\beta_{25-35}$50

Tabela 2. Efeito protetor da vitexina sob a produção de NO causada pelo $A\beta_{25-35}$ 51

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa que apresenta como uma das suas principais características o acúmulo de um peptídeo com propriedades tóxicas para os neurônios, chamado beta amiloide ($A\beta$). Embora o mecanismo de neurotoxicidade apresentado por este peptídeo não esteja completamente elucidado, vários estudos *in vivo* utilizando animais modelos de Alzheimer e estudos *in vitro* utilizando células PC12, têm demonstrado que o $A\beta$ eficientemente produz espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), as quais podem iniciar processos que culminam na morte das células neuronais, refletindo nos diversos sintomas apresentados por pacientes com Alzheimer. Atualmente, o tratamento mais indicado para a DA objetiva a recuperação dos déficits colinérgicos, no entanto os resultados obtidos não são positivos para todos os pacientes. Por esta razão, recentemente, há um grande interesse na busca por novos agentes terapêuticos que possam exercer um efeito protetor na prevenção dos danos neuronais associados a esta doença. Deste modo, este estudo objetivou avaliar o efeito neuroprotetor e antioxidante dos flavonoides presentes no extrato metanólico da planta *Serjania erecta* sob a toxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta$, fragmento 25-35 ($A\beta_{25-35}$) nas células PC12. Os flavonoides presentes nas folhas desta planta foram isolados por técnicas cromatográficas, e identificados como quercetrina, vitexina e isovitexina. A atividade protetora destes compostos frente a toxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta_{25-35}$ foi avaliada através do ensaio de viabilidade celular (MTT). Como resultado, os três flavonoides isolados mostraram atividade protetora. O mais eficaz foi a vitexina, o qual exibiu atividade significativa na concentração mais baixa (25 $\mu\text{g} / \text{mL}$). A quercetrina na mesma concentração demonstrou atividade protetora, no entanto inferior à apresentada pela vitexina. Já a isovitexina apresentou atividade significativa apenas na maior concentração testada (200 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Por apresentar o melhor resultado, a vitexina foi ensaiada a fim de verificar a sua proteção frente aos danos da membrana celular induzido pela presença do peptídeo $A\beta_{25-35}$, através do ensaio de LDH. Do mesmo modo, foi quantificado o aumento na produção de NO^- , causado pela ação do mesmo peptídeo, e a possibilidade de vitexina atenuar este processo. Deste modo, a eficácia desta substância na proteção dos danos na membrana celular e na capacidade em diminuir a concentração de óxido nítrico foi validada. Como conclusão os flavonoides purificados de *S. erecta* apresentam atividade protetora e antioxidante, em especial a vitexina a qual apresentou atividade significativa, mesmo na menor concentração testada.

Palavras chaves: neuroproteção, peptídeo $A\beta$, flavonoides, *Serjania erecta*

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that presents as one of its main features the accumulation of a peptide with toxic to neurons, called amyloid beta ($A\beta$). Although the mechanism of neurotoxicity presented by this peptide is not fully elucidated, several *in vivo* studies using Alzheimer's animal models and *in vitro* studies using neuronal PC12 cells have shown that $A\beta$ peptide efficiently produces reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS), which can initiate processes that culminate in death of neuronal cells, reflecting the different symptoms presented by Alzheimer's patients. Nowadays, the most commonly indicated treatment for AD aims the recovery of the cholinergic deficits, but obtained results have not been positive for all patients. For this reason, recently, there has been an extensive interest in the search for new therapeutic agents that provide a protective effect for preventing neuronal damages associated with this disease. Thus this study aimed to evaluate the neuroprotective and antioxidant effects of the flavonoids isolated from methanolic extract of *Serjania erecta* under toxicity induced by $A\beta$ peptide fragment 25-35 ($A\beta_{25-35}$) in PC12 cells. The flavonoids were isolated by chromatographic techniques and identified as quercetrin, vitexin and isovitexin. The flavonoids were isolated by chromatographic techniques including column chromatography, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. The protective activity of isolated flavonoids against toxicity induced by peptide $A\beta_{25-35}$ was evaluated using the cell viability assay (MTT). As a result, the three flavonoids isolated showed protective activity. The most effective was the vitexin, which exhibited significant activity at the lowest concentration (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The quercetrin at the same concentration showed protective activity, however inferior to that presented by vitexin. Already isovitexin showed significant activity only at the highest concentration tested (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). By presenting the best result, vitexin was tested to verify its protection against damage to the cell membrane induced by the presence of $A\beta_{25-35}$ peptide, using the LDH assay. Similarly, it was quantified the increase in production of NO-, caused by the action of the same peptide, and the possibility of vitexin mitigate this process. Thus, the efficacy of this substance in the protection of cell membrane damage and the ability to reduce the concentration of nitric oxide has been validated. In conclusion *S. erecta* purified flavonoids show protective and antioxidant activity, especially vitexin which showed significant activity, even at the lowest concentration tested.

Keywords: neuroprotection, $A\beta$ peptide, flavonoids, *Serjania erecta*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos	I
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	IV
Resumo	V
Abstract	VI
I-INTRODUÇÃO	10
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. A doença de Alzheimer	12
2.1.1 Hipótese dos emaranhados neurofibrilares	13
2.1.2 Hipótese da cascata amilóide	14
2.2. Fatores de risco e causas da doença de Alzheimer	18
2.3. Diagnóstico da doença de Alzheimer	19
2.4. Tratamento da doença de Alzheimer	20
2.5. Importância plantas medicinais na busca de novos fármacos	21
2.6. Plantas medicinais como fonte de compostos ativos relacionados ao SNC	22
2.6.1 Plantas adaptógenas.....	23
2.6.2 <i>Serjania erecta</i> Radlk	24
2.7. Flavonoides	25
2.8. Modelos de estudos sobre doença de Alzheimer e o fragmento Aβ₂₅₋₃₅	27
III – JUSTIFICATIVA	28
IV – HIPÓTESE	29
V – OBJETIVOS	30
5.1 Objetivos Gerais	30
5.2 Objetivos Específicos	30
VI – MATERIAIS E MÉTODOS	31

6.1. Materiais e preparo das soluções	31
6.1.1 Reagentes.....	31
6.1.2 Preparo das soluções para análises cromatográficas	31
6.1.2.1 BAW	31
6.1.2.2 NP/PEG	31
6.1.3 Preparo das soluções para ensaios com as células.....	32
6.1.3.1 Meio de cultura DMEM	32
6.1.3.4 Solução Hanks	32
6.1.3.5 Solução Tripsina	32
6.1.3.6 Preparo A β ₂₅₋₃₅	32
6.1.3.7 Solução HCL (1N)	33
6.2. Condições cromatográficas	33
6.3. Extração e purificação dos flavonoides presentes no extrato metanólico de <i>Serjania erecta</i>	33
6.3.1 Coleta e preparação do material.....	33
6.3.2 Fracionamento do extrato metanólico de <i>Serjania erecta</i>	34
6.3.2.1 Fração 3	34
6.3.2.2 Fração 4.....	35
6.3.3 Purificação dos flavonoides.....	35
6.4. Cultura celular	36
6.4.1 Padronização do cultivo celular e criação de um banco de células PC12..	36
6.5. Ensaio viabilidade celular	36
6.5.1 Determinação da concentração do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ adequada para indução de toxicidade às células PC12	37
6.5.2 Tratamento	37
6.5.3 Determinação do efeito protetor do flavonóide quercetrina, isovitexina e vitexina na viabilidade celular frente a toxicidade induzida pelo A β ₂₅₋₃₅ em células PC12.....	38
6.6. Ensaio Lactato Desidrogenase	38
6.7. Ensaio da determinação do óxido nítrico	39
6.8. Análise Estatística	40
VII RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
7.1. Purificação dos flavonoides de <i>Serjania erecta</i>	41
7.2. Análise da viabilidade celular frente a toxicidade induzida por diferentes concentrações de Aβ₂₅₋₃₅	44

7.3. Efeito protetor dos flavonoides quercetrina, isovitexina e vitexina frente ao estresse oxidativo induzido por Aβ₂₅₋₃₅	46
7.4. Ensaio LDH	49
7.5. Ensaio NO	51
VIII – CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

I. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa, fortemente relacionada ao envelhecimento e a principal causa de demência em todo mundo. Os fatores que implicam no seu surgimento ainda não foram totalmente elucidados, no entanto, a hipótese mais aceita indica que o processamento errado da proteína precursora da amilóide (PPA) possa ser o fator inicial da degeneração neuronal observada, uma vez que o erro no processamento desta proteína leva a geração e ao acúmulo do beta-amilóide ($A\beta$), um peptídeo com propriedades tóxicas para os neurônios.

Dados na literatura comprovam que a neurotoxicidade apresentada por este peptídeo, é mediado principalmente pela geração de espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio. A presença destas espécies favorece o surgimento de uma condição prejudicial ao sistema nervoso central, conhecida como estresse oxidativo/nitrosativo. A ligação entre esta condição e a neurodegeneração encontrada na DA comprova-se através de estudos e análises em tecidos cerebrais *post mortem* de pacientes com Alzheimer, os quais revelam níveis elevados de dano oxidativo/nitrosativo a proteínas, lipídios e DNA. Estes danos levam a morte das células neuronais, a principal característica observada nesta doença.

Além do estresse oxidativo outras alterações encontradas em cérebros de pacientes com Alzheimer são inflamação, desregulação de cálcio, disfunção mitocondrial e neuroquímica. No entanto, as maiores marcas patológicas desta demência incluem a formação de emaranhados neurofibrilares, deposição extracelular do peptídeo $A\beta$ e extensiva perda neuronal, os quais levam ao aparecimento de diversos sintomas como déficits colinérgicos, extensiva perda de memória e alterações psíquicas graves.

Atualmente, o tratamento mais empregado contra os sintomas da DA objetiva principalmente a melhora do déficit colinérgico, no entanto os resultados obtidos não se apresentem de forma positiva para todos os pacientes. Deste modo, nos últimos anos, o grande interesse tem sido na busca por novas terapias que possam retardar a progressão da doença, exercendo um efeito protetor, impedindo os danos causados pelo peptídeo $A\beta$ aos neurônios. Uma classe de plantas conhecida como adaptógenas têm se mostrado um alvo terapêutico promissor, uma vez que estes vegetais são espécies com potencial capacidade de normalizar as funções do corpo e reforçar sistemas comprometidos por diferentes agentes estressores, apresentando substâncias com pronunciada atividade protetora sobre a saúde.

Neste contexto, a planta *Serjania erecta* Radlk, popularmente conhecida como cipó-cinco-folhas surge como alvo de estudo por pertencer a classe das adaptógenas e por apresentar dentre os seus metabólicos secundários substâncias da classe dos flavonoides, compostos com notória atividade antioxidante e protetora. Estudos anteriores realizados com *S. erecta* demonstraram que esta espécie é fonte promissora de compostos com atividade terapêutica relacionada ao sistema nervoso central, como estimulantes de memória e ação antioxidante.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é definida como uma desordem neurodegenerativa, fortemente relacionada com a perda progressiva de sinapses e neurônios, o que leva o indivíduo a apresentar um grande comprometimento cognitivo (XIAONING, 2010; SERENIKI e VITAL, 2008).

Ela foi primeiramente descrita pelo alemão Alois Alzheimer no ano de 1906, com base em observações feitas no cérebro de uma paciente de 51 anos, vítima de uma doença mental até então incomum. Dentre os sintomas apresentados por esta paciente, destacava-se a extensiva e progressiva perda de memória, a qual foi posteriormente compreendida através dos resultados de estudos *post mortem* que revelaram danos em áreas do cérebro principalmente ligadas a memória e aprendizagem (GOEDERT, 2006; SWERDLOW, 2007).

Atualmente, a DA é o tipo mais comum de demência, predominando em 60 a 80% dos casos, e o seu surgimento está fortemente relacionada com o envelhecimento (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010; HENRIQUES, 2003). Dentre os primeiros sintomas desta desordem estão a perda gradativa da memória, alterações comportamentais e de outras funções cognitivas. Na fase intermediária, a principal característica é a dificuldade no processamento de novas informações (REBELATTO e MORELLI, 2004). Com o decorrer e consequente agravamento da doença o indivíduo fica incapaz de desempenhar atividades antes consideradas simples como alimentar-se, vestir-se e reconhecer pessoas conhecidas. Na fase avançada, observam-se alterações psíquicas e comportamentais como psicose, agressividade e depressão (RASKIND, 1995; KAUFFMAN, 2001; PORTH, 2002; REBELATTO e MORELLI, 2004).

A prevalência de indivíduos com Alzheimer a nível mundial tem crescido drasticamente com o aumento da expectativa de vida. No Brasil, segundo o IBGE, 7% da população de idosos nacionais vivem com Alzheimer, o que significa aproximadamente um milhão de brasileiros afetados por esta doença (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER, 2009). Estimativas mundiais, as quais fazem parte de um estudo realizado a cada quatro anos com o principal objetivo de fazer da doença de Alzheimer uma prioridade a nível global, apontam que em 2010, 35 milhões de pessoas estariam convivendo com esta demência, e que esse número poderia aumentar surpreendentemente a cada 20 anos, chegando

a 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050 (FREITAS et al, 2008; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER, 2009; ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2010).

Levando em consideração que um paciente com Alzheimer perde, em média, 11 anos de vida saudável, devido ao alto índice de invalidez e mortalidade prematura, em termos econômicos, os dados que demonstram o prejuízo gerado por esta doença são tão alarmantes quanto os de sua prevalência (FREITAS et al, 2008; ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2010; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER, 2009). Os gastos anuais com um idoso portador de Alzheimer podem chegar a US\$ 33 mil por paciente, comparado com US\$ 10,6 mil de cada idoso sem a doença. A nível mundial, o custo com esta demência chega a US\$ 315 bilhões por ano (FREITAS et al, 2008; ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2010; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER, 2009).

Embora tenha se passado mais de um século da sua primeira descrição, os fatores que implicam no surgimento dos sinais clínicos do Alzheimer não se encontram completamente elucidados. Uma grande gama de anormalidades metabólicas tem sido observada em cérebros de pacientes com Alzheimer como estresse oxidativo, desregulação de cálcio, inflamação, disfunção mitocondrial e neuroquímica. No entanto, as maiores marcas patológicas deste tipo de demência incluem formação de emaranhados neurofibrilares, deposição extracelular do peptídeo A β e extensiva perda neuronal, em áreas do cérebro principalmente ligadas a memória e aprendizagem (JI e HA, 2010; XIAONING, 2010; RODRÍGUEZ, 2010, BALLARD et al, 2011; BONDA, 2011; GOEDERT e SPILLANTINI, 2006). Embora tais alterações possam ser encontradas em cérebros de idosos saudáveis, elas não ocorrem conjuntamente e em tal intensidade (SMITH, 1999).

Dentre as principais hipóteses que objetivam explicar o surgimento da DA estão a formação dos emaranhados neurofibrilares e o evento da cascata amilóide.

2.1.1 Hipótese dos emaranhados neurofibrilares

Emaranhados neurofibrilares são estruturas anormais, encontradas dentro das células nervosas, compostas principalmente por agregados de uma proteína denominada tau (SUH e CHECLER, 2002). Esta proteína quando associada aos microtúbulos desempenha funções importantes na sua montagem e estabilização; os microtúbulos por sua vez, são partes

fundamentais da estrutura interna dos neurônios e ajudam no transporte de nutrientes e outras moléculas como os neurotransmissores. Em situações não patológicas a tau aparece ligada a um certo número de grupamentos fosfatos, no caso de pacientes com Alzheimer, ela se apresenta hiperfosforilada, ou seja, com um número de grupamentos excessivos unidos a ela, impedindo sua ligação aos microtúbulos. Em função deste conseqüente desligamento, inicia-se a formação de uma compacta rede filamentosa, composta pelo agrupamento desta proteína, culminando na montagem da estrutura denominada emaranhados neurofibrilares (RODGERS, 2008; MACCIONI, MUÑOZ e LUIS, 2001; NASSIF, 2006). Nesta condição, os microtúbulos se desintegram, ocasionando um colapso na rede interna de transporte e comunicação entre os neurônios, levando-os a morte.

Embora a hipótese dos emaranhados neurofibrilares seja ainda hoje muito defendida, a sua presença parece na verdade ser um evento secundário na patogenia da DA, já que a disfunção da proteína tau e a formação de emaranhados neurofibrilares estão presentes em outras enfermidades do SNC conhecidas como taupatias, e não aparecem em conjunto com placas A β característica fundamental para o diagnóstico *post mortem* da DA (SUH e CHECLER, 2002; SERENIKII e VITAL, 2003; MACCIONI, MUÑOZ e LUIS, 2001; HUMPEL, 2011; DEMARIN et al, 2011).

De fato, alguns estudos apontam que a formação dos emaranhados neurofibrilares é um evento posterior a presença das placas amiloides, uma vez que o acúmulo do peptídeo A β e a formação das placas favorecem a fosforilação da proteína tau e conseqüentemente a geração de emaranhados neurofibrilares, podendo aumentar a sua concentração em até cinco vezes (FERRARI et al, 2003; SUH e CHECLER, 2002).

Apesar destes dados não excluírem a possibilidade de outros fatores também induzirem a formação de emaranhados neurofibrilares no cérebro, há grandes indícios de que a deposição do A β pelo menos acentua e agrava este processo (SUH e CHECLER, 2002; FERRARI et al, 2003).

2.1.2 Hipótese da cascata amilóide

A hipótese da cascata amilóide é certamente a mais aceita quando se objetiva explicar o início do Alzheimer (RODRÍGUEZ et al, 2010; LEE et al, 2011; SERENIKI e VITAL, 2008; FORLENZA, 2005).

Os defensores desta hipótese apontam que a desordem observada nesta doença inicia-se a partir do processamento errado da proteína precursora da amilóide (PPA) resultando no acúmulo, agregação e toxicidade do peptídeo A β . Dentre as evidências que comprovam esta hipótese estão: (i) a ligação entre os genes raros que praticamente garantem que um indivíduo vai desenvolver Alzheimer e o fato destes genes aumentarem a produção ou o acúmulo do peptídeo A β ; (ii) e os estudos realizados com modelos animais mutados para apresentar genes humanos associadas ao Alzheimer que como resultado, além de apresentarem a doença, desenvolveram as placas amilóides e dificuldades relacionadas a memória (SUH e CHECLER, 2002, ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2008; GOEDERT, 2006). A PPA é uma proteína associada a membrana e sua real função ainda não é conhecida. Esta proteína é clivada em pequenos fragmentos e dependendo de qual enzima está envolvida e o local onde a clivagem ocorre, o processamento da PPA pode seguir por duas vias distintas: não amiloidogénica e amiloidogénica, sendo esta última via a responsável pela produção do peptídeo A β (TILLEMENT, LECANU, PAPADOPOULOS, 2011; RODGERS, 2008; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2008).

Na via não amiloidogénica, α -secretases clivam a molécula da PPA em um local o qual elimina a possibilidade produção do peptídeo A β e conseqüentemente a formação de placas. Esta clivagem libera do neurônio um fragmento chamado sAPP α , o qual tem propriedades benéficas, como promover o crescimento e sobrevivência neuronal. Na via amiloidogénica, β -secretases clivam a molécula da PPA em uma extremidade do peptídeo, liberando o fragmento sAPP β da célula. Em seguida, γ -secretases clivam o fragmento resultante liberando o peptídeo A β .

Normalmente, este peptídeo é transportado pela barreira hematoencefálica. Em cérebros de pacientes com Alzheimer, a liberação destes fragmentos através do seu receptor é perturbada resultando no acúmulo e agregação do peptídeo A β (Figura 1). Vários fragmentos do peptídeo A β se juntam, ocorrendo a formação de oligômeros que ao se agruparem formam as estruturas denominadas fibras. Eventualmente, outras proteínas e restos de materiais celulares são aderidas a este complexo, tornando-se insolúveis, formando finalmente o que conhecemos como placas amilóides (RODGERS, 2008; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2008; TILLEMENT, LECANU, PAPADOPOULOS, 2011; MIRANDA et al, 2000; SWERDLOW, 2007).

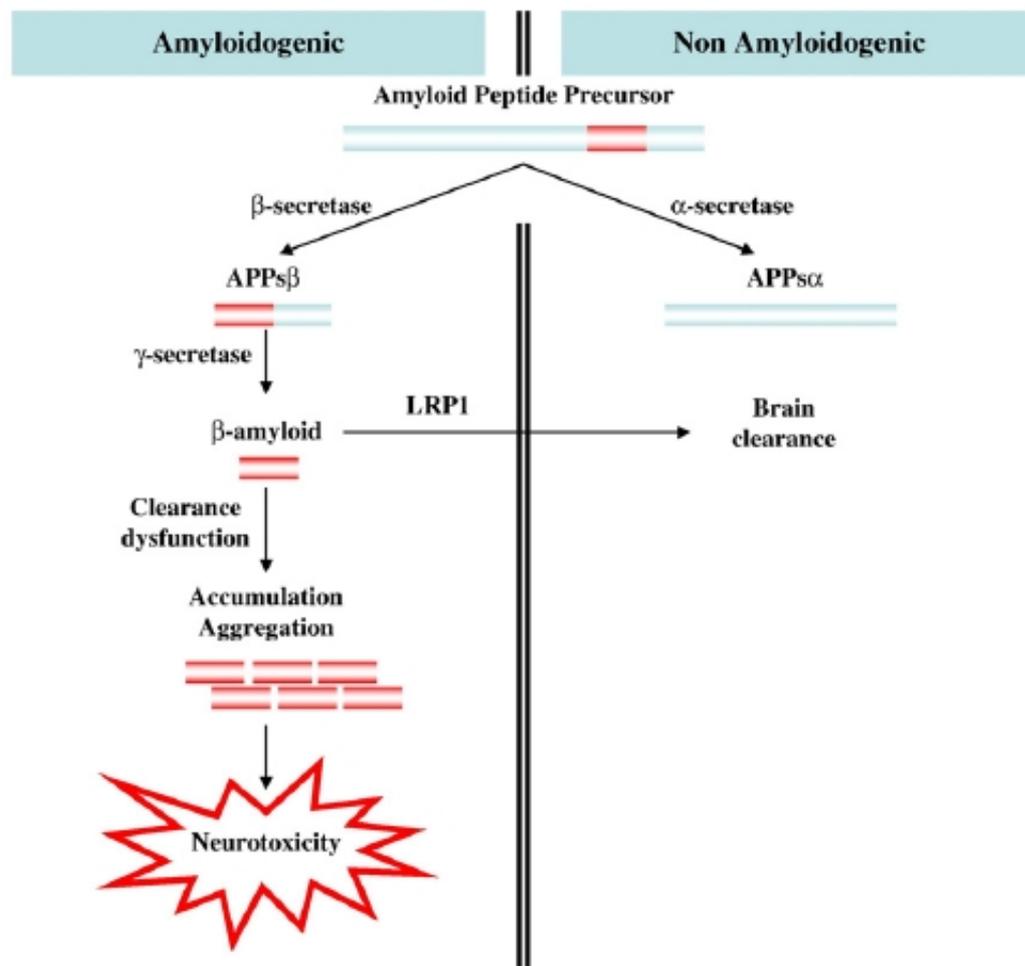


Figura 1. Clivagem da proteína precursora da amilóide. Via amiloidogénica e não amiloidogénica (TILLEMENT et al, 2011)

A presença do peptídeo A β por si já é prejudicial, podendo induzir processo de apoptose às células neuronais e ao contrário do que se imaginava sua toxicidade se inicia antes mesmo da sua formação fibrilar (KLEIN, 2002; TILLEMENT, LECANU, PAPADOPOULOS, 2011).

Diversos modelos experimentais demonstram inúmeros processos bioquímicos e moleculares modificados pelo peptídeo A β . Vários estudos deste tipo sugerem que a neurotoxicidade apresentada por este peptídeo, seja mediado pela geração de radicais livres (SUH e CHECLER, 2002; TILLEMENT, LECANU, PAPADOPOULOS, 2011; PAPPOLLA et al, 1988; BUTTERFIELD, 2006; LECANU, GREESON e PAPADOPOULOS, 2006; MONJI et al 2001; KIM et al, 2011; KIM et al, 2009; JIN et al, 2004; CHAUHAN e CHAUHAN, 2006).

Radical livre é qualquer espécie de existência independente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada externa. Eles desempenham funções importantes

em nosso organismo, no entanto são altamente instáveis e reativos, capazes de causar danos a várias biomoléculas e ocasionar morte celular. A classe de maior destaque destes radicais são aqueles derivados do oxigênio, comumente chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO), no entanto outra classe que vem ganhando destaque são os pertencente a espécies reativas de nitrogênio (ERN) como, por exemplo, o óxido nítrico (NO^\cdot) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; FINKEL e HOLBROOK, 2000; SPANEVELLO, 2009; AVERY, 2011; ISCHIROPOULOS e BECKMAN, 2003).

O NO^\cdot em excesso é considerado um mediador pró-inflamatório e modulador pró-apoptótico, através da ativação de caspases. Em combinação com ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot^-$) pode formar o radical peroxinitrito (ONOO^\cdot), um agente pró-oxidante altamente neurotóxico. O ONOO^\cdot por sua vez pode promover fragmentação oxidativa do DNA e peroxidação lipídica, contribuindo para o dano neuronal observado na DA (NASSIF, 2006; QUINN et al, 2001).

Embora o mecanismo da associação entre a presença do peptídeo $\text{A}\beta$ e a formação destes radicais livres não seja totalmente compreendida, trabalhos realizados *in vivo* com modelos animais de Alzheimer e *in vitro* em linhagens celulares PC 12 e Hela demonstram que a presença deste peptídeo eficientemente produz ERO, disfunção na homeostase do cálcio e indução da produção de óxido nítrico propiciando um ambiente altamente danoso as células nervosas. A presença destes componentes favorece o surgimento de uma condição prejudicial ao SNC, conhecida como estresse oxidativo/nitrosivo. Os locais no cérebro de pacientes com Alzheimer onde há aumento da deposição do peptídeo $\text{A}\beta$ estão associados a áreas onde ocorre extensiva perda neuronal e forte estresse oxidativo/nitrosivo (BUTTERFIELD, POCERNICH e CASTEGNA, 2001).

Além da própria geração de radicais livres, outro mecanismo que objetiva explicar a indução de estresse oxidativo através deste peptídeo, inclui o que indica que o $\text{A}\beta$ interage diretamente com enzimas responsáveis por manter níveis baixos destes radicais, propiciando a ocorrência de injúrias oxidativas, como a peroxidação lipídica, oxidação proteica, inativação enzimática e dano no DNA (BELKACEMI e RAMASSAMY, 2012; SUH e CHECLER, 2002; TILLEMENT, LECANU, PAPADOPOULOS, 2011; BUTTERFIELD 2006, LECANU, GREESON e PAPADOPOULOS, 2006; MONJI et al 2001; BOBBA et al, 2010; BUTTERFIELD, POCERNICH e CASTEGNA, 2001).

De fato, análises em tecidos *post mortem* revelam que os níveis de dano oxidativo a proteínas, lipídios e DNA são elevados nos cérebros de paciente com Alzheimer. Os danos a estas moléculas citadas ocasionam morte neuronal a principal característica observada nesta doença, confirmando assim, o papel crucial do estresse oxidativo no desenvolvimento da DA

(ISCHIROPOULOS e BECKMAN, 2003; POON et al, 2004; EMERIT, EDEAS e BRICAIRE, 2004; UTTARA et al, 2009; LEE et al, 2007; ISCHIROPOULOS e BECKMAN, 2003; CASSARINO e BENNETT, 1999; KRUMA et al, 1997).

2.2. Fatores de risco e causas da doença de Alzheimer

O maior fator de risco para doença de Alzheimer é a idade avançada (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2008; LOPEZ, 2011), no entanto os fatores genéticos vêm sendo amplamente estudados a fim de se conhecer melhor o surgimento desta desordem. Como resultado destes estudos constatou-se a existência de dois tipos de Alzheimer: de início precoce e tardio.

A doença de Alzheimer de início precoce, geralmente afeta pessoas com idades entre 30 a 60 anos. A maioria dos casos são hereditários e são chamados de DA familiar (DAF). Já o Alzheimer de início tardio é com certeza o tipo mais comum e ocorre em indivíduos com idade superior a 60 anos. Ambos os tipos da doença envolvem componentes genéticos (TILLEY, MORGAN, KALSHEKERS, 1988; RODGERS, 2008).

A DAF está relacionada com mutações em alguns genes presentes nos cromossomos 21, 14 e 1. Tais mutações exercem um papel na clivagem da PPA, sendo parte de um processo que gera formas nocivas das placas amilóides. Se apenas um destes genes apresentarem mutação, será quase inevitável que a pessoa desenvolva Alzheimer de início precoce. Se a mutação é hereditária, a criança quase certamente irá desenvolver DAF (RODGERS, 2008 e 2004; TILLEY, MORGAN, KALSHEKERS, 1988; SWERDLOW, 2007; SMITH, 1999).

A DA de início precoce só corresponde a cerca de 5% dos casos, 95% do total ocorrem com início tardio. Nestes segundo tipo de Alzheimer, a mutação ocorre em local distinto.

Embora mais de 30 possíveis marcadores genéticos já foram apontadas para a DA, apenas o alelo $\epsilon 4$ do gene ApoE, localizado no cromossomo 19 mostrou uma associação consistente com esta doença (SERENIKI e VITAL, 2008; ROCCHI et al, 2003).

Este gene produz uma proteína chamada apolipoproteína E. ApoE aparece em diferentes formas ou alelos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. A ApoE $\epsilon 2$ aparentemente promove alguma proteção. Se a doença de Alzheimer ocorrer em uma pessoa com este alelo, a doença irá se desenvolver mais tardiamente do que em alguém com a presença do ApoE ϵ , entretanto é raramente encontrada. ApoE $\epsilon 3$, é o alelo mais comum, acredita-se que ele não exerça nenhum papel na

doença, enquanto que a ApoE ϵ 4, ocorre em 40% das pessoas que desenvolvem Alzheimer tardio e está presente em cerca 25 a 30% da população. Indivíduos com DA são mais prováveis a terem ApoE ϵ 4 do que aqueles que não têm DA. No entanto um terço da população com Alzheimer não apresenta este alelo, o contrário também ocorre: herdar a ApoE ϵ 4 não significa que a pessoa irá definitivamente desenvolver Alzheimer.

Apesar desta variação, inúmeros estudos demonstram que o ApoE ϵ 4 aumenta o risco do desenvolvimento da DA, porém como isto ocorre ainda não está claro (TILLEY, MORGAN E KALSHEKER, 2012; MUNOZ e FELDMAN, 2000).

A principal hipótese do envolvimento do ApoE com a doença de Alzheimer é a formação de um complexo ApoE/A β já que a ApoE ϵ 4 liga-se fracamente ao peptídeo A β , quando comparado à ApoE ϵ 2 ou ϵ 3, reduzindo assim a capacidade de remoção do peptídeo A β e promovendo, dessa maneira, a acúmulo e a formação das placas amilóides (FROZZA, 2008). Alguns estudos têm demonstrado também que mutação neste gene pode afetar a formação dos emaranhados neurofibrilares (SERENIKI e VITAL, 2008; ROCHI et al, 2003).

Além dos fatores genéticos alguns outros pontos são levantados como fatores de riscos para doença de Alzheimer como a toxicidade a agentes infecciosos, ao alumínio, a radicais livres de oxigênio, traumatismo craniano, lesão cerebral traumática, comprometimento cognitivo leve e a presença de doenças como hipertensão e diabetes mellitus (LOPEZ, 2011; SMITH, 1999).

2.3. Diagnóstico da doença de Alzheimer

A DA só pode ser definitivamente diagnosticada com bases em estudo realizado em tecido cerebral *post mortem* (ROCHI, 2002).

Para um diagnóstico clínico provável da doença, uma avaliação neuropsicológica é necessária (BALLARD, 2011; HUMPEL, 2011; ROCCHI et al, 2003) e só após uma combinação de testes e eliminação de outras possíveis doenças, o diagnóstico pode ser feito. Entretanto, os testes realizados são eficientes na distinção de pacientes com Alzheimer daqueles que não tem nenhuma demência, quando há a necessidade de distinguir a DA de outros tipos de demência, esta especificidade decai (XIAONING, 2010; ROCCHI et al, 2003).

Novas metodologias como as avaliações por neuroimagens têm ganhado espaço na busca por diagnósticos mais precisos para esta demência. A tomografia computadorizada e a

ressonância magnética, por exemplo, são muito utilizadas e podem revelar mudanças na estrutura cerebral indicando o aparecimento da DA (SALLOWAY e CORREA, 2009).

Outra grande análise consiste na tomografia por emissão de pósitrons (PET) utilizando padrões de fluorodesoxiglicose. Este exame demonstra os padrões de metabolismo cerebral, os quais se encontram alterados em pacientes com a DA. No entanto este tipo de tomografia não pode ser realizada regularmente devido ao seu alto custo e baixa disponibilidade (SALLOWAY e CORREA, 2009).

Quanto ao diagnóstico molecular, a análise que investiga a presença e os níveis de produtos da PPA e Tau em fluídos cerebral e espinhal são os mais utilizados. Embora alguns avanços tenham sido alcançados no diagnóstico da DA, a sua complexidade torna complicada a elaboração de um diagnóstico preciso, que por consequência dificulta o desenvolvimento de terapias certas (SMALL et al, 1997; SALLOWAY e CORREA, 2009).

2.4. Tratamento da doença de Alzheimer

Terapias disponíveis atualmente anti-DA objetivam a melhora cognitiva dos sintomas comportamentais através principalmente da indicação do uso de anticolinesterásicos (NUNOMURA et al, 2006; FORLENZA, 2005).

Segundo ensaios clínicos realizado pela FDA, os benefícios alcançados com o uso destes fármacos são modestos. A maioria das terapias baseadas em anticolinesterásicos proporcionam alívios moderados, prognósticos ruins, e diversos efeitos colaterais, portanto o desenvolvimento de novas intervenções, que possam ter como alvo fundamental alterações precoces tem sido foco de recentes terapias anti-DA (NUNOMURA et al, 2006, GOEDERT et al, 2006).

As novas estratégias terapêuticas propostas objetivam estabilizar, interromper e até mesmo reverter a patogenicidade das placas amilóides, dentro outros mecanismos através da redução da sua toxicidade aos neurônios, justificando assim o emprego de substâncias neuroprotetoras no combate a DA. Dentre as substâncias que vêm sendo amplamente estudadas destacam-se os compostos antioxidantes por serem capazes de atuar no retardo da expansão dos danos neuronais, na melhora do potencial neurológico e na eliminação dos efeitos deletérios dos radicais livres causados pela presença do peptídeo A β (BOOTHBY e DOERING, 2005; SHERKI, MELAMED e OFFEN, 2003; MONJI, 2006; KIM et al, 2011; LIU et al, 2011).

Dentre os compostos antioxidantes extensivamente estudados destacam-se os de ocorrência natural, principalmente originados de plantas, uma vez que estas espécies vegetais apresentam uma gama de substâncias advindas do metabolismo secundário com as mais diversas atividades farmacológicas, muitas vezes mais eficazes que os medicamentos já disponíveis no mercado.

2.5. Importância das plantas medicinais na busca de novos fármacos

Desde os tempos mais remotos, a humanidade tem feito uso das plantas para os mais diversos fins, seja alimentício, medicinal ou como matéria prima na construção de ferramentas e abrigos. No contexto medicinal, até meados do século XX as plantas e seus derivados constituíam a base da terapêutica, no entanto com o desenvolvimento de pesquisas no campo da química, a utilização de plantas para fins medicinais em muitos locais foi substituída pelo uso de moléculas obtidas através de síntese química (FOGLIO et al, 2006).

Apesar desta mudança, 85% das práticas da medicina tradicional ainda hoje aplicadas envolve o uso de plantas medicinais (SEVERIANO et al, 2010), uma vez que diversas populações não tem acesso a medicina oficial, principalmente pela falta de condições financeiras (FOGLIO et al, 2006).

O conhecimento destas populações acerca das propriedades de algumas plantas tem chamado atenção dos meios científicos e acadêmicos gerando interesses na valorização destas plantas, no incentivo da sua utilização e principalmente no seu aproveitamento econômico.

No mercado mundial de medicamentos, estima-se que dos mais de 300 bilhões de dólares anuais gerados, cerca 40% deste montante seja proveniente (diretamente ou indiretamente) de fontes naturais, sendo 75% de origem vegetal (BRITO, 2010).

A crescente participação dos derivados de plantas medicinais no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, na identificação de moléculas candidata a serem novas drogas e no grande interesse atual voltado a estas espécies vegetais pode ser melhor compreendido graças a grande eficácia de algumas substâncias nelas encontradas, ainda hoje amplamente utilizadas na medicinal convencional como a morfina, ácido acetil salicílico, digoxina, emetina, vincristina, colchicina, forskolina, taxol e a artemisinina dentre outras (FOGLIO et al, 2006; CALIXTO, 2000; ABIFISA, 2004, ROUT et al, 2009).

Além disso, a diversidade de estruturas encontradas possibilita seu uso como molde na modificação e desenvolvimento de novos medicamentos semissintéticos ou sintéticos, uma

vez que identificadas, estas moléculas podem formar a base da indústria farmacêutica moderna (BALUNAS e KINGHORN, 2005; FOGLIO et al, 2006, MCCLATCHEY et al, 2009).

2.6. Plantas medicinais como fonte de compostos ativos relacionados ao SNC

Vários estudos descritos na literatura demonstram o emprego de plantas medicinais com relevante atividade no SNC. Dentre estes estudos destaca-se uma revisão feita por McClatchey et al (2009) onde pode ser encontrado a descrição de diversas moléculas oriundas de plantas com conhecida ação junto ao SNC.

Em se tratando especialmente da DA, numerosas plantas e seus constituintes são utilizados na medicina tradicional a fim de aliviar seus sintomas. Uma revisão realizada por HOWES et al (2003), demonstra o uso tradicional de várias plantas e seus compostos ativos no combate a DA e de outras desordens cognitivas. Isto porque estas plantas e seus respectivos compostos apresentam grande eficácia no tratamento cognitivo, anti-inflamatório, estrogênico e antioxidante.

Além desta, muitas outras revisões como de RODRIGUES E CARLINI (2004), GIORGETTI et al (2007), KUMAR (2006), HALPERN (2004), MCCURDY e SCULLY (2005) trazem informações acerca de plantas medicinais, enfatizando seus usos populares no sistema nervoso central e no combate aos sintomas da DA, bem como demonstrando comprovações científicas de suas propriedades medicinais. Dentre as plantas mais evidenciadas nestes estudos estão as pertencentes a classe das adaptógenas.

2.6.1 Plantas adaptógenas

Plantas adaptógenas são espécies vegetais com potencial capacidade de normalizar as funções do corpo e reforçar sistemas comprometidos pelo estresse. Tais plantas apresentam substâncias que exercem efeito protetor sobre a saúde contra uma ampla variedade de agressões ambientais e condições emocionais mantendo a homeostase interna (KELLY, 2001; BROGGINI et al, 2010; LIN, DE e KWAN, 2011).

A atividade das adaptógenas pode ser melhor entendida quando recordamos que o estresse é uma resposta de defesa do organismo contra fatores externos, o qual estimula a formação endógena de substâncias mensageiras tais como catecolaminas, prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico, que por sua vez, ativam outros fatores, os quais podem neutralizar o

estresse ou, inversamente, induzir ou facilitar doença. A este mecanismo deu-se o nome de "execução do estresse". O contrário desta condição protege todo o organismo do exaustivo prejudicial, sendo chamado de "desativação do estresse", mecanismo este que inclui a ativação de enzimas antioxidantes, tais como catalase, glutatona peroxidase, superóxido dismutase e interleucinas que regulam para baixo vários aspectos da resposta imune, certos corticosteróides e mediadores inflamatórios.

Sob condições de estresse, um organismo com a homeostase normal apresenta as atividades de execução e desativação do estresse em equilíbrio, no entanto quando isso não ocorre, a execução excessiva do mecanismo estresse aparece associado a diversas condições patológicas. Com este conceito estabelecido, entende-se que as adaptógenas podem ser definidas como agentes que reduzem a reação exagerada do sistema de defesa do organismo submetido a diversos tipos de estresse, ajudando a restaurar sua homeostase normal (PANOSSIAN, 2003).

Plantas adaptógenas, quando cronicamente utilizadas, são capazes de aumentar a capacidade de suportar agressões ambientais, proporcionando uma melhoria nas condições de saúde, através da melhoria das funções cognitivas (aprendizagem e memória) e da qualidade do sono (CARLINI, 2003). Algumas teorias sugerem que a atividade apresentada por esta classe de plantas ocorra devido a sua ação antioxidante e sequestradora de radicais livres. Embora esta hipótese possa ser precisa, tomá-la como verdadeira e única ainda é inadequada para explicar todos os efeitos propostos para estes vegetais (WINSTON, 2004; PANOSSIAN, 2003). Entretanto, a escolha de plantas adaptógenas é naturalmente a alternativa mais certa para busca de novos compostos que possam exercer considerável atividade antioxidante e capacidade protetora.

2.6.2 *Serjania erecta* Radlk

A família Sapindaceae, a qual pertence a planta *Serjania erecta* é amplamente distribuída nas regiões tropicais e muitas espécies são encontradas no Brasil (FERNANDES, et al, 2011). Esta família é composta por 136 gêneros e aproximadamente 2000 espécies, as quais são altamente apreciadas na medicina tradicional em várias partes do mundo (FERRUCI 2000; CHÁVEZ e DELGADO, 1994).

Estudos fitoquímicos realizados com as Sapindaceae têm demonstrado a presença de compostos das mais diferentes classes como isoprenóides, polifenóis, saponinas, triterpenos,

diterpenos, lectinas, compostos cianogênicos e aminoácidos, sendo suas sementes caracterizadas pela abundância em óleos (CHÁVEZ e DELGADO, 1994; LIMA et al, 2006).

A importância etnobotânica desta família ainda não foi devidamente demonstrada, principalmente por sua ampla distribuição territorial e pelos diversos usos atribuídos a ela (GUARIM NETO, SANTANA e SILVA 2000), entretanto, significativos efeitos farmacológicos especialmente no Sistema Nervoso Central têm sido relatados (DI STASI e LIMA, 2006). No Brasil, a família Sapindaceae é representada por cerca de 411 espécies, divididas em 25 gêneros sendo *Serjania* o de maior prevalência. Embora este gênero compreenda cerca de 226 espécies, há poucos dados acerca dos seus usos populares, e menos ainda a respeito das suas possíveis propriedades farmacológicas (CASTELO, 2009).

Dentre as espécies relatadas com uso popular estão: *Serjania acuminata* Radlk, *Serjania caracasana* (Jacq.) Willd, *Serjania curassavica* Radlk, *Serjania cuspidata* Camb, *Serjania fuscifolia* Radlk, *Serjania lethalis* A. St. Hil, *Serjania nodosa* Radlk, *Serjania noxia* St. Hil, *Serjania paucidentata* DC, *Serjania piscatoria* Radlk e *Serjania triquetra* Radlk (ARRUDA, 2008). As atividades biológicas encontradas nestas espécies foram analgésica, antibacteriana, antifúngica e moluscicida (DI STASI et al, 1988; EKABO et al, 1996; LIMA et al, 2006; GOMING et al, 2008).

A espécie em estudo *Serjania erecta* (Figura 2), comumente conhecida como cinco-folhas, cipó-cinco-folhas ou retrato-de-teiú é uma planta adaptógena, popularmente recomendada para tratamento de doenças inflamatórias e úlceras (GUARIM NETO, SANTANA e SILVA 2000).



Figura 2. *Serjania erecta* (arquivo pessoal)

Quimicamente, a análise do extrato hidroalcoólico desta planta detectou a presença de saponinas, flavonoides, triterpenóides, esteróides, taninos e catequinas. Dentre os poucos estudos com esta espécie, o realizado por GOMIG et. al (2008) demonstrou a atividade anti-inflamatória de extratos e frações, capazes de reduzir edemas em modelo animal através do uso tópico. Já o estudo realizado por ARRUDA et al (2009) descreveu atividade gastroprotetora e antioxidante dos extratos clorofórmico e metanólico.

A escolha desta planta para estudo baseou-se em sua possível atuação junto ao SNC, relacionada a sua propriedade antioxidante, e estimuladora da memória demonstradas através de dados obtidos nos estudos realizado por BROGGINI (2010) e MORAES (2008).

O estudo realizado por MORAES (2008) objetivou a prospecção de substâncias ativas de *Serjania erecta* Radlk como estimulantes da memória, atividade e inibição da acetilcolinesterase, encontrando a presença de saponinas, flavonoides, terpenos e taninos.

O estudo fitoquímico e farmacológico desta espécie realizado por BROGGINI, (2006 e 2010), demonstraram resultados positivos sobre a atividade antioxidante *in vitro* e também a aquisição e evocação da memória em roedores jovens e adultos com tratamento subcrônico do extrato bruto (via oral), tratamento agudo da fração semipurificada (via intracerebroventricular) e antagonista reversível colinérgico. Neste estudo a análise fitoquímica demonstrou a presença de taninos, flavonoides e saponinas (BROGGINI, 2006 e 2010).

2.7. Flavonoides

Em meio as diversas substâncias presentes nos vegetais com relevante atividade antioxidante e neuroprotetora encontram-se os compostos polifenólicos (POSSAMAI, 2005). Segundo HALIWELL e GUTTERIDGE (2007) a presença de polifenóis na dieta é de extrema importância uma vez são capazes de diminuir absorção excessiva de metais e proteger o organismo quanto aos danos oxidativos por eles associados.

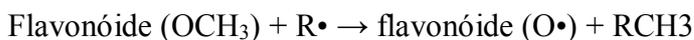
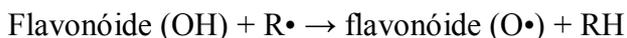
Dentre os polifenóis, o maior destaque pela ação neuroprotetora e antioxidante é atribuído aos flavonoides, uma classe de metabólitos secundários de abordagem promissora na prevenção e retardo do envelhecimento e do surgimento de doenças neurológicas de acordo com resultados obtidos em vários ensaios realizados *in vivo* e *in vitro* (SCHMITT-SCHILLIG et al, 2005; LEE et al, 2003).

A palavra flavonóide deriva do latim *flavus*, que significa amarelo, no entanto encontramos alguns incolores podendo variar no seu espectro de coloração do verde ao azul (PETERSONE e DWYER, 1998). São substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal, atuam nas plantas na proteção contra radiações UV e patógenos; ajuda na polinização e dentre outras atividades fornece cores ou padrões específicos para flores (ANGELO e JORGE, 2006).

São compostos de baixo peso molecular, em sua maioria consistindo de 15 átomos de carbono. Sua estrutura química apresenta dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada uma destas classes (ANGELO e JORGE, 2006).

Além da pronunciada atividade antioxidante, os flavonoides apresentam amplo espectro de atividades como antiinflamatória, antiviral, antitumoral, protetora capilar, ação tônica-venosa entre outras (SIMÕES, 1999).

A reação que explica a ação antioxidante dos flavonoides (MACHADO et al, 2008; NIJVELDT et al, 2001) pode ser entendida de acordo com as equações:



Onde $\text{R}\cdot$ representa um radical livre e $\text{O}\cdot$ representa um radical livre de oxigênio.

Há evidências consideráveis de que estes compostos eficientemente conseguem atenuar o efeito deletério das ERO/ERN por possuírem grupamentos hidroxila altamente reativos os quais são oxidados, estabilizando estes radicais a moléculas menos reativa (SCHMITT-SCHILLIG, 2005). No entanto seu potencial nesta ação não deve ser só relacionado e dependente do sequestro de radicais livres. Os flavonoides podem atuar impedindo a formação de espécies reativas do oxigênio por meios distintos como a inibição do sistema enzimático responsável pela geração destes radicais; a quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais; e pela proteção e indução de enzimas antioxidantes (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007; SCHILLIG et al, 2005). Acredita-se que os flavonoides atuem também através da modulação de vias de sinalização celular, inibindo ou

estimulando ações de vias susceptíveis a afetar a função neuronal. Esta capacidade dos flavonoides em modular as funções neuronais e em prever doenças neurodegenerativas relacionadas a idade tem chamado atenção dos meios científicos, uma vez que o uso de extratos de plantas ricos destes compostos tem demonstrando resultados positivos na cognição através da proteção, melhora funcional, e estimulação da regeneração neuronal (VAUZOUR et al 2008).

Tais substâncias têm demonstrado grande capacidade protetora contra a toxicidade induzida pelo A β e têm sido amplamente avaliada em estudos *in vivo* e *in vitro* (ZEPEDA et al, 2005; PARIS et al, 2011; HAMAGUCHI et al, 2009; ZADEH, 2009; SCHILLIG et al, 2005).

2.8. Modelos de estudos sobre doença de Alzheimer e o fragmento A β ₂₅₋₃₅

A fim de elucidar os mecanismos de toxicidade apresentado pelo peptídeo A β e na busca por agentes terapêuticos mais eficientes no combate ao Alzheimer, diversos modelos de estudos desta doença têm sido propostos.

Dentre os modelos *in vitro* destaca-se a utilização de linhagens celulares neuronais expostas a fragmentos do A β como o A β ₂₅₋₃₅. Este fragmento (25-35), amplamente estudado, é considerada a região biologicamente ativa do peptídeo completo (1-42), apresenta a mesma toxicidade e exhibe níveis significativos de agregação molecular (IVERSEN, 1995; FROZZA et al, 2009).

Tratando-se das culturas celulares utilizadas como modelo para estudos relacionados à DA, as células PC12 vêm ganhando destaque no meio científico. Esta linhagem celular é derivada de um feocromocitoma (tumor da glândula adrenal) de rato, apresenta características funcionais e fenotípicas de células neuronais simpáticas e sensoriais, expressam uma grande variedade de receptores e canais iônicos, liberam dopamina, norepinefrina e catecolaminas. São bastante empregadas em estudos de neurobiologia e neuroquímica, ou como modelos neuronais para doenças neurodegenerativas (GREENE e TISCHLER, 1976; WESTERINK et al, 2002; AYKIN-BURNS e ERCAL, 2006; WESTERINK e EWING, 2008).

O uso desta linhagem associada a exposição ao peptídeo A β ₂₅₋₃₅ apresenta-se como uma ferramenta de estudo eficiente na busca por esclarecimentos de eventos que ocorrem em cérebros de portadores de Alzheimer bem como na procura de substâncias com potencial atividade terapêutica contra esta doença.

III. JUSTIFICATIVA

O aumento da expectativa de vida relacionada com a baixa taxa de fecundidade atual comparada a do passado faz com que tenhamos um grande número de idosos. Só no Brasil, por exemplo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) possui dados estatísticos de que entre 1950 e 2025 a população de idosos crescerá dezesseis vezes mais, o que fará com que o Brasil fique em sexto colocado mundial no que diz respeito a essa população. Tendo em vista esta perspectiva, o número de indivíduos com idade propícia para desenvolvimento de doenças neurodegenerativas é bastante significativa.

A DA é considerada a doença neurodegenerativa de maior prevalência entre os idosos. É causa de extrema preocupação em todo o mundo, e um dos problemas de saúde mais sérios em muitos países, inclusive nos desenvolvidos. Evidências demonstram que a produção e o acúmulo do peptídeo A β através da geração de estresse oxidativo têm papel central no desenvolvimento desta doença. Terapias que visam diminuir os danos causados por esta condição, através do uso de substâncias com atividade antioxidante e protetora surgem como um alvo terapêutico promissor. Como já se sabe as plantas possuem uma enorme quantidade de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais podem ser úteis para a síntese de um grande número de fármacos. Dentre estas substâncias, a classe dos flavonoides destaca-se pela conhecida atividade protetora e antioxidante.

Neste contexto, a planta *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae), surge como um alvo de estudo promissor, por ser uma planta pertencente ao grupo das adaptógenas (plantas amplamente utilizados para diversas desordens que acometem o sistema nervoso central), e por apresentar dentre os seus metabólitos secundários substâncias da classe dos flavonoides, compostos com reconhecida ação antioxidante e neuroprotetora.

Desta forma, este trabalho contribui para elucidação de flavonoides farmacologicamente ativos, presentes nas frações da planta *Serjania erecta* Radlk, que possam apresentar atividade antioxidante e neuroprotetora, fornecendo alternativas para terapias futuras contra a DA.

IV. HIPÓTESE

Os flavonoides isolados de *Serjania erecta* podem atenuar a toxicidade exercida pelo peptídeo beta amilóide em células PC12 através da diminuição da presença de NO⁻ e pela ação protetora à membrana celular.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito antioxidante e neuroprotetor de flavonoides isolados do extrato metanólico de *Serjania erecta* sob o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo A β ₂₅₋₃₅ em cultura de células linhagem PC12.

5.2. Objetivos dos específicos

- a) Fracionar o extrato metanólico de *Serjania erecta* e purificar flavonoides presentes
- b) Padronizar o cultivo da linhagem celular PC12
- c) Determinar a concentração do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ que deverá ser utilizada para induzir toxicidade nas células PC12 neste estudo
- d) Avaliar o efeito protetor das substâncias isoladas frente a toxicidade induzida pelo peptídeo A β ₂₅₋₃₅ nas células PC12
- e) Avaliar o mecanismo de ação envolvido na proteção da substância escolhida através da investigação do seu efeito sob a membrana celular e sob a produção de óxido nítrico.

VI. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Materiais e preparo das soluções

6.1.1 Reagentes

O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro bovino fetal (SBF), MTT, DMSO, peptídeo A β ₂₅₋₃₅, padrões de produtos naturais isovitexina e vitexina, kits de ensaios (LDH e Nitrito/Nitrato), Sephadex LH20 e tripsina obtida de pâncreas suíno foram adquiridos pela Sigma Aldrich®. Os solventes e reagentes como metanol, ácido clorídrico, n-butanol, ácido acético, álcool etílico 92 e 95%, NP, PEG, EDTA dissódico, HEPES, KCl e KH₂PO₄, NaHCO₃ e NaCl foram obtidos pela Synth®. As placas de sílica gel foram adquiridos através da Fluka® e o NaHPO₄ e Triton X-100 foram adquiridos pela VETEC®.

Os produtos naturais foram dissolvidos em DMSO a 0,4%.

6.1.2 Preparo das soluções para análises cromatográficas

6.1.2.1 BAW

O eluente BAW utilizado nas análises em CCD foi preparado utilizando-se os solventes n-butanol, ácido acético e água na proporção 4:1:5 (fase superior).

6.1.2.2 NP/PEG

Os reveladores NP/PEG foram preparados separadamente e mantido a temperatura ambiente. Um grama de NP foi dissolvido em aproximadamente 50 mL de metanol. Em seguida, essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com metanol.

Para preparo do PEG foram utilizados 5 g deste composto dissolvidos em aproximadamente 50 mL de etanol (P.A). Em seguida essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com etanol.

6.1.3 Preparo das soluções para ensaios com as células

6.1.3.1 Meio de cultura DMEM

Para a preparação de 1 L do meio de cultivo DMEM foram utilizados 1 frasco de DMEM; 1,2 g de NaHCO_3 e 2,38 g de HEPES. Após dissolver o meio de cultivo em 400 mL água MiliQ, os outros reagentes foram adicionados e o pH foi aferido para 7,2 a 7,4. O volume foi completado para 1 L utilizando-se uma proveta.

Para esterilização o meio preparado foi filtrado a vácuo em câmara de fluxo laminar utilizando uma membrana de 0,20 μm , a solução foi transferida para uma garrafa estéril e armazenada a 2-8 °C.

6.1.3.4 Solução Hanks

A solução I foi preparada utilizando 0,4 g de KCl; 0,06 g de KH_2PO_4 ; 0,04 g de NaHPO_4 ; 0,35 g NaHCO_3 , 8 g de NaCl e 500 mL de água miliQ. A solução II foi feita com 1 g de glicose dissolvida em 500 mL de água.

Ambas as soluções foram autoclavadas durante 15 minutos, reunidas e homogeneizadas dentro da câmara de fluxo laminar e estocadas a temperatura de 2-8°C.

6.1.3.5 Solução Trypsina

Foram adicionados em 100 mL de HANKS 0,125 g de tripsina e 0,02 g de EDTA. Esta mistura foi filtrada em membrana de 0,20 μm dentro da câmara de fluxo laminar e estocada a temperatura de 2-8°C.

6.1.3.6 Preparo $\text{A}\beta_{25-35}$

O peptídeo $\text{A}\beta_{25-35}$, o fragmento mais tóxico derivado da proteína precursora da amilóide foi dissolvido em água deionizada e destilada. A solução estoque foi preparada conforme descrito por PARK et al (2008) na concentração de 1 mM e incubado em banho de água a 37°C por 3 dias. Esta solução foi diluída para concentração de 100 μM e estocada a -20°C até uso.

6.1.3.7 Solução HCl (1N)

Foram pipetados 829 μ L de ácido clorídrico (P.A) para um balão volumétrico de 10 mL já contendo aproximadamente cerca de 5mL de água MiliQ. Em seguida o volume do balão foi completado e a solução foi mantida a temperatura ambiente.

6.2. Condições cromatográficas

As análises de CCD foram realizadas em placas de sílica gel (20 cm x 10 cm) utilizando como fase móvel BAW e reveladas com NP/PEG. As análises de CLAE foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo SHIMADZU (SPD M10A) acoplado a um detector de arranjo de diodo.

Para purificação semipreparativa utilizou-se coluna Supelcosil LC-18 (25,0 cm x 10,0 mm), fluxo 1 mL/min e fase móvel metanol (B) e água (A). Iniciando em 10 % em B, passando para 100% com 50 min, 52% aos 52 min e parando com 60 min. Para as condições analíticas utilizou-se coluna Supelcosil LC-18 (25,0 cm x 4,6 mm), fluxo 1,0 mL/min e fase móvel metanol (B) e ácido acético 0,1 % (A). Iniciando de 10 % em B, passando para 66% com 32 min, voltando a condição inicial aos 35 min e parando com 45 min.

6.3. Extração e purificação dos flavonoides presentes no extrato metanólico de *Serjania erecta*

As etapas do processo de extração e purificação dos flavonoides estão detalhadamente descritas abaixo e encontram-se sumarizados na Figura 3.

6.3.1 Coleta e preparação do material

Folhas de *Serjania erecta* foram coletadas na Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP, na unidade de Biotecnologia em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Os exemplares (HPMU-835) estão depositados no Herbário de Plantas Medicinais da UNAERP e foram identificados pela botânica responsável Dra. Inês Cordeiro.

As folhas foram secas em estufa de ar quente circulante a 50 °C por 72 h e trituradas em moinho de facas (50 mesh), e posteriormente foram pesadas obtendo-se uma massa de 1,225 kg.

6.3.2 Fracionamento do extrato metanólico de *Serjania erecta*

O material vegetal obtido (1,225 kg) foi submetido a maceração com metanol por três dias obtendo-se o extrato metanólico. Este procedimento foi repetido três vezes obtendo-se assim 24,345 g do extrato o qual foi concentrado por evaporador rotativo (Fisatom®) e aplicado em uma coluna cromatográfica (45 cm x 5,5 cm) empacotada com Sephadex LH20, eluída com álcool etílico 95%, gerando as frações denominadas 1 (12,166g), 2 (0,620g), 3 (0,669g), 4 (1,861g), 5 (2,176g) e 6 (5,320g).

6.3.2.1 Fração 3

A fração 3 foi solubilizada em MeOH e centrifugada. A parte solúvel foi aplicada em uma coluna cromatográfica empacotada com Sephadex LH20, utilizando como fase móvel MeOH e a parte insolúvel foi colocada na capela para secagem e denominada I3 (0,177g). As frações obtidas desta coluna foram coletadas em frascos de penicilina e após realização de CCD foram reunidas e identificadas como 3.1 (0,293g), 3.2 (0,074g), 3.3 (0,084g), 3.4 (0,021g) e 3.5 (0,005g).

6.3.2.2 Fração 4

Foi preparada uma coluna cromatográfica empacotada com Sephadex LH20, utilizando como fase móvel etanol 92%, para aplicação da fração 4. A amostra foi dissolvida em MeOH e centrifugada. A parte solúvel foi aplicada na coluna e a parte insolúvel denominada I4 (0,513g) foi colocada na capela para secagem. As frações obtidas desta coluna foram coletadas em cubetas e após realização de CCD foram reunidas e identificadas como 4.1 (0,123g), 4.2 (0,404g), 4.3 (0,540g) e 4.4 (0,245g).

6.3.3 Purificação dos flavonoides

As frações de interesse pela presença de flavonoides (I3, 4.2, 4.3) foram injetadas CLAE semipreparativo, para purificação. Após a realização de CCD e observação dos cromatogramas, as frações que apresentaram o mesmo perfil foram reunidas originando três frações puras denominadas P1, P2 e 3I, sendo suas massas 44, 200 e 150 mg, respectivamente. Estas frações foram analisadas através de CLAE em coluna analítica juntamente com dois padrões de flavonoides para comparação com as substâncias isoladas.

A elucidação das estruturas dos flavonoides purificados foi realizada através de técnicas espectroscópicas de análise de RMN ^1H e ^{13}C (DEPT e HMBC) em comparação com os dados da literatura.

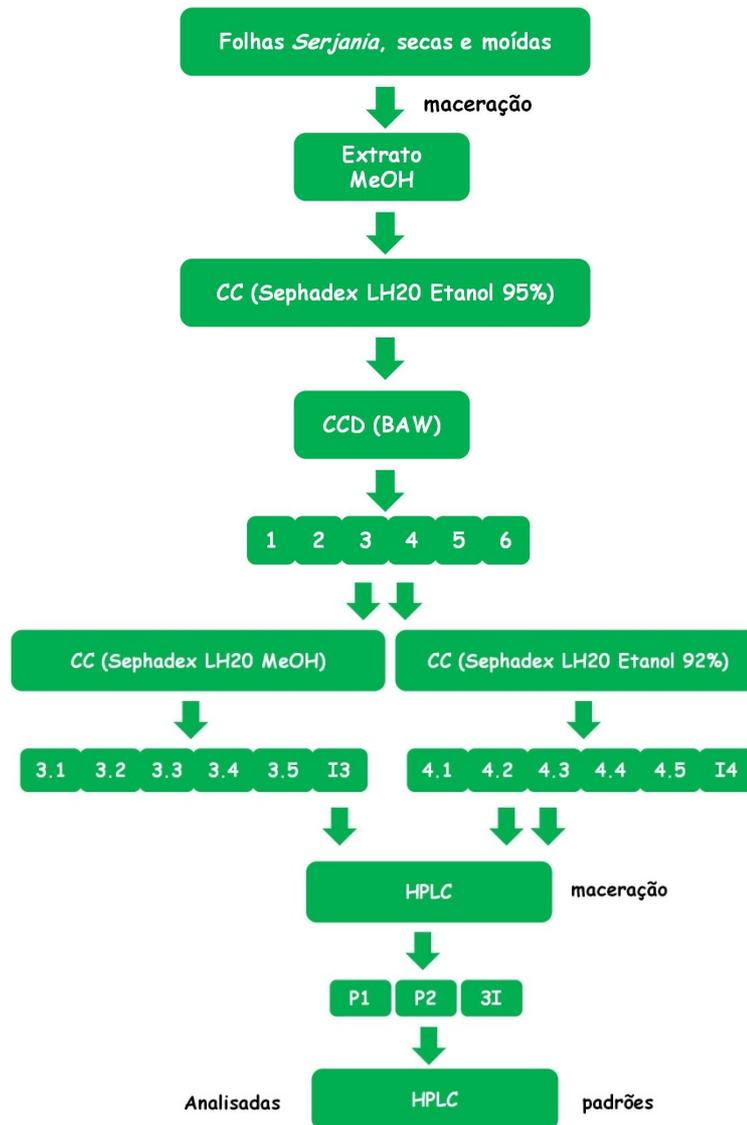


Figura 3. Fluxograma das etapas do processo de extração e purificação dos flavonoides presentes no extrato metanólico de *Serjania erecta*.

6.4. Cultura celular

A cultura de células linhagem PC12 utilizada neste estudo foi adquirida através do banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ (Associação Técnico Científica Paul Ehrlich – APABCAM).

6.4.1 Padronização e manutenção de um banco de células da linhagem PC12

Para manutenção das células PC12, foi utilizado meio Dulbecco's modificado Eagle's (DMEM) suplementado com soro bovino fetal (10 %), 1U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em atmosfera úmida a 37 ° C com 5% de CO₂. O meio era trocado todos os dias (GAO et al, 2010).

Quando a cultura apresentou confluência em cerca de 100% ela foi submetida à criopreservação. O meio da garrafa foi descartado. As células foram lavadas com solução de hanks que foi descartada e em seguida foi adicionada a solução de tripsina. A garrafa de cultivo foi então incubada na estufa a 37°C de 3 a 5min. Após verificação se as células estavam soltas, a solução foi transferida da garrafa para um tubo de centrífuga de 15 mL que foi centrifugado por 1 minuto a 2.400 rpm, e em seguida o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 900 µL de SBF e transferido para um criotubo e em seguida 100 µL de DMSO foram adicionados. O criotubo foi mantido *overnight* a -80°C e em seguida foi transferido para o nitrogênio líquido.

Quando necessário o descongelamento das células, o criotubo foi retirado do nitrogênio líquido, colocado em banho maria a 37°C. Após descongelamento o conteúdo do criotubo foi transferido para uma garrafa de cultivo previamente preparada contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com SBF a 10%. A garrafa de cultivo foi então colocada em estufa a 37°C a 5% de CO₂.

6.5. Ensaio viabilidade celular

A viabilidade celular frente a toxicidade apresentada pelo peptídeo Aβ₂₅₋₃₅ foi analisada através do ensaio do MTT. Este ensaio colorimétrico baseia-se no uso do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT), que é reduzido pela enzima succinato desidrogenase, apenas por mitocôndrias de células viáveis. O sal MTT reduzido passa da cor

amarela para cristais azul de formazan, sendo a sua densidade diretamente proporcional ao número de células vivas presentes (MOSMANN, 1983).

6.5.1 Determinação da concentração do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ adequada para indução de toxicidade às células PC12

Após o processo de tripsinização as células PC12 foram plaqueadas em placas 96 poços (Corning CellBind®), na densidade de 4×10^4 cel/mL com meio DMEM suplementado SBF a 2% e colocadas na estufa overnight a 37°C – 5% CO₂. Após este período o meio das células foi trocado por 200 μ L/poço de meio novo (sem SBF) contendo peptídeo A β ₂₅₋₃₅ nas concentrações de 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M e 50 μ M. O controle de células foi realizado adicionando 200 μ L de meio novo (sem SBF) sem a presença do peptídeo A β ₂₅₋₃₅.

Após 24 horas, 20 μ L de solução de MTT (5 mg/mL em hanks) foi acrescentada, e a placa foi então incubada por mais 4 horas em estufa a 37°C – 5% CO₂. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 2400 rpm, o meio foi descartado e 200 μ L de DMSO foram adicionados em cada poço. Aguardou-se uma hora e a leitura da absorbância foi realizada a 570nm em uma leitora de microplaca ELISA (KIM et al, 2009; MA et al, 2010, WANG, et al, 2005).

6.5.2. Tratamentos

Os tratamentos consistiam na pré-incubação das células PC12 com ou sem as substâncias em teste em diferentes concentrações por 1 hora, seguida de incubação com 50 μ M do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ por 24 horas adicionais, levando em consideração o tratamento especificado em cada grupo:

(i) controle de células: não recebeu nenhum tratamento, somente adição do meio de cultura;

(ii) controle A β ₂₅₋₃₅: recebeu adição de 50 μ M de A β ₂₅₋₃₅ em meio de cultura;

(iii) células tratadas: receberam diferentes concentrações dos flavonoides por 1 h com posterior adição de 50 μ M A β ₂₅₋₃₅;

(iv) controle do solvente: recebeu meio acrescido de DMSO a 0,4%;

(v) controle da substância o qual consistia na adição de meio acrescido da substância na maior concentração ensaiada.

6.5.3. Determinação do efeito protetor do flavonóide quercetrina, isovitexina e vitexina na viabilidade celular frente a toxicidade induzida pelo $A\beta_{25-35}$ em células PC12

Após o processo de tripsinização as células PC12 foram plaqueadas em placas 96 poços, na densidade de 4×10^4 cel/poço com meio DMEM suplementado com SBF a 2% e colocadas na estufa *overnight* a $37^\circ\text{C} - 5\% \text{CO}_2$.

Após tratamento conforme especificado no item 5.3 e reposição do meio, 20 μL da solução de MTT (5 mg/mL em hanks) foi acrescentada.

As placas foram incubadas por mais 4 horas em estufa a $37^\circ\text{C} - 5\% \text{CO}_2$ e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 2400 rpm. O meio foi descartado e 200 μL de DMSO foram adicionados em cada poço. Aguardou-se uma hora e a leitura da absorbância foi realizada a 570nm em uma leitora de microplaca ELISA (MA et al, 2010).

6.6. Ensaio Lactato Desidrogenase

A lactato desidrogenase é uma enzima que catalisa a conversão reversível do piruvato a lactato na presença de NADH conforme a reação demonstrada na Figura 4.

Deste modo, o ensaio proposto baseia-se na redução de NAD a NADH pela presença da LDH. O NADH gerado nesta reação é então utilizado na conversão de um corante o qual pode ser analisado por espectrofotometria de UV/visível. Uma vez que o aumento da liberação desta enzima para o meio extracelular está relacionado a perda da integridade da membrana, quanto maior o dano ocasionado, maior o sinal espectrofotométrico observado (GARCIA, 2009).

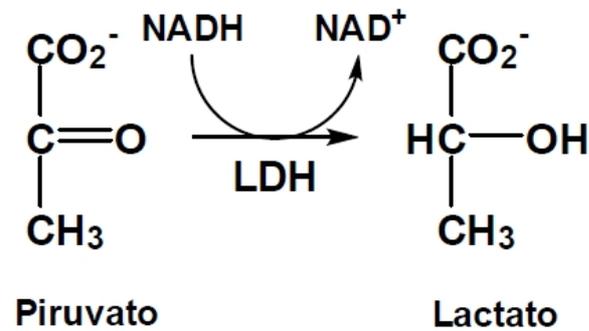


Figura 4. Reação enzimática da conversão reversível do piruvato a lactato pela enzima lactato desidrogenase na presença de NADH (GARCIA, 2009)

O ensaio foi realizado de acordo com o descrito no protocolo do fabricante do kit. Após o processo de tripsinização as células PC12 foram plaqueadas em placas 96 poços, na densidade de 4×10^4 cel/poço com meio DMEM suplementado com SBF a 2% e colocadas na estufa *overnight* a $37^\circ\text{C} - 5\% \text{CO}_2$.

As células foram então tratadas com a substância vitexina nas concentrações de 150 e 25 $\mu\text{g/mL}$, conforme descrito no item 5.3. Após centrifugação da placa a 250 g por 4 minutos, 50 μL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Adicionou-se 100 μL de uma mistura reativa contendo enzima, substrato e corante na proporção 1:1:1, e incubou-se a placa por 30 minutos protegidos da luz a temperatura ambiente. Após este período adicionou-se 15 μL HCL (1N) a fim de para a reação e a absorbância foi medida a 492 nm em uma leitora de microplaca.

6.7. Ensaio da determinação do óxido nítrico

Uma prática comum para determinação dos níveis de NO na amostra é medir a quantidade total dos seus produtos finais gerados (nitrito e nitrato), através do método de Griess.

O primeiro passo deste ensaio baseia-se na redução do nitrato a nitrito através da nitrato redutase; o segundo passo consiste na adição dos reagentes de Griess, iniciando a conversão do nitrito a um composto o qual medido sua absorbância possibilita a determinação da sua concentração (μM) quando comparado a uma curva de calibração realizada com NaNO_3 , que também é reduzido pela nitrato redutase (SANTOS, 2007).

Após o tratamento com a substância vitexina nas concentrações de 150 e 25 µg/mL, conforme descrito no item 5.3, realizou-se este ensaio, de acordo com o descrito no protocolo do fabricante:

Centrifugou-se a placa de 96 poços a 1000 g por 15 minutos, e volumes iguais das amostras (grupos tratados e controles) ou de nitrato para a curva de calibração foram transferidos para uma placa nova de 96 poços e foram incubados por 2 h a temperatura ambiente com 10 µL da solução de nitrato redutase e 10 µL da solução de cofatores enzimáticos. Após este período foram adicionados 50 µL do reagente de Griess A e 5 minutos depois 50 µL do reagente de Griess B. A placa foi então incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e a leitura foi realizada a 550 em um leitor de microplaca (ELISA). A concentração de nitrito produzido foi calculada a partir da curva de calibração.

6.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste Scott-Knott, os valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Purificação dos flavonoides de *Serjania erecta*

Os resultados obtidos com a análise das principais substâncias do fracionamento do extrato MeOH de *Serjania erecta* nos confirmam a presença de substâncias da classe dos flavonoides.

A Figura 5 refere-se a análise dos padrões isovitexina e vitexina. Sendo A1 e B1 o cromatograma demonstrando o tempo de retenção das substâncias e A2 e B2 o perfil da banda de absorção.

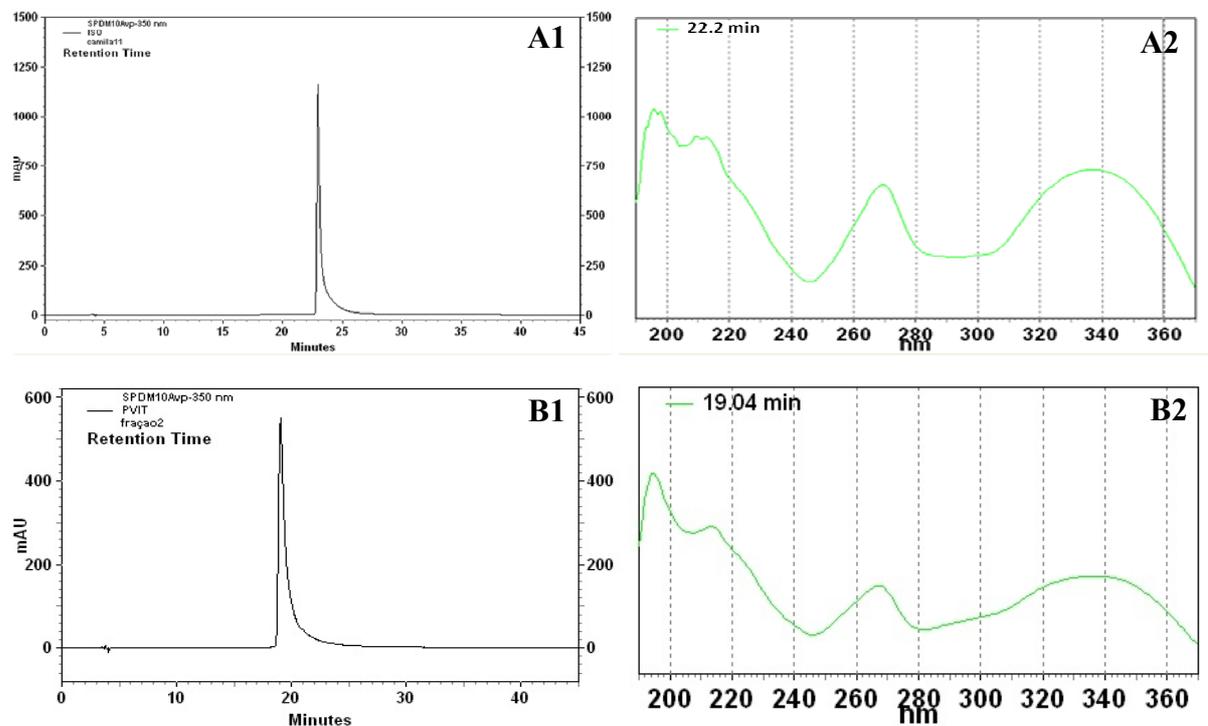


Figura 5. Cromatograma e espectro UV/visível das substâncias padrões isovitexina e vitexina. Análise realizada através de CLAE. Onde: A1 (cromatograma) e A2 (espectro) referem-se a substância isovitexina. B1 (cromatograma) e B2 (espectro) referem-se a substância vitexina.

Os resultados das análises cromatográficas (Figura 6) demonstram espectros com bandas de absorção de substâncias com características da classe de flavonoides, um dos objetivos do presente trabalho. As frações P1, P2 e 3I obtidas com a purificação do extrato MeOH de *Serjania erecta* encontraram-se purificadas. As massas relacionadas a estas substâncias são 44 mg, 200 mg e 150 mg, respectivamente.

Com estas análises (Figura 6) observou-se que substância isolada 3I poderia ser o flavonóide vitexina, e a substância P2 o seu isômero o flavonóide isovitexina, pois apresentam tempo de retenção e perfil de absorção semelhantes aos padrões injetados (Figura 5).

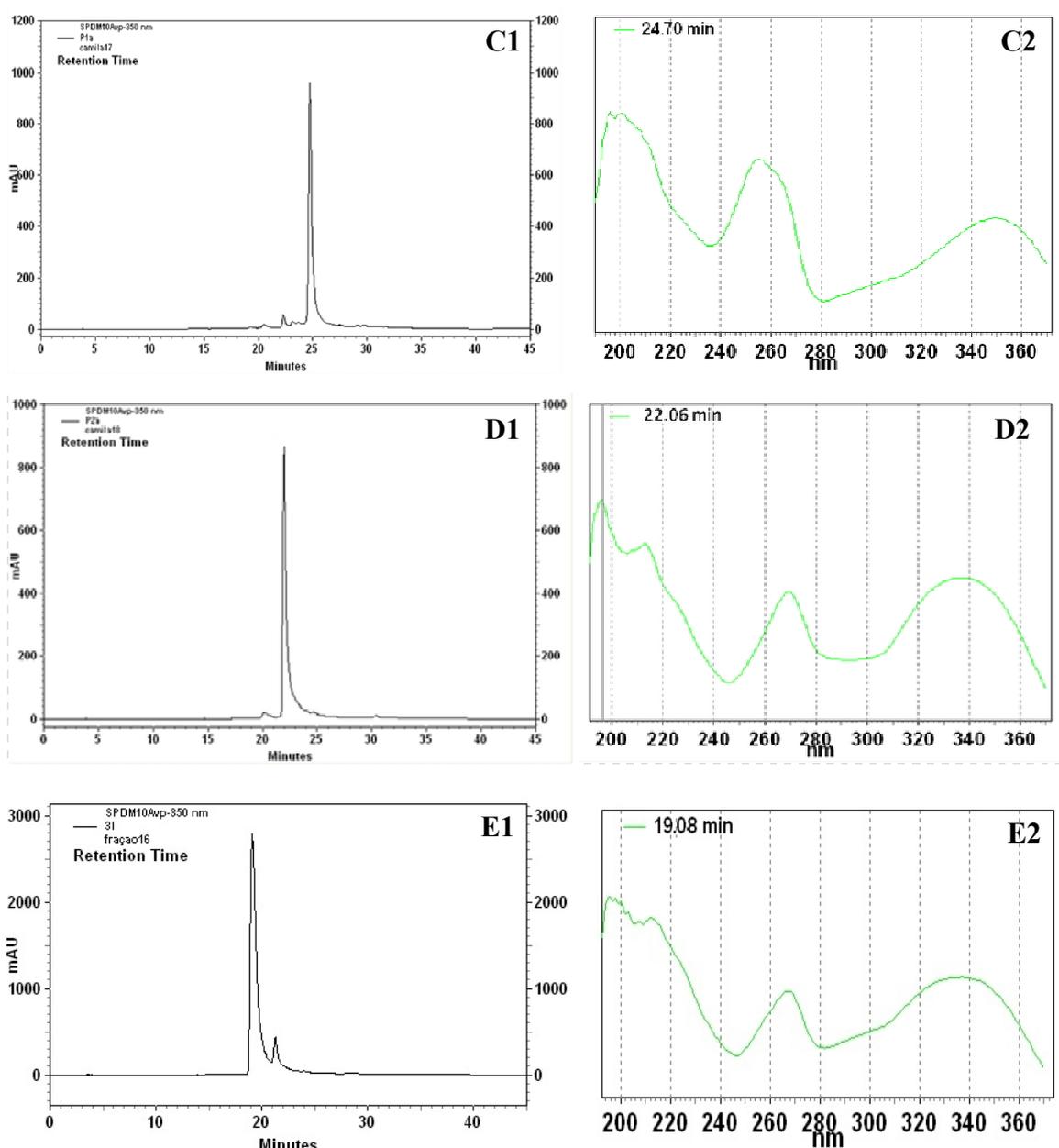


Figura 6. Cromatograma e espectros UV/visível das substâncias presentes no extrato MeOH de *Serjania erecta*. Análise realizada através da CLAE. Onde: C1 (cromatograma) e C2 (espectro) são referentes a substância denominada P1. D1 (cromatograma) e D2 (espectro) são referentes a substância denominada P2. E1 (cromatograma) e E2 (espectro) são referentes a substância denominada 3I.

A confirmação das estruturas dos flavonoides purificados foi realizada através de técnicas espectroscópicas como a análise de RMN ^1H e ^{13}C . Com o resultado destas análises confirmou-se que as substâncias 3I e P2 são aos flavonoides conhecidos como vitexina e

isovitexina, respectivamente. A substância P1 foi identificada como sendo o flavonóide quercetina 3- α -raminosídeo, conhecido como quercetrina. Os espectros obtidos das análises foram interpretados pelo Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira e as estruturas dessas substâncias estão representadas na Figura 7.

Dois destes flavonoides, isovitexina e vitexina já foram encontrados na espécie estudada, a quercetrina por sua vez só foi descrita em estudos realizados com o gênero *Serjania*, sem especificação de qual espécie se tratava (COELHO et al, 2007; BALDO, 2007).

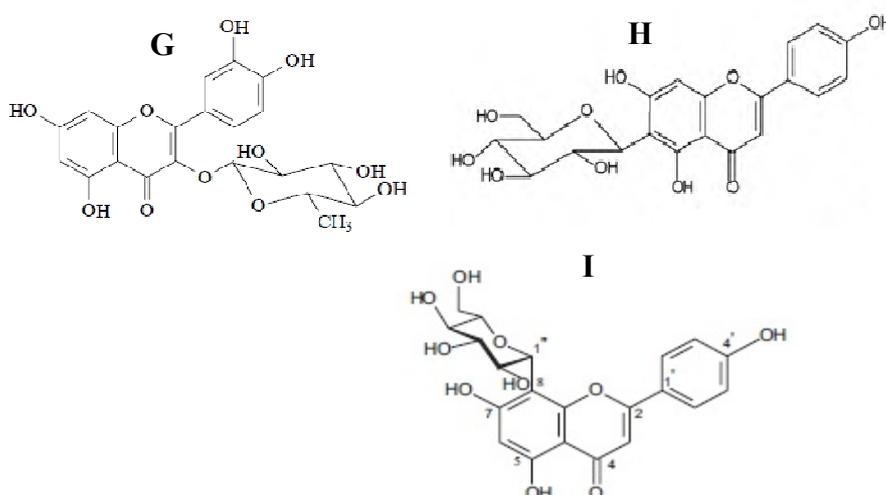


Figura 7. Estruturas químicas dos flavonoides purificados do extrato MeOH de *Serjania erecta*. Quercetrina (G) (BELTRAME et al, 2001), isovitexina (H) (GARCIA et al, 2010) e vitexina (I) (KIM, et al 2009).

Apesar de ser descrito na literatura a utilização do fluxo de 3 mL/min para purificação das substâncias, o fluxo de 1 mL/min tem sido utilizado e como demonstrado foi ideal para purificação proposta. Além disso, este parâmetro pode possibilitar economia de solvente e redução do desgaste da coluna aumentando assim seu tempo de vida.

O sistema de detecção por detector de diodos, conhecidos como DAD permite a visualização dos espectros de absorção na região UV/Vis das substâncias separadas por CLAE. Apesar das substâncias serem diversas e apresentarem o mesmo grupo cromóforo e, conseqüentemente a mesma capacidade de absorção de luz, o espectro de absorção molecular na região UV/Vis associado com o tempo de retenção é um sistema importante para identidade da molécula. No que se refere aos sistemas eluentes indicados para análise de substâncias fenólicas por CLAE em fase reversa, a literatura indica o uso de misturas ácidas. SOUZA (2002) informa que misturas de metanol e ácido fosfórico 1% (v/v) ou metanol e ácido acético 1% (v/v) são eluentes comuns para separação de flavonoides em coluna de fase reversa. Estas informações corroboram com a de GOVINDARAJAN et. al (2007), que

indicam haver uso freqüente de eluição binária com água ácida e solvente orgânico polar (metanol ou acetonitrila) em sistema de fase reversa (colunas C18) e detecção por DAD, para análise de produtos vegetais com marcadores fenólicos.

2. Análise da viabilidade celular frente a toxicidade induzida por diferentes concentrações de A β ₂₅₋₃₅

As células PC12 foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ (10, 20, 30, 40 e 50 μ M) por 24 h, exceto o controle de células o qual não recebeu nenhum tratamento. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio do MTT.

Como é possível observar na Figura 8, todas as concentrações testadas do peptídeo A β diminuíram a viabilidade celular. A exposição das células a 50 μ M deste peptídeo consideravelmente diminuiu a viabilidade celular para 56.4 %. Nas demais concentrações testadas, 10, 20, 30 e 40 μ M a viabilidade celular observada foi de 85.8, 87.5, 84.3 e 72.3%, respectivamente.

A concentração escolhida para dar continuidade aos ensaios com o peptídeo A β ₂₅₋₃₅ foi a de 50 μ M. Embora alguns autores descrevam o uso de concentrações menores deste peptídeo e maiores tempos de exposição (GE, THANG e ZHANG, 2009; JANG et al, 2004; KIM, LEE e LEE, 2007; LEE et al, 2011; LI et al, 2004), a faixa de morte celular e o tempo de exposição mais comumente utilizados estão em torno de 40 a 50% e 24 h, respectivamente.

Como demonstrado na figura 5, a concentração que se enquadra dentro desta faixa, na condição de exposição por 24 h foi a de 50 μ M, justificando assim a sua escolha. Resultado similar foi encontrado por Lee et al (2005).

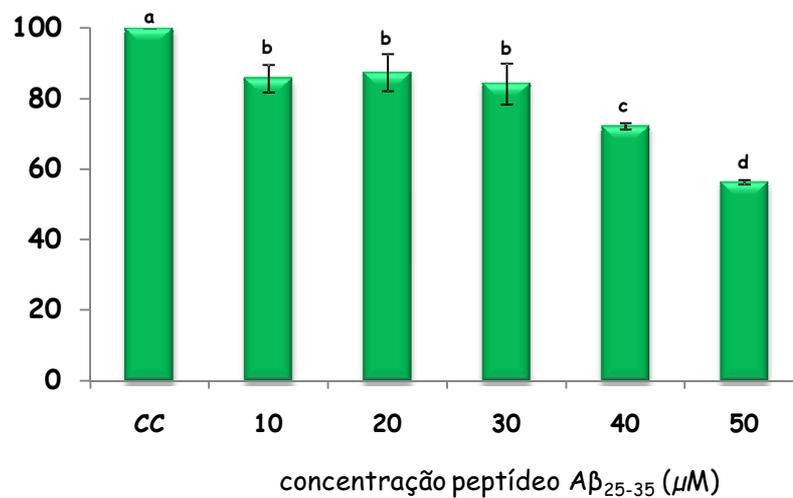


Figura 8. Efeito citotóxico das diferentes concentrações do peptídeo A β_{25-35} . Os dados apresentados são referentes a três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott, $p < 0.05$ comparado ao grupo controle (CC) o qual não recebeu nenhum tratamento.

Durante a padronização deste ensaio foi observado a necessidade da diminuição da porcentagem de SBF, uma vez que a sua presença interfere diretamente na citotoxicidade apresentada pelo A β_{25-35} .

Alguns trabalhos encontrados na literatura, de fato demonstram propriedades protetora do SBF frente a ação de espécies reativas, sustentando assim nossa hipótese de que componentes presentes no SBF possam ser susceptíveis a rápida reação com as espécies reativas geradas, por estarem livremente disponíveis no meio. Deste modo, o SBF estaria atuando como um agente protetor contra o estresse oxidativo induzido pelo A β_{25-35} .

Dentre estes trabalhos, destaca-se o realizado Iglesias et al (1999) que aponta a albumina, um dos principais compostos presentes nos SBF comerciais, como maior fator de sobrevivência para células tubulares renais e macrófagos, através do sequestro de radicais, dentre outros mecanismos. Este trabalho demonstrou uma potente atividade antioxidante desta proteína. Outra ação semelhante foi demonstrada por Kiaer e Thams (2009) que também apontou a albumina como um fator de sobrevivência para células β -pancreáticas através do sequestro de espécies reativas de oxigênio.

Em consideração a estes dados e como observados na sessão matérias e métodos, a concentração de SBF foi ajustada de forma com que a não interferisse na citotoxicidade apresentada pelo peptídeo A β_{25-35} .

3. Efeito protetor dos flavonoides quercetrina, isovitexina e vitexina frente ao estresse oxidativo induzido por $A\beta_{25-35}$

A incubação das células PC12 com 50 μM do peptídeo $A\beta_{25-35}$ por 24 horas diminuiu significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo controle (CC) que não recebeu nenhum tratamento em todos os ensaios. No entanto, o pré-tratamento das células com os flavonoides quercetrina, isovitexina e vitexina reduziram a morte causada por este peptídeo (Figura 9, 10 e 11)

A quercetrina atenuou a toxicidade do $A\beta_{25-35}$ proporcionando um aumento na viabilidade celular de 12.9, 7.1, 9.5 e 10, 9% nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No entanto as diferentes concentrações ensaiadas não se diferenciam estatisticamente uma das outras (Figura 9).

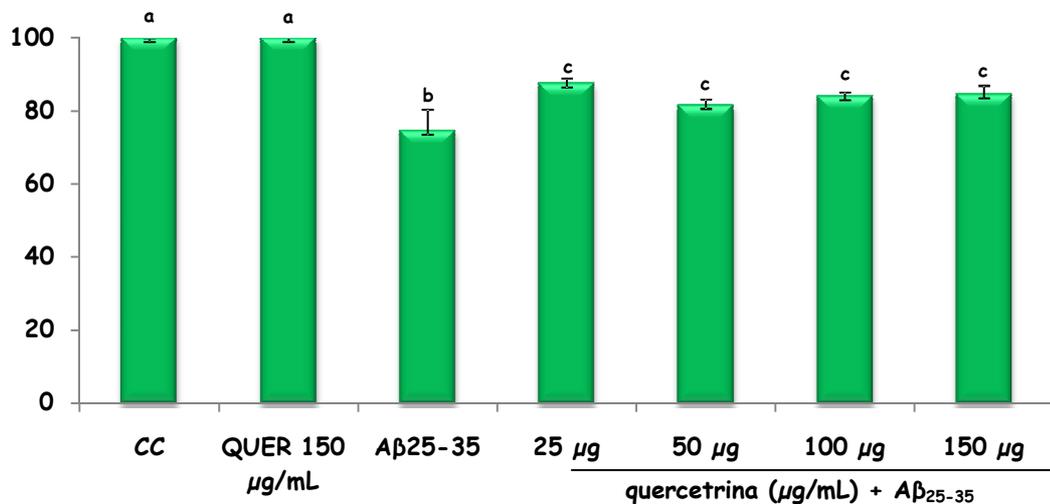


Figura 9. Efeito protetor do flavonóide quercetrina frente a citotoxicidade induzida por $A\beta_{25-35}$. CC: controle substância. QUER: controle substância. Os dados apresentados são referentes a três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott, $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com o $A\beta_{25-35}$.

O flavonóide isovitexina, também foi eficiente na redução da morte celular causada por este peptídeo. Porém um efeito protetor significativo foi observado somente na maior concentração testada (200 $\mu\text{g/mL}$). A viabilidade celular nesta concentração foi de 81.8%. Um aumento considerável (23.7%) quando comparado as células expostas somente ao peptídeo $A\beta_{25-35}$, que apresentava viabilidade em torno de 58.1%.

As demais concentrações testadas 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram viabilidade em torno 63.3, 64.3 e 68.8%, um aumento de 5.2, 6.2 e 10.7% respectivamente, não se diferenciando estatisticamente do grupo exposto ao peptídeo $A\beta_{25-35}$ (Figura 10).

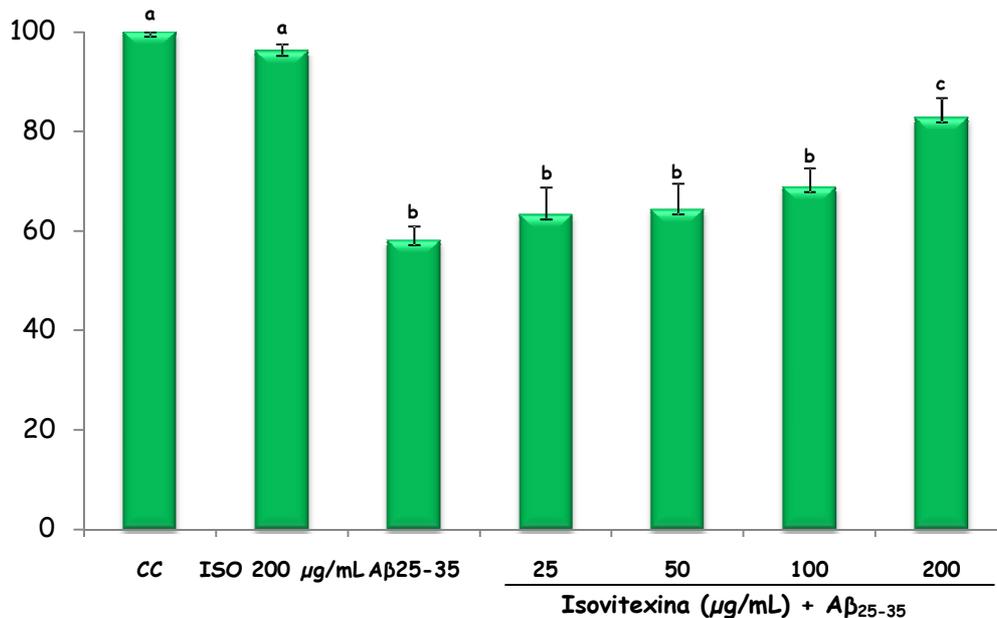


Figura 10. Efeito protetor do flavonóide isovitexina frente a citotoxicidade induzida por Aβ₂₅₋₃₅. CC: controle substância, ISO: controle substância. Os dados apresentados são referentes a três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott, $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com o Aβ₂₅₋₃₅.

Ao contrário da isovitexina, seu isômero, o flavonóide vitexina apresentou efeito protetor significativo até mesmo na menor concentração testada (Figura 11).

O pré-tratamento com 25 μg/mL deste flavonóide consideravelmente proporcionou uma melhora na viabilidade celular para 67.5%, quando comparado ao grupo exposto somente ao peptídeo Aβ₂₅₋₃₅, o qual apresentou viabilidade de 50.9%, neste ensaio. O aumento da viabilidade celular proporcionado neste tratamento foi de 16.6%.

As concentrações de 50, 100 e 150 μg/mL apresentaram viabilidade celular em torno de 70.2, 76.4 e 91.0%, obtendo-se assim um aumento na viabilidade de 19.3, 25.5 e 40.1%.

A concentração de 150 μg/mL, estatisticamente reverteu os danos causados pela toxicidade do peptídeo Aβ₂₅₋₃₅ na concentração de 50 μM.

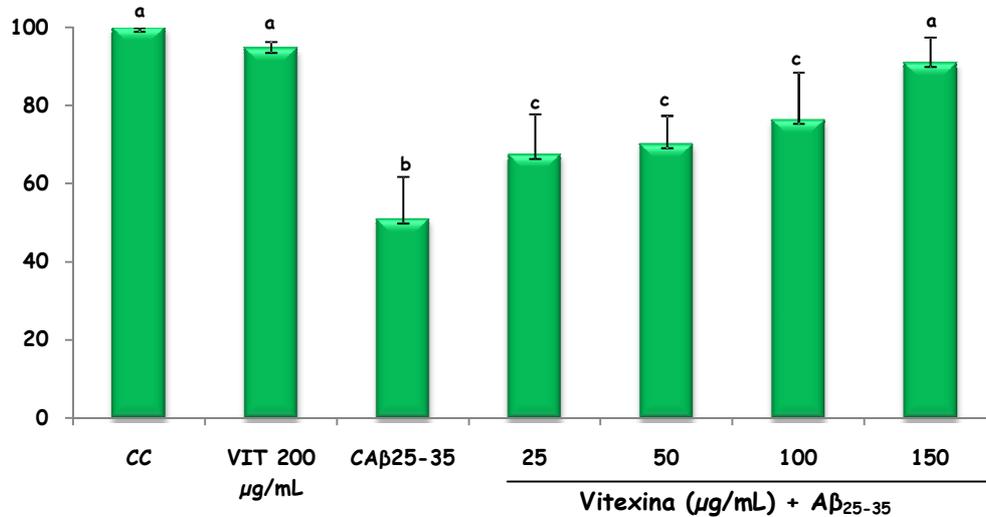


Figura 11. Efeito protetor do flavonóide vitexina frente a citotoxicidade induzida por A β 25-35. CC: controle substância, VIT: controle substância. Os dados apresentados são referentes a três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott, $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com o A β 25-35.

As substâncias ensaiadas não demonstraram toxicidade conforme evidenciado nas Figuras 9, 10 e 11. O solvente utilizado (DMSO a 0,4%) também não interferiu nos resultados apresentados (dados não mostrados).

Uma vez já comprovada em dados na literatura que a presença deste peptídeo causa morte das células neuronais através da geração de radicais livres sugere-se que o mecanismo de proteção apresentada por estes flavonoides em estudo seja antioxidante, uma vez que esta classe de substância está altamente associada a esta ação.

A quercetrina já teve sua atividade antioxidante avaliada através do ensaio de DPPH, o qual mede a capacidade de uma substância em seqüestrar radicais livres. Nestes estudos foi evidenciada a potente atividade antioxidante deste composto, sendo um dos mais eficazes e apresentando melhores resultados que o controle positivo utilizado, o ácido ascórbico. A atividade antioxidante deste flavonóide se deve à porção catecol presente no anel B, juntamente com a sua conjugação estendida através do sistema de carbonil α,β -insaturado no anel C (RIBEIRO et al, 2005 e KGATLE, 2007).

No presente trabalho, o qual objetivou analisar a atividade antioxidante e neuroprotetora das substâncias isoladas do extrato metanólico de *Serjania erecta* frente a toxicidade induzida pelo A β 25-35, a quercetrina demonstrou considerável atividade protetora (10%), na menor concentração ensaiada (25 $\mu\text{g/mL}$), no entanto o aumento nas concentrações para até 150 $\mu\text{g/mL}$ não proporcionaram uma melhora significativa na viabilidade celular.

A respeito das flavonas C-glicosiladas vitexina e isovitexina, diversos trabalhos na literatura avaliaram a atividade antioxidante destes dois flavonoides, demonstrando relevante atividade (ZHU et al, 2007; DU e LI, 2011; LIN et al, 2009; KIM et al, 2005; CAO et al, 2011; SHIBANO et al, 2008; KIM et al, 2005), e embora dados divergentes possam ser encontrados, essa diversidade de resultados possa ser explicado pelos diferentes métodos de avaliação empregados e conseqüentemente diferentes mecanismos de ação.

Os flavonoides C-glicosilados estão presentes em frutas e nutracêuticos, e têm recebido bastante atenção por conta das suas sugeridas propriedades antioxidantes. De acordo com Zielinska e Zielinski (2011) e Peng et al., (2008) a atividade antioxidante apresentada por estes dois flavonoides C-glicosilados em estudo, se deve a presença do grupo resorcinol no anel A, ao único grupo hidroxil presente no anel B, a dupla ligação entre C-2 e C3 conjugados com o grupo 4-oxo no anel C. E embora sejam isômeros, os resultados encontrados demonstram uma diferença significativa quanto a atividade protetora destas duas flavonas. A isovitexina apresentou uma proteção considerável (23.7%) na concentração de 200 µg/mL enquanto a vitexina proporcionou uma significativa capacidade protetora (16.6%) em uma concentração 8 vezes menor (25 µg/mL).

Este resultado nos permite inferir que existe uma relação estrutura-efeito, onde a posição da glicose ligada às estruturas destas flavonas seja fundamental para atividade destas moléculas. Este resultado encontrado corrobora com o descrito por LATTÉ e KOLODZIEJ (2004), o qual demonstra que a presença do grupo C-glicosil na posição C-8 apresenta maior capacidade sequestradora de radicais livres que os seus homólogos onde esta presença se encontra posição C-6.

Com bases nestes resultados, foi possível observar que a substância vitexina apresentou melhor capacidade protetora frente as células expostas ao peptídeo A β ₂₅₋₃₅, deste modo esta substância foi escolhida para dar continuidade aos ensaios.

4. Ensaio LDH

Considerando os dados descritos na literatura, os quais demonstram que o beta amilóide causa o rompimento da membrana celular, a substância vitexina foi ensaiada a fim de analisar seu efeito protetor frente ao dano gerado por este peptídeo.

Os resultados obtidos foram expressos em valores de absorbância (Tabela 2) e demonstram que a incubação por 24 h com 50 µM do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ ocasionou um aumento

significativo na concentração de LDH extracelular, indicando o rompimento da membrana celular.

No entanto, quando foi realizado o pré-tratamento destas células com a vitexina nas concentrações de 25 e 150 µg/mL estes danos foram parcialmente revertidos, resultando em uma queda na concentração de LDH liberado para o meio, evidenciando a atividade protetora desta substância frente aos danos causados pelo peptídeo.

Transformando estes dados em porcentagem e considerando a quantidade de LDH liberada no controle de células como 100%, houve um aumento da concentração de LDH liberado para 259,5% quando as células foram tratadas somente com o peptídeo. No entanto, quando ocorreu o pré-tratamento destas células com 25 e 150 µg/mL de vitexina a porcentagem de liberação de LDH caiu para 202,2 e 155%, respectivamente.

A incubação somente com a vitexina não interferiu nos resultados conforme demonstrado na tabela 3, indicando novamente não ser citotóxica, uma vez que não houve aumento significativo na concentração de LDH liberada em seu tratamento. O mesmo ocorreu com o grupo tratado com o solvente (DMSO a 0,4%).

Tabela 1. Efeito protetor da vitexina sob os danos causados na membrana pelo A β ₂₅₋₃₅

Tratamento	Densidade óptica (LDH liberado)	Liberação LDH (%)
Controle células	0,269 ± 0,063 ^a	100,0
Controle substância	0,283 ± 0,063 ^a	105,2
Controle Aβ₂₅₋₃₅	0,698 ± 0,135 ^b	259,5
25 µg/mL (3I)	0,554 ± 0,111 ^c	202,2
150 µg/mL (3I)	0,417 ± 0,120 ^c	155,0

Os resultados seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott, p<0.05 comparado ao grupo controle de células.

O fato do A β ser produzido pela clivagem da PPA na sua região transmembranar associado a sua já comprovada toxicidade à membrana celular tem levantado questões e direcionado vários estudos na busca pela elucidação e comprovação dos mecanismos envolvidos nesta toxicidade. Alguns destes estudos sugerem que este peptídeo apresenta uma afinidade pela membrana celular, demonstrando que suas possíveis vias de permeação e toxicidade sejam através da sua interação com os componentes essenciais da membrana (receptores, esteróis, proteína e lipídios). Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* têm

demonstrado que este peptídeo de fato é capaz de interagir com a membrana celular alterando sua permeabilidade, podendo causar seu rompimento e ocasionar morte celular (WILLIAMS e SERPELL, 2011; CROUCH et al, 2008).

Uma vez que já comprovado o papel do peptídeo A β na morte das células neuronais observada na doença de Alzheimer, vários estudos investigam o uso de compostos naturais visando a proteção das mesmas (FE et al, 2005; WANG et al, 2007; PENG et al, 2002; WANG et al, 2009; ZHOU et al, 2011; MUTHAIYAH et al, 2011, JI et al, 2006; QIN et al, 2010). O resultado obtido no presente trabalho demonstra que a substância em estudo exerceu um efeito protetor pronunciado contra a capacidade do peptídeo beta amilóide em ocasionar o rompimento da membrana celular. Os resultados aqui apresentados são consistentes com os observados através do ensaio de viabilidade celular (MTT), confirmando que a atividade exercida pela vitexina não se trata de um efeito proliferativo e sim protetor contra a citotoxicidade apresentada pelo peptídeo.

5. Ensaio NO

A exposição das células PC12 a 50 μ M do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ induziu um aumento significativo na produção de NO, em relação ao controle de células. No entanto, quando houve o pré-tratamento destas células com concentrações específicas de vitexina (25 e 150 μ g/mL) ocorreu uma queda na produção desta espécie reativa indicando assim a capacidade antioxidante deste flavonóide frente a esta espécie reativa.

Estatisticamente, o tratamento com ambas as concentrações de vitexina atenuou significativamente a geração de óxido nítrico, abaixando sua concentração para níveis normais como o encontrado no controle de células.

Tabela 2. Efeito protetor da vitexina sob a produção de NO causada pelo A β ₂₅₋₃₅.

Tratamento	Concentração NO (μ M)
Controle de células	7,1 \pm 1,625 ^a
Vitexina 150 μ g/mL	4,1 \pm 3,567 ^a
A β ₂₅₋₃₅	20,3 \pm 0,529 ^b
Vitexina 25 μ g/mL + A β ₂₅₋₃₅	11,8 \pm 1,053 ^a
Vitexina 150 μ g/mL A β ₂₅₋₃₅	8,0 \pm 1,171 ^a

Os resultados seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott, $p < 0.05$ comparado ao grupo controle de células.

Embora o NO esteja envolvido na sinalização celular e na regulação fisiológica normal do sistema nervoso sua propriedade como um radical livre sugere que ele seja neurotóxico quando presentes em quantidades excessivas. Níveis acumulados de NO juntamente com outra espécie reativa conhecida como superóxido dão origem ao peróxido nítrico. O peróxido nítrico e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são capazes de ocasionar oxidação e nitração, resultando na condição conhecida como estresse nitroso, altamente danosa as células (SAYRE, PERRY e SMITH, 2008).

Na literatura a presença excessiva de NO tem sido associada a morte dos neurônios em várias doenças neurodegenerativas, dentre elas no Alzheimer (KEIL et al, 2004; LI et al, 1996). Consistente a este fato, o beta amiloide formando nos cérebros de pacientes com Alzheimer tem demonstrado induzir apoptose em culturas de neurônios através da geração de NO e peroxinitrito. O NO tem sido considerado um modulador pró-apoptótico, através da indução das caspases enquanto o peroxinitrito tem sido relacionado a fragmentação oxidativa do DNA e peroxidação lipídica contribuindo com o dano observado na DA (JANG et al, 2004; KEIL et al, 2004).

Os resultados encontrados no presente trabalho podem ser relacionados a estudos *in vivo* realizados com ratos, os quais têm demonstrado que o peptídeo A β induz a produção NO e que esta produção quando de forma exagerada conduz a morte das células neuronais, demonstrando que esta via deve ser considerada relevante para a patogenia encontrada na DA (LI et al, 1996; QUINN et al, 2001; KEIL, 2004).

Dentre estes estudos, o realizado por TRAN et al (2001), demonstrou que a infusão (i.c.v) do peptídeo beta amiloide resultou no estímulo da produção de NO, contribuindo com a neurotoxicidade observada *in vivo*, e ainda mais interessante, demonstrou que a produção do excessiva de NO está envolvido no surgimento de déficits de memória e colinérgicos.

Deste modo, a substância vitexina também demonstrou resultados positivos neste ensaio uma vez que proporcionou um declínio nos níveis de NO gerado pela presença do peptídeo A β , evidenciando assim seu potencial uso como agente antioxidante e neuroprotetor.

VIII. CONCLUSÃO

Conclui-se que os flavonoides purificados de *S. erecta* apresentam potencial capacidade neuroprotetora. Em destaque a substância vitexina apresentou-se como uma molécula promissora no combate a neurotoxicidade apresentada pelo peptídeo A β ₂₅₋₃₅ através da sua capacidade em proteger a membrana das células bem como da sua eficiência em diminuir as concentrações de NO ambos causados pela ação neurotóxica deste peptídeo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. **Informações sobre os fitoterápicos brasileiros**, 2004. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 20 maio 2012.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Disease Fact's and Figures. Disponível em: <www.alz.org>. Acesso em: 05 dez. 2011.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Experimental Alzheimer Drugs Targeting Beta-Amyloid and the Amyloid Hypothesis. Disponível em: <www.alz.org>. Acesso em: 01 ago. 2011.

ALZHEIMER'S DISEASE EDUCATION & REFERRAL CENTER. Alzheimer's Disease Genetics. Disponível em: <www.nia.nih.gov>. Acesso em: 04 maio de 2011

ANGELO P M e JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**. Inst. Adolfo Lutz, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALZHEIMER. Disponível em: <www.abraz.com.br>. Acesso em: 12 jul. 2010

AVERY, S V. Molecular targets of oxidative stress. **Biochemical Journal**, v.434, p.201-210, 2011.

AYKIN-BURNS, N; ERCAL, N. Effects of selenocystine on lead exposed Chinese hamster ovary (CHO) and PC-12 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 214, n. 2, p.136-143, 2006.

BALDO, D C; NEHME, C J; SANTOS, L C; VILEGAS, W. **Flavonoids from the leaves from *serjania* sp.** I Simpósio Paulista de Farmacognosia. Resumo, 2007.

BALLARD, C; GAUTHIER, S; CORBETT, A; BRAYNE, C; AARSLANDI, D; JONES, E. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p.1019-1031, 2011

BALUNAS, M J; KINGHORN, A D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p.431-441, 2005.

BELKACEMI, A; RAMASSAM, C. Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid- β cascade. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p.593-600, 2012

BOBBA, A; PETRAGALLO, V A; MARRA, E; ATLANTE, A. Alzheimer's Proteins, Oxidative Stress, and Mitochondrial Dysfunction Interplay in a Neuronal Model of Alzheimer's Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2010, p.1-11, 2010.

BONDA, D J; LEE, H L; CAMINS, A; PALLAS, M; CASADESUS, G; SMITH, M A; XIONGWEI, Z. The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease:mechanistic and therapeutic considerations. **The Lancet Neurology**, v. 10, n.3, p.275-279, 2011.

BOOTHBY, L A; DOERING, P L. Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 39, p. 2073–2079, 2005.

BRITO, S C D. **Os efeitos do marco regulatório sobre a competitividade da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos no brasil.** 98 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Tocantis, Palmas, 2010.

BROGGINI, L S C et. al. Behavioral and enzymatic bioassays with *Serjania erecta* correlated with cognitive dysfunctions. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 20, n.4, p. 519-528, 2010.

BUTTERFIELD, A. Amyloid β -peptide (1–42)-induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain. A Review. **Free Radical Research**, v. 36, n. 5, p.1307-1313, 2002.

BUTTERFIELD, A; DRAKE, J; POCERNICH, C; CASTEGNA, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. **Trends in Molecular Medicine**, v.7, n.12, p. 548-554, 2001

CALIXTO, J B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n.2, p.179-189, 2000.

CAO, D; LI, H, YI, J; ZHANG, J; CHE, H; CAO, J; YANG, L; ZHU, C; JIANG, W. Antioxidant Properties of the *Mung Bean* Flavonoids on Alleviating Heat Stress. *Public library of science* v. 6, n. 6, 2011

CASSARINO, D S; BENNETT, J P. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. **Brain Research Review**, v. 29, n. 1, p. 1–25, 1999.

CASTELO, A P C C B N. Gastroprotective effect of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae): involvement of sensory neurons, endogenous nonprotein sulfhydryls, and nitric oxide. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 6, p.1411-1415, 2009.

CARLINI, A E. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p.501-512, 2003.

CHAUHAN, V; CHAUHAN, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, n. 3, p. 195–208, 2006.

CHÁVEZ, M I; DELGADO, G. Isolation and Relay Synthesis of 1-Hydroperoxy Diacetyl Hederagenin, a Novel Triterpenoid Derivative from *Serjania triquetra* (Sapindaceae). Biogenetic Implications. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 13, p.3869-3878, 1994.

COELHO, R G; SOMMERFELD, O S; CARDOSO, C A L; HONDA, N K. **Atividade antioxidante e teores de flavonoides e fenólicos totais das infusões de *Serjania erecta* Radlk**. 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007

CROUCH, P J, HARDING, S M E; WHITE, A R; CAMAKARIS, J; BUSH, A I; COLIN, L. Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n.2 , p.181-198, 2008.

DEMARIN, V; ZAVOREO, I; KES, V B; SIMUNDIC, A M. Biomarkers in Alzheimer's disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 5, p.773-778, 2011

DU, Q; LI, B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens* by high-speed counter-current chromatographic separation–DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity. **Food Chemistry**, v. 131, n.4, p. 1181–1186, 2012

EMERIT, J; EDEAS, M; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 58, n.1,p.39-46, 2004.

EKABO, O A; FARNSWORTH, N R. Antifungal and Molluscicidal Saponins from *Serjania salzmanniana*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p.431-435, 1996

FERNANDES, R S; COSTA, T R; MARCUSSI, S; BERNARDES, C P; MENALDO, D L, GONZALEZ, R; PEREIRA, P S; SOARES, AM. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 17, n. 1, p.85-93, 2011.

FERRARI, A. β -Amyloid Induces Paired Helical Filament-like Tau Filaments in Tissue Culture. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p.40162-40168, 2003.

FERRUCI, M S. Cytotaxonomy of Sapindaceae with special reference to the tribe Paullinieae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p.941-946, 2000.

FINKEL, T; HOLBROOK, N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6908, p.239-47, 2000.

FOGLIO, M A; QUEIROGA, C L; SOUSA, I M; RODRIGUES, R A F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p.1-8, 2006.

FORLENZA, O V. Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.32, n.3, p.137-148, 2005

FREITAS, I C C; PAULA; K C C; SOARES, J L S; PARENTE, A C M. Convivendo com o portador de Alzheimer: perspectivas do amiliar cuidador. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 4, p.508-513, 2008

FROZZA, R L. CITOXICIDADE DOS PEPTIDEOS AB25-35 E AB1-42 EM CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2008

GAO, Y; ZHANG H W; QIAO, H I ;WANG, W; CHANG, J B. Protective effect of 3-butyl-6-bromo-1(3H) isobenzofuranone on hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells. **Brain Research**, v. 1358, p. 239-247, 2010

GARCIA, R C T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo** 138 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GE, Y S; TENG, W; ZHANG, C. Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells. **Chinese Medical Journal**, v. 122, n.6, p. 716-724, 2009.

GIORGETTI, M; NEGRI, G; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - A estudy of historical sources from the 16th to 19th century. **Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p.338-347, 2007.

GOEDERT, M; SPILLANTINI, M G. A century of Alzheimer's disease. **Science**, v. 314, n.5800, p. 777-781, 2006

GOVINDARAJAN, R; SINGH, DP; RAEAT, AK S. Higher performance lipid chormatografhi method for the quantification os phenolic in "Chyavanprash" a potent Ayuverdic drug. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 527-532, 2007

GREENE, L A; TISCHLER, A S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v. 73, n. 7, p. 2424-2428, 1976.

GUARIM NETO, G; SANTANA, S R; SILVA, J V B. Notas etnobotânicas de espécies de sapindaceae jussieu. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 3, p.327-344, 2000

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J M C. **Free Radicals in Biology and Medicin**, 4th ed., New York, Oxford University Press, 2007.

HALPERN, J H. Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n.2, p.131-138, 2004.

HAMAGUCHI, T; ONO, K; MURASE, A; YAMADA, M. Phenolic Compounds Prevent Alzheimer's Pathology through Different Effects on the Amyloid- β Aggregation Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2257-2565, 2009

HENRIQUES, A G S C. **The effect of cellular stress on the Alzheimer's amyloid recursor protein**. 78 f. Dissertação Mestrado - Universidade de Aveiro, 2008.

HOWES, M J; PERRY, N S L; HPUGHTON, P J. Plants with Tradiocional uses and Activities relevant to the management of alzheimer's disease and other cognitive disordes.**Phytotherapy Research**, v. 17, n. 1, p.1-18, 2003.

HUMPEL, C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 1, p.26-32, 2011.

IGLESIAS, J; ABERNETHY, V E; WANG, Z; LIEBERTHAL, W; KOH, JS; LEVINE, J S. Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS. **The American journal of physiology**, v. 277, 711-722, 1999.

ISCHIROPOULOS, H; BECKMAN, J S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 163–169, 2003.

IVERSEN, L L; MORTISHIRE-SMITH, R J; POLLACK, S; SHEARMAN, M S. The toxicity in vitro of fl-amyloid protein. **Biochemical Journal**, v. 311, p.1-16, 1995.

JANG, J H; ARUOMA, O I; JEN, L S; CHUNG, H Y; SURH, H J. Ergothioneine rescues pc12 cells from β -amyloid-induced apoptotic death. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 36, n. 3, p. 288 – 299, 2004.

JI, W; HA, I. Drug Development for Alzheimer's Disease: Recent Progress. **Experimental Neurobiology**, v. 19, n.3 p.120-131, 2010

JI, Z; DONG, T T X; YE, W C; CHOI, R C; LO, C K; TSIM, W K. Ginsenoside Re attenuate β -amyloid and serum-free induced neurotoxicity in PC12 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p.48-52, 2006.

JIN, D Q; PARK, BC; LEE, J S; CHOI, H D; LEE, Y S; YANG, J H; KIM, J A. Mycelial extract of *Cordyceps ophioglossoides* prevents neuronal cell death and ameliorates beta-amyloid peptide-induced memory deficits in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p.7, 1126–1129, 2004.

KAUFFMAN, T. L. Manual de reabilitação geriátrica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KEIL, U; MARQUES, C A; STROSZNADJER, J B; SPAHN, F M; MULLER, W E; ECKERT, A. Elevated nitric oxide production mediates β -amyloid-induced mitochondria failure. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 48, p.631-634, 2004.

KELLY, G S. *Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n. 3, p.293-302, 2001.

KGATLE, D. **Isolation and characterization of antioxidants compounds from *Combretum apiculatum* dub *apiculatum*: subst *apiculatum* leaf extracts.** 78 f. Dissertação (Mestrado) - Universiteit Van Pretoria, V, 2007.

KIAER, C; THAMS, P. Serum albumin protects from cytokine-induced pancreatic b cell death by a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. **Endocrine**, v. 35, n.3, p. 325-332, 2009.

KIM, H J; LEE, K W; LEE, H J. Protective Effects of Piceatannol against Beta-Amyloid-Induced Neuronal Cell Death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, p. 473-482, 2007.

KIM, H S; LIM, J Y; SUL, D; HWANG, B Y; WON, T J; HWANG, K W; PARK, S Y. Neuroprotective effects of the new diterpene, CBNU06 against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of NF-kappaB signaling pathway in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 622, p. 25-31, 2009.

KIM, J H; LEE, B C; KIM, J H; SIM, G S; LEE, D H; LEE, K E; YUN, Y P; PYO, H B. The Isolation and Antioxidative Effects of Vitexin from *Acer palmatum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 2, p. 195-202, 2005

KIM, M; LEE, J; SEONG, A; LEE, Y; KIM, Y; BAEK; H; KIM, Y J; JUN, W J; YOON, H G. Neuroprotective effects of *Eriobotrya japonica* against β -amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n.4, p.780-784, 2011.

KIM, Y C; JUN, M; JEONG, W S; CHUNG, S K. Antioxidant Properties of Flavone C-Glycosides from *Atractylodes japonica* Leaves in Human Low-density Lipoprotein Oxidation. **Journal of food science** v. 70, n. 9, 2005

KLEIN, W L. A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. **Neurochemistry International**, v. 41, n.5, p.345-352, 2002.

KRUMA, N I; BRUCE-KELLER, A J; BREDESEN, D; WAEG, G; MATTSON, M P. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 13, p. 5089-5100, 1997.

KUMAR, V. Potential Medicinal Plants for CNS Disorders: an Overview. **Phytoterapy Reserach**, v. 20, n.12, p.1023-1035, 2006.

LATTE, K P; KOLODZIEJ, H. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds from *Pelargonium reniforme*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52 n.15, p. 4899-4902, 2004.

LECANU, L; GREESON, J; PAPADOULOS, V. Beta-Amyloid and Oxidative Stress Jointly Induce Neuronal Death, Amyloid Deposits, Gliosis, and Memory Impairment in the Rat Brain. **Pharmacology**, v. 76, p.19-33, 2006

LEE, C; PARK, G H; KIM, C Y; JANG, J H. [6]-Gingerol attenuates b-amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n.6, p. 1261–1269, 2011

LEE, D C; MASON, C W; GOODMAN, C B. Hydrogen peroxide induces lysosomal protease alterations in PC12 cells. **Neurochemical Research**, v. 32, n.9, p. 1499–1510, 2007

LI, M H; JANG, J H; SUN, B; SURH, Y J. Protective Effects of Oligomers of Grape Seed Polyphenols Against β -Amyloid-Induced Oxidative Cell Death. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1030, p. 317-329, 2004.

LI, M; SUNAMOTO, M; OHNISHI, K; ICHIMORI, Y. M. β -Amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity. **Brain Research**, v. 720, p. 93-100, 1996.

LIMA, M R F; LUNA, J S; SANTOS, A F; ANDRADE, M C C; SANT'ANA, A E G, GENET, J P; MARQUEZ, B; NEUVILLE, L; MOREAUB, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n.1-2 , p.137-147, 2006.

LIN, Y P; CHEN, T Y; TSENG, H W; LEE, M H; CHEN, S T. Neural cell protective compounds isolated from *Phoenix hanceana* var. formosana. **Phytochemistry**, v. 70, n.9, p.1173–1181, 2009.

LIN, SY; DE, L L; KWAN, H S. *Eleutherococcus senticosus* as a crude medicine: Review of biological and pharmacological effects. *J. Med. Plants Res.* 5, 5946-5952, 2011.

LIU, R; ZHANG, T; YANG, H; LAN, X; YING, J; DU, G. The Flavonoid Apigenin Protects Brain Neurovascular Coupling against β -Amyloid₂₅₋₃₅-Induced Toxicity in Mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 24, p.85-100, 2011.

LOPEZ, O L. The Growing Burden of Alzheimer's Disease. **The American Journal of Managed**, v. 17, n. 13, p.1-11, 2011.

MA, W; YUAN, L; YU, H; DING, B; XI, Y; FENG, J; XIAO, R. Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by β -amyloid peptides 25–35 in PC12 cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.28, n.4, p. 289-295, 2010.

MACCIONI, R B; MUÑOZ, J P; BARBEITO, L. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. **Archives of Medical Research**, v. 32, n.5, p.367-381, 2001

MACHADO, H; NAGEM, T J; PETERS, V M; FONSECA, C S; OLIVEIRA, T.T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MCCLATCHEY, W C; MAHADY, G B; BENNETT, B C; CHIELS, L; SAVO, V. Ethnobotany as a Pharmacological Research Tool and Recent Development in CNS-active Products from Ethnobotanical Sources. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 123, n. 2, p.239-254, 2009.

MCCURDY, C R; SCULLY, S S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v. 78, n.5, p.476-484, 2005.

MIRANDA, S; OPAZO, C; LARRONDO, L F; MUÑOZ, F R; LEIGHTON, F; INESTROSA, N. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid b-peptide in Alzheimer's disease. **Progress In Neurobiology**, v. 62, n.6, p.633-648, 2000

MONJI, A; UTSUMI, H; UEDA, T; IMOTO, T; YOSHIDA, I; HASHIOKA, S; TASHIRO, K; RASHIRO, N. The relationship between the aggregational state of the amyloid-b peptides and free radical generation by the peptides. **Neurochemistry**, v. 77, p.1425-1432, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n.1/2, p.55-63, 1983.

MORAES, L T. Prospecção de substâncias ativas de *Serjania erecta* Radlk como estimulantes da memória. Dissertação de Mestrado Biotecnologia. Universidade de Ribeirão Preto, 2008.

MUNOZ, D G; FELDMAN, H. Causes of Alzheimer's disease. **Canadian Medical Association or Its Licensors**, v. 162, n. 1, p.65-72, 2000.

MUTHAIYAH, B; ESSA, V C; CHAUHAN, A. Protective *Effects of Walnut* Extract Against Amyloid Beta Peptide-Induced Cell Death and Oxidative Stress in PC12 Cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n.11, p.2096-2103, 2011.

NASSIF, M C. TOXICIDADE INDUZIDA PELOS PEPTIDEOS AB25-35 E AB1-42 EM MODELO DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2006.

NIJVELDT, R J; NOOD, E V; HOORN, D E C; BOELENS, P G; NORREN, K; LEEUWEN, AM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n.4, p. 418-425, 2001.

NUNOMURA, A; CASTELLANI, R J, ZHU, X; MOREIRA, P I; PERRY, G; SMITH, M A. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.65, n.7, p. 631–641, 2006.

PANOSSIAN, A G. Adaptogens Tonic Herbs for Fatigue and Stress. **Natural Pharmacy**, v. 7, n. 4, p.327-331, 2003.

PAPPOLLA, M A; CHYAN, Y J; OMAR, R A; HSIAO, T K; PERRY, G; SMITH, M A; BOZNER, P. Evidence of Oxidative Stress and *in vivo* Neurotoxicity of β -Amyloid in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease A Chronic Oxidative Paradigm for Testing antioxidant Therapies *in vivo*. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 4, p.871-877, 1988

PARIS, D; MATHURA, V, GHEZALA, A I, ABDELAHAD, D B; PATEL, N; BACHMEIER, C; MULLAN, M. Flavonoids lower Alzheimer's A β production via an NF κ B dependent mechanism. **Bioinformation**, v.6, n.6, 2011.

PARK, S Y; KIM, H S; CHO, E; KWON, BY; PHARK, S; HWANG, K; SUL, D. Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2881–2887, 2008

PENG, X; ZHENG, Z; CHENG, K W; SHAN, F; REN, G X, CHEN, F. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. **Food Chemistry**, v. 106, n.2, p. 475-481, 2008.

PETERSON, J e DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p.1995-2018, 1988

POON, H F B S; CALABRESE, V; SCAPAGNINI, G; BUTTERFIELD, A. Free radicals and brain aging. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 20, p.329-359, 2004.

PORTH, C. M. Fisiopatologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1162-1163, 2002

QIN, X Y; CHENG, Y; YU, L C. Potential protection of curcumin against intracellular amyloid β -induced toxicity in cultured rat prefrontal cortical neurons. **Neuroscience Letters**, v. 480, n.1, p.21-24, 2010.

QUINN, J; DAVIS, F; WOODWARD, W R; ECKENSTEIN, F. β -Amyloid Plaques Induce Neuritic Dystrophy of Nitric Oxide-Producing Neurons in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Experimental Neurology**, v. 168, n.2, p.203-212, 2001.

RASKIND, M A. Alzheimer's disease: treatment of noncognitive behavioural abnormalities. **Journal of Psychopharmacology: the fourth generation of progress**, p. 1427-35, 1995.

REBELATTO, J R; MORELLI, J G S. Fisioterapia geriátrica: a prática de assistência ao idoso. São Paulo: editora Manole, 2004.

RIBEIRO, A B; BOLZANI, V S; YOSHIDA, M; SANTOS, L S; EBERLIND, M; SILVA, D. New Neolignan and Antioxidant Phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3, p.526-530, 2005.

ROCCHI, A; PELLEGRINI, S; SICILIANO, G; MURRI, L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. **Brain Research Bulletin**, v. 61, n.1, p.1-24, 2003

RODGERS, A B. Alzheimer: Unraveling the Mystery. Disponível em: www.nia.nih.gov/Alzheimer. Acesso em: 25 jan 2011.

RODRIGUES, E; CARLINI, A. Plants used by a Quilombola group in Brazil with potential central nervous system effects. **Phytotherapy Research**, v. 18, n.9, p.748-753, 2004.

RODRÍGUEZ, S M. Causes versus effects: the increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 10, n. 5, p.683-691, 2010.

ROUT, S P; CHOUDARY, K A; KAR, D M; JAIN, L D A. Plants in traditional medicinal system - future source of new drugs. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p.179-189, 2009.

SALLOWAY, S; CORREIA, C. Alzheimer disease: Time to improve its diagnosis and treatment. **Level and clinic journal of medicine**, v. 76, n. 1; 2009.

SANTOS, J S. **Desenvolvimento e otimização de metodologias para a determinação de nitrogênio**. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

SAYRE, M L; PERRY, G; SMITH, M A. Oxidative Stress and Neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicolog**, v. 21, n.1, p.172-188, 2008.

SCHMITT-SCHILLIG, S; SCHAFFER, S; WEBER, C C; ECKERT, E G, MÜLLER, W E. Flavonoids and the aging brain. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.1, p. 23-26, 2005

SERENIK, A; VITAL, M A B F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos RS. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1, p.25-30, 2008.

SEVERIANO, M V N; DANTAS, I C; SILVA, J C; FELISMINO, D C. Levantamento das plantas medicinais cultivadas no centro de estudo e pesquisa malaquias da Silva Amorim. **Revista de Biologia e Fármacia**, v. 4, n. 1, p.93-101, 2010.

SIMÕES, C M O et. al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1ª ed., UFRGS editora, 1999.

SHERKI, Y G; MELAMED, E; OFFEN D. Antioxidant Treatment in Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 21, n.1, p. 1-11, 2003.

SHIBANO, M; KAKUTANI, K; TANIGUCHI, M; YASUDA, M; BABA, K. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their α -glucosidase-inhibitory activity. **The Journal of Natural Medicines**, v. 62, n.3, p. 349-353, 2008.

SMALL, G W; RABINS, P V; BARRY, PP. Alzheimer disease and related disorders: consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer. **The Journal of the American Medical Association**, v. 278, n. 16, p.0-11, 1997.

SMITH, M A C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p.3-7, 1999.

SOUZA, K C B. Avaliação biológica de preparação obtidas a partir das inflorescências de *Achyrocline satureoides* (Lam). Tese de doutorado, 2002

SPANVELLO, R M. Avaliação da atividade de nucleotidasas e parâmetros do estresse oxidativo em paciente com esclerose múltipla e em modelo experimental de desmielinização em ratos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2009

STASI, L C D; LIMA, C A H. **Plantas Medicinais na amazônia e na mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2002. 592 p.

SUH, Y; CHECLER, F. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 3, p.469-525, 2002

SWERDLOW, R H. Pathogenesis of Alzheimer's disease. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 3, p.347-359, 2007

TILLEMENT, L; LECANU, L; PAPADOPOULOS, V. Alzheimer's disease: Effects of β -amyloid on mitochondria. **Mitochondrion**, v. 11, n.1, p.13-21, 2011

TILLEY, L; MORGAN, K; KALSHEKER, J, K. Genetic risk factors in Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 51, n.6, p.293-304, 1988

TRAN, M H; YAMADA, K; OLARIU, A; MIZUNO, M; REN, X H; NABESHIMA, T. Amyloid β -peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. **The FASEB Journal**, v. 15, n.8, p.1407-1409, 2001

UTTARA, B; SINGH, A V; ZAMBONI, P; MAHAJAN, R T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, n. 7, n.1, p.65-74, 2009

VAUZOUR, D; VAFEIADOU, K; MATEOS, A R; RENDEIRO, C; SPENCER, J P. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. **Genes and Nutrition**, v.3, n. 3/4, p. 115-126, 2008

WANG, B; WANG , X M; FU, H; LIU, G X. Protective Effects of Wu-Zi-Yan-Zonf-Fang on Amyloid beta -induced damage *in vitro* and *in vivo*. **The Pharmaceutical Society of Japan**, v. 129, n. 8, p.941-948, 2009

WANG, H; XU, H; DYCK, LD; LI, X M. Olanzapine and Quetiapine Protect PC12 Cells From β -Amyloid Peptide_{25–35}- Induced Oxidative Stress and the Ensuing Apoptosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, n.4, p.572–580, 2005

WANG, L; ZHANG, X; WANG, H; QI, L, LOU, Y. Neuroprotective effects of Icaritin against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cultured rat neuronal cells via estrogen-dependent pathway. **Neuroscience**, v. 145, n.3, p.911-922, 2007

WESTERINK, R H.; EWING, A G. The PC12 cell as model for neurosecretion. **Acta Physiologica**, v. 192, n.2, p.273–285, 2008

WESTERINK, R H; KLOMPMAKERS, A A; WESTENBERG, H G; VIJVERBERG, H P. Signaling Pathways Involved in Ca^{2+} and Pb^{2+} Induced Vesicular Catecholamine Release From Rat PC12 Cells. **Brain Research**, v. 957, n. 1, p. 25-36, 2002

WILLIAMS, T L; SERPELL, L C. Membrane and surface interactions of Alzheimer's A β peptide – insights into the mechanism of cytotoxicity. **Febs Journal**, v. 278, n.20, p.3905-3917, 2011.

WINSTON, D. Harmony Remedies: An Overview of Adaptogens. **Adaptogenic Materia Medica**, p. 1-8, 2004

XIAONING, B. Alzheimer Disease: Update. Journal of the American **Osteopathic Association**, v. 110, p.S3-S9, 2010

ZADEH, K Z; SHYTLE, R D;BAI, Y, TIAN, J, HOU, H, MORI, T; ZENG, J, OBREGON, D; TOWN, T, TAN, J. Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer's disease β -amyloid production. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 547-588, 2009

ZEPEDA, A G; WU, R S Z; BROWN, M; WU, Y; KHAN, I; LINK, C D; ZHAO, B, LUO, Y. Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **BMC Neuroscience**, v. 6, n. 54, p. 1-9, 2005

ZIELINSKA, D; ZIELINSKI H. Antioxidant activity of flavone C-glucosides determined by updated analytical strategies. **Food Chemistry**, v. 124, n .2 p. 672-678, 2011.

ZHOU, Y, LI, W, XU, L, CHEN, L. In *Salvia miltiorrhiza*, phenolic acids possess protective properties against amyloid β -induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 31, n.3, p- 443-452, 2011.

ZHU, J T T; CHOI, R C Y; CHU, J K Y; CHEUNG, A W H; GAO, T Q; LI, J; JIANG, Z Y; DONG, T T X; TSIM, K W K. Flavonoids Possess Neuroprotective Effects on Cultured Pheochromocytoma PC12 Cells: A Comparison of Different Flavonoids in Activating Estrogenic Effect and in Preventing α -Amyloid-Induced Cell Death. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.55, n.6, p. 2438-3445, 2007.