

ANDRÉIA GOMES BEZERRA

**Avaliação do efeito dos extratos de *Panax ginseng*,
Turnera diffusa e *Heteropterys aphrodisiaca* sobre a
apoptose de células do Sistema Nervoso Central**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2007

Bezerra, Andréia Gomes

Avaliação do efeito dos extratos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca* sobre a apoptose de células do Sistema Nervoso Central./Andréia Gomes Bezerra -- São Paulo, 2007

xi, 101p

Tese de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* and *Heteropterys aphrodisiaca* extracts' effects evaluation on Central Nervous System's cells apoptosis.

1. Plantas medicinais. 2. Adaptógenos. 3. Nootrópicos. 4. Apoptose.
5. Envelhecimento.

ANDRÉIA GOMES BEZERRA

**Avaliação do efeito dos extratos de *Panax ginseng*,
Turnera diffusa e *Heteropterys aphrodisiaca* sobre a
apoptose de células do Sistema Nervoso Central**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Elisaldo Luiz de Araújo Carlini

Co-orientadora: Profa. Dra. Soraya Soubhi Smali

São Paulo

2007

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com bolsa de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Verás que um filho teu não foge à luta...”.

Hino Nacional Brasileiro (Joaquim Osório Duque Estrada)

“Porque eu sou do tamanho do que vejo,

E não, do tamanho da minha altura...”.

O Guardador de Rebanhos/ Alberto Caeiro (Fernando Pessoa)

*Aos meus queridos pais, Manoel e Salete,
grandes exemplos de luta diante da vida.*

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlini, por me ensinar o que é ciência e, principalmente, pelo seu carinho paterno. Foi uma grande honra tê-lo como meu orientador.

À Profa. Soraya, pela co-orientação, amizade e exemplo. Aprendi sobre a apoptose e também aprendi que podemos ter esperança e lutar por um mundo melhor.

Aos Professores membros da banca de suficiência, Dra. Deborah Sucheki, Dr. José Roberto Leite e Dr. Ricardo Tabach, pelas valiosas sugestões.

Às Professoras da banca examinadora da tese, Dra. Bagnólia Araújo da Silva, Dra. Guiomar Silva Lopes e Dra. Sônia Soares da Costa e ao suplente, Dr. Fúlvio Rieli Mendes, pela avaliação e correções.

Ao Prof. Manuel de Jesus Simões, por permitir a utilização do seu laboratório de histologia, e ao Paulinho, pelo apoio técnico e pelas longas conversas, sempre agradáveis e divertidas.

À Profa. Maria Teresa Lima Landman, por permitir a utilização do liofilizador do seu laboratório, e ao Joaquim (o Joca) pelo grande auxílio técnico e por todo o aprendizado que me proporcionou.

À minha mãe Salete e ao meu pai Manoel, exemplos de força, determinação e dedicação, por me dar todo suporte, amor e incentivo. Vocês são o meu alicerce.

Aos meus irmãos Kaká, Éna e Digo, à minha sobrinha Lê, às minhas avós, “Cristal” e Maria, à tia Anália e a toda minha família pelo carinho, apoio, incentivo e paciência nas ausências de fim-de-semana e festas.

Ao Cris (o Tchuco!) pelo companheirismo nessa fase tão importante e ao mesmo tempo complicada. Obrigada pelo amor, carinho, apoio, paciência... Obrigada por tudo. Você é e sempre será muito especial!

À Dona Vera, por ter sido uma mãe e uma grande amiga. Obrigada pelo carinho... e por seus almoços deliciosos!

À Gina e ao Maurício pela ajuda fundamental na parte fitoquímica, explicações e paciência. Ao Fúlvio, pelas correções e sugestões da tese. Um beijo no coração da Yone e da Zila, que estiveram ao meu lado quando mais precisei. Todos foram grandes amigos.

A todo o pessoal do CEBRID, Aline, Claudinha, Jane, Mara, Márcia, Paty pelo auxílio nos serviços prestados e pelos bons momentos de convivência, especialmente ao Herbert pela ajuda fundamental no inglês e pelo bom-humor inigualável!

Aos amigos da Farmacologia, Hanako, Tati, Rodrigo e “Meninas felizes” (Ju e Mari), pela convivência alegre e ao Cícero e Lourdes pelo auxílio técnico. Agradeço especialmente a Anitchas e a Pris, pela ajuda nos experimentos, por me ensinarem tudo o que sabiam, pelo carinho e amizade. Vocês foram uns anjos.

Aos amigos da Pós-graduação, Alberto, Beth, Bruno, Daniel, Francisco Godoi, Francisco Dubiela, Grazi, Lúcio, Lyvia, Melina, Paulinha, Perla, Raquel, Sérgio, Tati, Tharcila, pelos conselhos e por tornarem mais leves e divertidos os dias no Departamento. Em especial agradeço a Luzinha, pelo auxílio com o TUNEL e pelo exemplo de fé.

Às “meninas” Akiko, Andrezza, Bruna, Claudinha, Dri, Gabizinha, Ivanda, Juliana, Karina, Nadine, Suzi, pelas divertidas conversas, paciência e ajuda sem as quais não conseguiria prosseguir.

À Shica, que foi uma grande amiga nessa reta final... Obrigada por tudo: sugestões, correções, teto, batatas fritas, choros e risos... Não há palavras para expressar tudo... um beijo enorme!

Aos queridos de Jundiaí, Andréia (Bãr), Camila, Danilo, Luciana e Rina pelo carinho, incentivo e, principalmente, pela indispensável amizade durante todos esses anos, apesar da distância.

À Cris da biblioteca, sempre solícita, por tirar nossas dúvidas e nos ajudar sempre (ah, e pela organização das festas juninas!).

À Nereide, Júlio e Márcio por resolverem as questões burocráticas da pós - graduação e pela atenção não somente com os “prazos” e cursos.

Aos funcionários do setor de pesquisas básicas (Cris, Gilbertinho, Tomé, Ricardo, Marilde) que tornaram possível a realização de diversos trabalhos. Ao Marcelo (*in memoriam*) por tornar os experimentos leves e risonhos. Saudades.

A todos os professores e pesquisadores do Departamento.

A todos os funcionários do departamento que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq, AFIP e CEBRID, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – A Apoptose.....	1
1.2 – O Envelhecimento.....	4
1.3 – Terapêutica Atual: Nootrópicos e Adaptógenos.....	6
1.4 – Plantas medicinais com Efeito Nootrópico e/ou Adaptógeno.....	7
1.5 – Plantas Medicinais e Apoptose.....	9
1.6 – <i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.....	10
1.7 – <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.....	13
1.8 – <i>Heteropterys aphrodisiaca</i> O. Mach.....	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 – Material Botânico	19
3.2 – Preparo dos Extratos Hidroalcoólicos	19
3.3 – Análise Fitoquímica	20
3.3.1 – Reações de Caracterização de Classes Químicas com Base no Uso de Reagentes Específicos.....	20
3.3.2 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	22
3.3.3 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	23
3.4 – Experimentos <i>in vivo</i>	25
3.4.1 – Animais.....	25
3.4.2 – Tratamento dos Animais.....	25
3.4.3 – Processamento Histológico dos Cérebros Perfundidos.....	26
3.4.4 – Análise da Apoptose pela Reação de Imuno-histoquímica do TUNEL.....	26
3.5 – Experimentos <i>in vitro</i>	28
3.5.1 – Cultura de Astrócitos	28
3.5.2 – Tripsinização.....	28
3.5.3 – Plaqueamento dos Astrócitos	29
3.5.4 – Reação de Hoechst 33342 (Avaliação da Proliferação e Apoptose Celular)	29
3.5.6 – Microscopia de Fluorescência.....	30

3.6 – Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 – Análise Fitoquímica.....	31
4.1.1 – Reações de Caracterização.....	31
4.1.2 – Cromatografia em Camada Delgada.....	32
4.1.3 – Determinação de Compostos Fenólicos por CLAE/UV/DAD.....	35
4.2 – Experimentos in vivo.....	41
4.2.1 – Análise da Apoptose pela Reação de Imuno-histoquímica do TUNEL.....	41
4.3 – Experimentos in vitro.....	43
4.3.1 – Avaliação dos Efeitos dos Extratos nos Astrócitos pela Reação de Hoechst.....	43
4.3.2 – Avaliação do Efeito Protetor do Extrato de Panax ginseng frente a Agentes Apoptóticos.....	48
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58
8. ANEXOS.....	81
ABSTRACT.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAB – Diaminobenzidina

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DNA – (Deoxyribonucleic acid) Ácido desoxirribonucléico

EDTA – (EthyleneDiamineTetrAcetic acid) Ácido etilenodiamino tetra-acético

EP – Erro-padrão

GSH – Glutathiona peroxidase

NS – Não significativo

PBS – (Phosphate Buffer Saline) Tampão fosfato

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

TdT – (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) Enzima Transferase desoxinucleotídeo Terminal

TNF α – (Tumor Necrosis Factor alpha) Fator de Necrose Tumoral alfa

TUNEL – (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) Ligação de dUTP-biotina mediada por TdT)

UV – Ultravioleta

Unidades de medidas utilizadas:

cm² – centímetros quadrados

kg – quilograma

mg – miligrama

ml – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

nM – nanomolar

nm – nanômetro

°C – graus Celsius

rpm – rotações por minuto

UI – Unidade Internacional

l – lambda

mg – micrograma

ml – microlitro

mm – micrômetro

Fórmulas e símbolos químicos utilizados:

Na⁺ – íon sódio

K⁺ – íon potássio

Cl⁻ – íon cloreto

Ca⁺⁺ – íon calcio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

NH₄OH – hidróxido de amônio

Na₂SO₄ – sulfato de sódio

MeOH – metanol

KOH – hidróxido de potássio

FeCl₃ – cloreto férrico

AlCl₃ – cloreto de alumínio

CHCl₃ – clorofórmio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo de retenção e absorbâncias de padrões fenólicos (Sigma), analisados nas mesmas condições cromatográficas.

Tabela 2 – Classes químicas detectadas nos ensaios químicos de caracterização com base no uso de reagentes específicos, dos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca*.

Tabela 3 – Classes químicas detectadas por cromatografia em camada delgada dos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca*.

Tabela 4 – Classes químicas detectadas no extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos.

Tabela 5 – Classes químicas detectadas no extrato hidroalcoólico de *Turnera diffusa* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos.

Tabela 6 – Classes químicas detectadas no extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos.

Tabela 7 – Porcentagem de células TUNEL-positivas nas diferentes regiões do hipocampo (CA1, CA3, Giro denteado dorsal e Giro denteado ventral) de 3 grupos de animais idosos tratados com extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* (PG), extrato hidroalcoólico de *Turnera diffusa* (TD) e extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca* (HA), além dos controles (CTL), tratados com água.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias da apoptose.

Figura 2: Raiz de *Panax ginseng*.

Figura 3: Partes aéreas de *Turnera diffusa*.

Figura 4: Raízes e folhas de *Heteropterys aphrodisiaca*.

Figura 5: Metodologia para avaliação da apoptose.

Figura 6: Cromatografia em camada delgada (gel de sílica 60 F₂₅₄) dos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng* (a), *Turnera diffusa* (b) e *Heteropterys aphrodisiaca* (c) para detecção de alcalóides (fase móvel – clorofórmio: dietilamina) e triterpenóides (fase móvel – diclorometano: ácido acético). As substâncias de referência utilizadas foram a lobelina (d) e o acetato de lupeol (e).

Figura 7: Cromatografia em camada delgada dos extratos de *Panax ginseng* (a), *Turnera diffusa* (b) e *Heteropterys aphrodisiaca* (c) para detecção de saponinas (clorofórmio: ácido acético: metanol: água) e iridóides (fase móvel – butanol: ácido acético: água). Uma solução-padrão de saponina (d) foi utilizada como substância de referência.

Figura 8: Cromatograma de *Panax ginseng* obtido por CLAE-DAD em 270 nm.

Figura 9: Cromatograma de *Turnera diffusa* obtido por CLAE-DAD em 270 nm.

Figura 10: Cromatograma de *Heteropterys aphrodisiaca* obtido por CLAE-DAD em 270 nm.

Figura 11: Fotomicrografia do giro denteado (hipocampo) mostrando uma célula apoptótica (seta) corada por Diaminobenzidina (DAB). Notar os corpos apoptóticos no interior da mesma. Ao redor estão as células normais coradas por Hematoxilina de Carrazi. Objetiva de 100X.

Figura 12: Imagem típica de núcleos de astrócitos marcados com Hoechst 33342 e examinados em microscópio de fluorescência. Os núcleos apoptóticos são identificados pelas setas.

Figura 13: Número total de núcleos presentes após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Panax ginseng* (PG) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml.

Figura 14: Número total de núcleos presentes após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Turnera diffusa* (TD) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml.

Figura 15: Número total de núcleos presentes após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Heteropterys aphrodisiaca* (HA) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml.

Figura 16: Porcentagem de núcleos apoptóticos após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Panax ginseng* (PG) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml.

Figura 17: Porcentagem de núcleos apoptóticos após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Turnera diffusa* (TD) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml.

Figura 18: Porcentagem de núcleos apoptóticos após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Heteropterys aphrodisiaca* (HA) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml.

Figura 19: Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* (PG – 100 µg/ml), frente a agentes apoptóticos como: **(A)** a staurosporina (STS – 250 nM), **(B)** o etanol (ETN – 2,5%) e **(C)** a cafeína (CAF – 10 mM). A porcentagem de apoptose desses agentes foi comparada com o grupo controle (CTL).

RESUMO

Plantas medicinais como *Panax ginseng* C.A. Mey, *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. e *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. são amplamente utilizadas pela população como tônicas e para melhora da cognição. Inicialmente realizou-se uma análise geral das principais classes químicas presentes nos extratos hidroalcoólicos das três plantas, por meio de Reações de Caracterização e Cromatografia de Camada Delgada. Através dessas técnicas detectou-se a presença de flavonóides, taninos e saponinas no *Panax ginseng* e na *Heteropterys aphrodisiaca*. Além das classes químicas já citadas, a presença de triterpenos foi identificada no extrato de *Turnera diffusa*. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) permitiu a caracterização dos compostos fenólicos encontrados nos três extratos. Além disso, o presente estudo propôs verificar se essas plantas poderiam ter algum efeito protetor na morte celular por apoptose, podendo este ser um dos mecanismos de ação dessas substâncias. Utilizando-se a reação de TUNEL, não foram observadas diferenças entre a porcentagem de células apoptóticas de ratos idosos e jovens controles. Os animais idosos tratados cronicamente com os extratos das três plantas também não diferiram dos animais idosos sem tratamento. Uma curva concentração-tempo-efeito foi feita em cultura de astrócitos de ratos incubadas com os três extratos hidroalcoólicos das plantas. O extrato de *Panax ginseng* foi atóxico em todos os tempos e concentrações testados. A *Turnera diffusa* demonstrou toxicidade na concentração de 1000 µg/ml, a partir de 6 horas de incubação e o extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca*, a partir de 24 horas de incubação, na mesma concentração. Os três extratos não influenciaram a proliferação dos astrócitos em cultura. Para verificar se o extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* protegia os astrócitos da apoptose induzida pela staurosporina, cafeína ou etanol, as células foram previamente incubadas com uma concentração de 100 µg/ml do extrato. Os dados sugerem que em astrócitos de rato, o extrato hidroalcoólico das raízes de *Panax ginseng* não apresentou efeito antiapoptótico no modelo de indução de apoptose por staurosporina e que, ao contrário do esperado, os extratos hidroalcoólicos das folhas de *Turnera diffusa* e das raízes de *Heteropterys aphrodisiaca* induziram apoptose de maneira não dependente de concentração. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que estes extratos possam exibir atividade antiapoptótica em outras células ou em outros modelos experimentais de apoptose, ainda não investigados.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – A Apoptose

A morte celular por apoptose é descrita como um mecanismo de controle de eliminação celular, regulando a população de células animais. A etimologia do vocábulo “apoptose” é grega: deriva de ‘apo’ – *de* + ‘ptosis’ – *queda*, e se refere à queda das folhas das árvores no outono – um evento que ocorre graças a uma morte celular programada fisiológica e apropriada que também implica em renovação. KERR et al. (1972) pretendiam referir-se às características morfológicas e bioquímicas desse evento.

As células também podem morrer por necrose, mas é um mecanismo de morte diferente da apoptose. Na necrose, há perda do controle do balanço iônico, lise, liberação de constituintes intracelulares e resposta inflamatória que pode lesionar o tecido (LOCKSHIN e ZAKERI, 2004).

A apoptose, por sua vez, consiste de uma seqüência organizada de eventos morfológicos, a saber: 1) perda de volume intracelular com a inibição do sistema co-transporte de Na^+ , K^+ e Cl^- (YU et al., 2001), ocorrendo encolhimento celular; 2) alterações nucleares características, incluindo a condensação da cromatina, tornando-a picnótica (WYLLIE et al., 1980; KERR et al., 1994); 3) ao final do processo de apoptose, em alguns casos verifica-se uma fragmentação celular e a formação dos chamados corpos apoptóticos (ALLEN et al., 1997). Estes são típicos da morte celular por apoptose e podem ser fagocitados rapidamente por células vizinhas.

Há duas vias principais de sinalização que podem desencadear a apoptose: uma é mediada pelos receptores de morte localizados na superfície da célula – também conhecida como via extrínseca; a outra é mediada pela mitocôndria – a via intrínseca (figura 1) (IGNEY e KRAMMER, 2002).

Em ambas as vias, temos a participação da cascata de cisteíno-proteases chamadas de caspases (**cysteine aspartic acid specific protease**), que são

enzimas importantes no orquestramento da morte celular (MARTIN e GREEN, 1995; ALNEMRI et al., 1996).

Há uma variedade de ligantes que podem estimular esses receptores de morte, ativando a via extrínseca da apoptose, como por exemplo, polipeptídeos da família TNF (Tumour Necrosis Factor). Após essa estimulação, a cascata de caspases é ativada desencadeando uma série de reações que levarão à apoptose (IGNEY e KRAMMER, 2002).

A via mitocondrial (ou intrínseca) é ativada por insultos externos ou danos no DNA. Entre estes insultos estão a radiação ionizante, os quimioterápicos, agentes virais, a supressão de hormônios entre outros (KERR e HARMON, 1991). A membrana da mitocôndria é estimulada por membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, ocasionando a liberação do citocromo C e outros fatores apoptogênicos no citosol, que também vão ativar as caspases (HENGARTNER, 2000). A atividade proteolítica das caspases promove uma mudança bioquímica no processo de morte celular, pois as mesmas clivam proteínas como as lamininas e as proteínas do citoesqueleto, que levam, em estágios iniciais da cascata, à formação de protuberâncias (“blebbings”) nas membranas plasmáticas. Em estágios mais avançados, a clivagem pode levar à condensação nuclear e à fragmentação do DNA. A fragmentação do DNA é resultado da ativação de uma endonuclease, a DFF40 ou CAD (desoxiribonuclease ativada por caspase) que tem acesso à cromatina entre as histonas. Em condições normais, a cromatina está protegida da ação enzimática por um inibidor chamado ICAD (WYLLIE, 1980; NAGATA, 2000). Além disso, a ativação de uma cascata de cisteíno-proteases pode clivar reguladores anti-apoptóticos (inativando sua inibição) ou proteínas apoptóticas (catalisando a sua ação), que contribuem para a execução das etapas que levam à morte da célula (ORRENIUS et al., 2003).

As caspases são, portanto, enzimas importantes na ativação e na execução central da apoptose (HENGARTNER, 2000).

A morte celular programada é um evento que está relacionado com a homeostase na regulação fisiológica da população de células animais, exercendo um papel oposto ao da mitose. Assim, a apoptose pode ocorrer nos processos

fisiológicos de tecidos normais em desenvolvimento, como na embriogênese. Tem a função de esculpir estruturas, eliminar estruturas desnecessárias, controlar o número de células totais, eliminar células anormais, defeituosas ou não-funcionais (JACOBSON et al., 1997).

Anormalidades nos mecanismos de apoptose podem ocasionar processos patogênicos. A deficiência na apoptose pode gerar doenças auto-imunes, má-formação congênita e câncer (SAIKUMAR et al., 1999). Já o excesso de apoptose pode estar relacionado à patogênese de doenças neurodegenerativas muito associadas ao envelhecimento, como a doença de Alzheimer (COTMAN e ANDERSON, 1995; MATTSON, 2004), a doença de Huntington (THOMAS et al., 1995; ROSENSTOCK et al., 2004) ou a doença de Parkinson (ZIV et al., 1994).

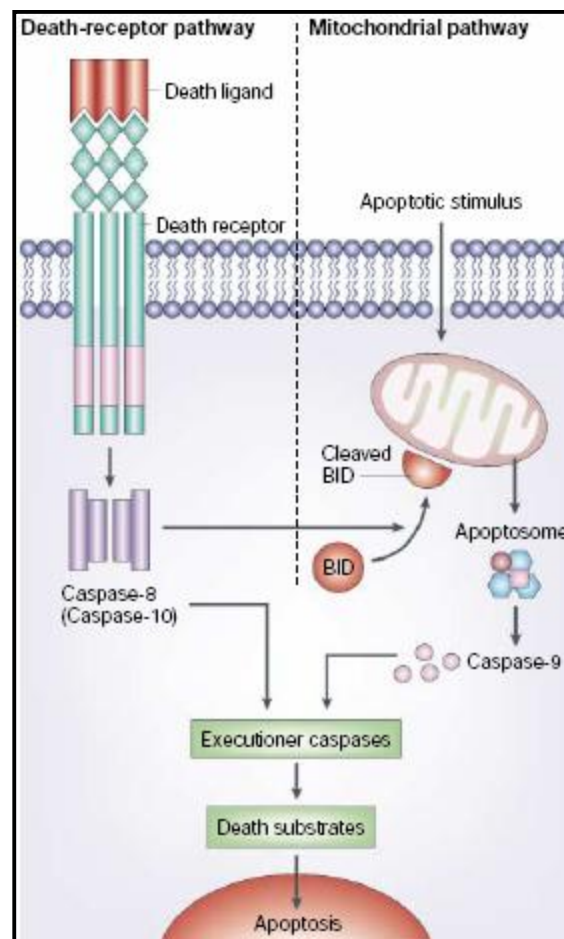


Figura 1: Vias da apoptose (IGNEY e KRAMMER, 2002).

1.2 – O Envelhecimento

De acordo com projeções das Nações Unidas, no ano de 2025 haverá 1,2 bilhões de idosos no mundo, um pouco menos que o dobro da população idosa atual (ONU, 2007).

O processo de envelhecimento provoca uma série de alterações fisiológicas e anatômicas (KNOX, 1994), acarretando modificações neurofisiológicas, tais como: diminuição da cognição, coordenação motora e da acuidade sensorial, lentificação dos reflexos posturais, alterações do sono e humor, entre outras. Conseqüentemente ocorre perda gradativa da memória e das funções cognitivas, tais como atenção, raciocínio, orientação e linguagem (ALBERT, 1994). Ocorre aumento da viscosidade sanguínea, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo cerebral e aporte de glicose e oxigênio, resultando em menor atividade cerebral e queda da cognição (GALDURÓZ et al., 1995). Muitos autores descrevem que no envelhecimento há uma diminuição fisiológica no número total de células em algumas regiões do cérebro (McGEER et al., 1977; VIJAYASHANKAR e BRODY, 1979; McGEER et al., 1984), porém outros autores sugerem que há somente uma perda funcional, não estrutural, dessas células no envelhecimento normal (MORRISON e HOF, 1997). Embora este declínio cognitivo seja muito diferente daquele que se verifica no estado demencial, ainda assim traz grande desconforto no dia-a-dia do idoso, uma vez que compromete suas relações com a sociedade e sua capacidade de trabalho.

Além das alterações neuropsicológicas ocorrem diversas alterações na esfera física, como a diminuição da massa e força muscular, decorrentes da perda de proteínas; diminuição das funções neurais, pela redução do número de axônios medulares e da velocidade de condução nervosa; bem como uma série de alterações dos músculos lisos (LOPES et al., 2004; 2006; 2007) e cardiovasculares (McCARDLE et al., 1991).

Vários mecanismos podem estar envolvidos nessas patologias, como a morte celular por apoptose, anteriormente descrita (STEGE e BOSMAN, 1999) e o estresse oxidativo (FLOYD, 1991; ROSENSTOCK et al., 2004). Estudos relatam

que o estresse oxidativo está intimamente relacionado com a indução e modulação da apoptose (WHITTEMORE et al., 1994; CHANDRA et al., 2000).

O estresse oxidativo ocorre em consequência da ação das espécies reativas de oxigênio, entre outras, também conhecidas como radicais livres. Radicais livres (peróxido de hidrogênio e radical superóxido, por exemplo) são moléculas que apresentam elevada reatividade química que lhes dá a propriedade de reagir com componentes celulares, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, provocando sérios danos celulares. Entre os possíveis danos, podem ser destacados aqueles sobre a membrana celular, decorrentes da oxidação de proteínas e lipídeos, que podem levar à ruptura da célula; e os sobre os ácidos nucléicos, podendo levar à mutação do DNA (WERNIS e LUCCHESI, 1990; MONTINE et al., 2002; CARDOZO-PELAEZ et al., 2002).

No entanto, nem sempre os processos oxidativos são vilões, eles são necessários para realização de diversas funções celulares, como respiração mitocondrial e ação citotóxica de macrófagos; e, por vezes, são gerados como produtos da biossíntese celular. Portanto, um balanço entre a formação de radicais livres e sua inativação é fundamental. Para isso, algumas enzimas antioxidantes exercem o controle da produção e inativação dos radicais livres. São elas, principalmente, a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GSH) que, ao lado de antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas C e E, provenientes da alimentação, promovem um balanço adequado (NOVELLI et al., 1990; ARUOMA, 1994).

Durante o envelhecimento, ocorre diminuição da atividade e expressão destas enzimas antioxidantes em vários sistemas, incluindo o cérebro (SEMSEI et al., 1991; CINI e MORETTI, 1994). Diversas evidências apontam para a importância dos antioxidantes na prevenção de doenças neurodegenerativas e de alterações relacionadas à idade (COYLE e PUTTFARCKEN, 1993; HARMAN, 1994; HIRAMATSU e KOMATSU, 1999; MONTINE et al., 2002; MOOSMANN e BEHL, 2002; DI MATTEO e ESPOSITO, 2003), o que reforça a importância dessa atividade em substâncias para atenuar os déficits decorrentes do envelhecimento.

Assim, existe uma grande necessidade de se obter drogas capazes de amenizar os déficits causados pelo envelhecimento ou que melhorem a qualidade de vida dos idosos.

1.3 – Terapêutica Atual: Nootrópicos e Adaptógenos

A ciência busca tratamentos que diminuam os déficits produzidos durante o envelhecimento e que melhorem a qualidade de vida dos idosos. Existem agentes farmacológicos voltados para a melhora desses déficits, normalmente com ações muito inespecíficas, mas com algumas diferenças que os distinguem:

Nootrópicos: Os nootrópicos são drogas caracterizadas por melhorar o desempenho cognitivo do indivíduo e não possuem uma classe química ou mecanismo de ação específico (BENESOVÁ, 1994). Ao contrário das substâncias adaptógenas, os nootrópicos não promovem um aumento do desempenho físico ou da resistência ao estresse (MENDES, 2005).

É descrito que o Piracetam (GIURGEA, 1976; MÜLLER et al., 1999), uma das drogas pioneiras desta classe de fármacos, age na fluidez da membrana; já outros sintéticos, como o donezepil, a tacrina e a galantamina, agem inibindo a acetilcolinesterase (TAKATORI, 2006). Há ainda, o efeito de antioxidantes, como a vinpocetina e seus derivados (PEREIRA et al., 2003) que indicaram ser eficientes na neutralização de radicais livres em testes *in vitro*.

Adaptógenos: O termo adaptógeno foi inicialmente definido pelo cientista russo LAZAREV, em 1947, como substâncias que aumentam um estado de resistência inespecífica dos organismos após contato com fatores estressantes diversos, promovendo um estado de adaptação à situação excepcional (BREKHMANN e DARDYMOV, 1969; CARLINI, 1995). Podem ainda ser definidos como biorreguladores naturais que aumentam a habilidade do organismo em se adaptar a fatores ambientais e evitar danos decorrentes destes fatores

(PANOSSIAN et al., 1999). Segundo BREKHMANN e DARDYMOV (1969), uma planta ou substância adaptógena deve obedecer aos seguintes requisitos:

1- Mostrar uma atividade não específica, isto é, aumentar o poder de resistência do organismo em relação a agentes nocivos de natureza física, química e biológica.

2- Deve ter uma influência normalizadora, independente da direção da mudança do estado patológico prévio.

3- Deve ser inócua e também não influenciar o funcionamento normal do organismo mais que o necessário.

As substâncias adaptógenas parecem agir através de diferentes sistemas, cujo conjunto de ações seria responsável pelos efeitos benéficos e protetores observados. Sabe-se, por exemplo, que os adaptógenos podem agir aumentando a capacidade do organismo em responder a estímulos estressores, ativando e/ou desativando mediadores da resposta de estresse, como corticosteróides, catecolaminas e o óxido nítrico (PANOSSIAN et al., 1999; REGE et al., 1999). Podem ainda apresentar, de maneira inespecífica, atividade imunomodulatória, hipoglicêmica, antioxidante, entre outras (WAGNER, 1995; DAVYDOV e KRIKORIAN, 2000).

Apesar das diferentes nomenclaturas e possíveis mecanismos de ação dessas substâncias, destaca-se a capacidade de ambas gerarem uma melhora cognitiva geral, principalmente em idosos.

1.4 – Plantas medicinais com Efeito Nootrópico e/ou Adaptógeno

Efeitos Nootrópicos: O termo “nootrópico” surgiu a partir de substâncias sintéticas, porém vários artigos têm descrito a atividade nootrópica de plantas medicinais. O extrato hidroalcoólico do caule de *Equisetum arvense* melhorou o desempenho de animais avaliados na esQUIVA inibitória, efeito atribuído a sua propriedade antioxidante (JUNIOR et al., 2005). Uma fração rica em saponinas, do extrato de *Albizzia lebbbeck*, também demonstrou atividade nootrópica, facilitando a

transmissão noradrenérgica e inibindo a transmissão gabaérgica (CHINTAWAR et al., 2002). Há ainda outros exemplos de plantas descritas na literatura com o efeito benéfico sobre a memória e que, portanto, poderiam ser classificadas como nootrópicos, como *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Ocimum sanctum* e *Bacopa monniera* (LEE et al., 2000; ITIL et al., 1998; JOSHI e PARLE, 2006; RUSSO e BORRELLI, 2005).

Efeitos Adaptógenos: O uso como tônico ou fortificante se enquadra no perfil de atividade de um adaptógeno. As plantas ou substâncias empregadas para tal fim, são utilizadas visando uma melhora geral do organismo, ao invés de serem indicadas para uma moléstia específica (DAHANUKAR e THATTE, 1997).

Na medicina tradicional asiática, especialmente na chinesa, estas ervas são também utilizadas visando promover um aumento do poder adaptativo do organismo frente a modificações físicas, químicas e/ou ambientais que possam vir a ocorrer. Por este motivo, essas plantas são também chamadas de resistógenas, ou seja, conferem mais resistência ao organismo frente àquelas alterações (FULDER, 1980).

Diversos são os exemplos de plantas com efeito adaptógeno bem estabelecido: *Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*, *Whithania somnifera*, *Ocimum sanctum*, *Bryonia alba*, *Rhodiola rosea*, *Schizandra chinensis*, entre outras (NOCERINO et al., 2000; WAGNER et al., 1994; WAGNER, 1995; PANOSSIAN et al., 1997; DAVYDOV e KRIKORIAN, 2000; SINGH et al., 2003).

Muitas vezes, algumas plantas acabam se enquadrando nas duas definições, como é o caso da *Ginkgo biloba*. Ela possui estudos verificando sua atividade nootrópica (ITIL et al., 1998) e apesar de não ser uma planta considerada um adaptógeno clássico pela comunidade científica, ela atua na melhora do desempenho psicomotor e na memória (WAROT et al., 1991; KENNEDY et al., 2000; MIX e CREWS, 2002), efeitos que também caracterizam uma substância adaptógena.

1.5 – Plantas Medicinais e Apoptose

Ao consultar o PubMed, verifica-se que há cerca de 330 trabalhos relacionando plantas medicinais e apoptose. Assim, uma variedade de extratos de plantas tem sido investigada para verificar sua influência no processo de morte celular programada (THATTE et al., 2000), seja agindo como agente pró-apoptótico ou anti-apoptótico, como explicado a seguir.

A grande maioria dos artigos verifica a influência desses extratos em células cancerosas, patogênese na qual há uma falha no mecanismo de morte das células defeituosas, buscando-se, assim, substâncias que estimulem a apoptose no sentido de eliminar essas células danificadas (YANO et al., 1994; ZHANG et al., 2004; JOW et al., 2004; LEE et al., 2006).

Por outro lado, apesar de estar em menor número, também há estudos verificando a possível proteção de extratos de plantas, frente a uma apoptose degenerativa. Os extratos metanólicos de *Acori graminei* e *Uncariae Ramulus* protegeram o hipocampo da morte celular induzida por isquemia (LEE et al., 2003). Um preparado da medicina chinesa denominado Toki-shakuyaku-san (composto por diversas raízes e rizomas) teve um efeito neuroprotetor contra a proteína β -amilóide, efeito atribuído a sua ação anti-oxidante (EGASHIRA et al., 2005). A ocorrência da β -amilóide está implicada com o quadro da doença de Alzheimer (SELKOE, 1989). Um feniletanol isolado do caule de *Cistanche salsa* também demonstrou proteção na apoptose induzida por $\text{TNF}\alpha$ em células neuronais (DENG et al., 2004). Células NG108-15 tratadas com H_2O_2 , tiveram os danos reduzidos quando pré-incubadas com flavonóides das folhas de *Diospyros kaki*, planta muito utilizada para melhorar danos relacionados à isquemia cerebral (BEI et al., 2005). O $\text{TNF}\alpha$ está envolvido com a ativação da via extrínseca da apoptose enquanto que o peróxido de hidrogênio está envolvido com a via mitocondrial (IGNEY e KRAMMER, 2002; SINGH et al., 2007).

Outros agentes são descritos como indutores da apoptose. A staurosporina, a cafeína e o etanol foram utilizados nesse trabalho e são responsáveis pelo aumento da concentração do Ca^{2+} citoplasmático (HIRATA et al., 2006). Sabe-se

que mudanças na homeostase do Ca^{2+} podem ativar diversas vias da apoptose (McCONKEY e ORRENIUS, 1997).

Assim, é notável o crescimento do interesse científico em buscar plantas medicinais que protejam o sistema nervoso central (SNC) da degeneração causada por mecanismos descontrolados da apoptose.

As plantas estudadas neste trabalho têm um uso popular muito disseminado e que coincide com uma possível ação nootrópica ou adaptógena. Há alguns trabalhos na literatura sobre o *Panax ginseng* e por isso ele foi escolhido para validar a metodologia utilizada (KIM et al., 2003; LEE et al., 2004; NAVAL et al., 2007). A *Turnera diffusa* e a *Heteropterys aphrodisiaca* foram escolhidas por serem plantas brasileiras e também por não possuírem estudos científicos conclusivos sobre os efeitos benéficos alegados pela população. Um levantamento bibliográfico realizado pelo nosso grupo confirma que essas plantas se enquadram no conceito de adaptógeno e estão entre as mais usadas pela população (MENDES e CARLINI, 2007).

1.6 – *Panax ginseng* C.A. Mey.

O exemplo mais conhecido de uma planta considerada adaptógena é o ginseng coreano (*Panax ginseng*), erva da família Araliaceae, com 60-80 cm, cujas raízes são empregadas na medicina tradicional chinesa há milênios (COURT, 1985).



Figura 2: Raiz de *Panax ginseng*.

Fonte: <http://www.ordinace.cz/danek/zensen/>

O próprio nome do ginseng dá uma idéia de sua reputação como planta superior, capaz de curar todos os males: panax (“pan” = todos, “axos” = cura) ginseng (“jen” = erva, “sheng” = homem, por causa da forma humana da raiz). Assim, *Panax ginseng* quer dizer “erva em forma de homem que tudo cura”. Talvez em razão dessa generalização de planta mágica ou panacéia, o ginseng tenha sido relegado pela comunidade científica durante muitos anos. O próprio conceito de panacéia é distorcido, pois, segundo a mitologia grega, Panacea, filha de Aesculapius, não encontrou a cura contra todas as doenças, mas um remédio para manter a saúde das pessoas (OWEN, 1981).

Apesar do descrédito inicial pela comunidade médico-científica do ocidente, nas últimas décadas, o ginseng foi alvo de intensa pesquisa que lhe trouxe credibilidade. Seu mercado movimenta milhões de dólares graças à sua fama como planta benéfica frente ao envelhecimento e ao estresse, atuando sobre o SNC, sistemas cardiovascular, endócrino, imune e sobre o metabolismo (GILLIS, 1997; BAHRKE e MORGAN, 2000; KIEFER e PANTUSO, 2003).

Diversos trabalhos têm confirmado sua ação adaptógena, mostrando efeitos positivos sobre a memória, avaliada pela melhora do desempenho de ratos submetidos ao labirinto ou à esquiva (PETKOV, 1978; PETKOV e MOSHARROF, 1987). Podem ser citados ainda, estudos com animais idosos tratados com ginseng, que apresentaram melhora do desempenho no labirinto radial (NITTA et al., 1995), na esquiva (PETKOV et al., 1993) ou ratos jovens administrados com ginsenosídeos e avaliados em modelos de déficit induzido por etanol ou escopolamina (YAMAGUCHI et al., 1996; JIN et al., 1999; LEE et al., 2000).

Segundo YAMAGUCHI et al. (1997) os efeitos positivos de certas saponinas sobre a aprendizagem e memória de animais idosos parecem ocorrer por aumento da atividade da enzima colina-acetiltransferase e, por conseqüência, do neurotransmissor acetilcolina. No entanto, outras investigações propuseram que os ginsenosídeos podem desempenhar seu papel sobre a memória agindo por outros sistemas (PETKOV, 1978; TSANG et al., 1985; TACHIKAWA et al., 1999).

Mais recentemente, foi verificado que o extrato de ginseng apresenta efeito protetor na morte por apoptose em células neuronais SK-N-MC (LEE et al., 2004) e em células neuronais PC12 (KIM et al., 2003).

Saponinas e triterpenos denominados ginsenosídeos e que foram isolados do ginseng, foram capazes de aumentar a capacidade física, avaliada em modelos de exaustão e fadiga, tais como: correia horizontal, corda rolante, roda giratória e agitador vai-e-vem (BREKHMANN e DARDYMOV, 1969; TAKAGI et al., 1972; SAITO et al., 1974; WANG e LEE, 1998).

Um grande número de saponinas triterpênicas (os ginsenosídeos) são os principais constituintes encontrados nos diferentes tecidos do *Panax ginseng*, especialmente nas raízes e folhas. Os principais ginsenosídeos reportados pela literatura são do tipo damarano (TANI et al., 1981; ASSINEWE et al., 2003; CHRISTENSEN et al., 2006; LI et al., 2006; NG et al., 2006; SCHLAG e McINTOSH, 2006; CHANG et al., 2007). Compostos fenólicos, tais como, os ácidos p-cumárico, protocatecuico, gentísico, ferúlico, entre outros, foram encontrados por SIVAKUMAR e PAEK (2005) nas raízes de *Panax ginseng*. Estudos sobre a padronização do *Panax ginseng* por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram realizados (XIE et al., 2006; KIM et al., 2007)

Em vista do grande número de aplicações e usos do ginseng, geralmente por tempo prolongado, é de se esperar que ele possua baixa toxicidade. De fato, seu uso é bem tolerado e a toxicidade é bem baixa, não produzindo alterações relevantes (KAKU et al., 1975; KITTS e HU, 2000; RUSSO, 2001). A ocorrência de efeitos adversos em pacientes e voluntários que tomaram ginseng é comparável à do grupo placebo (COON e ERNST, 2002), sendo relatados poucos casos de mania (VÁZQUEZ e AGÜERA-ORTIZ, 2002; NAPPO e CARLINI, 2003) de nervosismo, insônia e distúrbios gastrintestinais por pessoas que consumiram doses maiores que as recomendadas por um longo período de tempo (SIEGEL, 1979), ou ainda, interação com alguns fármacos (KIEFER e PANTUSO, 2003).

1.7 – *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

No Brasil, a população em geral utiliza várias plantas para manter um estado “saudável”. Essas plantas são definidas como tônicas ou fortificantes e são utilizadas para melhorar o desempenho geral e prevenir os déficits decorrentes do envelhecimento (CARLINI, 1995; MENDES e CARLINI, 2007).

Uma planta que goza de fama internacional como tônica e afrodisíaca é a *Turnera diffusa* (Turneraceae), conhecida popularmente como damiana (figura 3). A *Turnera diffusa* é uma planta que no Brasil pode ser encontrada nos estados das regiões norte e nordeste (CORRÊA, 1984; MILLER, 1993), porém sua ocorrência se expande para regiões tropicais das três Américas e há ainda relatos de sua existência na África (MILLER, 1993). É um arbusto pubescente, bastante ramificado, com folhas pequenas ovais e denteadas e flores amarelas (CORRÊA, 1984; CORDEIRO et al., 1996). O uso popular das folhas de damiana é bastante antigo. Há relatos que ela era utilizada nos Estados Unidos como estimulante sexual desde o século XIX (RUSSO, 2001).



Figura 3: Partes aéreas de *Turnera diffusa*. Foto: Mimi Kamp.

Além de tônica e afrodisíaca a damiana é ainda utilizada popularmente como estimulante do apetite, digestiva, antiúlcera, hipoglicemiante, diurética, antimalária, no combate à diarreia, contra o abuso de drogas, entre outros usos (MILLER, 1993; MORS et al., 2000).

Apesar da grande gama de aplicações e usos populares que goza a planta, poucos são os estudos científicos sobre suas ações farmacológicas. Levantamento feito nas bases PubMed, Lilacs e MedLine com a expressão "*Turnera diffusa*" aponta 12 artigos publicados. Chama a atenção que os poucos estudos farmacológicos são todos atuais (a partir de 1996), o que por um lado mostra o recente interesse surgido pela planta.

ALARCON-AGUILARA et al. (1998), verificaram uma redução do pico de hiperglicemia induzida por injeção subcutânea de glicose em coelhos tratados com damiana. Este possível efeito hipoglicemiante não foi confirmado em camundongos com diabetes induzida por naloxano tratados com o extrato hidroalcoólico da planta (ALARCON-AGUILAR et al., 2002).

Outro estudo apontou que o extrato hexânico de *Turnera diffusa* foi efetivo contra bactérias causadoras de distúrbios gastrointestinais em um ensaio *in vitro* (HERNÁNDEZ et al., 2003). Ainda em relação ao sistema gastrointestinal, (GRACIOSO et al. 2000), observaram que os extratos etanólico e diclorometânico reduziram as ulcerações induzidas por HCl e etanol em camundongos, o que não foi observado para a espécie *Turnera ulmifolia*.

Sua possível ação afrodisíaca, sem dúvida o principal uso popular da damiana, também foi alvo de investigação farmacológica. Extratos fluidos hidroalcoólicos de *Turnera diffusa* e *Pfaffia paniculata* foram testados em ratos sexualmente incapacitados e melhoraram a performance copulatória destes animais (ARLETTI et al., 1999) sem alterar sua atividade locomotora.

Investigações fitoquímicas revelaram a presença a presença de 35 substâncias, entre as quais estão os flavonóides (PIACENTE et al., 2002), terpenóides, carboidratos, derivados fenólicos e cianogênicos (ZHAO et al., 2007), alcalóides, saponinas (KUMAR et al., 2006), óleos voláteis (KUMAR et al., 2005) e arbutina (fenólico glicosilado) (KUMAR e SHARMA, 2005). A padronização dos

extratos de *Turnera diffusa* foi realizada por KUMAR et al. (2006) e RAMIREZ-DURON et al. (2007).

Com base nestes achados, que parecem confirmar parte das indicações utilizadas popularmente para a *Turnera diffusa*, além de sua grande reputação como tônico geral e estimulante do SNC e ausência de estudos científicos relacionados a estas ações, torna-se interessante avaliar os efeitos da planta, em modelos animais e bioquímicos, indicativos de uma ação adaptógena.

1.8 – *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach.

A *Heteropterys aphrodisiaca* (figura 4) é conhecida popularmente como nó-de-cachorro. Othon Machado trabalhou na identificação botânica da planta a partir de 1929 e só apenas em 1949, conseguiu amostras floridas da mesma, originárias do Mato Grosso. Machado observou que esta pertencia ao gênero *Heteropteris* Kunth e concluiu de que se tratava de uma espécie nova, classificando-a como *Heteropteris aphrodisiaca*, pertencente à família Malpighiaceae e definindo-a como “planta medicinal, útil principalmente como afrodisíaca e contra o esgotamento nervoso” (MACHADO, 1949; SANGIRARDI, 1981).

As raízes do nó-de-cachorro são irregulares, com partes engrossadas e nós (daí o nome comum, por semelhança ao pênis canino) (POTT e POTT, 1994). Esta espécie é encontrada principalmente no cerrado de Mato Grosso e Goiás (CORRÊA, 1984), e também é conhecida como cordão-de-São-Francisco (POTT e POTT, 1994).

As raízes do nó-de-cachorro são utilizadas como “afrodisíacas” sob a forma de garrafadas (curtidas na cachaça ou vinho branco) e medicinalmente empregadas no tratamento de “debilidade nervosa”, contra o “esgotamento nervoso”, como “tônico” e “estimulante”, bem como para os problemas de visão, como “depurativo” e para o tratamento de disenterias (RIZZINI e MORS, 1976; LÓPEZ-PALACIOS, 1983; CORRÊA, 1984; GUARIM NETO, 1987; ELISABETSKY et al., 1992; POTT e POTT, 1994).



Figura 4: Raízes e folhas de *Heteropterys aphrodisiaca*.

Foto: Fúlvio Rieli Mendes.

Estudos em laboratório apontam uma ação moderada da *Heteropterys aphrodisiaca* como um antiviral (MELO et al., 2006).

As ações mais interessantes descritas na literatura são aquelas que enquadram o nó-de-cachorro (*Heteropterys aphrodisiaca*) nos conceitos de uma substância adaptógena ou nootrópica (GALVÃO et al., 2005). A planta demonstrou um bom índice antioxidante sobre a lipoperoxidação *in vitro*. *In vivo*, em animais idosos, a administração crônica do extrato aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD) (MATTEI et al., 2001). Em um teste de esquiva passiva para avaliar a memória de ratos idosos, um extrato padronizado da planta foi eficaz em reverter o déficit de memória desses animais (GALVÃO et al., 2001; 2002). O extrato da planta não induziu sinais de toxicidade em três espécies de roedores, mas exerceu efeito tóxico em cães da raça Beagle em doses moderadas

(GALVÃO, 1997; 2003). Estes sinais de caráter tóxico não foram, contudo, observados em cães Boxer e Vira-latas.

GALVÃO et al. (2002) também detectaram a presença de flavonóides glicosilados, glicosídeos cardioativos com núcleo esteroidal e também com anéis lactônicos pentagonais, saponinas, taninos condensados e hidrolisáveis, glicosídeos aromáticos e derivados cianogênicos.

São poucas as informações e dados da literatura acerca da *Turnera diffusa* e da *Heteropterys aphrodisiaca*, plantas com o uso popular muito semelhante ao *Panax ginseng*. Esta última planta possui características adaptógenas/nootrópicas bem estabelecidas e o presente trabalho procurou analisar se a *Turnera diffusa* e a *Heteropterys aphrodisiaca* possuem efeitos semelhantes ao *Panax ginseng*, contra uma apoptose degenerativa para o SNC e no processo de envelhecimento.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar os efeitos dos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca* sobre a apoptose em células do SNC, analisando a possível proteção dos mesmos diante do processo de envelhecimento ou frente a estímulos agressores.

Objetivos Específicos:

1 – Traçar os perfis fitoquímicos dos extratos hidroalcoólicos das espécies selecionadas, por intermédio de Reações de Caracterização de Classes Químicas com Base no Uso de Reagentes Específicos, Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2 – Verificar o possível efeito protetor dos extratos frente a apoptose, no hipocampo de animais idosos tratados com os mesmos.

3 – Analisar a toxicidade dos extratos hidroalcoólicos em culturas primárias de astrócitos de córtex de ratos.

4 – Verificar se a pré-incubação com o extrato hidroalcoólico das plantas é capaz de proteger os astrócitos frente a agentes apoptóticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material Botânico

As folhas de *Turnera diffusa* foram obtidas comercialmente através da fornecedora Quimer Ltda, provida de laudo da identificação botânica da espécie (anexo 1). As partes aéreas foram pulverizadas por meio de um moinho de facas, utilizando tamis de mesh número 20.

Os pós das raízes de *Panax ginseng* e *Heteropterys aphrodisiaca* foram obtidos comercialmente da fornecedora Santos Flora[®], também providos de laudo de identificação botânica das espécies (anexos 2 e 3).

Todo o material foi acondicionado em frascos de vidro âmbar, para proteção, caso fosse fotossensível. Conforme o andamento do trabalho, quantidades apropriadas do extrato seco foram preparadas pela metodologia descrita a seguir.

3.2 – Preparo dos Extratos Hidroalcoólicos

Na preparação do extrato utilizou-se a técnica de turbólise: cem gramas do pó do material foram deixados em agitação, durante 30 minutos, em um liquidificador semi-industrial, tendo como líquido extrator, 1000 ml de solução hidroalcoólica (50% de etanol absoluto (P.A., Labsynth[®]) e 50% de água destilada) (FRANCO, 1990).

Após a fase de extração, o material foi inicialmente filtrado em algodão para eliminar as partículas mais grossas e, posteriormente, em papel de filtro, utilizando um funil de Büchner. Os extratos foram concentrados em rotavapor (modelo FISATON), sob 45-50°C, até atingirem cerca de 10% do volume inicial. Posteriormente foi colocado em frasco apropriado e congelado à -40°C, sendo então liofilizado (liofilizador EDWARDS pirani 501) para obtenção do extrato seco, o qual foi armazenado dentro de um dessecador em geladeira.

Pouco antes da realização dos testes, os extratos secos foram pesados e solubilizados em água, na concentração desejada.

3.3 – Análise Fitoquímica

A prospecção fitoquímica das principais classes de produtos naturais foi realizada através de Reações de Caracterização, Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Diodo-Array (CLAE/DAD/UV).

3.3.1 – Reações de Caracterização de Classes Químicas com Base no Uso de Reagentes Específicos.

Para os ensaios fitoquímicos preliminares foram utilizadas reações de caracterização desenvolvidas por WAGNER e BLADT (1996), com algumas modificações. Para estes testes, foram utilizadas amostras preparadas a partir dos extratos hidroalcoólicos. As mesmas amostras foram analisadas por CCD (ver item 3.3.2).

3.3.1.1 – Alcalóides

Preparo da amostra: 1,0 grama de cada extrato hidroalcoólico foi adicionado a 15 ml de H₂SO₄ a 25%, sendo essa mistura sonicada (sonicador de banho Ultra Cleaner UNIQUE) por 15 minutos em temperatura ambiente (25°C). A mistura foi filtrada em papel de filtro, lavando-se o precipitado com H₂SO₄ a 25%. O filtrado foi neutralizado com 1 ml de NH₄OH concentrado com ligeira agitação. O filtrado neutralizado foi submetido à extração líquido-líquido em funil de separação com duas porções de 10 ml de clorofórmio. O extrato aquoso foi descartado e o extrato clorofórmico foi filtrado em papel de filtro com Na₂SO₄. Esse extrato também foi analisado por CCD para pesquisa de alcalóides.

Pipetou-se 1ml do respectivo extrato clorofórmico para um tubo de ensaio onde foi realizada a pesquisa de alcalóides com o Reagente de Dragendorff (2

gotas). A formação de um precipitado de cor vermelho-tijolo indica reação positiva. Utilizou-se uma solução-padrão de boldina como controle positivo.

3.3.1.2 – Compostos Fenólicos e Saponinas:

Preparo da amostra: 1,0 grama do liofilizado foi adicionado a 15 ml de MeOH, sendo a mistura sonicada por 15 minutos em temperatura ambiente (25°C). A mistura foi filtrada em papel de filtro, lavando-se o precipitado com MeOH. Esse extrato também foi utilizado para pesquisar saponinas e iridóides em CCD.

Pipetou-se 1 ml do extrato metanólico para quatro tubos de ensaio. Em cada tubo realizou-se a pesquisa de uma classe química, como descrito a seguir:

- Flavonóides: Adição de uma gota de FeCl₃. Reação positiva: cores verde, amarelo, castanho.
- Taninos: Adição de 1 ml de Ácido Acético 10% + 1 gota de Acetato de Chumbo 10%. Presença de galataninos: formação de precipitado, Presença de catequinas: ausência de precipitado.
- Cumarinas: Adição de 0,5 ml de NH₄OH. Sob agitação observar em luz UV. Reação positiva: fluorescência azul ou verde-amarelada.
- Saponinas: Agitação enérgica por 5 min. Reação positiva: formação de espuma persistente.

3.3.1.3 – Esteróides e Triterpenos (Triterpenóides)

Preparo da amostra: 1,0 grama do liofilizado foi adicionado a 15 ml de CHCl₃, sendo a mistura sonicada por 15 minutos em temperatura ambiente (25°C). A mistura foi filtrada em papel de filtro, lavando-se o precipitado com CHCl₃. O filtrado foi concentrado. Esse extrato também foi submetido à análise por CCD.

Pipetou-se 1 ml do referido extrato para dois tubos de ensaio para a pesquisa com os reagentes citados (2 gotas para cada reagente):

- Reagente de Liebermann-Burchard: Reação positiva: coloração rosa, azul, verde ou amarelo.
- Reagente de Keller-Kelliani: Reação positiva para Esteróides: Azul
Reação positiva para Triterpenos (Triterpenóides): Verde.

3.3.2 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A prospecção fitoquímica das principais classes de produtos naturais foi realizada por CCD de sílica gel (MARKHAN, 1982; WAGNER e BLADT, 1996). Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio com espessura da camada de sílica gel de 0,25 mm (Merck 60 F₂₅₄). As amostras foram aplicadas a 1 cm da base da cromatofolha, eluídas com fases móveis apropriadas e reveladas com reagentes específicos, como detalhado a seguir.

3.3.2.1 – Alcalóides

A fase móvel foi preparada com clorofórmio e dietilamina (9:1). Foi utilizado reagente de Dragendorff e aquecimento por 5 minutos a 100°C como método de revelação de substâncias alcalóidicas. Como controle positivo foi utilizado uma solução-padrão de boldina.

3.3.2.2 – Saponinas

A fase móvel foi preparada com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (65:25:9:1). As cromatoplasmas foram nebulizadas com uma solução de vanilina sulfúrica e posterior aquecimento por 5 minutos a 100°C. Como controle positivo foi utilizado uma solução-padrão de saponina.

3.3.2.3 – Iridóides

A fase móvel foi preparada com butanol:ácido acético:água (6:2:1). As cromatoplasmas foram monitoradas com auxílio de luz UV e com nebulização de

uma solução etanólica a 5% de KOH e posterior visualização em luz UV. A presença de iridóides é detectada pela coloração vermelha.

3.3.2.4 – Esteróides e Triterpenos (Triterpenóides)

A fase móvel foi preparada com diclorometano:ácido acético (1:1). As cromatoplasmas nebulizadas com Reagente de Liebermann-Burchard e aquecidas a 100°C por 10 min. Como controle positivo foi utilizada uma solução-padrão de acetato de lupeol.

3.3.3 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação dos compostos fenólicos nas amostras foi realizada utilizando um detector de arranjo de diodos acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência. O cromatógrafo utilizado foi um Hewlett-Packard 1090 série II constituído por injetor automático de amostras e detector de arranjo de diodos (DAD), monitorado pelo software ChemStation. A separação dos compostos foi realizada em coluna de fase reversa C18 Zorbax (4,6 X 250 mm, 5 µm). As fases móveis utilizadas foram, A: água Milli Q:ácido acético (99,9:0,1) e B: metanol, na proporção de: 0 minutos – 20% de B em A; 10 minutos – 30% de B em A; 20 minutos – 50% de B em A; 30 minutos – 70% de B em A; 40 minutos – 90% de B em A; 45 minutos – 40% de B em A; e 50 minutos – 20% de B em A. As separações foram monitoradas em dois comprimentos de onda com a finalidade de que várias substâncias fenólicas fossem detectadas; 270 nm para flavanonas, flavanois, lignanas e taninos; 360 nm para flavonas, flavonóis e chalconas (CAI et al., 2006; DUARTE-ALMEIDA et al., 2007). Os tempos de retenção e espectros de ultravioleta obtidos a partir das amostras foram comparados com aqueles obtidos a partir dos padrões Sigma (tabela 1). Considerou-se a determinação da classe fitoquímica quando a semelhança entre os espectros foi igual ou superior a 90%.

Tabela 1 – Tempo de retenção e absorbâncias de padrões fenólicos (Sigma), analisados nas mesmas condições cromatográficas.

Composto	Retenção (minutos)	Máximos de absorção $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Ácido tânico (tanino)	5,83	280
Ácido salicílico (ácido benzóico)	6,90	270
Ácido caféico (ácido fenólico)	21,06	300, 330
Ácido cumárico (ácido fenólico)	25,95	300, 330
Rutina (flavonol diglicosilado)	29,29	260, 360
Ácido elágico (tanino)	29,99	260, 370
Quercetina (flavonol)	34,70	260, 365
Apigenina (flavona)	38,20	270, 340

A presença de compostos fenólicos tem sido determinada qualitativamente e quantitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por diodo array (HPLC/DAD/UV) e a separação tem sido realizada em colunas de fase reversa (C8 ou C18) (FARAG et al., 2007). De um modo geral, os constituintes mais polares possuem tempos de retenção menores, sendo assim, taninos e flavonóides diglicosilados possuem tempos de retenção menores do que os flavonóides monoglicosilados e flavonóides agliconas (FARAG et al., 2007).

Os constituintes dos extratos foram caracterizados levando-se em consideração os máximos de absorção obtidos [$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)] no espectro de ultravioleta, através da detecção por Diodo Array. Flavonóides glicosilados e agliconas possuem um sistema conjugado de ligações duplas, as quais absorvem energia nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm. Taninos absorvem radiação UV, nos comprimentos de onda mais baixos, entre 200 e 290 nm. Ácidos fenólicos apresentam absorção de energia em comprimentos de onda maiores que os taninos. Os espectros típicos de absorção no UV/vis do ácido hidroxicinâmico e seus derivados possuem um pico entre 305 e 330 nm (banda I) e um ombro entre 290 e 300 nm (banda II) (FARAG et al., 2007).

3.4 – Experimentos in vivo

3.4.1 – Animais

No experimento para avaliar a morte nas regiões CA1, CA3 e Giro denteado (dorsal e ventral) do hipocampo, foram utilizados ratos da linhagem Wistar, com 20 meses de idade, pesando entre 500-700g, e ratos jovens, com 3 meses de idade, pesando entre 300-400g, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia, UNIFESP.

Todos os animais foram mantidos em salas com controle de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas com água e comida *ad libitum*.

Os animais foram sacrificados por decapitação. O projeto foi submetido e **aprovado** pelo Comitê de Ética da UNIFESP (**protocolo número 0464/05**) antes do início dos experimentos.

3.4.2 – Tratamento dos Animais

Os animais idosos (20 meses) foram divididos em quatro grupos e receberam os tratamentos, por via oral (gavagem), durante 30 dias. Os grupos receberam 100 mg/kg do extrato de *Panax ginseng*, dose eficaz na aprendizagem e memória de ratos (PETKOV e MOSHARROF, 1987), 50 mg/kg de *Heteropterys aphrodisiaca*, dose que reverteu o prejuízo de memória em ratos idosos (GALVÃO et al., 2002), 500 mg/kg de *Turnera diffusa* (dose definida por ensaios farmacológicos prévios) ou água (grupo controle idoso). Um quinto grupo de animais jovens recebeu água, por via oral, durante 30 dias (controle jovem).

No trigésimo dia de tratamento, após uma hora da administração, os animais foram anestesiados com ketamina (0,8 ml/kg) e xilazina (0,5 ml/kg) para serem perfundidos. Após abrir o abdômen, o diafragma foi cortado e o tórax do animal aberto. Foram injetados 60 UI de heparina no ventrículo esquerdo do coração e uma agulha que estava acoplada à bomba de perfusão foi inserida pelo ventrículo esquerdo até a aorta. A aorta abdominal foi clampeada, para que a

perfusão ocorresse somente na região superior do animal. Durante 30 segundos fez-se uma lavagem com solução salina e a seguir, trocou-se pela solução de formaldeído 4%, deixando perfundir cerca de 200 ml desta solução.

A seguir, os animais foram decapitados e os cérebros foram retirados cuidadosamente e armazenados em solução de formaldeído 4% por 48 horas.

3.4.3 – Processamento Histológico dos Cérebros Perfundidos

Decorridas 48 horas, os cérebros foram armazenados em álcool 70% por sete dias. Eles foram desidratados em álcool absoluto (P.A., Labsynth[®]) por cinco horas e diafanizados em xileno por três horas. A seguir foram submetidos a banhos e inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados em espessuras de aproximadamente 5 µm e as secções foram montadas em lâminas cobertas com 10% de silânio (para obter aderência do tecido à lâmina).

3.4.4 – Análise da Apoptose pela Reação de Imuno-histoquímica do TUNEL

Trata-se da detecção da fragmentação do DNA. As fitas de DNA quebradas deixam a região 3'-OH livres permitindo a ligação enzimática de nucleotídeos modificados (GAVRIELI et al., 1992). Essa região final do DNA livre é uma característica típica identificada em corpos apoptóticos. Para a utilização da reação de TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) foi adquirido um Kit (ApopTag Plus-peroxidase da ONCOR, Inc., EUA), seguindo-se o protocolo do fabricante e conforme descrito por LOPES et al. (2004).

Neste experimento foram utilizados os cérebros dos animais previamente tratados com os extratos das plantas em estudo e que foram incluídos em parafina. As secções do tecido foram desparafinadas com xileno, hidratadas com concentrações decrescentes de etanol (de 95 a 70%) e lavadas em PBS. Assim, uma seqüência de reações de imuno-histoquímica foi realizada, utilizando resíduos de nucleotídeos marcados com digoxigenina, que cataliticamente foram adicionados ao DNA fragmentado pela enzima transferase deoxinucleotídeo

terminal (TdT), na ligação –OH do carbono 3' (figura 5). A revelação da cor ocorreu com a diaminobenzidina (DAB) contrastada com Hematoxilina de Carrazi.

As lâminas foram montadas com Entellan e observadas em microscópio de luz. Calculou-se a porcentagem de células positivas para a reação de TUNEL nas regiões do hipocampo (CA1, CA3 e giro denteado dorsal e ventral). A porcentagem foi obtida contando-se o número de células marcadas pela reação em relação ao número total de células presentes em uma amostra das camadas piramidais e granulares das referidas regiões.

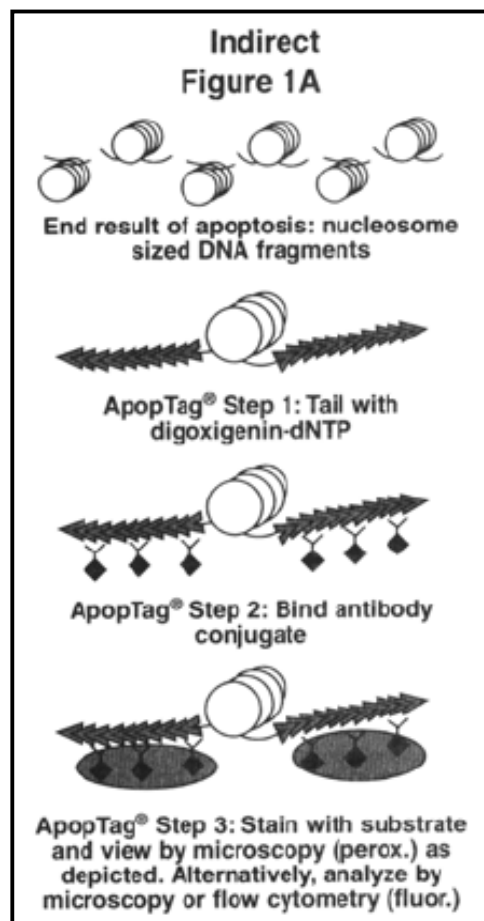


Figura 5: Metodologia para avaliação da apoptose.
Fonte: Manual do kit ApopTag®

3.5 – Experimentos *in vitro*

3.5.1 – Cultura de Astrócitos

A cultura de astrócitos foi obtida a partir do córtex de ratos com 3 dias de idade conforme descrito anteriormente por SMAILL e RUSSELL, 1999. (Animais provenientes do biotério do Instituto Nacional de Farmacologia – INFAR, UNIFESP).

Os animais foram sacrificados e seus cérebros retirados e dissecados com auxílio de uma lupa, sendo o córtex separado dos outros tecidos cerebrais. O tecido foi fragmentado mecanicamente com o auxílio de tesouras microcirúrgicas. Em um segundo momento, as células foram incubadas com tripsina (2,5%) por 20 minutos a 37°C, com constante agitação. Em seguida foi acrescentado às células até completar 40 ml, o meio de cultura (DMEM + 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina/penicilina e 0,1% de fungizone) contendo 1% de DNAase (4 mg/ml), deixando agir por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o “pellet” de células disperso mecanicamente com auxílio de pipeta “Pasteur”. Em seguida as células foram ressuspensas em meio de cultura e centrifugadas por 1000 rpm por 10 minutos a 25°C. Após essa centrifugação para retirada das enzimas, o “pellet” foi ressuspenso em meio de cultura e as células distribuídas em frascos para cultura celular de 75 cm². As células foram mantidas em meio de cultura até a confluência que ocorreu por volta do 8^o dia, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 dias. Antes do experimento as células foram retiradas dos frascos por tripsinização.

3.5.2 – Tripsinização

A retirada das células dos frascos, quando confluentes, foi realizada pelo processo de tripsinização. Foi adicionada às células, tripsina/EDTA 0,25% e após 5 minutos a 37°C, a enzima foi inativada com meio de cultura contendo DNAse (10

mM). Depois que as células foram desprendidas do frasco, estas foram centrifugadas (2500 rpm, 10 minutos, 25°C) e ressuspensas em meio de cultura.

3.5.3 – Plaqueamento dos Astrócitos

Após a tripsinização de um frasco, um volume de 10 µl da suspensão foi submetido à contagem com o auxílio de uma câmara de Newbauer, uma lamínula de vidro, microscópio invertido Nikon e contador de células. Multiplicando-se a média do número de células contadas nos quatro quadrantes por 10^4 , obtêm-se o número total de células por ml. O valor encontrado foi de 72×10^4 células/ml. A partir de tal valor e das diluições necessárias, inicialmente os astrócitos foram plaqueados em placas de 24 poços, para uma concentração final de 36 mil células por poço. Após alguns testes, determinou-se a concentração de 18 mil células por poço, o que permitiu uma confluência parcial e a observação e contagem das células.

3.5.4 – Reação de Hoechst 33342 (Avaliação da Proliferação e Apoptose Celular)

Este método permitiu investigar a apoptose por meio da observação da morfologia dos núcleos e da visualização da fragmentação do DNA. O Hoechst 33342 é um corante excitado em 350 nm e que emite a fluorescência em 450 nm. Com esta marcação os núcleos de células não apoptóticas apresentam um contorno regular e uma fluorescência homogênea, enquanto que os núcleos apoptóticos apresentam-se com um contorno irregular, a fluorescência não é homogênea e às vezes picnótico (mais denso).

Inicialmente as células foram incubadas com os três extratos das plantas nas concentrações de 10 µg/ml, 100 µg/ml e 1000 µg/ml e foram avaliadas com 6, 24 e 48 horas de incubação. Assim, uma curva concentração-tempo-efeito foi feita para avaliar possíveis efeitos na proliferação das células e toxicidade dos extratos. Uma cultura de astrócitos foi utilizada para cada tempo de incubação.

Para verificar a proteção dos extratos frente a estímulos apoptóticos, as células foram incubadas por 24 horas com extrato de ginseng, e após 18h desta incubação, foi adicionada a staurosporina (250nM), ou cafeína (10mM) ou etanol (2,5%) (adaptado de HIRATA et al., 2006). Assim, os agentes apoptóticos ficaram incubados por 6 horas com as células.

Após as diferentes incubações, as células foram lavadas com tampão de fluorescência e incubadas com Hoechst 33342 (1µg/ml) por 15 min à temperatura ambiente, e em seguida, observadas em microscópio de fluorescência. Os núcleos considerados apoptóticos foram contados e calculados em porcentagem em relação ao total de núcleos observados em cada campo. Para cada tratamento e tempo de incubação foram realizados pelo menos 4 experimentos (ROSENSTOCK et al., 2004).

3.5.6 – Microscopia de Fluorescência

As imagens de fluorescência foram obtidas através de um microscópio invertido (Nikon, TE 300) acoplado a uma câmera digital de alta resolução (CCD câmera 512, Roper Sci, Princeton Ins, USA). As aquisições das imagens foram feitas com auxílio do programa Spectralyzer (Anderson, NJ, USA).

3.6 – Análise Estatística

Para análise dos dados utilizou-se ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan, quando necessário. Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão (EP) da média e adotou-se um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 – Análise Fitoquímica

4.1.1 – Reações de Caracterização

A tabela 2 apresenta os resultados das reações de caracterização realizadas para a identificação das classes químicas presentes nos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca*.

Detectou-se a presença de flavonóides, taninos e saponinas nos extratos de *Panax ginseng* e *Heteropterys aphrodisiaca*. Além das classes químicas já citadas, verificou-se a presença de triterpenos (triterpenóides) no extrato de *Turnera diffusa*.

Tabela 2 – Classes químicas detectadas nos ensaios químicos de caracterização com base no uso de reagentes específicos, dos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca*.

ENSAIO Classes Químicas	<i>Panax ginseng</i>	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Heteropterys aphrodisiaca</i>
Flavonóides	+	+	+
Taninos	+	+	+
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	+	+	+
Esteróides e triterpenos (triterpenóides)	-	+	-

Legenda: (+) presença; (-) ausência.

4.1.2 – Cromatografia em Camada Delgada

Os resultados da CCD para os três extratos estão resumidos na tabela 3 e ilustrados nas figuras 3 e 4.

Tabela 3 – Classes químicas detectadas por cromatografia em camada delgada dos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca*.

CCD Classes Químicas	<i>Panax ginseng</i>	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Heteropterys aphrodisiaca</i>
Alcalóides	-	-	-
Triterpenos	-	+	-
Saponinas	+	+	+
Iridóides	-	-	-

Legenda: (+) presença; (-) ausência.

Prospecção de Alcalóides e Triterpenóides

O teste realizado com os extratos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa*, *Heteropterys aphrodisiaca* por meio de CCD para a comprovação da presença de alcalóides foi negativo, enquanto que para triterpenóides, foi positivo apenas para amostra de *Turnera diffusa* (figura 6).

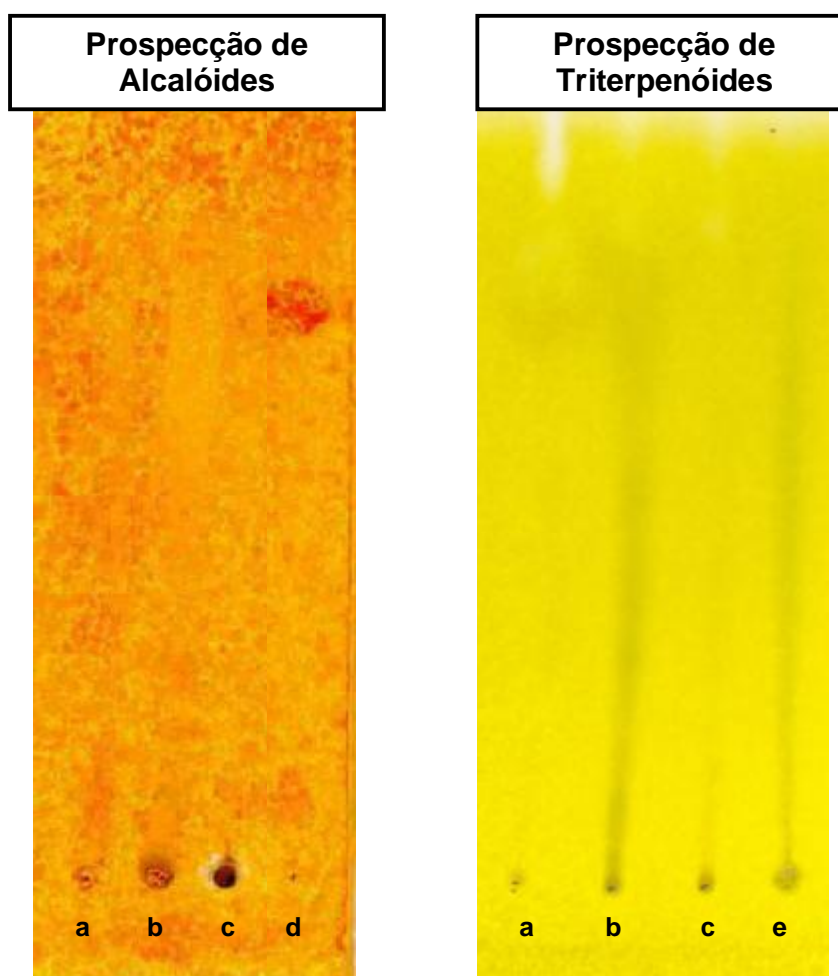


Figura 6: Cromatografia em camada delgada (gel de sílica 60 F₂₅₄) dos extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng* (a), *Turnera diffusa* (b) e *Heteropterys aphrodisiaca* (c) para detecção de alcalóides (fase móvel – clorofórmio: dietilamina) e triterpenóides (fase móvel – diclorometano: ácido acético). As substâncias de referência utilizadas foram a lobelina (d) e o acetato de lupeol (e).

Prospecção de Saponinas e Iridóides

O teste realizado com os extratos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca* por meio de CCD para a comprovação da presença de saponinas foi positivo. A comprovação da presença de iridóides foi negativa para os três extratos, pois deveria apresentar coloração vermelha (figura 7).

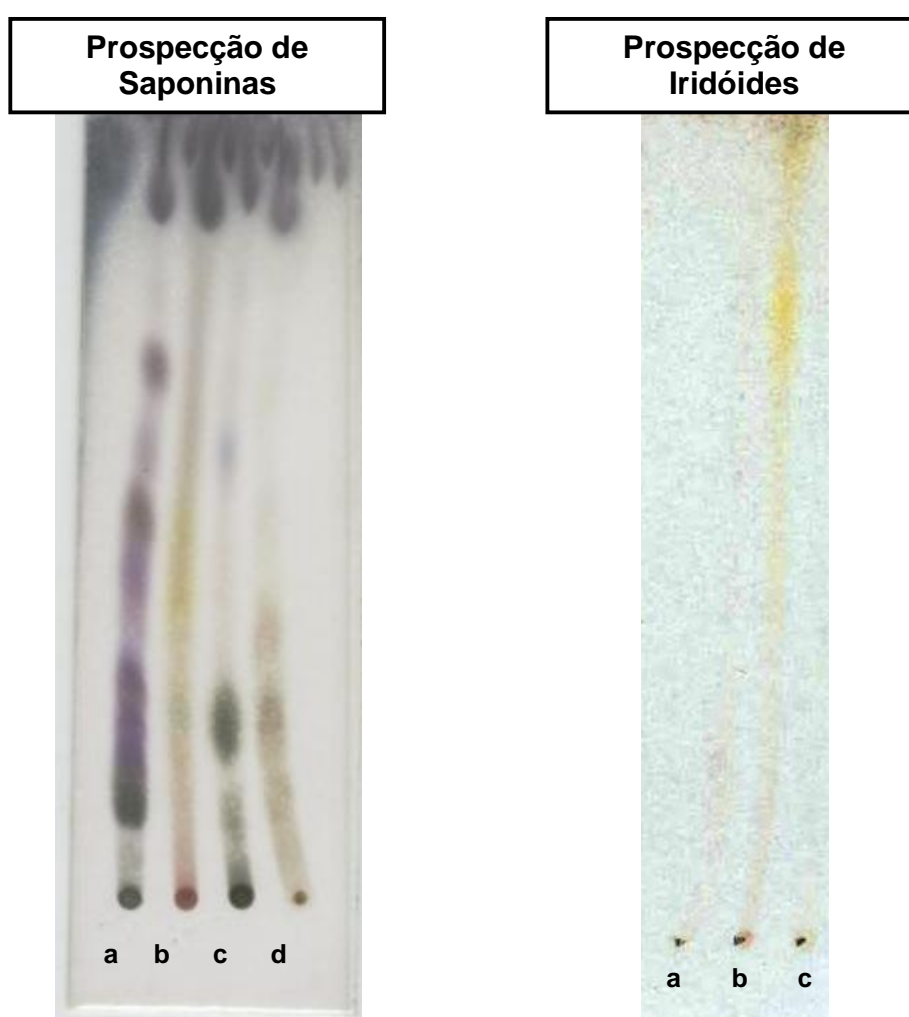


Figura 7: Cromatografia em camada delgada dos extratos de *Panax ginseng* (a), *Turnera diffusa* (b) e *Heteropterys aphrodisiaca* (c) para detecção de saponinas (clorofórmio: ácido acético: metanol: água) e iridóides (fase móvel – butanol: ácido acético: água). Uma solução-padrão de saponina (d) foi utilizada como substância de referência.

4.1.3 – Determinação de Compostos Fenólicos por CLAE/UV/DAD

***Panax ginseng* – Análise em 360, 270 e 210 nm**

Por meio da análise dos espectros de ultravioleta (UV) obtidos pelo arranjo de diodos, foi verificado que os principais constituintes do extrato de *Panax ginseng* são ácidos fenólicos, principalmente os derivados dos ácidos gálico e caféico (figura 8, tabela 4).

A literatura descreve que o *Panax ginseng* é rico em saponinas. A análise realizada com as mesmas condições cromatográficas em um comprimento de onda de 210 nm e utilizando acetonitrila como solvente, mostrou a presença de vários ginsenosídeos (saponinas triterpênicas) entre 2,4 e 28,1 minutos, sendo que a maior parte ficou concentrada entre 5,0 e 6,9 minutos, indicando tratar-se de saponinas muito polares. A maior dificuldade para se detectar a presença de saponinas por ultravioleta, é a necessidade de realizá-la em baixos comprimentos de onda (203 a 210 nm), o que conduz a problemas de linha de base instável e interferência dos eluentes na análise (CHEN et al., 2007).

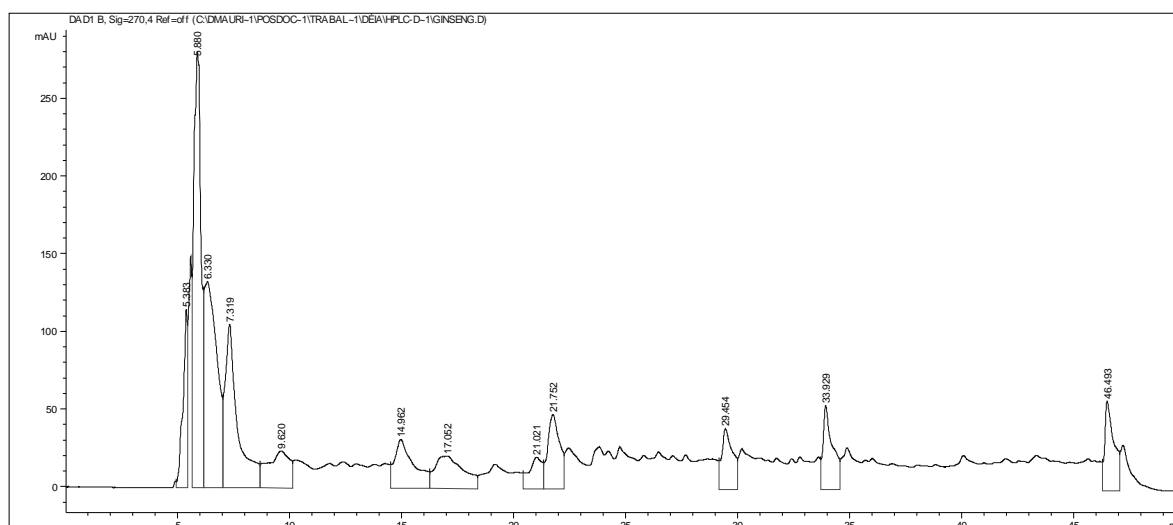


Figura 8 – Cromatograma de *Panax ginseng* obtido por CLAE-DAD em 270 nm.

Tabela 4 – Classes químicas detectadas no extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos.

Tempo de retenção (min)	% encontrada	Máximos de Absorção $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Classes detectadas
5,383	6,0	270	Tanino
5,880	28,1	260	Tanino
6,330	22,1	260	Tanino
7,319	13,2	260	Tanino
9,620	3,1	300; 330	Fenilpropanóide
14,962	3,7	300; 330	Fenilpropanóide
17,052	3,5	300; 330	Fenilpropanóide
21,752	3,1	300; 330	Fenilpropanóide
29,454	6,0	300; 330	Flavonol
33,929	6,0	300; 330	Fenilpropanóide
46,493	2,8	300; 330	Fenilpropanóide

Resultados obtidos por meio do software ChemStation.

Turnera diffusa – Análise em 360 e 270 nm

O extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Turnera diffusa* apresentou flavonas derivadas da apigenina e luteolina, entre 24,650 e 40,155 minutos, como principais constituintes (figura 9, tabela 5).

Flavonóides exibem dois máximos de absorção entre 330-360 nm (banda I) e 250-270 nm (banda II), que são originados pelos anéis B e A, respectivamente. O principal constituinte com tempo de retenção de 33,240 minutos mostrou máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$ 268, 338) no UV, sugerindo ser uma flavona derivada de luteolina. A flavona 7,3',4' – trimetoxiflavona foi isolada da *Turnera diffusa* por DOMINGUEZ e HINOJOSA (1976).

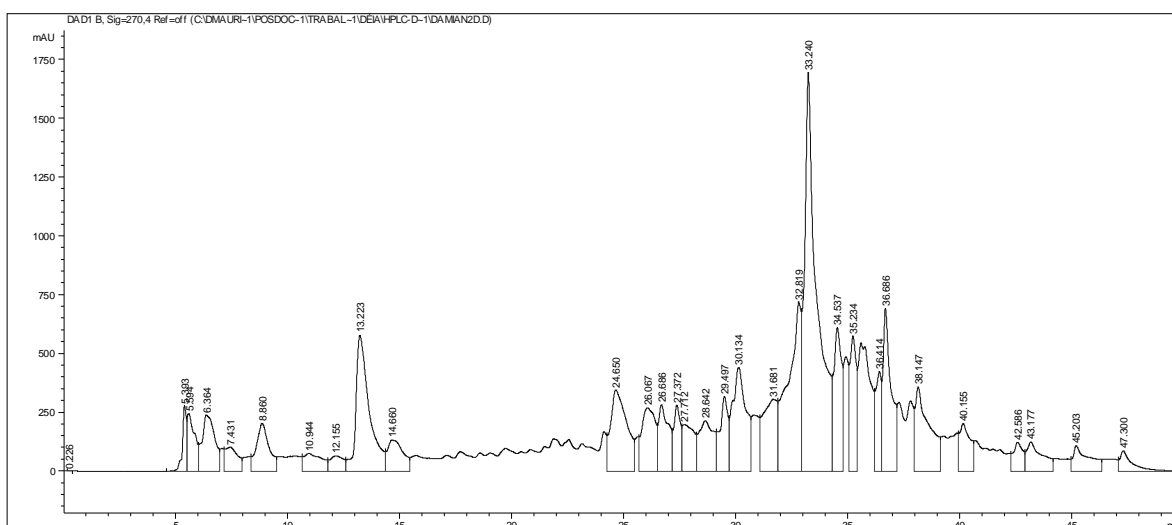


Figura 9 – Cromatograma de *Turnera diffusa* obtido por CLAE-DAD em 270 nm.

Tabela 5 – Classes químicas detectadas no extrato hidroalcoólico de *Turnera diffusa* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos.

Tempo de retenção (min)	% encontrada	Máximos de Absorção $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Classes detectadas
5,393	1,0	270	Tanino
5,594	1,2	270	Tanino
6,364	1,1	270	Tanino
8,860	1,5	270	Tanino
12,155	1,5	300, 330	Fenilpropanóide
13,223	4,6	280	Fenilpropanóide
14,660	2,6	300, 330	Fenilpropanóide
24,650	2,0	270, 338	Flavona
26,067	4,6	270, 340	Flavona
26,686	4,1	260, 365	Flavonol
27,372	3,2	270, 338	Flavona
28,642	4,4	270, 340	Flavona
29,497	4,0	260, 360	Flavonol
30,134	2,8	270, 338	Flavona
31,681	2,2	270, 350	Flavona
33,240	30,5	270, 340	Flavona
34,537	3,1	270, 340	Flavona
35,234	6,8	270, 340	Flavona
36,686	3,4	265, 365	Flavonol
38,147	1,5	270, 340	Flavona
40,155	4,4	270, 350	Flavona

Resultados obtidos por meio do software ChemStation.

***Heteropterys aphrodisiaca* – Análise em 360, 270 e 210 nm**

Os principais constituintes do extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca* são ácidos fenólicos derivados do ácido gálico, caféico e clorogênico (figura 10, tabela 6). A análise usando comprimento de onda de 210 nm também indicou a presença de saponinas muito polares.

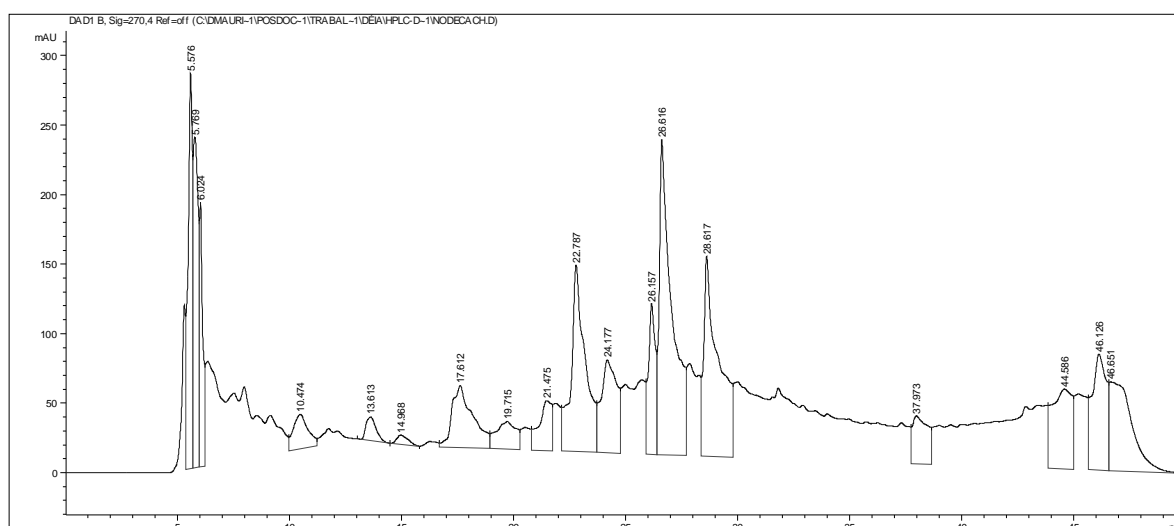


Figura 10 – Cromatograma de *Heteropterys aphrodisiaca* obtido por CLAE-DAD em 270 nm.

Tabela 6 – Classes químicas detectadas no extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos.

Tempo de retenção (min)	% encontrada	Máximos de Absorção $I_{\text{máx}}$ (nm)	Classes detectadas
5,576	22,5	270	Tanino
5,769	16,5	280	Tanino
6,024	15,5	270	Tanino
13,613	3,4	300, 330	Fenilpropanóide
17,612	4,3	300, 330	Fenilpropanóide
22,787	5,2	300, 330	Fenilpropanóide
24,177	3,4	300, 330	Fenilpropanóide
26,157	3,8	300, 330	Fenilpropanóide
26,616	13,6	300, 330	Fenilpropanóide
28,617	6,2	300, 330	Fenilpropanóide
37,973	3,1	300, 330	Fenilpropanóide

Resultados obtidos por meio do software ChemStation.

4.2 – Experimentos in vivo

4.2.1 – Análise da Apoptose pela Reação de Imuno-histoquímica do TUNEL

A figura 11 mostra a marcação de uma célula apoptótica de hipocampo de rato idoso, ou seja, TUNEL-positiva.

Na tabela 7 observa-se que a porcentagem de morte nas regiões hipocampais analisadas pela reação de TUNEL não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais idosos e jovens. Além disso, os ratos idosos tratados com os três diferentes extratos de plantas não diferiram dos animais idosos sem tratamento. A porcentagem foi calculada como (Células apoptóticas/ Total de células) X 100.



Figura 11: Fotomicrografia do giro denteado (hipocampo) mostrando uma célula apoptótica (seta) corada por Diaminobenzidina (DAB). Notar os corpos apoptóticos no interior da mesma. Ao redor estão as células normais coradas por Hematoxilina de Carrazi. Objetiva de 100X.

Tabela 7 – Porcentagem de células TUNEL-positivas nas diferentes regiões do hipocampo (CA1, CA3, Giro denteado dorsal e Giro denteado ventral) de 3 grupos de animais idosos tratados com extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* (PG), extrato hidroalcoólico de *Turnera diffusa* (TD) e extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca* (HA), além dos controles (CTL), tratados com água. Os resultados representam a média \pm EP. ANOVA, NS.

% de Células TUNEL-positivas (x100)				
Grupo/ Tratamento (n)	CA1	CA3	GDd	GDv
Idoso CTL (7)	3 \pm 3	0 \pm 0	2 \pm 2	0 \pm 0
Jovem CTL (4)	0 \pm 0	11 \pm 11	5 \pm 3	6 \pm 6
Idoso PG (6)	10 \pm 6	5 \pm 5	0 \pm 0	3 \pm 3
Idoso TD (5)	10 \pm 7	7 \pm 7	0 \pm 0	3 \pm 3
Idoso HA (6)	7 \pm 4	12 \pm 8	0 \pm 0	0 \pm 0

4.3 – Experimentos *in vitro*

4.3.1 – Avaliação dos Efeitos dos Extratos nos Astrócitos pela Reação de Hoechst

A figura 12 mostra uma imagem de células marcadas com o corante Hoescht 33342. Os núcleos apoptóticos apresentam-se picnóticos, fragmentados e/ou com a cromatina condensada, quando comparados com os núcleos normais.

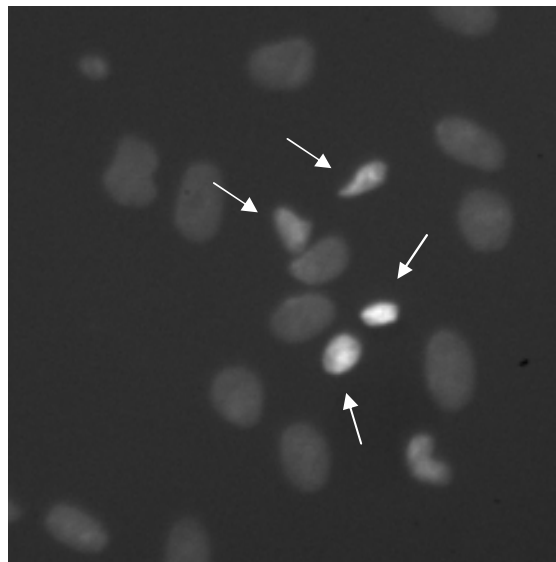


Figura 12: Imagem típica de núcleos de astrócitos marcados com Hoechst 33342 e examinados em microscópio de fluorescência. Os núcleos apoptóticos são identificados pelas setas.

4.3.1.1 – Avaliação da proliferação celular

As células foram marcadas com Hoescht 33342 após incubação com os extratos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca* nas concentrações de 10, 100 ou 1000 $\mu\text{g/ml}$ e em três diferentes tempos (6, 24 ou 48h). Os núcleos totais presentes (normais e apoptóticos) em um campo foram contados para se ter indícios sobre a proliferação destas células.

Pelas figuras 13, 14 e 15, verifica-se que a ANOVA não detectou efeito significativo da incubação com os extratos no número total de células. A análise estatística foi realizada nos três diferentes tempos independentemente.

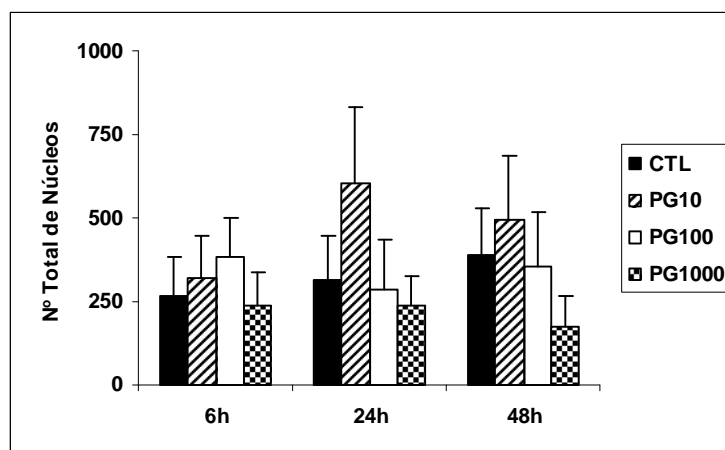


Figura 13: Número total de núcleos presentes após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Panax ginseng* (PG) nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$. Os dados representam a média \pm EP. ANOVA, NS.

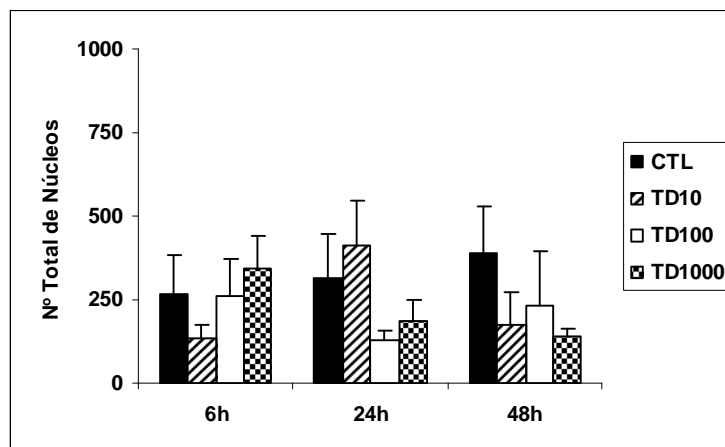


Figura 14: Número total de núcleos presentes após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Turnera diffusa* (TD) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml. Os dados representam a média ± EP. ANOVA, NS.

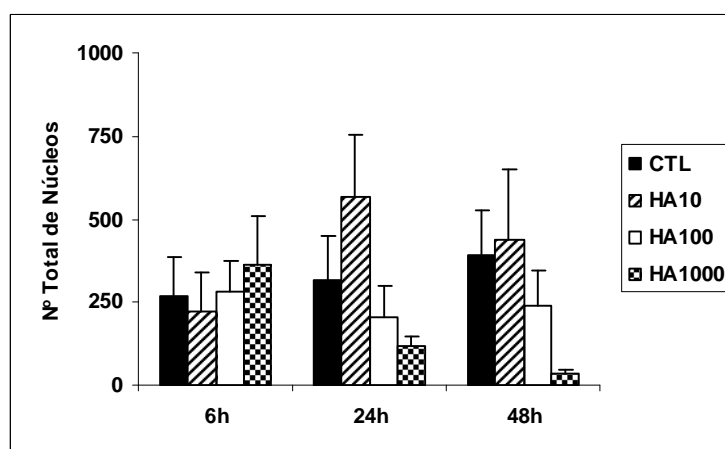


Figura 15: Número total de núcleos presentes após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Heteropterys aphrodisiaca* (HA) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml. Os dados representam a média ± EP. ANOVA, NS.

4.3.1.2 – Avaliação da apoptose (toxicidade dos extratos)

Como pode ser observado na figura 16, a ANOVA de uma via, realizada comparando as porcentagens de morte das células, não detectou diferenças entre as células incubadas com o extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* e as células do grupo controle.

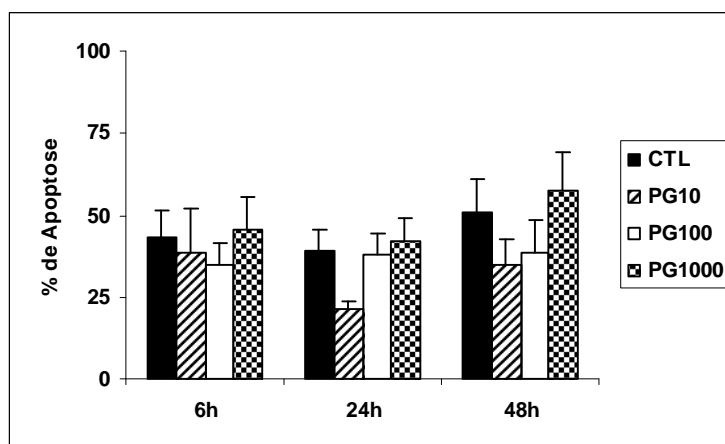


Figura 16: Porcentagem de núcleos apoptóticos após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Panax ginseng* (PG) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml. Os dados representam a média \pm EP. ANOVA, NS.

A ANOVA detectou um efeito significativo na porcentagem de morte das células incubadas por 6 horas com o extrato de *Turnera diffusa* [$F_{(3,32)}=3,03$; $P<0,05$]. As células incubadas com a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ por 6 horas apresentaram uma porcentagem de morte maior do que todos os outros grupos de células com o mesmo período de avaliação (Duncan, $P<0,05$) (figura 17). Esse efeito se repetiu com as células avaliadas após 24 horas de incubação [$F_{(3,32)}=5,19$; $P<0,05$], porém as células incubadas com a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ nesse período de tempo apresentaram um aumento na porcentagem de morte somente em relação às células do grupo controle e às células incubadas com a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Duncan; $P<0,01$). Com 48 horas de incubação, essa diferença não foi mais detectada, provavelmente devido ao aumento da porcentagem da morte das células do grupo controle.

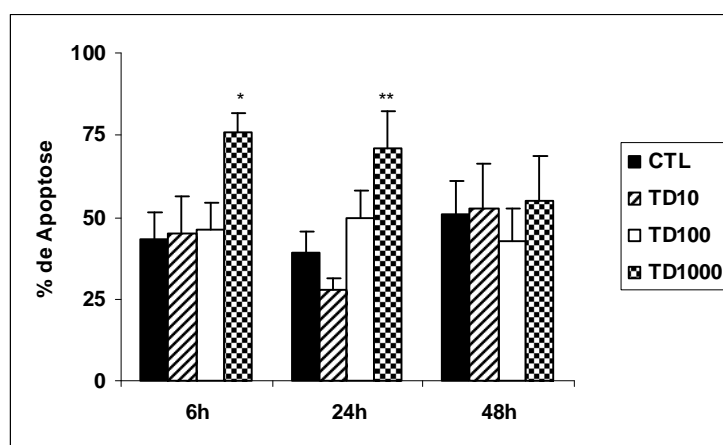


Figura 17: Porcentagem de núcleos apoptóticos após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Turnera diffusa* (TD) nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$. Os dados representam a média \pm EP. ANOVA/Duncan: * $P<0,05$ (em relação a todos os outros grupos, às 6h); ** $P<0,05$ (em relação ao grupo controle (CTL) e ao grupo TD10, às 24h).

Já o extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca* apresentou toxicidade quando incubado com as células por 24 horas (figura 18). A ANOVA detectou um efeito significativo [$F_{(3,32)} = 21,83$; $P < 0,05$] na porcentagem de morte das células. A análise a posteriori foi realizada pelo teste de Duncan e detectou que a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ provocou um aumento na porcentagem de morte em relação a todos os outros grupos ($P < 0,01$).

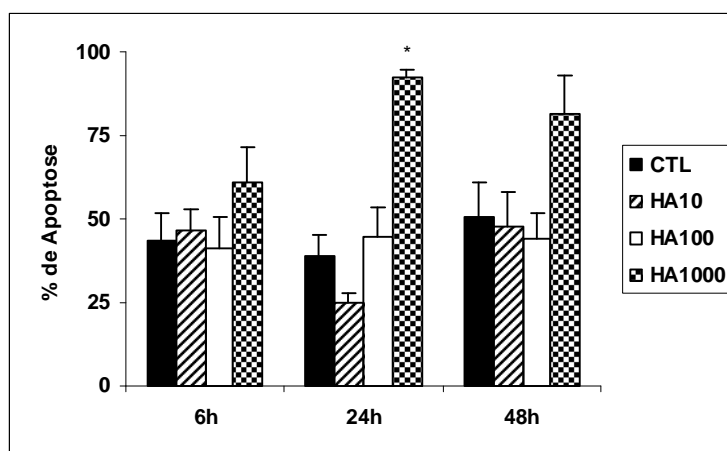


Figura 18: Porcentagem de núcleos apoptóticos após incubação por 6, 24 e 48 horas com extrato de *Heteropterys aphrodisiaca* (HA) nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$. Os dados representam a média \pm EP. ANOVA/Duncan: * $P < 0,05$ (em relação a todos os outros grupos, às 24h).

4.3.2 – Avaliação do Efeito Protetor do Extrato de *Panax ginseng* frente a Agentes Apoptóticos

A concentração escolhida para verificação de um possível efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* foi de 100 $\mu\text{g/ml}$, devido à ausência de toxicidade observada nos experimentos anteriores. A apoptose foi induzida por staurosporina, cafeína ou etanol, que foram incubados por 6 horas.

A staurosporina induziu apoptose nas células, pois houve um aumento de morte significativo de células incubadas com a mesma quando comparadas com o grupo controle e o grupo PG100 [$F_{(3,56)} = 5,81$; $P < 0,05$]. Por sua vez, a incubação

prévia do extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* não foi capaz de prevenir essa apoptose induzida pela staurosporina (figura 19-A).

A incubação das células com cafeína e etanol não causou morte estatisticamente diferente do grupo controle, devido à concentração ou ao tempo de incubação escolhidos, dificultando a análise de um possível efeito protetor do extrato (figuras 19-B e 19-C).

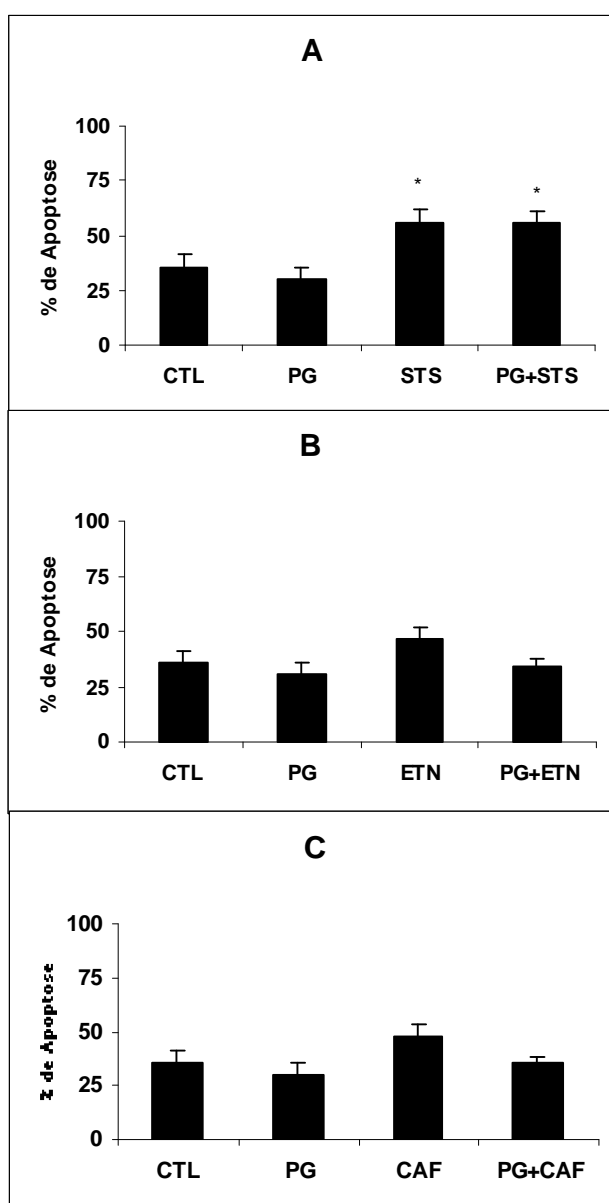


Figura 19: Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* (PG – 100 µg/ml), frente a agentes apoptóticos como: **(A)** a staurosporina (STS – 250 nM), **(B)** o etanol (ETN – 2,5%) e **(C)** a cafeína (CAF – 10 mM). A porcentagem de apoptose desses agentes foi comparada com o grupo controle (CTL). Os dados representam a média ± EP. ANOVA/Duncan: * $P < 0,05$ (em relação ao grupo CTL).

5. DISCUSSÃO

No mundo e no Brasil, é crescente o uso de plantas medicinais para tratamento de diversas enfermidades e para melhora geral de qualidade de vida. Os idosos constituem uma classe social em crescimento que se beneficia e se entusiasma com os efeitos das plantas medicinais, devido aos déficits físicos e cognitivos decorrentes da idade.

Diante desse quadro, a ciência busca novas drogas e substâncias capazes de melhorar as moléstias relacionadas ao envelhecimento ou ainda, atenuar seus processos degenerativos. A investigação de medicamentos de origem vegetal que se enquadrem nos conceitos de adaptógeno ou nootrópico pode ter importância clínica e econômica.

Diversos são os estudos de substâncias de origem vegetal buscando um efeito antiapoptótico nas células do SNC (LEE et al., 2003; DENG et al., 2004; BEI et al., 2005; EGASHIRA et al., 2005). A maioria desses estudos utiliza a isquemia como modelo indutor de apoptose. A administração de *Carthamus tinctorius* em ratos diminuiu a área de infarto cerebral e a expressão da caspase-3 (proteína pró-apoptótica) (LUO et al., 2004). Em outro estudo, a atividade das enzimas SOD e GSH aumentou e o número de células apoptóticas diminuiu graças ao tratamento desses animais com os glicosídeos de *Rubus parvifolius* (WANG et al., 2006a). Em um modelo de morte gerado por privação de soro, frações da *Gastrodia elata* também protegeram células PC12 da apoptose (HUANG et al., 2007). Essas plantas são comumente utilizadas para melhorar enfermidades relacionadas ao SNC e a proteção da morte celular pode ser um indício de mecanismo de ação dessas substâncias.

No presente trabalho, buscou-se avaliar o efeito dos extratos hidroalcoólicos de três plantas usadas como adaptógeno, frente a apoptose em diferentes modelos experimentais, bem como determinar o seu perfil fitoquímico.

É importante lembrar que os testes fitoquímicos empregados não descartam a presença de nenhuma classe fitoquímica e, sim, apontam se sua concentração é detectável ou não. Além disto, estão eventualmente sujeitos a apresentarem falso-positivos em razão da complexidade de substâncias presentes

nos extratos vegetais (WAGNER et al., 1984; ROCHA, 2002). Também não se deve esquecer que os resultados referem-se especificamente à parte do vegetal coletada e que a extração hidroalcoólica pode eliminar ou concentrar determinados constituintes químicos no liofilizado, dependendo de sua polaridade. No caso do extrato hidroalcoólico, espera-se que predominem os constituintes polares. Portanto, flavonóides, ácidos fenólicos e outras classes ricas em radicais hidroxilas seriam facilmente extraídos, enquanto triterpenos e esteróides, mais apolares, seriam extraídos em pequena quantidade, ainda que presentes na planta (WAGNER et al., 1984).

A prospecção fitoquímica realizada com o extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* demonstrou a presença de flavonóides, taninos e saponinas. Através da CLAE foi constatado que os principais constituintes são ácidos fenólicos, principalmente os derivados dos ácidos gálico e caféico. Várias saponinas muito polares, provavelmente contendo açúcares ligados em seu esqueleto esteroidal, foram detectadas em 210 nm (ACKLOO et al., 2000). Compostos fenólicos, tais como, os ácidos p-cumárico, protocatecuico, gentísico, ferúlico, entre outros foram encontrados por SIVAKUMAR e PAEK (2005) nas raízes de *Panax ginseng*. O laudo técnico da planta fornecido pela empresa que a comercializou descreve a presença de ginsenosídeos e saponinas (anexo 2). Os principais constituintes reportados pela literatura são ginsenosídeos do tipo damarano (saponinas triterpênicas) (ASSINEWE et al., 2003; CHRISTENSEN et al., 2006; LI et al., 2006; NG et al., 2006; SCHLAG e McINTOSH, 2006; WANG et al., 2006b; CHANG et al., 2007). Ginsenosídeos apresentam ações neuroprotetoras podendo ser utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas (RAUSCH et al., 2006).

O extrato hidroalcoólico de *Turnera diffusa* apresentou triterpenos, além de flavonóides, taninos e saponinas, na prospecção fitoquímica qualitativa. Através da CLAE detectou-se principalmente a presença de flavonóides, classe que tem se apresentado como potente antioxidante, podendo desempenhar um importante papel nas doenças neurodegenerativas (DAJAS et al., 2003; MUZITANO e COSTA, 2006). Os principais constituintes foram flavonas derivadas da apigenina e luteolina, entre 24,650 e 40,155 minutos, o que é corroborado pela análise feita

por ZHAO et al. (2007), que também encontraram várias flavonas no extrato de *Turnera diffusa*.

Investigações fitoquímicas realizadas por diversos autores, identificaram a presença de várias substâncias na *Turnera diffusa*, entre as quais estão os flavonóides (PIACENTE et al., 2002), terpenóides, carboidratos, derivados fenólicos e cianogênicos (ZHAO et al., 2007), alcalóides, saponinas (KUMAR et al., 2006), óleos voláteis (KUMAR et al., 2005) e arbutina (fenólico glicosilado) (KUMAR e SHARMA, 2005). Os principais constituintes dos óleos essenciais são o óxido de cariofileno, cariofileno, cadineno, elemeno e 1,8-cineol (ALCARAZ-MELENDZ et al., 2004).

Ao analisar qualitativamente o extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca*, também se encontrou flavonóides, taninos e saponinas. O laudo técnico fornecido pela empresa que comercializou o produto também descreve a presença de taninos (anexo 3). Os dados obtidos por meio da CLAE indicam que os principais constituintes são ácidos fenólicos derivados do ácido gálico, caféico e clorogênico. Em estudo realizado anteriormente, constatou-se também a presença de flavonóides glicosilados, glicosídeos cardioativos com núcleo esteroidal e também com anéis lactônicos pentagonais, saponinas, taninos condensados e hidrolisáveis, glicosídeos aromáticos e derivados cianogênicos em um extrato padronizado de *Heteropterys aphrodisiaca* (GALVÃO et al., 2002).

Para os experimentos *in vivo*, os animais foram tratados por 30 dias com os extratos hidroalcoólicos das plantas em estudo. Os cérebros desses animais foram retirados para posterior reação do TUNEL. Analisaram-se as regiões CA1, CA3 e Giro denteado dorsal e ventral do hipocampo quanto à porcentagem de morte. As regiões analisadas pela reação de TUNEL não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais idosos tratados com os três diferentes extratos de plantas, e os grupos de animais idosos e jovens sem tratamento.

No envelhecimento, é descrito que diversas populações de neurônios podem ter seu número reduzido pela morte celular. Além disso, várias enzimas que sintetizam neurotransmissores diminuem com a idade, indicando

anormalidades nos neurônios que sintetizam estes transmissores (PRICE, 2003). O hipocampo é uma região do cérebro que está envolvida nos processos de memória, processo que está alterado nos idosos (KANDEL et al., 2003).

Essa perda neuronal é discutida por muitos autores. Parte dos mesmos descreve que no envelhecimento há uma diminuição fisiológica no número total de células em algumas regiões do cérebro (McGEER et al., 1977; VIJAYASHANKAR e BRODY, 1979; McGEER et al., 1984). Neste sentido, ISHIMARU et al. (1991) observaram que o número de células no hipocampo dos ratos idosos é de 10 a 30% menor do que dos ratos jovens. Um aumento da apoptose foi encontrado no estriado de ratos adultos e idosos, através da reação de TUNEL, o que pode estar relacionado com essa diminuição celular no SNC (ZHANG et al., 1995).

Entretanto, alguns estudos sugerem que essa perda neuronal durante o envelhecimento normal é altamente específica quanto às regiões afetadas e quanto aos fatores que a determinam. Por exemplo, há autores que descrevem que essa perda neuronal está mais ligada a processos degenerativos, como na doença de Alzheimer e que o declínio fisiológico das funções cognitivas parece estar mais relacionado com alterações sinápticas (MORRISON e HOF, 1997, 2002; KELLY et al., 2006). Outros estudos sugerem que a perda neuronal durante o envelhecimento no hipocampo, pode ser atribuída, em parte, a uma longa exposição a glicorticóides (REAGAN e McEWEN, 1997).

WHITE e BARONE (2001) realizaram um estudo, que caracterizou a apoptose dos cérebros de ratos recém-nascidos, de ratos adultos e de ratos idosos. Notaram que no neocórtex, tronco encefálico, hipocampo e cerebelo, a morte celular por apoptose diminui no envelhecimento, quando comparada com os animais recém-nascidos. Nos recém-nascidos, essa alta taxa de apoptose está intimamente ligada ao desenvolvimento, proliferação e migração celular (WHITE e BARONE, 2001). Outros autores também analisaram o bulbo, o cerebelo e o corpo caloso de animais idosos. Os mesmos verificaram um aumento das células danificadas da região do cerebelo e bulbo nos animais idosos (DORSZEWSKA et al., 2004). Portanto, o grau de apoptose no animal idoso é algo que não está totalmente definido.

Os dados do presente trabalho estão de acordo com alguns achados na literatura que descrevem ausência de um grande número de células apoptóticas no cérebro de animais idosos. Além de medir os efeitos anatômicos do envelhecimento de uma região específica do cérebro, seria adequado fazer outros ensaios que permitam verificar outros aspectos da apoptose, por exemplo, avaliar as caspases ou as proteínas da família Bcl-2 (CHAO & KORSMEYER, 1998; GORMAN et al., 1998), que estão diretamente relacionadas ao evento.

Para os estudos *in vitro*, foram feitas culturas primárias de astrócitos do córtex de ratos neonatos. Os astrócitos são células da glia muito importantes na proteção de neurônios e oligodendrócitos. Eles são responsáveis pela expressão de enzimas antioxidantes, transporte e metabolismo de glicose, síntese de glutathiona (enzima antioxidante) e captação da vitamina C (WILSON, 1997).

O equilíbrio da proliferação celular é tão importante quanto o de morte celular, pois uma proliferação descontrolada poderia gerar um tumor (EVAN e VOUSDEN, 2001). Nesse sentido, diversos estudos com plantas medicinais buscam um efeito inibitório da proliferação dessas células tumorais, ou seja, um efeito pró-apoptose (PATHAK et al., 2003; CHOR et al., 2005; ROY et al., 2007).

No presente trabalho, os três extratos não influenciaram a proliferação celular nas concentrações e tempos utilizados. O número total de células presentes quando tratadas com os extratos foi igual ao das células do grupo controle.

Quanto à morte celular, o extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* não aumentou a mortalidade celular e, portanto, não demonstrou toxicidade nas três concentrações do extrato e nos três tempos de incubação avaliados. Esses resultados *in vitro* corroboram os dados *in vivo* que descrevem a segurança e baixa toxicidade do *Panax ginseng* (KAKU et al., 1975; APHALE et al., 1998; KITTS e HU, 2000; RUSSO, 2001).

O extrato hidroalcoólico de *Turnera diffusa* demonstrou toxicidade na concentração de 1000 µg/ml, após 6 horas de incubação e o extrato hidroalcoólico de *Heteropterys aphrodisiaca*, após 24 horas de incubação, na mesma concentração. Contudo as concentrações de 10 e 100 µg/ml de ambos os extratos

apresentaram efeito semelhante ao grupo controle após 6 horas de incubação, o que determina a baixa toxicidade celular dessas concentrações nesse período. Esperava-se que às 48 horas de incubação, a concentração de 1000 µg/ml dos extratos de *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca* deveria continuar diminuindo a viabilidade dos astrócitos, porém os resultados indicaram que a porcentagem de células viáveis não diferiu do controle. Isso pode ter ocorrido, pois, após 48 horas sem troca de meio, mesmo as células controles começam a ficar sem nutrientes, a perder a aderência e a morrer naturalmente.

Para avaliar o efeito protetor de *Panax ginseng* frente a conhecidos agentes apoptóticos, as células foram tratadas com 100 µg/ml do extrato por 24 horas. Nas últimas 6 horas, adicionou-se um dos agentes indutores de morte celular: a staurosporina, numa concentração de 250 nM, etanol a 2,5% ou cafeína numa concentração de 10 nM (adaptado de HIRATA et al., 2006).

A staurosporina, através de seus múltiplos mecanismos de ação, é conhecida como uma droga que atua no retículo endoplasmático e mitocôndrias, aumentando a concentração de Ca^{2+} no citoplasma, o que aumenta os níveis de apoptose. Por sua vez, a incubação do extrato hidroalcoólico de *Panax ginseng* não foi capaz de proteger os astrócitos dessa apoptose induzida pela staurosporina.

A incubação das células com cafeína não causou morte estatisticamente diferente do grupo controle, talvez devido à concentração ou ao tempo de incubação escolhido. A cafeína, em altas concentrações, induz morte celular programada ou apoptose (BODE e DONG, 2007). JANG et al. (2002) em estudo realizado em neuroblastoma humano observaram que a cafeína aumenta a atividade da caspase 3.

A concentração e tempo de incubação do etanol também não foram suficientes para provocar morte diferente dos astrócitos sem tratamento, dificultando a avaliação das células tratadas com etanol e ginseng. São vários os efeitos do etanol no SNC, podendo ocorrer mudanças na neurogênese, na morfologia dos neurônios e um aumento na morte de neurônios (WARD e WEST, 1992). Nas células da glia, o etanol aumenta a morte celular por necrose ou

apoptose, sendo esse efeito relacionado ao aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático (HOLOWNIA et al., 1997).

Em um modelo de apoptose induzida pelo estresse oxidativo gerado por H_2O_2 , o extrato aquoso de *Panax ginseng* manteve a atividade das enzimas antioxidantes dos astrócitos reduzindo a morte dos mesmos (NAVAL et al., 2007). Em células neuronais SK-N-MC, a adição de um extrato de ginseng diminuiu a apoptose induzida por um poluente neurotóxico, porém concentrações muito elevadas diminuiriam a viabilidade celular, o que indica a importância desse tipo de investigação na determinação de concentrações efetivas na proteção (LEE et al., 2004). Embora não tenham sido realizados os ensaios para verificar o efeito anti-apoptótico da *Heteropterys aphrodisiaca*, MATTEI et al. (2001) mostraram que o extrato da mesma apresenta um bom efeito anti-oxidante *in vitro* e *in vivo*, o que sugere que a planta poderia ser eficaz em modelos de apoptose induzida por estresse oxidativo.

As técnicas *in vitro* utilizadas precisam ser aprimoradas, adequando-se o tempo de tratamento dos agentes indutores de apoptose e ainda, futuramente, utilizar uma metodologia quantitativa, como é o caso da citometria de fluxo. Os estudos científicos com substâncias vegetais que protegem o SNC da apoptose são poucos e portanto, é importante aprofundar esses estudos.

Para o estudo em animais, é também interessante utilizar um agente apoptótico, para verificar a eventual proteção dos extratos, já que segundo alguns estudos da literatura, o envelhecimento por si só não é um bom “modelo indutor de apoptose” no SNC.

Futuramente, o estudo da apoptose em células do SNC poderá fazer parte de um screening de plantas medicinais com efeitos na melhora de cognição ou ainda, de plantas medicinais capazes de atuar em processos neurodegenerativos, comuns no envelhecimento, como a doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, o que seria de grande valor terapêutico e social.

6. CONCLUSÕES

1 – Os extratos hidroalcoólicos das raízes de *Panax ginseng*, das folhas de *Turnera diffusa* e das raízes de *Heteropterys aphrodisiaca* apresentaram a presença de compostos fenólicos, flavonóides e saponinas, substâncias amplamente descritas como antioxidantes. Além disso, a análise fitoquímica permitiu certo controle de qualidade, já que foi detectada nesses extratos a presença de constituintes já descritos pela literatura.

2 – Verificou-se que a porcentagem de apoptose no hipocampo durante o envelhecimento não está alterada quando comparada com os ratos jovens. O tratamento com os três extratos também não produziu nenhum efeito no hipocampo desses ratos idosos.

3 – A incubação com os três extratos não alterou a proliferação dos astrócitos em cultura. O extrato de *Panax ginseng*, não foi tóxico para as células, ou seja, não aumentou a apoptose em nenhuma das concentrações ou tempo analisados. Já os extratos de *Turnera diffusa* e *Heteropterys aphrodisiaca* causaram um aumento na apoptose com a concentração de 1000 µg/ml.

4 – O extrato de *Panax ginseng* não protegeu os astrócitos da apoptose causada pela staurosporina. Porém não se pode descartar a hipótese de que o *Panax ginseng* possa vir a exibir esta atividade em outros modelos experimentais.

7. REFERÊNCIAS

Ackloo SZ, Smith RW, Terlouw JK, McCarry BE. Characterization of ginseng saponins using electrospray mass spectrometry and collision-induced dissociation experiments of metal-attachment ions. *Analyst*. 2000; 125: 591-7.

Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Flores-Saens JL, Aguirre-Garcia F. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res*. 2002; 16: 383-6.

Alarcon-Aguilara FJ, Roman-Ramos R, Perez-Gutierrez S, Aguilar-Contreras A, Contreras-Weber CC, Flores-Saens JL. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J Ethnopharmacol*. 1998; 61: 101-10.

Albert MS. Age-related changes in cognitive function. In: Albert ML, Koefel JE. *Clinical neurology of aging*. 2a ed. New York: Oxford University Press; 1994. p.314-28.

Alcaraz-Melendez L, Delgado-Rodriguez J, Real-Cosio S. Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*. 2004; 75: 696-701.

Allen RT, Hunter III WJ, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997; 37: 215-28.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicolson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996; 87:171.

Aphale AA, Chhibba AD, Kumbhakarna NR, Mateenuddin M, Dahat SH. Subacute toxicity study of the combination of ginseng (*Panax ginseng*) and ashwagandha (*Withania somnifera*) in rats: a safety assessment. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1998; 42: 299-302.

Arletti R, Benelli A, Cavazzuti E, Scarpetta G, Bertolini A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology.* 1999; 143: 15-9.

Aruoma OI. Nutrition and health aspects of the free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32: 671-83.

Assinewe VA, Baum BR, Gagnon D, Arnason JT. Phytochemistry of wild populations of *Panax quinquefolius* L. (North American ginseng). *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 4549-53.

Bahrke MS, Morgan WR. Evaluation of ergogenic properties of ginseng: an update. *Sports Med.* 2000; 29: 113-33.

Bei W, Peng W, Ma Y, Xu A. Flavonoids from the leaves of *Diospyros kaki* reduce hydrogen peroxide-induced injury of NG108-15 cells. *Life Sci.* 2005; 76: 1975-88.

Benesová O. Neuropathobiology of senile dementia and mechanism of action of nootropic drugs. *Drugs Aging.* 1994; 4: 285-303.

Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett.* 2007; 247: 26-39.

Brekhman II, Dardymov IV. New substances of plants origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol.* 1969; 9: 419-30.

Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 2006; 78: 2872-88.

Cardozo-Pelaez F, Stedeford TJ, Brooks PJ, Song S, Sanchez-Ramos JR. Effects of diethylmaleate on DNA damage and repair in the mouse brain. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 292-8.

Carlini EA. Efeito adaptógeno ou resistógeno de algumas plantas. In: ____ Medicamentos, droga e saúde. São Paulo: Editora Hucitec; 1995.

Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29: 323-33.

Chang TC, Huang SF, Yang TC, Chan FN, Lin HC, Chang WL. Effect of ginsenosides on glucose uptake in human Caco-2 cells is mediated through altered Na⁺/glucose cotransporter 1 expression. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 1993-8.

Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Ann Rev Immunol.* 1998; 16: 395-419.

Chen J, Xie M, Fu Z, Lee FS-C, Wang X. Development of a quality evaluation system for *Panax quinquefolium*. L based on HPLC chromatographic fingerprinting of seven major ginsenosides. *Microchem J.* 2007; 85: 201-8.

Chintawar SD, Somani RS, Kasture VS, Kasture SB. Nootropic activity of *Albizzia lebbek* in mice. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81: 299-305.

Chor SY, Hui AY, To KF, Chan KK, Go YY, Chan HL, Leung WK, Sung JJ. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of herbal medicine on hepatic stellate cell. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 180-6.

Christensen LP, Jensen M, Kidmose U. Simultaneous determination of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng root (*Panax quinquefolium* L.) by high-performance liquid chromatography. J Agric Food Chem. 2006; 54: 8995-9003.

Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. Neurobiol Aging. 1994; 16: 53-7.

Coon JT, Ernst E. *Panax ginseng*. A systematic review of adverse effects and drug interactions. Drug Saf. 2002; 25: 323-44.

Cordeiro R, Nunes VA, Almeida CR. Enciclopédia das plantas que curam. Vol1. São Paulo: Editora Três; 1996. p199-200.

Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 6 Volumes. Brasília: Ministério da agricultura / Instituto brasileiro de desenvolvimento florestal; 1984.

Cotman CW, Anderson AJ. A potencial role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 1995; 10:19-45.

Court WE. The doctrine of signatures or similitudes. TiPS. 1985; 6: 225-7.

Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science. 1993; 262: 689-94.

Dahanukar SA, Thatte UM. Current status of ayurveda in phytomedicine. Phytomedicine. 1997; 4: 359-68.

Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M, Morquio A. Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36: 1613-20.

Davydov M, Krikorian AD. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72: 345-93.

Deng M, Zhao JY, Tu PF, Jiang Y, Li ZB, Wang YH. Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2004; 505:11-8.

Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2003; 2: 95-107.

Dominguez XA, Hinojosa M. Mexican medicinal plants. XXVIII. Isolation of 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy-flavone from *Turnera diffusa*. *Planta Med.* 1976; 30: 68-71.

Dorszewska J, Adamczewska-Goncerzewicz Z, Szczech J. Apoptotic proteins in the course of aging of central nervous system in the rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004; 139: 145-55.

Duarte-Almeida JM, Vidal Novoa A, Lynares AF, Lajolo FM, Genovese MI. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant Food.* 2006; 61: 187-92.

Egashira N, Iwasaki K, Akiyoshi Y, Takagaki Y, Hatip-Al-Khatib I, Mishima K, Kurauchi K, Ikeda T, Fugiwara M. Protective effect of Toki-shakuyaku-san on amyloid beta 25-35-induced neuronal damage in cultured rat cortical neurons. *Phytother Res.* 2005; 19: 450-3.

Elisabetsky E, Figueiredo W, Oliveira G. Tradicional amazonian nerve tonics as antidepressant agents: *Chaunochiton kappleri*: A case study. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 1992; 1: 125-61.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001; 411: 342-8.

Farag MA, Huhman DV, Lei ZT, Sumner LW. Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochemistry*. 2007; 68: 342-54.

Floyd RA. Oxidative damage to behavior during aging. *Science*. 1991; 254: 1597.

Franco SL. *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reiss. Celastraceae – Proposta tecnológica de macerados [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1990.

Fulder S. The root of being: GINSENG and the pharmacology of harmony. London: Hutchinson; 1980.

Galduróz JCF, Santos RF, Carlini EA. Os efeitos da idade e sexo sobre a viscosidade sanguínea em voluntários normais. *Temas*. 1995; 50: 159-166.

Galvão SMP, Marques LC, Oliveira MGM, Carlini EA. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): A Brazilian plant that improves memory in aged rats. *J Ethnopharmacol*. 2002; 79: 305-11.

Galvão SMP, Mendes FR, Oliveira MGM, Mattei R, Carlini EA. Possíveis efeitos adaptógenos da *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. (Extrato BST 0298), uma planta da área do pantanal brasileiro. *Arq Bras Fitomed Cient*. 2005; 2: 41-55.

Galvão SMP, Rodrigues E, Carlini EA. Estudo pré-clínico de uma planta brasileira (Extrato BST 0298) com efeito sobre a memória de ratos idosos. *Revista Racine*. 2001; 60: 56-60.

Galvão SMP. Estudo farmacológico e toxicológico de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. – Malpighiaceae (nó-de-cachorro) em roedores jovens e idosos [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1997.

Galvão SMP. *Heteropterys aphrodisiaca* O.Mach (extrato BST 0298): Estudos pré-clínicos farmacológicos e toxicológicos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2003.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119: 493-501.

Gillis CN. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem Pharmacol*. 1997; 54: 1-8.

Giurgea C. Piracetam: Nootropic pharmacology of neurointegrative activity. *Current Develop Psychopharmacol*. 1976; 3: 221-73.

Gorman AM, Orrenius S, Ceccatelli S. Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport*. 1998; 9: R49-55.

Gracioso JS, Vilegas W, Batochio M, Nasser LM, Camargo EES, Hiruma-Lima CA, Paula ACB, Toma W, Almeida ABA, Souza Brito ARM. Preliminary antiulcerogenic activity of three organics extracts obtained from *Turnera diffusa* L. and *Turnera ulmifolia* L. [Resumo 10.132] In: XVI Congresso Latino-Americano de Farmacologia; 2000; Águas de Lindóia, SP.

Guarim Neto G. Plantas utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia e CNPq; 1987. p58.

Harman D. Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span. Ann N Y Acad Sci. 1994; 717: 1-15.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000; 407: 770-6.

Hernández T, Canales M, Avila JG, Duran A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). J Ethnopharmacol. 2003; 88: 181-8.

Hiramatsu M, Komatsu M. Mixed Japanese herbs and age-related neuronal functions. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. Antioxidant food supplements in human health. San Diego: Academic Press; 1999. p. 411-28.

Hirata H, Machado LS, Okuno CS, Brasolin A, Lopes GS, Smaili SS. Apoptotic effect of ethanol is potentiated by caffeine-induced calcium release in rat astrocytes. Neurosci Lett. 2006; 393: 136-40.

Holownia A, Ledig M, Ménez JF. Ethanol-induced cell death in cultured rat astroglia. Neurotoxicol Teratol. 1997; 19: 141-6.

Huang NK, Chern Y, Fang JM, Lin CI, Chen WP, Lin YL. Neuroprotective principles from *Gastrodia elata*. J Nat Prod. 2007; 70: 571-4.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer. 2002; 2: 277-88.

Ishimaru H, Ogawa S, Fuji K, Fukuta T, Kaneyama T, Nabeshima T. Aged-related changes in learning and memory, choline acetyltransferase activity and number of neuronal cells in rats. *J Pharmacobio-Dyn.* 1991; 14: 321-5.

Itil TM, Eralp E, Ahmed I, Kunitz A, Itil KZ. The pharmacological effects of *Ginkgo biloba*, a plant extract, on the brain of dementia patients in comparison with tacrine. *Psychopharmacol Bull.* 1998; 34: 391-7.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997; 88: 347-54.

Jang MH, Shin MC, Kang IS, Baik HH, Cho YH, Chu JP, Kim EH, Kim CJ. Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SK-N-MC. *J Korean Med Sci.* 2002; 17: 674-8.

Jin S, Park J, Nam K, Park S, Jung N. Korean red ginseng saponins with low ratios of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponin improve scopolamine-induced learning disability and spatial working memory in mice. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66: 123-9.

Joshi H, Parle M. Evaluation of nootropic potential of *Ocimum sanctum* Linn. in mice. *Indian J Exp Biol.* 2006; 44: 133-6.

Jow GM, Wu YC, Guh JH, Teng CM. Arnepavine oxalate induces cell death on CCRF-CEM leukemia cell line through an apoptotic pathway. *Life Sci.* 2004; 75: 549-57.

Junior JGS, Monte FHM, Blanco MM, Lanziotti VMNB, Maia FD, Leal LKA. Cognitive enhancement in aged rats after chronic administration of *Equisetum arvense* L. with demonstrated antioxidant properties in vitro. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81: 593-600.

Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A. Chemico-pharmacological studies on saponins of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 1975; 25: 539-47.

Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Aprendizagem e memória. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Princípios da Neurociência.* 1ª ed. brasileira. São Paulo: Editora Manole; 2003. p. 1227-46.

Kelly KM, Nadon NL, Morrison JH, Thibault O, Barnes CA, Blalock EM. The neurobiology of aging. *Epilepsy Res.* 2006; 68: S5-S20.

Kennedy DO, Scholey AB, Wesnes KA. The dose-dependent cognitive effects of acute administration of *Ginkgo biloba* to healthy young volunteers. *Psychopharmacol.* 2000; 151: 416-23.

Kerr JFR, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. *Apoptosis: The molecular basis of cell death.* Edited by L. David Tomei and Frederick O. Cope; 1991.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994; 73: 2013-26.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetic. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-57.

Kiefer D, Pantuso T. *Panax ginseng.* *Am Fam Physician.* 2003, 68: 1539-42.

Kim EH, Jang MH, Shin MC, Shin MS, Kim CJ. Protective effect of aqueous extract of *Ginseng* radix against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26: 1668-73.

Kim SN, Ha YW, Shin H, Son SH, Wu SJ, Kim YS. Simultaneous quantification of 14 ginsenosídeos in *Panax ginseng* C.A.Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 45: 164-70.

Kitts D, Hu C. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutr.* 2000; 3: 473-85.

Knox CA. Neuroanatomical changes associated with aging in the peripheral nervous system. In: Albert ML, Koefel JE. *Clinical neurology of aging*. 2a ed. New York: Oxford University Press; 1994. p.68-78.

Kumar S, Sharma A. Anti-anxiety activity studies on homoeopathic formulations of *Turnera aphrodisiaca* Ward. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005; 2: 117-9.

Kumar S, Taneja R, Sharma A. Pharmacognostic standardization of *Turnera aphrodisiaca* Ward. *J Med Food.* 2006; 9: 254-60.

Kumar S, Taneja R, Sharma A. The genus *Turnera*: A review update. *Pharmaceutical Biology.* 2005; 43: 383-91.

Lazarev NV. 7th All – Union Congr. *Physiol., Biochem., Pharmacol*; 1947; Medgiz, Moskau.

Lee B, Choi Y, Kim H, Kim SY, Hahm DH, Lee HJ, Shim I. Protective effects of methanol extract of *Acori graminei* rhizome and *Uncariae Ramulus et Uncus* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairments in the rat. *Life Sci.* 2003; 74: 435-50.

Lee HJ, Son DH, Lee SK, Lee J, Jun CD, Jeon BH, Lee SK, Kim EC. Extract of *Coptidis* rhizome induces cytochrome-C dependent apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Phytother Res.* 2006; 20: 773-9.

Lee J, Kim J, Cho S, Kim Y, Choi K, Joo W, Cho Y, Moon J. Protective effect of ginseng extract against apoptotic cell death induced by 2,2', 5,5' tetrachlorobiphenyl in neuronal SK-N-MC cells. *Life Sciences.* 2004; 75: 1621-34.

Lee S, Moon Y, You K. Effects of red ginseng saponins and nootropic drugs on impaired acquisition of ethanol-treated rats in passive avoidance performance. *J Ethnopharmacol.* 2000; 69: 1-8.

Li DT, Cheng CG, Du ZX, He YQ, Kong LC. Classification of *Panax quinquefolium* L. and *Panax ginseng* C.A. Mey. Based on FTIR analysis with SVM. *Spectroscopy and Spectral Analysis.* 2006; 26: 2186-9.

Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 2405-19.

Lopes GS, Ferreira AT, Oshiro ME, Vladimirova I, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, Smaili SS. Aging-related changes of intracellular Ca²⁺ stores and contractile response of intestinal smooth muscle. *Exp Gerontol.* 2006; 41: 55-62.

Lopes GS, Mora OA, Cerri P, Faria FP, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, Smaili SS. Mitochondrial alterations and apoptosis in smooth muscle from aged rats. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1658: 187-94.

Lopes GS, Smaili SS, Neto AC, Vladimirova I, Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH. Aging-induced decrease of cholinergic response and calcium sensitivity on rat jejunum contractions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007; 62: 264-70.

López-Palacios S. Enumeracion de algunos afrodisiacos vegetales. Revista de la Facultad de Farmácia ULA. 1983; 23: 5-63.

Luo J, Fang ZP, Zhou LM, Lai ST. [Effects of *Carthamus tinctorius* injection on bcl-2, caspase-3 expression related to neurons apoptosis after local cerebral ischemia]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2004; 29: 977-80. Chinese.

Machado OXB. Nova espécie do gênero *Heteropteris* Kunth. Rodriguésia. 1949; 11-12: 113-9.

Markhan KR. Techniques of flavonoids identification. London: Academic Press; 1982.

Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? Cell. 1995; 82: 349-52.

Mattei R, Barros MP, Galvão SMP, Bechara EJH, Carlini EA. *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. Phytother Res. 2001; 15: 604-7.

Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature. 2004; 430: 631-9.

McCardle WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.

McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. Biochem Biophys Res Comm. 1997; 239: 357-66.

McGeer PL, McGeer EG, Suzuki J, Dolman CE, Nagai T. Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system of the basal forebrain. *Neurology*. 1984; 34: 741-5.

McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS. Aging and extrapyramidal function. *Arch Neurol*. 1977; 34: 33-5.

Melo FL, Benati FJ, Junior WA, de Mello JC, Nozawa C, Linhares RE. The *in vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiol Res*. In press 2006.

Mendes FR. Avaliação farmacológica da carqueja (*Baccharis trimera*) e do cipó-caboclo (*Davilla rugosa*), duas plantas brasileiras utilizadas popularmente como tônicas, em testes para ação adaptógena [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2005.

Mendes FR, Carlini EA. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007; 109: 493-500.

Miller RA. The Magical and Ritual use of Aphrodisiacs. Rochester: Vermont, Destiny Books; 1993. p.15-20.

Mix JA, Crews WD. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in a sample of cognitively intact older adults: neuropsychological findings. *Hum Psychopharmacol*. 2002; 17: 267-77.

Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33: 620-6.

Moosmann B, Behl C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002; 11: 1407-35.

Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 1997; 278: 412-9.

Morrison JH, Hof PR. Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. 2002; 136: 467-86.

Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. *Medicinal Plants of Brazil*. Algonac: Reference Publications, Inc.; 2000. p. 327-8.

Müller WE, Eckert GP, Eckert A. Piracetam: Novelty in a unique mode of action. *Pharmacopsychiatry*. 1999; 32: 2-9.

Muzitano MF, Costa SS. Produtos naturais e a apoptose: Um enfoque promissor para a descoberta de novos fármacos. *Revista Fitos*. 2006; 2: 46-53.

Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000; 256: 12-8.

Nappo S, Carlini EA. Não acreditem na inocência dos fitomedicamentos! *Boletim PSIFAVI/Sistema de Psicofarmacovigilância*. 2003; n° 15, item 5.

Naval MV, Gómez-Serranillos ME, Carretero AMV. Neuroprotective effect of a ginseng (*Panax ginseng*) root extract on astrocytes primary culture. *J Ethnopharmacol*. 2007; 112: 262-70.

Ng KM, Che CM, Wo SK, Tam PKH, Lau ASY. Analytical application of acetate anion in negative electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of triterpenoid saponins-ginsenosides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006; 20: 1545-50.

Nitta H, Matsumoto K, Shimizu M, Ni XH, Watanabe H. *Panax ginseng* extract improves the performance of aged fischer 344 rats in radial maze task but not in operant brightness discrimination task. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18: 1286-8.

Nocerino E, Amato M, Izzo AA. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. *Fitoterapia.* 2000; 71: 1-5.

Novelli GP, Bracciotti G, Falsini S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8: 9-13.

ONU [homepage on the Internet]. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat, *World Population Prospects: The 2006 Revision* and *World Urbanization Prospects: The 2005 Revision*. [cited 2007 May 01]. Available from: <http://esa.un.org/unpp>

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptotic link. *Nature.* 2003; 4: 552-65.

Owen RT. Ginseng: a pharmacological profile. *Drugs Today.* 1981; 17: 343-51.

Panossian A, Gabrielian E, Wagner H. Plant adaptogens. II. *Bryonia* as an adaptogen. *Phytomedicine.* 1997; 4: 85-99.

Panossian A, Wikman G, Wagner H. Plant adaptogens. III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine.* 1999; 6: 287-300.

Pathak S, Multani AS, Banerji P, Banerji P. Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer. *Int J Oncol.* 2003; 23: 975-82.

Pereira C, Agostinho P, Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, Oliveira CR. Neuroprotection strategies: effect of vinpocetine *in vitro* oxidative stress models. *Acta Med Port.* 2003, 16: 401-6.

Petkov V. Effect of ginseng on the brain biogenic monoamines and 3',5'-AMP system. *Experiments on rats. Arzneimittelforschung.* 1978; 28: 388-93.

Petkov VD, Kehayov R, Belcheva S, Konstantinova E, Petkov VV, Getova D, Markovska V. Memory effects of standardized extracts of *Panax ginseng* (G115), *Ginkgo biloba* (GK501) and their combination Gincosan (PHL-00701). *Planta Med.* 1993; 59:106-14.

Petkov VD, Mosharraf AH. Age- and individual-related specificities in the effects of standardized ginseng extract on learning and memory (experiments on rats). *Phytother Res.* 1987; 1: 80-4.

Piacente S, Camargo EES, Zampelli A, Gracioso JS, Brito ARS, Pizza C, Vilegas W. Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*. *Z Naturforsch [C], J Biosciences.* 2002; 57: 983-5.

Pott A, Pott VJ. *Plantas do Pantanal.* Brasília: EMBRAPA; 1994. p.320.

Price DL. Envelhecimento do encéfalo e demência do tipo Alzheimer. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Princípios da neurociência.* 1ª ed. brasileira. São Paulo: Editora Manole; 2003. p. 1151.

Ramirez-Duron R, Cenicerós-Almaguer L, Salazar-Aranda R, Salazar-Cavazos MDLL, De Torres, NW. Evaluation of thin-layer chromatography methods for quality control of commercial products containing *Aesculus hippocastanum*, *Turnera diffusa*, *Matricaria recutita*, *Passiflora incarnata*, and *Tilia occidentalis*. *J AOAC Int.* 2007; 90: 920-4.

Rausch W-D, Liuz S, Gille G, Radad K. Neuroprotective effects of ginsenosides. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2006; 66: 369-75.

Reagan LP, McEwen BS. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat*. 1997; 13: 149-67.

Rege NN, Thatte UM, Dahanukar SA. Adaptogenic properties of six *rasayana* herbs used in Ayurvedic medicine. *Phytother Res*. 1999; 13: 275-91.

Rizzini CT, Mors WB. *Botânica econômica brasileira*. São Paulo: EPU e EDUSP; 1976. p. 207.

Rocha AD. Estudo fitoquímico de *Clytostoma ramentaceum* Bureau & K. Schum. e *Mansoa hirsuta* DC (Bignoniaceae) biomonitorado por ensaios *in vitro* de atividade antifúngica [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

Rosenstock TR, Carvalho AC, Jurkiewicz A, Frussa-Filho R, Smaili SS. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem*. 2004; 88: 1220-8.

Roy MK, Nakahara K, Na TV, Trakoontivakom G, Takenaka M, Isobe S, Tsushida T. Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line *in vitro* via induction of apoptosis. *Pharmazie*. 2007; 62: 149-53.

Russo A, Borrelli F. *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine*. 2005; 12: 305-17.

Russo E. *Handbook of Psychotropic Herbs – A scientific analysis of herbal remedies for psychiatric conditions*. New York: The Haworth Press, Inc; 2001. p. 352.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* 1999; 107: 489-506.

Saito H, Yoshida Y, Takagi K. Effects of *Panax ginseng* root on exhaustive exercise in mice. *Jpn J Pharmacol.* 1974; 24: 119-27.

Sangirardi JR. Plantas eróticas. Rio de Janeiro: Codecri;1981, p. 222-3.

Schlag EM, McIntosh MS. Ginsenoside content and variation among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) populations. *Phytochemistry.* 2006; 67: 1510-9.

Selkoe DJ. The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. *Ann Méd.* 1989; 21: 73-6.

Semsei I, Rao G, Richardson A. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1991; 58: 13-9.

Siegel RK. Ginseng abuse syndrome. Problems with the panacea. *JAMA.* 1979; 241: 1614-5.

Singh B, Chandan BK, Gupta DK. Adaptogenic activity of a novel withanolide-free aqueous fraction from the roots of *Withania somnifera* Dun. (Part II). *Phytother Res.* 2003; 17: 531-6.

Singh M, Sharma H, Singh N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion.* In press. 2007.

Sivakumar G, Paek KY. Methyl jasmonate induce enhanced production of soluble biophenols in *Panax ginseng* adventitious roots from commercial scale bioreactors. *Chemistry of Natural Compounds*. 2005; 41: 669-73.

Smaili SS, Russel JT. Permeability transition pore regulates both mitochondrial membrane potential and agonist-evoked Ca^{2+} signals in oligodendrocyte progenitors. *Cell Calcium*. 1999; 26: 121-30.

Stege GJ, Bosman GJ. The biochemistry of Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. 1999; 14: 437-46.

Tachikawa E, Kudo K, Harada K, Kashimoto T, Miyate Y, Kakizaki A, Takahashi E. Effects of ginseng saponins on responses induced by various receptor stimuli. *Eur J Pharmacol*. 1999; 369: 23-32.

Takagi K, Saito H, Lee CH, Hayashi T. Pharmacological studies on fatigue I. *Jpn J Pharmacol*. 1972; 22: 17-26.

Takatori Y. Mechanisms of neuroprotective effects of therapeutic acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease. *Yakugaku Zasshi*. 2006; 126: 607-16.

Tani T, Kubo M, Katsuki T, Higashino M, Hayashi T, Arichi S. Histochemistry. 2. Ginsenosides In Ginseng (*Panax ginseng*, Root). *J Nat Prod*. 1981; 44: 401-7.

Thatte U, Bagadey S, Dahanukar S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2000; 46: 199-214.

Thomas LB, Gates DJ, Richfield EK, O'Brien TF, Schweitzer JB, Steindler DA. DNA end labeling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions. *Exp Neurol*. 1995; 133: 265-72.

Tsang D, Yeung HW, Tso WW, Peck H. Ginseng saponins: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *Planta Med.* 1985; 51: 221-4.

Vázquez I, Agüera-Ortiz LF. Herbal products and serious side effects a case of ginseng induced manic episode. *Acta Psychiatr Scand.* 2002; 105: 76-7.

Vijayashankar N, Brody H. A quantitative study of the pigmented neurons in the nuclei locus coeruleus and subcoeruleus in man as related to aging. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1979; 38: 490-7.

Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas.* Berlin: Springer-Verlag; 1984.

Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* 2nd Berlin: Springer Verlag, 1996.

Wagner H, Nörr H, Winterhoff H. Plant adaptogens. *Phytomedicine.* 1994; 1: 63-76.

Wagner HKM. Immunostimulants and adaptogens from plants. In: Arnason JT, Mata R, Romeo JT. *Phytochemistry of medicinal plants.* New York: Plenum Press; 1995. v.29, p.1-17.

Wang JS, Qiu ZY, Xia YP, Li HZ, Ren LY, Zhang L. [The protective effects of total glycosides *Rubus parvifolius* on cerebral ischemic in rat]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2006a; 31: 138-41. Chinese.

Wang Y, Pan JY, Xiao XY, Lin RC, Cheng YY. Simultaneous determination of ginsenosides in *Panax ginseng* with different growth ages using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 2006b; 17: 424-30.

Wang LCH, Lee T. Effect of ginseng saponins on exercise performance in non-trained rats. *Planta Med.* 1998; 64: 130-3.

Ward GR, West JR. Effects of ethanol during development on neuronal survival and plasticity. In: *Development of the Central Nervous System*. New York: Wiley-Liss; 1992. p. 109-38.

Warot D, Lacomblez L, Danjou P, Weiller E, Payan C, Puech AJ. Comparative effects of *Ginkgo biloba* extracts on psychomotor performance and memory in healthy subjects. *Therapie.* 1991; 46: 33-6.

Werns SW, Lucchesi BR. Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci.* 1990; 11: 161-6.

White LD, Barone Jr S. Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death Differ.* 2001; 8: 345-56.

Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport.* 1994; 5: 1485-8.

Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997; 75: 1149-63.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *International Review Cytology*: Edited by Academic Press, Inc; 1980. v.68, p. 251-307.

Xie P, Chen S, Liang YZ, Wang X, Tian R, Upton R. Chromatographic fingerprint analyses – a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *J. Chromatogr A.* 2006; 1112: 171-80.

Yamaguchi Y, Higashi M, Kobayashi H. Effects of oral and intraventricular administration of ginsenoside Rg1 on the performance impaired by scopolamine in rats. *Biomed Res.* 1996; 17: 487-90.

Yamaguchi Y, Higashi M, Kobayashi H. Effects of ginsenosides on maze performance and brain choline acetyltransferase activity in scopolamine-treated young rats and aged rats. *Eur J Pharmacol.* 1997; 329: 37-41.

Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res.* 1994; 54: 448-54.

Yu SP, Canzoniero LMT, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13: 405-11.

Zhang L, Kokkonen G, Roth GS. Identification of neuronal programmed cell death in situ in the striatum of normal adult rat brain and its relationship to neuronal death during aging. *Brain Res.* 1995; 677: 177-9.


Zhang Y, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25: 83-9.

Zhao J, Pawar RS, Ali Z, Khan IA. Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *J Nat Prod.* 2007; 70: 289-92.

Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, Barzilai A. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons – a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1994; 170: 136-40.

8. ANEXOS

ANEXO 1

 <p>Opção Natural de Qualidade</p>		<p>Informações Gerais Laudo de Análise Botânica E-mail: quimer@quimer.com.br Website: www.quimer.com.br</p>		<p>Téc. Resp. e Reg.: Inscr. CRF-SP: ROGERIO S. VEIGA / 26006 Data: 22/07/2004 Ass.: [Assinatura] / 07/0004 Cert. Reg. IBAMA: 187933 Aut. Func. M.S.: 1.04.003-0 Nº Pr. SUS: Lic. Func. Vg. Sanic.: 001310125361/98 02.2384/0101</p>	
<p>Rua Andaraí, 789/799/821 - Vila Maria - Cep 02117-001 - São Paulo - SP - Brasil Fone / Fax: 55 (11) 6955-8800 - CNPJ: 08.224.997/0001 - 05 - INSCRI. EST.: 133.478.712.111</p>					
<p>Insumo</p>		<p>DAMPIANA (TURNERA DIFFUSA)</p>			
<p>Família</p>		<p></p>			
<p>Classificação (NCM)</p>		<p>1211909900</p>		<p>Número / Nosso Pedido</p>	
<p>Método de Secagem</p>		<p>AO SOL</p>		<p>152928</p>	
<p>Procedência (Reg.Bo)</p>		<p>AMERICA CENTRAL</p>		<p>Peso Liq.(Entregue) Kg.</p>	
<p>Origem (Região)</p>		<p>MEXICO</p>		<p>10,000</p>	
<p>Odor e Sabor (Ins. em Bruto)</p>		<p>CHARACTERISTICOS</p>		<p>Volumes (Entregue)</p>	
<p>Parte Utilizada</p>		<p>FOLHA</p>		<p>Tara por Volume - Kg.</p>	
<p>Colheita (Mês/Ano)</p>		<p>11/2003 val:11/2006</p>		<p>0,40</p>	
<p>Número do Lote</p>		<p>011</p>		<p>Data do Preparo</p>	
<p>Aspecto Macroscópico:</p>		<p>PEQUENINAS FOLHAS DIVIDIDAS DE COR VERDE-CLARO E AROMA AGRADAVEL.</p>			
<p>Aspecto Microscópico:</p>		<p>NUMEROSAS TRICOMAS, PECTORES LONGOS, UNICELULARES, COM A BASE EXTENDIDA OU CURVA. AGRUPAMENTOS DE CRISTAIS DE OXALATO DE CALCIO. NUMEROSOS ESTOMATOS ENCONTRADOS NA EPIDERMIS INFERIOR.</p>			
<p>A assinatura gráfica constante neste Documento é válida e autenticada pela Quimer Comércio Ltda somente quando acompanhada da nossa respectiva Nota Fiscal.</p> <p>Para garantir qualidade e a validade desse insumo, armazenar em local seco e arejado, longe do calor direto e da umidade, mantendo-o na embalagem original. Não expor ao sol e ao contato com alimentos. Embalagens confeccionadas com resinas plásticas de baixa densidade. É responsabilidade do cliente efetuar a descontaminação e as análises comprobatórias nesse insumo vegetal, por não terem sido solicitadas durante seu pedido de compra. Por se tratar de insumo de origem vegetal, poderão ocorrer leves variações em sua cor, odor e sabor.</p>					

ANEXO 2



Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
R Tuiuti, 718/720 - CEP 03081-000
São Paulo - SP - Brasil - Fone: +55 11 6191-8787 - Fax: +55 11 6191-6387

Controle de qualidade Laudo Técnico e Identificativo

E-mail: santosflora@santosflora.com.br
WebSite: www.santosflora.com.br

Registro IBAMA: 35867
Licença de Funcionamento: 1101016300
Autorização ANVISA: 1.04.604-1
Registro CRF: 2-02633-0101
Data: 20/1/2006

NOMENCLATURA:

GINSENG PANAX PÓ

Nome científico(gênero/espécie):	<i>Panax ginseng Meyer</i>	Esterilização:	Não Houve
Identificação botânica:	<i>Panax ginseng Meyer</i>	Família:	Araliacae
Parte utilizada:	Raiz	Origem:	China
Manufatura/Val(mês/ano):	06/2005 - 06/2008	Lote:	GINP04/02
Método de secagem:	Ao sol	Granulometria:	GINP04/02

Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:

Raízes axonomorfas, carnosas, de coloração amarelada escura. Em caso de pó: Pó fino de cor amarelado, odor e sabor característicos.

Teste de pureza e integridade:

Umidade: 13,02% (**esp. máx. 15%); Cinzas Totais: 7% (*esp. máx 7%); Cinzas Insolúveis: 0,94% (*esp. máx 1%); Matéria-estranha: Ausente

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:

**Teor de ginsenosídeos: 1,43%
***Teste positivo p/ Saponinas

PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Máx. 1.000 ufg/g	N.R.
Bolores e leveduras	Máx. 100 ufg/g ou ml	N.R.
Contagem de enterobactérias	Máx. 100 ufg/g ou ml	N.R.
E. coli	Ausência	N.R.
Staphylococcus aureus	Ausência	N.R.
Pseudomonas sp	Ausência	N.R.
Salmonella sp	Ausência	N.R.

* LIMITES ESTABELECIDOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS (WHO PHARM. 5TH 1996)

** ARMAZENAR EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DE UMIDADE E CALOR.

*** N.A. REQUERIU-SE A TESTE NÃO REALIZADO

* ALTERAÇÃO DE COR PODERIA OCORRER DEVIDO SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL

* A VALIDADE SERÁ DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMAZENADO EM LOCAIS INADEQUADOS

* Farmac. Européia 5.0, 2.4.16
** De acordo com o laudo original (Farm. Eur. 4.0)
*** Especificação Experimental Interna

Susana Cabral Gasparri

Susana Salvador Cabral Gasparri
Farmacêutica Responsável:
CRF/SP: 35.739

ANEXO 3



Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
R. Tuiluti, 718/720 - CEP 03081-000
São Paulo - SP - Brasil - Fone: +55 11 6191-8787 - Fax: +55 11 6191-6387

Controle de qualidade Laudo Técnico e Identificativo

E-mail: santosflora@santosflora.com.br
WebSite: www.santosflora.com.br

Registro IBAMA: 35567
Licença de Funcionamento: 1101016300
Autorização ANVISA: 1.04.604-1
Registro CRF: 2-02635-0101
Data: 20/1/2006

NOMENCLATURA:

NO DE CACHORRO - PO

Nome científico(gênero/espécie):	<i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O.M.	Esterilização:	Não Houve
Identificação botânica:	<i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O.M.	Família:	Malpighiaceae
Parte utilizada:	Raiz	Origem:	Brasil
Manufatura/Val(mês/ano):	08/2005 - 08/2008	Lote:	NOC06/02
Método de secagem:	Ao sol	Granulometria:	

Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:

Raiz flexível, com partes engrossadas, de cor avermelhada, apresentando nós.
Em caso de pó: Pó fino de coloração parda escura, sabor e odor característicos.

Teste de pureza e integridade:

Umidade: 8,4% (*esp. máx. 12%); Cinzas Totais: 6% (*esp. máx. 10%); Cinzas Insolúveis: 1,7% (*esp. máx. 4%).

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:

Teste positivo para Taninos (R. Cloreto Férrico)

PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Máx. 1.000 ufg/g	N.R.
Bolores e leveduras	Máx. 100 ufg/g ou ml	N.R.
Contagem de enterobactérias	Máx. 100 ufg/g ou ml	N.R.
<i>E. coli</i>	Ausência	N.R.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	N.R.
<i>Pseudomonas</i> sp	Ausência	N.R.
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	N.R.

* LIMITES ESTABELECIDOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS (WHO PHARMOPOL, 8th 1996)
* ARMAZENAR EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DE UMIDADE E CALOR.
* N.R. SIGNIFICA A TESTE NÃO REALIZADO
* ALTERAÇÃO DE COR PODERÁ OCORRER DEVIDO SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL
* A VALIDADE SERÁ DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMAZENADO EM LOCAIS INADEQUADOS

* Especificação Experimental Interna

Susana Salvador Cabral Gasparri
Farmacêutica Responsável:
CRF/SP: 35.739

ABSTRACT

Medicinal plants as *Panax ginseng* C.A. Mey, *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult. and *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. are widely used by the population as tonic and cognitive enhancers. Initially, a general analysis about the main chemical classes presented on the three hydroalcoholic extracts was done by means of Characterization Reactions and Thin Layer's Chromatography. By these techniques, flavonoids, tannins and saponins were detected on *Panax ginseng* and *Heteropterys aphrodisiaca*. Besides the chemical classes already cited, triterpenes were identified on the *Turnera diffusa* extract. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) allowed the characterization of phenolic compounds presented on the three extracts. Moreover, the present study proposed to verify if these plants could have some protective effect on cellular death by apoptosis, supposed to be an action mechanism for these substances. Using TUNEL reaction, it was possible to verify that there were no differences between aged and young animals (control) in apoptotic cells percentage. Also, aged animals treated chronically with the three plants' extracts did not differ from aged animals without treatment in apoptotic cells percentage. A concentration-time-effect curve was done in culture of astrocytes incubated with the three hydroalcoholic extracts of the plants. The *Panax ginseng* extract was atoxic in all concentration and time tested. *Turnera diffusa* demonstrated toxicity in the dose of 1000 µg/ml after 6 hours of incubation, and the *Heteropterys aphrodisiaca* hydroalcoholic extract, after 24 hours of incubation, in the same dose. The three extracts did not influence the astrocytes proliferation in culture. In order to verify if the *Panax ginseng* hydroalcoholic extract could protect the astrocytes from apoptosis induced by staurosporine, caffeine or ethanol, the cells were previously incubated with a 100 µg/ml concentration of the extract. The data suggest that on rats astrocytes, the root's hydroalcoholic extract of *Panax ginseng* did not present antiapoptotic effect in induction model of apoptosis by staurosporine and, on contrary of expected, the hydroalcoholic extracts from *Turnera diffusa* leaves and from *Heteropterys aphrodisiaca* roots, induced apoptosis of a not concentration-dependent. Meanwhile, it cannot discard the hypothesis these extracts could show antiapoptotic activity on other cells or in another experimental models of apoptosis, still not investigated.