

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM SAÚDE E AMBIENTE

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E
COMPORTAMENTAL DE EXTRATOS DA *Portulaca oleracea*
EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE
PARKINSON**

WALESKA BARROS MARTINS

ARACAJU
Agosto – 2012

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM SAÚDE E AMBIENTE

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E
COMPORTAMENTAL DE EXTRATOS DA *Portulaca oleracea*
EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE
PARKINSON**

Dissertação submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

WALESKA BARROS MARTINS

**Orientador (es)
Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.**

ARACAJU
Agosto – 2012

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM SAÚDE E AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL DE
EXTRATOS DA *PORTULACA OLERACEA* EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA
DE PARKINSON**

Waleska Barros Martins

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Margarete Gomes Zanardo, Ph.D.
Orientador

Ricardo Luiz Cavalcanti Júnior de Albuquerque, Ph.D.
Examinador

Sheyla Alves Rodrigues, Ph.D.
Examinadora

Francisco Prado Reis, Ph.D.
Suplente

ARACAJU
Agosto – 2012

AGRADECIMENTOS

Acredito que exigi dos meus orientadores muito mais do que deveria, entre artigos, metodologias e muito trabalho, encontrei uma mãe e um pai, Dra. Margarete Gomes Zanardo e Dr Lauro Xavier Filho. Agradeço a oportunidade, a firmeza, o carinho e todos os abraços, amo vocês.

Dra Sheyla Alves Rodrigues e Dr Ricardo Luiz Cavalcanti Júnior de Albuquerque, vocês foram a minha felicidade e ponto de equilíbrio. Aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos.

Aos meus pais e irmãos, Altair, Heloilda, André e Talan por proverem tudo o que foi indispensável para a conquista do mestrado.

À minha super estagiária Hatamy, que com sua dedicação, coragem e cabelo loiro, tornou os longos dias de trabalho mais descontraídos. Sem você seria possível impossível realização deste projeto. A todos os colegas de turma e alunos do ITP, pelas experiências e motivações compartilhadas.

Ao meu namoradinho Piter que sempre acreditou e me apoiou durante todo o mestrado, colaborando com o desenvolvimento do trabalho com muito amor, carinho, compreensão e principalmente paciência, simplesmente te amo.

Aos meus amigos Alliuska, André, Bruno, Carol, Cecília, Celinei, Cleyton, Diego, Darciane, Dilma, Emilly, Hiram, Isla, Juliano, Ligia, Lucas, Luciano, Marquinhos, Matheus, Mirela, Osvaldino, Palena, Renato, Thiago, e Zé Ribeiro (sou apaixonada por todos vocês). Freddie Mercury (yes, we are the champions), Britney Spears, Shakira pela trilha sonora e a força gravitacional.

A Capes/Fapitec pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	3
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 Doença de Parkinson	4
1.2 Etiologia	5
1.3 Fisiopatologia	6
1.4 Tratamento	9
1.5 Modelos experimentais para estudo da doença de Parkinson.....	10
1.6 Produtos naturais na pesquisa e tratamento da DP	12
1.7 Portulaca oleracea.....	13
1.8 Referências	18
CAPÍTULO II.....	26
2.1 Introdução.....	30
2.2 METODOLOGIA.....	31
2.2.1 Coleta, herborização e o registro de material botânico	31
2.2.2 Obtenção do extrato aquoso	32
2.2.3 Obtenção do extrato etanólico.....	32
2.2.4 Análise qualitativa da L-DOPA, dopamina e noradrenalina	33
2.2.5 Prospecção fitoquímica	33
2.2.6 Análise qualitativa da atividade antioxidante.....	34
2.2.7 Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	34
2.2.8 Animais.....	35
2.2.9 Cirurgia estereotáxica.....	35
2.2.10 Desenho experimental.....	37
2.2.11 Teste de campo aberto.....	38
2.2.12 Sacrifício e obtenção dos encéfalos.....	38
2.2.13 Reação imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH).....	38
2.2.14 Análise estatística.....	39
2.3 RESULTADOS	39
2.4 DISCUSSÃO	46
2.5 CONCLUSÃO.....	50

REFERÊNCIAS	51
ANEXOS.....	55

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II	Pg.
Tabela 1: Resultado da prospecção fitoquímica.	40
Tabela 2: Resultados do teste de campo aberto 24 horas após cirurgia.	43
Tabela 3: Resultados do teste de campo aberto 15 dias após cirurgia.	44

LISTA DE QUADROS

CAPITULO I	Pg.
Quadro 1: Medicamentos utilizados durante o tratamento da DP	9
CAPITULO II	
Quadro 1: Grupos de animais lesionados e tratados com extratos da PO ou salina.	37

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Pg.

Figura 1. Esquema representativo das projeções dopaminérgicas normais (A) e após degeneração na SNc (B). Observar a despigmentação de neurônios DA que contém neuromelanina (BENMOYAL-SEGAL et al.,2006).7

Figura 2. Esquema do circuito neural dos núcleos da base. À esquerda, localização anatômica. À direita, representação das vias direta (em verde) e indireta (em vermelho) (Adaptado de Bear. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3a edição). +: indica ativação das sinapses; - indica diminuição da transmissão sináptica.8

Figura 3: Semelhança entre as estruturas químicas da 6-OHDA (A), dopamina (B) e noradrenalina (C). 12

Figura 4. Esquema mostrando a via nigroestriatal do encéfalo de rato. Em A e mostrado o encéfalo de um rato não lesionado com as projeções dos neurônios dopaminérgicos partindo da *substância nigra* em direção ao corpo estriado (ou caudado-putamen) e globo pálido em ambos hemisférios. Em B, após lesão unilateral com 6-OHDA, ocorre significativa redução das projeções nigroestriatais e conseqüente redução dos níveis de dopamina no corpo estriado. CP, caudado-putamen; GP, globo pálido; PNE, projeções nigroestriatais; SN *substância* negra. Adaptado (KIRIK et al., 2004)..... 12

Figura 5. Caule, folhas e flores *Portulaca oleracea* 14

Figura 6. Sementes da *Portulaca oleracea* 15

CAPITULO II

Figura 1: Exsicata da *Portulaca oleracea* depositada no herbário da Universidade Federal de Sergipe 31

Figura 2: *Portulaca oleracea* picadas 32

Figura 3: Extrato etanólico da *Portulaca oleracea* em rotoevaporador 33

Figura 4: Realização da prospecção fitoquímica. A: Pesquisa de alcaloides; B: Pesquisa de taninos C: Pesquisa de saponinas. 34

Figura 5: Animal posicionado em aparelho de estereotaxia. 36

Figura 6: Período de tempo decorrido e fases de experimentação dos grupos de animais estudados. 37

Figura 7: CCD em luz UV na análise qualitativa da L-dopa, dopamina e noradrenalina. ... 39

Figura 8: A: CCD qualitativa para atividade antioxidante 40

Figura 9: Atividade antioxidante em porcentagem e desvio médio padrão do EEPO e EAPO em diferentes concentrações. 41

Figura 10: Fotomicrografias do tecido encefálico após imunohistoquímica para TH. Em A, C e E: estriado; em B, D e F: substância negra compacta. A e B representam regiões contralaterais à lesão; C e D representam cortes do grupo que recebeu 6-OHDA e E e F representes do grupo 6-OHDA tratado com extrato aquoso de PO. Aumento de 100X. 45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

- 1 **6-OHDA:** 6-hidroxidopamina
- 2 **CPu:** Caudado e putâmen
- 3 **DA:** Neurônios dopaminérgicos
- 4 **DP:** Doença de Parkinson
- 5 **EAPo:** Extrato aquoso da *Portulaca oleracea*
- 6 **EEPO:** Extrato etanólico da *Portulaca oleracea*
- 7 **EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- 8 **FPM:** Feixe prosencefálico medial
- 9 **GB:** Gânglios basais
- 10 **GPI:** Globo pálido interno
- 11 **GPe:** Globo pálido externo
- 12 **H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio
- 13 **L-DOPA:** 3,4-dihidroxifenilalanina
- 14 **MDA:** Malondialdeído
- 15 **MAO:** Monoamina oxidase
- 16 **MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
- 17 **NO:** óxido nítrico
- 18 **NB:** Núcleos basais
- 19 **PO:** *Portulaca oleracea*
- 20 **EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- 21 **STN:** Núcleo subtalâmico
- 22 **SN:** Substância negra
- 23 **SNr:** Substância negra reticular
- 24 **SNc:** Substância negra compacta
- 25 **SNC:** Sistema nervoso central
- 26 **SOD:** Superóxido dismutase
- 27 **TH:** Tirosina- hidroxilase
- 28 **VTA:** Área tegmentar ventral

RESUMO**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL DE EXTRATOS DA *Portulaca oleracea* EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

WALESKA BARROS MARTINS

A doença de Parkinson (DP) é descrita como uma patologia degenerativa, crônica e progressiva, relacionada ao estresse oxidativo. A *Portulaca oleracea* (PO) é uma planta que apresenta atividade antioxidante e ação sobre o sistema nervoso central. O presente estudo teve como objetivos caracterizar quimicamente os extratos aquoso e etanólico da PO e avaliar sua atividade antioxidante e sua possível ação neuroprotetora em modelo experimental da doença de Parkinson. Todas as partes da PO foram coletadas e processadas para obtenção dos extratos, que foram submetidos às análises de prospecção fitoquímica, cromatografia de camada delgada e análise quantitativa da atividade antioxidante utilizando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Para o ensaio biológico, ratos foram submetidos à aplicação de solução salina ou 6-hidroxidopamina intra-estriatal. No mesmo dia, os animais receberam, por via oral, veículo, extrato aquoso (EAPO, 200 e 400mg/kg) ou extrato etanólico da PO (EEPO, 200 e 400mg/kg) durante vinte e oito dias consecutivos. Ao primeiro e décimo quinto dias após o início dos tratamentos foi realizado teste do campo aberto para verificar o estado motor e emocional dos animais. Os resultados da avaliação comportamental foram submetidos à análise de variâncias múltiplas com medidas repetitivas. À análise fitoquímica foram detectados alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, terpenóides e polissacarídeos. O extrato aquoso apresentou maior ação antioxidante (IC50 EEPO: $162,62 \pm 16,37 \mu\text{g/ml}$; EAPO $463,92 \pm 40,88 \mu\text{g/ml}$). Na avaliação comportamental observou-se diminuição significativa da atividade motora em todos os grupos que receberam 6-OHDA, no primeiro dia após a cirurgia, independente do tratamento realizado por via oral ($P < 0,0001$). Por outro lado, aos quinze dias, os roedores tratados com extratos da PO mostraram recuperação significativa da atividade locomotora, sendo este efeito mais evidente quando administrado o EAPO na dose de 400mg/kg ($P < 0,0001$). Os resultados mostraram que os extratos aquoso e etanólico da PO foram capazes de reverter os déficits comportamentais induzidos por 6-OHDA e que estes efeitos podem estar relacionados às suas características químicas e atividade antioxidante. A PO apresenta-se, portanto como importante alvo de estudo com potencial terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: 6-OHDA; *Portulaca oleracea*; Neuroproteção, dopamina.

ABSTRACT**ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHYTOCHEMISTRY ANALYSIS AND BEHAVIORAL OF *Portulaca oleracea* EXTRACTS FROM AN EXPERIMENTAL MODEL IN PARKINSON'S DISEASE**

WALESKA BARROS MARTINS

Parkinson's disease (PD) is described as a degenerative, chronic and progressive dopaminergic neuronal death related. The *Portulaca oleracea* (PO) is a plant that exhibits antioxidant activity and action on the central nervous system. The present study aimed to characterize chemically the aqueous and ethanol extracts of PO and evaluate its possible neuroprotective activity in an experimental model of Parkinson's disease. All parts of the PO were collected and processed to obtain the extracts, which were analyzed by using phytochemical screening, thin layer chromatography and quantitative analysis of antioxidant activity using the 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazila (DPPH). For the biological assay, male rats underwent stereotaxic surgery for application of saline or 6-hydroxydopamine intra-striatal. On the same day of this procedure, the animals assigned into groups receiving oral administration of vehicle, aqueous extract (EAPO, 200 and 400mg/kg) or ethanol extract of PO (EEPO, 200 and 400mg/kg) for twenty-eight consecutive days. The first and fifteenth day after the initiation of treatment an open field test was conducted to verify the motor and emotional state of the animals. The photochemical analysis showed positive for the reactions of detection of alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, terpenoids and polysaccharides and aqueous extract presented higher antioxidant activity (IC₅₀ EPPO: 162.62 ± 16.37 µg/ml; EAPO 463.92 ± 40.88 µg/ml). In behavioral evaluation a significant decrease in motor activity was observed in all groups that received 6-OHDA, the first day after surgery, regardless of the treatment orally (P <0.0001). Moreover, the fifteenth day, the rodents treated with extracts of PO showed significant recovery of locomotor activity, and this effect was more evident when administered EAPO at a dose of 400mg/kg (P <0.0001). The results suggested that the aqueous and ethanol extracts of PO were able to reverse the behavioral deficits induced by 6-OHDA and that these effects may be related to their chemical composition and antioxidant activity. The PO is therefore an important object of study of therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: 6-OHDA, *Portulaca oleracea*, Neuroprotection, dopamine.

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM SAÚDE E AMBIENTE

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos na saúde proporcionaram à população em geral uma maior expectativa de vida, implicando em um aumento significativo da população idosa, que é mais suscetível ao desenvolvimento de doenças crônicas. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de pesquisas objetivando alternativas de tratamento e promoção da saúde.

Dentre as patologias associadas ao envelhecimento está a doença de Parkinson (DP) caracterizando-se com uma enfermidade neurodegenerativa, crônica e progressiva, que se manifesta geralmente entre 50 e 70 anos de idade. Ela se caracteriza pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos (DA) da substância negra compacta (SNc), resultando na diminuição da dopamina no estriado, levando ao surgimento de disfunções motoras e déficits cognitivos. O tratamento mais utilizado para a DP é a reposição de dopamina pela administração do precursor 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), frequentemente acompanhado de outros medicamentos (carbidopa, benserazida ou selegilina) ou por agonistas dopaminérgicos. Em estágios mais avançados da doença pode ser indicada intervenção cirúrgica. Todos estes tratamentos, no entanto, têm eficácia temporária ou reduzida e o tratamento com a L-DOPA pode ocasionar efeitos colaterais debilitantes, denominados discinesias. Dessa forma, estratégias para o aumento da sobrevivência e regeneração neuronal são importantes na busca da compreensão e tratamento da DP.

Neste sentido, estudos pré-clínicos têm sido úteis para reproduzir alterações celulares e bioquímicas relacionadas à degeneração e depleção DA por meio da administração de toxinas específicas, como a 6-hidroxidopamina, cujos efeitos podem ser mensurados por meio da avaliação de aspectos comportamentais em roedores.

No tocante à busca por novos tratamentos, os princípios ativos contidos em alguns produtos naturais têm se mostrado eficazes na prevenção da DP em humanos e na neuroproteção ante a degeneração DA em animais e cultura de células. A *Portulaca oleracea* (PO) é uma planta utilizada na China, não apenas como uma planta comestível, mas também por fazer parte da medicina tradicional chinesa. No Brasil distribui-se com maior concentração e diversidade nas regiões Nordeste e Sudeste. Dentre os componentes bioativos e atividades biológicas atribuídas à planta, podem ser destacadas a presença de catecolaminas como a dopamina e a noradrenalina, atividade antioxidante e ações sobre o sistema nervoso central (SNC) e periférico.

No entanto, a despeito da presença da dopamina e da L-DOPA e suas ações relacionadas ao SNC, não há estudos mostrando o efeito da administração de extrato da PO sobre a morte neuronal dopaminérgica.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo a identificação de compostos químicos, avaliação da atividade antioxidante e avaliação da possível ação neuroprotetora dos extratos aquoso e etanólico da *Portulaca oleracea*, em modelo experimental da doença de Parkinson.

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM SAÚDE E AMBIENTE

CAPÍTULO I

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção degenerativa do sistema nervoso central que acomete principalmente o sistema motor (FLOOD *et al.*, 2011). Em 1817, James Parkinson publicou o seu livro intitulado “An Essay on the Shaking Palsy”, no qual descreveu 6 pacientes homens com idade entre 50 e 72 anos, que apresentavam tremor involuntário, diminuição na força muscular, com deslocamento frontal do tronco e alterações na marcha, acompanhados de alterações cognitivas (PARKINSON, 1817). Contudo relatos históricos de possíveis sintomas parkinsonianos datam de 2.500 A.C (STERN, 1989).

Até então conhecida como “paralisia agitante”, a DP passou a ter tal nomenclatura em homenagem feita por Charcot, que colaborou na maior compreensão da enfermidade (TEIVE, 1998), que popularizou-se entre a sociedade quando celebridades como Michael J Fox e Muhammad Ali expuseram seus casos, ambos diagnosticados com a DP (MOBIM, 2011).

Atualmente, a DP é a segunda doença neurodegenerativa de maior incidência, ficando atrás somente do mal de Alzheimer, e afeta cerca de 1-2% da população acima de 65 anos (ALVES *et al.* 2008). Pode se manifestar antes dos 40 anos (Parkinson de início precoce) ou 20 anos de idade (Parkinson juvenil) (OBESO *et al.*, 2010). Em 1960 o número de indivíduos acima de 60 anos no Brasil já ultrapassava os 3 milhões, este número aumentou para 7 milhões em 1975 e 20 milhões em 2008, apresentando um aumento de quase 700% em menos de 50 anos. Como consequência, doenças próprias do envelhecimento passaram a ganhar maior expressão no conjunto da sociedade (VERAS, 2009). Deve-se ressaltar que metodologias variadas, diferentes critérios de diagnóstico e de estratégias em pesquisas dificultam uma exatidão nos valores de prevalência e incidência da DP (MUANGPAISAN *et al.* 2011).

A deficiência de dopamina em pacientes com DP resulta em anormalidades emocionais, comportamentais, de movimento e aprendizagem (RODRIGUEZ-OROZ *et al.* 2009). Os sintomas e sinais cardinais da DP são tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural. O diagnóstico da DP é estabelecido com a presença de dois dos referidos sinais. Outros dados clínicos de importância são: alteração da voz, disartria, disfunção olfatória, hipotensão ortostática, hiperidrose, seborreia, disfunção sexual, câimbra, dor, parestesia, disfagia, incontinência urinária, constipação intestinal e alterações da escrita (FAHN *et al.*, 2003).

A demência em pacientes com DP é diagnosticada com grande frequência e tem sido associada com diminuição da qualidade de vida, sobrevida reduzida e estresse sobre os familiares cuidadores de pacientes (LEVERENZ *et al.* 2009). A progressão da doença leva os pacientes a desenvolverem quadros psicóticos, distúrbios no sono, depressão, ansiedade e alterações no humor (SCHWARZ *et al.*, 2011).

1.2 Etiologia

Esta enfermidade degenerativa é progressiva e caracteriza-se pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra do mesencéfalo, resultando em déficit de dopamina no corpo estriado. Seu início costuma ser insidioso, raramente o paciente é capaz de relatar o momento exato em que notou alguma mudança fisiológica. Os sintomas podem ser notados somente quando ocorre perda de cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos e o conteúdo de dopamina no estriado é cerca de 80% inferior ao normal (OBESO *et al.*, 2010).

Embora a etiologia da DP permaneça desconhecida, estudos epidemiológicos sugerem exposição a pesticidas, herbicidas, fungicidas e metais pesados e são fatores de risco para a doença (MOISAN *et al.* 2011). Um exemplo proeminente é o do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), agente tóxico que foi comercializado como componente de drogas ilícitas, consumidas por jovens que apresentaram sintomas parkinsonianos, com depleção das células nervosas da substancia negra. Este fato estimulou uma grande quantidade de trabalhos sobre os mecanismos envolvidos nos seus efeitos neurotóxicos e sua possível relação com a DP (LANGSTON *et al.*, 1999).

O estresse oxidativo tem recebido mais atenção na DP devido ao potencial do metabolismo oxidativo da dopamina em produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), que são tóxicas para as membranas celulares e podem induzir apoptose (MILLER, 2009). A Substância negra compacta (SNc) é a região encefálica exposta a um maior nível de oxidação, se tornando mais susceptível à citotoxicidade (YUAN *et al.*, 2007).

A sequência de eventos que conduz a degeneração das células dopaminérgicas na DP está intimamente ligada ao estresse oxidativo e a outros componentes do processo degenerativo, tais como disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e a toxicidade do óxido nítrico (NO). Por conseguinte, é difícil determinar se o estresse oxidativo conduz ou é uma consequência destes eventos (JENNER, 2003). O NO é produzido por oxidação da L-arginina e exibe diversos papéis em vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da

neurotransmissão. Por outro lado, uma superprodução de NO está relacionada com diversas desordens neuronais degenerativas (CAMACHO *et al.*, 2012). Gomes *et al.*, (2008) relata que animais induzidos ao modelo de Parkinson pela 6-OHDA, exibem um aumento da síntese NO e sua inibição pode diminuir seus efeitos tóxicos nos terminais dopaminérgicos.

A L-DOPA é um aminoácido precursor da dopamina e é utilizado como agente terapêutico eficaz na DP na maioria dos casos. Dentro do cérebro e sobre descarboxilação é convertida em dopamina restaurando a neurotransmissão, uma vez que a dopamina não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. Entretanto, com a progressão da doença ocorre uma diminuição da resposta satisfatória ao tratamento e alguns efeitos secundários, tais como flutuações motoras e movimentos involuntários anormais, tornam-se mais atenuados, sugerindo que seus metabólitos oxidativos contribuem para o dano oxidativo (SAHIN; KIRIK 2012).

A inativação oxidativa mitocondrial parcial do complexo I acompanhado por dano oxidativo é um fenômeno descrito como "síndrome do complexo I", que é reconhecido como característico do envelhecimento do encéfalo de mamíferos e humanos com doenças neurodegenerativas. Esta disfunção tem sido reconhecida como um fenômeno mais acentuado em áreas do encéfalo como hipocampo e o córtex frontal de ratos, córtex humano e SNc sendo fortemente relacionada à formação de radicais livres (NAVARO *et al.*, 2010). Uma possível razão para a falta de identificação de outros fatores de risco é que a maioria dos estudos epidemiológicos têm se focado na vida adulta do paciente. Takahashi *et al.*, (1999), sugere que algumas degenerativas neurológicas, podem ter origem em infecções na infância e correlaciona o vírus influenza A à enfermidade.

1.3 Fisiopatologia

A principal característica celular da DP é a degeneração dos neurônios da substância negra no mesencéfalo, que se torna pálida no exame anatomopatológico (FAHN *et al.*, 2003), como ilustrado na figura 1. Na SNc podem ser observados corpos de inclusão citoplasmática, conhecidos como corpos de Lewy, em cujo interior encontra-se a proteína alfa-sinucleína, que representa um importante marcador do processo degenerativo na DP (OLANOW *et al.* 1999). A lesão da via dopaminérgica nigroestriatal determina a diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no corpo estriado, especialmente no putâmen. Esta alteração fisiopatológica ocasiona sintomas neurológicos como tremor de repouso, rigidez muscular e bradicinesia (MOORE *et al.*, 2005). No entanto, a DP é mais do que uma doença

do sistema nigroestriatal dopaminérgico, o processo neurodegenerativo afeta vários sistemas centrais e periféricos (LIM *et al.*, 2009).

Uma complexa rede neural, que inclui o córtex cerebral, o tálamo motor e os núcleos da base, atua na execução dos movimentos voluntários. Os núcleos da base são estruturas situadas lateralmente ao tálamo e se constituem de cinco núcleos: globo pálido (interno e externo), caudado e putâmen (CPu ou estriado dorsal, quando considerados em conjunto com o núcleo acumbens formam o complexo estriado), substância negra (*pars compacta* e *pars reticulada*) e núcleo subtalâmico (JUEPTNER & WEILLER, 1998). No telencéfalo localiza-se o estriado, formado pelo caudado e putâmen, separados pela capsula interna e medialmente ao putâmen, lateral à capsula interna, encontra-se o globo pálido. O núcleo subtalâmico (STN), localiza-se no diencéfalo e a substância negra (SN) na parte superior do mesencéfalo, dividida em parte compacta (SNc) e reticular (SNr) (OBESO *et al.*, 2002).

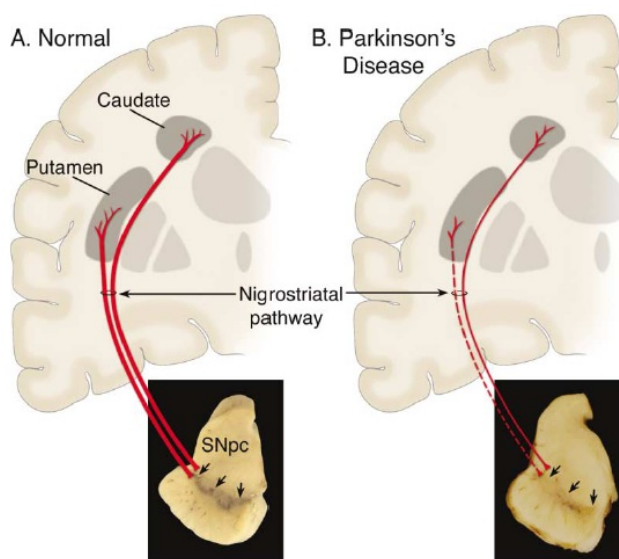


Figura 1. Esquema representativo das projeções dopaminérgicas normais (A) e após degeneração na SNc (B). Observar a despigmentação da SNc que contém neuromelanina (BENMOYAL-SEGAL *et al.*, 2006).

O modelo padrão sugere que existem duas vias que modulam a neurotransmissão através dos núcleos basais (NB), as vias direta e indireta (Figura 2). Com base nas polaridades das ligações conhecidas, a via direta está relacionada com a facilitação dos movimentos, enquanto a via indireta os suprime. O efeito da dopamina é diferente nas duas vias devido à presença de diferentes receptores dopaminérgicos nos neurónios do estriado (GALE *et al.*, 2007).

O sistema dopaminérgico inerva regiões dos núcleos basais e também do sistema límbico e áreas associativas. A dificuldade na realização dos movimentos tem sido geralmente considerada a principal manifestação de disfunção dos NB. Áreas motoras corticais projetam axônios glutamatérgicos ao CPu, que envia projeções GABAérgicas ao globo pálido interno (GPi) e a SNr por duas vias: a GABAérgica monossináptica, ou "circuito direto" (CPu-GPi/SNr) e a trisináptica (CPu-GPe-STN-GPi/SNr) "circuito indireto". A dopamina da SNc facilita neurônios putaminais na via direta e inibe os da via indireta. ativação da via direta leva a uma redução neuronal no GPi / SNr e na facilidade do movimento, enquanto a ativação da via indireta inibe movimentos. O córtex também envia projeções diretas para a SNc, GPe e STN (RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009).

Na DP, o déficit de dopamina conduz ao aumento na atividade do circuito indireto e hipoatividade no circuito direto. O corpo estriado contém receptores D1 onde a dopamina é excitatória e receptores D2 em que é inibitória, atuando por meio do aumento ou diminuição das vias intracelulares. A deficiência de dopamina nesses receptores gera hiperatividade excitatória do STN e a subsequente hiperatividade inibitória do GPi/SNr, com consequente diminuição da ativação tálamo-cortical, que se reflete em manifestações clínicas da doença (FAHN *et al*, 2003).

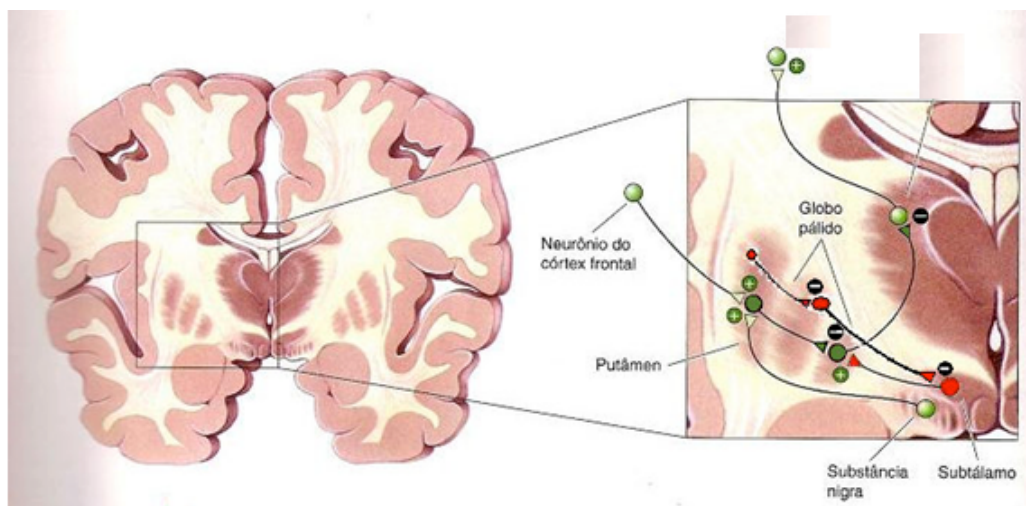


Figura 2. Esquema do circuito neural dos núcleos da base. À esquerda, localização anatômica. À direita, representação das vias direta (em verde) e indireta (em vermelho) (Adaptado de Bear. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3a edição). +: indica ativação das sinapses; - indica diminuição da transmissão sináptica.

1.4 Tratamento

Quadro 1: Medicamentos utilizados durante o tratamento da DP (NOORDHOUT *et al.*, 2009)

Fármaco	Categoria	Indicação	Efeito Colateral
Carbidopa/ Levodopa	L-DOPA	Utilizado para sintomas cardinais e secundários da DP.	Náusea, vômitos, anorexia, alucinações, mudança de comportamento, tontura.
Pramipexol, Bromocriptina, Ropinirol, Lisurida, Pergolida, Cabergolina, Piribedil, Apomorfina.	Agonistas Dopaminérgicos	Possuem ação direta sobre os receptores dopaminérgicos. Utilizados no início da DP ou como terapia combinada com outros medicamentos em fase avançada da DP.	Náusea, vômitos, alucinações, mudança de comportamento, tontura, hipotensão ortoestática, sonolência, fadiga, discinecias.
Selegilina	Inibidor da monoamina oxidase B	Controle das sintomatologias da DP.	Insônia, pesadelos, alucinações.
Entacapona	Inibidor catecol-O-metil-transferase	Prolongam a ação da levodopa ao diminuir o seu metabolismo periférico.	Diarreia, Náusea, vômitos, alucinações, tontura, hipotensão ortoestática, sonolência, fadiga, discinecias.
Amantadina	Inibidor N-metil-D-aspartato	Utilizados no início da DP, mais efetiva sobre o tremor, adjuvante com agonistas dopaminérgicos ou levodopa.	Boca seca, constipação, retenção urinária, sonolência ou insônia, depressão.
Prociclidina, Trihexifenidila	Anticolinérgicos	Utilizado sozinho ou com um agonista dopaminérgico.	Boca seca, constipação, retenção urinária, alucinações.

O objetivo do tratamento da doença de Parkinson é promover ao paciente uma vida saudável. Há fármacos atualmente utilizados que apresentam resultados positivos na redução da sintomatologia, sendo o medicamento mais utilizado a L-DOPA, contudo a escolha do medicamento é multifatorial e a maioria dos fármacos empregados apresenta efeitos colaterais (NOORDHOUT *et al.*, 2009). O Quadro 1 resume os principais medicamentos empregados no tratamento da DP e suas características.

A estimulação cerebral profunda é a intervenção cirúrgica de escolha quando as complicações motoras DP são inadequadamente controladas com medicamentos. A administração de alta frequência de estimulação elétrica contínua no núcleo subtalâmico é feita através de um dispositivo implantado cirurgicamente e tem como resultado uma melhora nos sintomas motores dos pacientes em estágios avançados da DP. Estudos relatam uma melhora significativa na função motora dos pacientes que se submetem ao procedimento. No entanto, esta terapia é pouco utilizada devido aos riscos inerentes da cirurgia ao paciente (WEAVER *et al.*, 2009).

1.5 Modelos experimentais para estudo da doença de Parkinson

A manipulação experimental dos sistemas neuronais permite o estudo das relações existentes entre o cérebro e o comportamento dos animais. Os modelos experimentais são úteis para estudar os possíveis mecanismos patológicos, etiológicos e fisiológicos envolvidos na doença, e são essenciais ao desenvolvimento e testes de novas estratégias terapêuticas (DEUMENS *et al.*, 2002).

Para o estudo da DP, o modelo animal deve mimetizar tanto a perda dos neurônios dopaminérgicos quanto os déficits comportamentais da mesma. Os modelos animais nos quais são induzidas tais alterações pela administração de toxinas são importantes meios de se estudar a fisiopatologia desta doença. As toxinas mais frequentemente utilizadas são o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (HODAIE *et al.*, 2007).

Embora a utilização da neurotoxina MPTP seja um modelo já validado para estudo da DP em camundongos e primatas não humanos, ela apresenta algumas limitações. A administração de MPTP provoca uma lesão dopaminérgica bilateral, não favorecendo a utilização de testes comportamentais que se baseiam em disfunções unilaterais. Além disso, uma recuperação espontânea dos sintomas ocorre tanto em macacos como em camundongos após lesão com MPTP, o que impede a avaliação dos efeitos terapêuticos de drogas em longo prazo (TAYLOR *et al.*, 1997; SEDELIS *et al.*, 2000; IANCU *et al.*, 2005).

Em contrapartida, a 6-OHDA permite reproduzir aspectos progressivos da DP, desta forma, ratos unilateralmente lesionados com esta neurotoxina são úteis como modelo de hemiparkinsonismo, permitindo o estudo das funções relacionadas aos neurônios dopaminérgicos. A 6-OHDA destrói seletivamente os neurônios catecolaminérgicos e é administrada unilateralmente, uma vez que injeções bilaterais ocasionam uma elevada mortalidade dos animais (IANCU *et al.*, 2005; GREALISH *et al.*, 2010). As lesões unilaterais permitem a comparação das mudanças entre o hemisfério cerebral lesionado (ipsilateral) e o intacto (contralateral), fornecendo, desta maneira, um controle interno da lesão. Também promovem a perda localizada da inervação dopaminérgica no estriado e, portanto, uma lateralização do déficit do comportamento devido a sua semelhança estrutural (Figura 3) com as catecolaminas endógenas (SCHWARTING e HUSTON, 1996).

A 6-OHDA é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica e para atingir a via dopaminérgica nigroestriatal deve ser injetada por via intracerebral na SN, no feixe prosencefálico medial ou no estriado (GREALISH *et al.*, 2010). Esse processo permite o estudo da fisiologia dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, possibilitando a análise e o entendimento de suas relações com os núcleos basais, seu papel no comportamento, e tem a vantagem de permitir, de uma maneira mais fácil, uma avaliação dos prejuízos motores em testes como rotação induzida por drogas e em testes motores espontâneos (UNGERSTEDT, 1976).

A 6-OHDA é uma neurotoxina específica para neurônios catecolaminérgicos, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico e sua neurotoxicidade ocorre através do desacoplamento da fosforilação oxidativa da mitocôndria, o que resulta na privação de energia para as células neuronais que, incapazes de realizarem suas funções fisiológicas normais, morrem. Além disso, a neurotoxicidade da 6-OHDA tem sido associada a sua auto-oxidação em pH neutro com produção de H₂O₂ e radicais hidroxila e superóxidos, os quais formam ligações covalentes com grupos nucleofílicos de macromoléculas que, conseqüentemente, aumentam sua toxicidade (IZUMI *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2006). Também se observa a diminuição da atividade da SOD, o aumento da atividade da MAO e a formação de radicais livres (MEREDITH *et al.*, 2008).

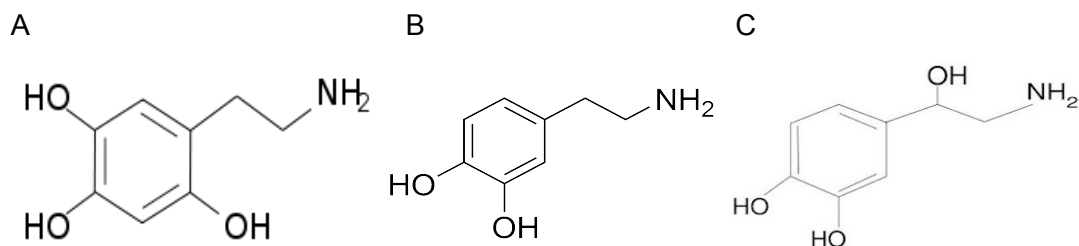


Figura 3: Semelhança entre as estruturas químicas da 6-OHDA (A), dopamina (B) e noradrenalina (C).

A magnitude da lesão é dependente da quantidade de 6-OHDA injetada e do local da aplicação. Quando administrada no corpo estriado, a neurotoxina produz uma degeneração lenta do sistema nigroestriatal (Figura 4) que dura cerca de três semanas após a lesão (MEREDITH *et al.*, 2008).

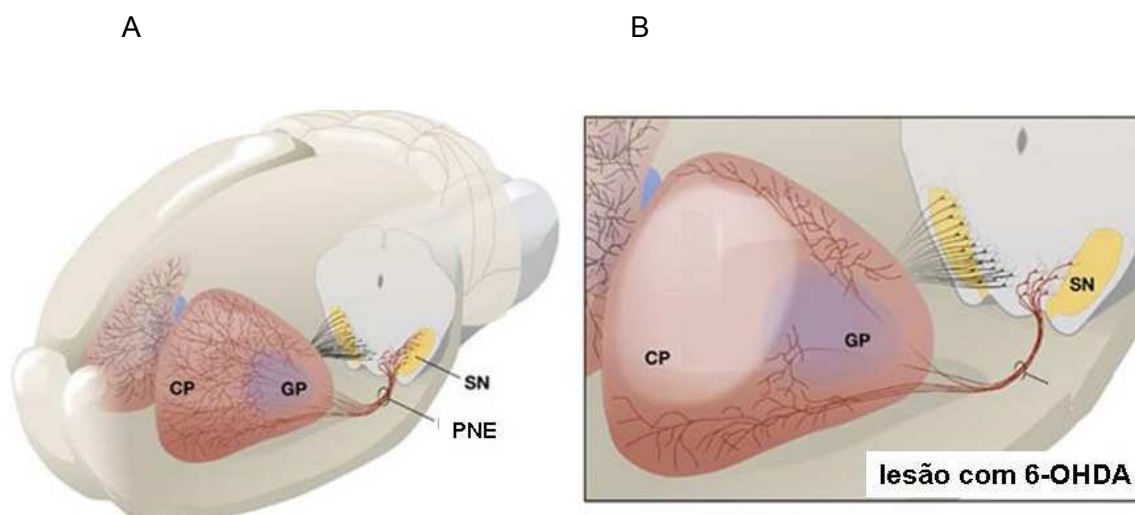


Figura 4. Esquema mostrando a via nigroestriatal do encéfalo de rato. Em 'A', é mostrado o encéfalo de um rato não lesionado com as projeções dos neurônios dopaminérgicos partindo da SN em direção ao corpo estriado (ou caudado-putâmen) e globo pálido em ambos os hemisférios. Em 'B', após lesão unilateral com 6-OHDA, ocorre significativa redução das projeções nigroestriatais e consequente redução dos níveis de dopamina no corpo estriado. CP, caudado-putâmen; GP, globo pálido; PNE, projeções nigroestriatais; SN substância negra. Adaptado (KIRIK *et al.*, 2004).

1.6 Produtos naturais na pesquisa e tratamento da DP

Os produtos naturais e seus princípios ativos têm se mostrado eficazes na prevenção da doença de Parkinson em humanos (GAO *et al.*, 2012). O efeito neuroprotetor,

após lesão induzida por 6-OHDA em ratos, foi demonstrado após administração de extrato da *Ginkgo biloba* (KIM *et al.*, 2004), cafeína (AGUIAR *et al.*, 2006) e *Nicotiana tabacum* (BLANCO *et al.*, 2008), *Coptidis rhizoma*, *Scutellariae radix* e *Rhei rhizoma* (SHIH, *et al.*, 2011) e *Hibiscus asper* (HRITCU *et al.*, 2011). *Cistanche salsa* (SHENG *et al.*, 2002), *Tripterygium wilfordii* (LI *et al.*, 2003) e *Acanthopanax senticosus* (FUJIKAWA *et al.*, 2005), apresentam efeito protetor contra a perda de dopamina induzida por MPTP em ratos.

A *Vicia faba* é rica em L-DOPA e casos de melhora sintomática após o seu consumo têm sido descritos em pacientes com DP (GOYOAGA *et al.*, 2008). Rabey *et al.* (1993) avaliou em cinco voluntários saudáveis e em seis pacientes com DP a adição da VF na dieta e observou uma melhora substancial quadro clínico em três pacientes, concluindo que sua ingestão produz um aumento substancial nos níveis de L-DOPA no plasma, que se correlaciona com uma melhoria substancial no desempenho motor.

A *Mucuna pruriens* é a planta que apresenta maior número de evidências de eficácia contra os sintomas motores em estudos experimentais. Suas sementes combinadas com levedopa, quando administradas em ratos lesionados por aplicação da toxina 6-OHDA, apresentaram atividade semelhante a L-DOPA (KASTURE *et al.*, 2009). Sua inclusão na dieta humana revela resultados positivos para o tratamento da DP melhorando a resposta motora. (KATZENSCHLAGER *et al.*, 2004).

1.7 *Portulaca oleracea*

A *Portulaca oleracea* (PO) é uma espécie cosmopolita, seu nome é derivado de “portula”, diminutivo de “porta” e “olera” indicativa de sua utilização difusa, sendo atribuídas a todas as partes da planta propriedades medicinais (BOSI *et al.*, 2009). Pertence a família Portulacaceae, que inclui cerca de 30 gêneros e 500 espécies. No Brasil o gênero *Portulaca*, que inclui 13 espécies, distribuídas com maior concentração e diversidade nas regiões Nordeste e Sudeste (COELHO, 2010)

Conhecida como “vegetal para uma longa vida” no folclore chinês, a PO (Figura 5 e 6) é amplamente utilizada não somente como uma planta comestível, mas também como erva da medicina tradicional chinesa no tratamento de disenterias, eczema, febrífugo e antisséptico (DONG *et al.*, 2010). Mencionada em antigos textos egípcios (MOHAMEND *et al.*, 1994), a PO está listada como uma das plantas medicinais mais consumidas no mundo, sendo-lhe atribuído o termo “Panacea Global”. Os caules e folhas das plantas são carnosos e comestíveis, com um gosto levemente ácido e salgado semelhantes ao espinafre e são de fácil desenvolvimento, dada a sua resistência à seca (DWECK, 2001).



Figura 5:Caule, folhas e flores da *Portulaca oleracea*.

A PO caracteriza-se principalmente pela presença de sépalas carenadas no botão floral, visível mesmo a olho nu e tricomas axilares que são pequenos e em número reduzido. Apresenta hábito completamente prostrado em ambientes ensolarados e em ambientes com pouca luminosidade pode atingir cerca de 40 cm de altura. É uma erva de caule curto, avermelhado; folhas pequenas, sésseis, obovadas, e suculentas; flores amarelas, pequenas, axilares ou terminais (COELHO, 2010).

Na região amazônica, a decocção das partes aéreas é utilizada como diurético, febrífugo, contra parasitas intestinais e cólicas renais. O uso tópico da decocção é considerado excelente para aliviar a dor de queimaduras e as partes aéreas cruas são usadas como alimento. Na região da Mata Atlântica, outros usos são atribuídos à espécie, o suco das folhas é usado contra úlceras e dores de barriga e as folhas frescas são mastigadas e deglutidas para as mesmas finalidades (DI STASI *et al.*, 2002). A PO também é utilizada como alimento para animais, em aquicultura e no processamento de alimentos industriais (MOHAMED *et al.*, 2011).

A PO é relatada como uma excelente fonte de compostos como o ômega-3 e ômega-6, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que apresentam alto poder antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Contém alcalóides (XIANG *et al.*, 2005), cumarinas, terpenóides, ácidos graxos (CHEN *et al.*, 2009), glicosídeos, catecolaminas, saponinas (Lu *et al.*, 2009), flavonoides (Zhu *et al.*, 2010), polissacarídeos (DONG *et al.*, 2010), fósforo, cálcio, potássio, ferro e manganês (MOHAMEND *et al.*, 1994). Apresenta dopamina e noradrenalina em sua composição química (CHEN *et al.*, 2003). DWECK *et al.*, (2001) citam que a planta também apresenta vitaminas A, B, C, E, PP, β - caroteno, glutathiona, e taninos. Estão presentes

também em sua composição diversos aminoácidos, como isoleucina, leucina, lisina, metionina, cistina, fenilalanina, treonina, tirosina, valina (MOHAMED *et al.*, 2011).



Figura 6. Sementes da *Portulaca oleracea*.

Algumas pesquisas revelaram que os extratos da PO possuem diversas bioatividades, como relaxante muscular (PARRY *et al.*, 1993), antimicrobiano (BAE, 2004), bronquodilatador (MALEK *et al.*, 2004), hipoglicêmico (FAYONG *et al.*, 2009), hepatoprotetor (PRABHAKARAN *et al.*, 2010).

Lee *et al.* (2011) concluiu em seus experimentos que a PO é capaz de diminuir o nível de glicose, triglicerídeos, colesterol LDL no sangue e reduzir a pressão sistólica em modelos de ratos diabéticos. Sua atividade hipoglicemiante também é avaliada por Li *et al.*, (2009) e Gao *et al.* (2010).

A administração via oral, em ratos, do extrato aquoso da PO (EAPO), resultou em diminuição significativa de AST, γ -GT, fosfatase alcalina e bilirrubina. Testes de função renal mostraram aumento do ácido úrico, com diminuição significativa na ureia e creatinina, comprovando o efeito benéfico da espécie. O extrato também causou um aumento significativo nos níveis de glutatona em vários órgãos. Sua utilização aumenta os níveis de SOD e diminui os níveis de MAO, produto final da peroxidação lipídica. Como conclusão, Dkhil *et al* (2011) afirmaram que a PO é benéfica para a função hepática, renal e para o tecido testicular.

O extrato etanólico da PO (EEPO) apresenta atividade antiinflamatória significativa contra edema induzido em patas de ratos na dose de 200 mg/kg e 400 mg/kg, corroborando a sua utilização farmacológica (SANJA *et. al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que o

extrato protege a camada vascular de células endoteliais, que é alvo direto do estresse oxidativo na inflamação. (GANDÍA-HERRERO, 2009).

Walaahozayen *et al.* (2011) propõem em seus estudos que a inclusão de óleo de peixe na dieta de animais, juntamente com o EAPO, podem fornecer uma opção terapêutica prolongada contra a nefropatia, melhorando as mudanças adversas nas funções renais, com o aumento da atividade antioxidante e redução da peroxidação sem efeitos colaterais.

Karimi *et al.* (2010), sugeriram que a PO pode proteger contra toxicidade renal induzida por cisplatina por apresentar diminuição significativa dos níveis de ureia e creatinina em ratos. O potencial antihelmíntico do extrato aquoso foi verificado *in vitro* contra *Fasciola hepatica*, podendo estar associado aos seus compostos, como alcaloides, aminoácidos e saponinas (ROMERO *et al.*, 2002). LU *et al.* (2009), descreveram que com extratos de PO administrados em ratos, obtiveram-se animais com maior resistência a fadiga física, atrasando a acumulação plasmática de lactato e amônia durante a natação forçada. Foi também comprovada sua ação *in vitro* contra o vírus da herpes tipo 2, no qual foi observada inibição do potencial de penetração do vírus em células (DONG *et al.*, 2010).

O extrato metanólico da PO não apresentou toxicidade em ratos, quando administrado em doses até 2000 mg/kg por via oral (MUSA *et al.*, 2007). O extrato aquoso também não mostrou citotoxicidade ou genotoxicidade e foi considerado seguro para o consumo diário como um vegetal (PRABHAKARAN *et al.*, 2010).

Assim como outros membros da Caryophyllales, a PO contém betalaínas que incluem duas classes de pigmentos: betacianinas e betaxantinas, no lugar de antocianinas (XIANG *et al.*, 2005). Resultados encontrados por Wang *et al.*, (2010) indicaram que betacianinas, extraídas da PO, na dose de 50 ou 100 mg/kg, invertem consideravelmente os prejuízos cognitivos e atenuam o dano oxidativo induzido por D-galactose no cérebro de camundongos.

Segundo Hongxing *et al.* (2007), a atividade da SOD diminui com o aumento da idade e essa alteração é considerada importante no desempenho de funções na aprendizagem e da memória. Sua pesquisa demonstrou que a administração do EAPO aumentou significativamente as atividades de enzimas antioxidantes, tais como SOD, e observou-se a diminuição nos níveis de produção de malondialdeído (MDA) no cérebro de ratos, indicando que o EAPO tem efeito protetor contra o mecanismo oxidativo do cérebro. Além disso, foi demonstrado que a PO teve efeito protetor contra o estresse oxidativo causado por deficiência de vitamina A (ARRUDA *et al.*, 2004).

De acordo com os trabalhos de Wang *et al.* (2007), a PO possui ação contra a hipóxia tecidual neuronal. Animais expostos a ambiente com baixa concentração de oxigênio

e que previamente receberam por via oral os extratos da planta, apresentaram, em comparação ao grupo controle, aumento na atividade de piruvato quinase, fosfofrutoquinase, lactato desidrogenase, indicando que estes extratos podem aumentar a glicólise fornecendo mais ATP para sustentar a manutenção da função celular.

Um estudo realizado por CHEN *et al.*(2009), demonstrou atividade anti hipóxica do extrato etanólico da PO, e sugeriu ainda que esta ação pode estar relacionada a promoção de enzimas chaves na glicólise, melhorando o nível de ATP em hipóxia nos camundongos.

Portanto, a administração de extratos da PO tem efeitos descritos sobre o SNC e poderia representar uma alternativa para, por meio de sua atividade antioxidante, retardar a morte neuronal dopaminérgica.

1.8 Referências

AGUIAR, L.M.V.; NOBRE, H.V.; MACÊDO, D.S.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S. M.; CUNHA, G. M. A.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 84, 415-419, 2006.

ALVES G, FORSAA EB, PEDERSEN KF, DREETZ GJERSTAD M, LARSEN JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*, 255(Suppl 5):18-32, 2008.

ARRUDA SF, SIQUEIRA EM, SOUZA EM. Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and purslane (*Portulaca oleracea*) leaves reduce oxidative stress in vitamin A-deficient rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 48: 288-295, 2004.

BAE J. Antimicrobial effect of *Portulaca oleracea* extracts on food-borne pathogens. *J Food Sci Nutr* 9:306–311, 2004.

BEAR MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: **Desvendando o Sistema Nervoso**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BENMOYAL-SEGAL, L. et SOREQ, H. Gene-environment interactions in sporadic Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, Vol. 97 no 6, p. 1740-1755, 2006.

BLANCO L, LORIGADOS L, GARCÍA R, MARTÍNEZ L, PAVÓN N, GONZÁLEZ ME, SERRANO T, BLANCO V. Neuroprotective effect of the systemic delivery of (-) nicotine in hemiparkinsonian rats. *Biotecnología Aplicada*. 25:126-134, 2008.

BOSI, G, GUARRERA, PM, RINALDI, R & BANDINI-MAZZANTI, M. Ethnobotany of purslane (*Portulaca oleracea* L.) in Italy and morphobiometric analyses of seeds from archaeological sites in the Emilia Romagna Region (Northern Italy). *J-P Morel & AM Mercuri* , pp. 129–139, 2009.

CAMACHO E. CARRION M.; D., LOPEZ-CARA M.; C., L.; ENTRENA, A.; A. GALLO, M.; ESPINOSA, A.; ESCAMES, G.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Melatonin Synthetic Analogs as Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *Medicinal Chemistry*, Vol12, N7, pp. 600-617, 2012.

CHEN, CHENG-JIE, WAN-YIN WANG, XIAO-LI WANG, LI-WEI DONG, YI-TIAN YUE, HAI-LIANG XIN, CHANG-QUAN LING AND MIN LI. Anti-hypoxic activity of the ethanol extract from *Portulaca oleracea* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 2, 246—250, 2009.

CHEN YG, SHEN ZJ, CHEN XP. Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides. *Int J Biol Macromol*, 45: 448-452, 2009.

CHEN J, SHI YP, LIU JY. Determination of noradrenaline and dopamine in Chinese herbal extracts from *Portulaca oleracea* L. by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1003:127–132, 2003.

COELHO, A. A. de O. P; GIULIETTI, A. M.. O gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) no Brasil. *Acta Bot. Bras.*, São Paulo, v. 24, n. 3, Sept. 2010.

DEUMENS, R., BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson'S Disease In Rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.*, v. 175, p. 303-317, 2002.

DKHIL A MOHAMED., AHMED E. ABDEL MONIEM, SALEH AL-QURAI SHY AND REDA AWADALLAH SALEH. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(9), pp. 1589-1563, 4 May, 2011.

DONG CX, HAYASHI K, LEE JB, HAYASHI T. Characterization of structures and antiviral effects of polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 58(4): 507-510, 2010.

DWECK, A. C. Purslane – *Portulaca oleracea* The global panacea. *Personal care magazine* 2,4 p. 7-15. 2001.

FAHN S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann NY Acad Sci* 991:1–14, 2003.

FAYONG GONG , FENGLIN LI , LILI ZHANG , JING LI , ZHONG ZHANG AND GUANGYAO WANG. Hypoglycemic Effects of Crude Polysaccharide from Purslane. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 880-888. 2009.

FLOOD M. P, QIAN L, PETERSON L. J, *et al.*, "Transcriptional Factor NF- κ B as a Target for Therapy in Parkinson's Disease," *Parkinson's Disease*, vol. 2011, Article ID 216298, 8 pages, 2011.

FERREIRA, FERNANDA VARGAS; CIELO, CARLA APARECIDA; TREVISAN, MARIA ELAINE. Aspectos respiratorios, posturais e vocais da Doença de Parkinson: considerações teóricas. *Rev. CEFAC*, São Paulo, v. 13, n. 3, June 2011.

FRIEDMAN JOLANTA GAŁĄZKA, FRIEDMAN ANDRZEJ. Role of iron in pathogenesis of Parkinson disease *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* vol. 92(2) C pp. 153-158 C . 2011.

FUJIKAWA T, MIGUCHI S, KANADA N, NAKAI N, OGATA M, SUZUKI I, ET AL. *Acanthopanax senticosus* Harms as a prophylactic for MPTP-induced Parkinson's disease in rats. *J Ethnopharmacol*;97:375–81, 2005.

GALE, J.T., ET AL., From symphony to cacophony: Pathophysiology of the human basal ganglia in Parkinson disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*,11.005, 2007.

GANDÍA-HERRERO, F., JIMÉNEZ-ATIÉN ZAR, M., CABANES, J., ESCRIBANO,J., AND GARCÍA-CARMONA, F. Fluorescence Detection of Tyrosinase Activity on Dopamine-Betaxanthin Purified from *Portulaca oleracea* (Common Purslane) Flowers. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2523–2528, 2009.

GAO X., CASSIDY A., SCHWARZSCHILD M.A., RIMM E.B., AND A. Ascherio Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*.78:1138-1145, 2012.

GAO, D.; LI, Q.; FAN, Y. Hypoglycemic effects and mechanisms of *Portulaca oleracea* L. in alloxan-induced diabetic rats. *J. Med. Plants Res.*, 4, 1996–2003. 2010.

GORELL J. M., MD, C. C. JOHNSON, PHD, B. A. RYBICKI, PHD, E. L. PETERSON, PHD, G. X. KORTSHA, MS, G. G. BROWN, PHD AND R. J. RICHARDSON, SCD Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology* March 1, vol. 48 no. 3 650-658, 1997.

GOETZ CG, POEWE W, RASCOL O, ET AL. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord.*;19:1020-1028., 2004.

GOMES MZ., RAISMAN-VOZARI R., DEL BEL EA. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effect on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain Res*, 1203:160-9, 2008.

GOYOAGA C, BURBANO C, CUADRADO C, et al. Content and distribution of vicine, convicine and L-DOPA during germination and seedling growth of two *Vicia faba* L. varieties. *European food research and technology*. Volume 227, N 5, 1537-1542, 2008.

GREALISH, S., MATTSSON, B., DRAXLER, P. AND BJÖRKLUND, A., Characterization of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 31: 2266–2278. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07265.x, 2010.

HRITCUA L., FOYETB H. S., STEFANA M., et al. Neuroprotective effect of the methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 137, Issue 1, Pages 585–591, 2011.

HODAIE, M.; NEIMAT, J.S.; LOZANO, A.M. The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. *Neurosurgery*, v. 60, p. 17-30, 2007.

HONGXING Z, NANCAI Y, GUOFU H, JIANBO S, YANXIA W, HANJU H, Neuroprotective effects of purslane herb aqueous extracts against D-galactose induced neurotoxicity, *Chemical and Biological Interactions*, 170(3), , 145-152. 2007.

HUSSAIN G., MANYAM B.V. *Mucuna pruriens* proves more effective than L-DOPA in Parkinson's disease animal models. *Phytother Res*; 11: 419-423. 1997.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 162, p. 1-10, 2005.

IZUMI, Y.; SAWADA, H.; SAKKA, N.; YAMAMOTO, N.; KUME, T.; KATSUKI, H.; SHIMOHAMA, S.; AKAIKE, A. p-Quinone mediates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death and ferrous iron accelerates the conversion of p-quinone into melanin extracellularly. *Journal of Neuroscience Research*, v. 79, p. 849-860, 2005.

JENNER P., Molecular mechanism of L-DOPA induce dyskinesia. *Nar Rev Neurosci*, 9:655-77, 2008.

JUEPTNER M.; WEILLER C. A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imagin studies. *Brain*, v.121, p.1437-49, 1998.

KASTURE S, PONTIS S, PINNA A, SCHINTU N, SPINA L, LONGONI R, ET AL. Assessment of symptomatic and neuroprotective efficacy of *Mucuna pruriens* seed extract in rodent model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 15:111–22.2009.

KARIMI GH.R.,KHOUEI A.R.,OMIDI A.,KALANTARI M.R.,BABAEI JAVAD,TAGHIABADI E.,RAZAVI B.M. Protective effect of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* against cisplatin induced nephrotoxicity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* Vol. 13, No. 2, Spring, 31-35, 2010.

KATZENSCHLAGER R, EVANS A, MANSON A, ET AL. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75:1672–1677, 2004.

KIRIK, D., B. GEORGIEVSKA, A. BJORKLUND. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci*; 7(2): 105-10, 2004.

KIM, M.-S., LEE, J.-I., LEE, W.-Y. AND KIM, S.-E. Neuroprotective effect of *Ginkgo biloba L.* extract in a rat model of Parkinson's disease. *Phytother. Res.*, 18: 663–666, 2004.

KUMAR, BAGEPALLI SRINIVASA ASHOK ET AL . Pharmacognostical studies of *Portulaca oleracea* Linn. *Rev. bras. farmacognosia*, João Pessoa, v. 18, n. 4, Dec. 2008.

LAM K, ET AL. , A case control study on bone mineral density in Chinese patients with Parkinson's disease, *Parkinsonism and Related Disorders*, doi:10.1016/j.par.kreldis.2010.05.002, 2010.

LANGSTON JW, FORNO LS, TETRUD J, REEVES AG, KAPLAN JA, KARLUK D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol.*;46:598-605, 1999.

LEE, A.S.; LEE, Y.J.; LEE, S.M.; YOON, J.J.; KIM, J.S.; KANG, D.G.; LEE, H.S. *Portulaca oleracea* ameliorates diabetic vascular inflammation and endothelial dysfunction in db/db mice. *Evid. Based Complement Alternat Med.*doi:10.1155/2012/741824. , 2012.

LEVERENZ JB, QUINN JF, ZABETIAN C, ZHANG JING, MONTINE K S& MONTINE T J. (). Cognitive impairment and Dementia in Patients with Parkinson Disease. *Curr Top Med Chem*, 9,p. 903-912, 2009.

LIU B, GAO H, HONG J. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect.*;111:1065–1073, 2003.

LI FQ, CHENG XX, LIANG XB, WANG XH, XUE B, HE QH ET AL. Neurotrophic and neuroprotective effects of triptchlorolide, an extract of Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F. on dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 179(1): 28-37, 2003.

LIM SY, FOX SH, LANG AE. Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 66(2):167–172, 2009.

LIM YY, QUAH EPL. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chemistry.* 103:734-740., 2007.

LU JR, HE TR, PUTHETI R. Compounds of Purslane extracts and effects of antikinetic fatigue. *J. Med. Plants Res.* 3: 506-510, 2009.

LUQUIN MR. Tratamiento inicial de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*; 50 (Supl 1): S35-6, 2010.

MA, Z.; WEI, X.; FONTANILLA, C.; NOELKER, C.; DODEL, R.; HAMPEL, H.; DU, Y. Caffeic acid phenethyl ester blocks free radical generation and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Life Sci.*, v. 79, p. 1307-1311, 2006.

MAGALHÃES, J., ANTUNES, A., BOECHAT, N.. Laboratórios farmacêuticos oficiais e sua relevância para saúde pública do Brasil - DOI:10.3395/reciis.v5i1.367pt. *RECIIS*, Brasil, 5, mar. 2011.

MALEK F, BOSKABADY MH, BORUSHAKI MT, TOHIDI M: Bronchodilatory effect of *Portulaca oleracea* in airways of asthmatic patients. *J Ethnopharmacol* , 93:57–62. 2004.

MCCORMACK AL, THIRUCHELVAM M, MANNING-BOG AB, THIFFAULT C, LANGSTON JW, CORY-SLECHTA DA, ET AL. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* 10:119–12, 2002.

MENESES MS, TEIVE HAG. Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos. **Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan**; 1996.

MILLER RL, JAMES-KRACKE M., SUN GY., SUN AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 34:55-65. 2009.

MOBIM A. A comparative analysis of how Michael J. Fox and Muhammad Ali changed the world's views on Parkinson's disease. *JPRLS*, Vol. 1, No. 1, 2011.

MOHAMED, A.I. AND HUSSEIN, A.S. Chemical composition of purslane (*Portulaca oleracea*). *Plant Foods. Hum. Nutr.* 45 (1): 1-9. 1994.

MOISAN F, SPINOSI J, DUPUPET JL, DELABRE L, MAZURIE JL, GOLDBERG M, IMBERNON E, TZOURIO C, ELBAZ A. The relation between type of farming and prevalence of Parkinson's disease agricultural workers in five French districts. *Mov Disord.* 26: 271–279, 2011.

MOORE, D.J., WEST, A.B., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28:57-87, 2005.

MUANGPAISAN W, MATHEWS A, HORI H, SEIDEL D. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. *J Med Assoc Thai.* Jun;94(6):749-55. 2011.

MUSA KY, A. AHMED, G. IBRAHIM, O.E. OJONUGWA, M. BISALLA, H. MUSA AND U.H. DANMALAM. Toxicity Studies on the Methanolic Extract of *Portulaca oleracea* L. (Fam. Portulacaceae). *Journal of Biological Sciences*, 7: 1293-1295. 2007.

NAVARRO A. AND BOVERIS A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 2, article 34, 2010.

NORMAN TR, CHAMBERLAIN KG, FRENCH MA, BURROWS GD. Platelet monoamine oxidase activity and cigarette smoking. *J Affect Dis* ; 4: 73-77,1982.

OBESO JAM RODRÍGUEZ-OROZ, BENITEZ-TERMINO B, BLESA FJ, GURIDI J, MARIN C, RODRIGUEZ M. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci*; 17:51-5, 2002.

OBESO JA, RODRIGUEZ-OROZ MC, GOETZ CG. *et al.* Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*;16 (6) 653- 661, 2010

OLIVEIRA I., VALENTAO P., LOPES R., ANDRADE P.B., BENTO A., PEREIRA J.A. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stem. *Microchemical Journal*, 92 (2), pp. 129-134. 2009.

OLANOW CW, TATTON WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 22:123-144. 1999.

PARRY O, MARKS JA, OKWUASABA FK. The skeletal muscle relaxant action of *Portulaca oleracea*: role of potassium ions. *J Ethnopharmacology* ;40:187–194. 1993.

PEIXINHO A, AZEVÊDO AL, SIMÕES RM. Alterações neuropsiquiátricas da Doença de Parkinson. *Rev Serv Psiquiatr Hosp Fernando Fonseca* 3:12-30. 2007.

PRABHAKARAN V., KUMAR B. S. A, SHEKAR D.S.S, NANDEESH R., SUBRAMANYAM P.. Evaluation of the hepatoprotective activity of *Portulaca oleracea* L. on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. *Plant Med Aromat* 9(3): 199-205. Epub May 25, 2010.

PRZEDBORSKI S. AND ISCHIROPOULOS H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 685–693.2005.

RABEY JM, VERED Y, SHAHTAI H, GRAFF E, HARSAT A, KOREZYN AD. Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease. *Adv Neurol* 60: 681-684.1993.

ROMERO, JM, OLAZABAL, ME, MARTINEZ, Y, SERRANO, H & MONTEAGUDO, A. Actividad fasciolicida in vitro de *Portulaca oleracea* L. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, vol. 21, pp. 297-30. 2002.

RODRIGUEZ-OROZ M. C., JAHANSHAHI M., KRACK P., LITVAN I., MACIAS R., BEZARD E., OBESO J. A.. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol.* 8, 1128–1139. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70293-5. 2009.

SAHIN, G.; KIRIK, D. Efficacy of L-DOPA therapy in Parkinson's disease. **Amino acids in human nutrition and health**.pp. 454-463; 2012.

SANCHEZ-RAMOS JR. Banisterine and Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 14: 391-402, 1991.

SANJA SD, SHETH NR, PATEL NK, PATEL D, PATEL B. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Portulaca oleracea* in carrageenan-induced paw edema in rats. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 3 (2) 59-62, 2009.

SEDELIS, M.; HOFELE, K.; AUBURGER, G.W.; MORGAN, S.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical and histological analysis of gender and strain differences. *Behav, Genet.*, v. 30, p. 171-182, 2000.

SHENG G, PU X, LEI L, TU P, LI C. Tubuloside B from *Cistanche salsa* rescues the PC12 neuronal cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis and oxidative stress. *Planta Med* 2002; 68(11): 966-970, 2002.

SHIH Y.-T., CHEN I.-J., WU Y.-C., AND Y.-C. LO, "San-Huang-Xie-Xin-Tang protects against activated microglia- and 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 429384, 11 pages, 2011.

STEIDL E. M. S.; ZIEGLER J. R.; FERREIRA F.V. DOENÇA DE PARKINSON: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. *Disc. Scientia*. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 115-129, 2007.

STERN G. Did parkinsonism occur before 1817? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Suppl: 11-1, 1989.

SUDHAKAR D, KRISHNA KISHORE R, PARTHASARATHY PR *Portulaca oleracea* L. extract ameliorates the cisplatin-induced toxicity in chick embryonic liver. [Journal Article] *Indian J Biochem Biophys* Jun; 47(3):185-9. 2010.

SCHWARZ J, ODIN P, BUHMANN C, et al. Depression in Parkinson's disease. *J Neurol.*;258(suppl 2):S336-S338; 2011.

TAKAHASHI M, YAMADA T. Viral etiology for Parkinson's disease a possible role of influenza A virus infection. *Jpn J Infect Dis*;52(3):89±98, 1999.

TAYLOR, J.R.; ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H.; SLADEK JR, J.R.; REDMOND JR, D.E. Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaeus*). *Neuroscience*, v. 81, p. 745-755, 1997

TEIVE HA G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. *Arq Neuropsiquiatr* 56:141-145. 1998.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand* Suppl., v. 367, p. 69-93, 1971.

VERAS, Renato. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 43, n. 3, June 2009.

WALAA.HOZAYEN, MOUHAMED. BASTAWY, HAIDY.ELSHAFEEY. Effects of Aqueous Purslane (*Portulaca Oleracea*) Extract and Fish Oil on Gentamicin Nephrotoxicity in Albino Rats. *Nature and Science* ;9(2):47-62, 2011.

WANG W, GU L, DONG L, WANG X, LING C, LI M, Protective effect of *Portulaca oleracea* extracts on hypoxic nerve tissue and its mechanism, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(Suppl-1), 227-233, 2007.

WANG C Q, YANG G Q. Betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine* . 17: 527-532, 2010.

WEAVER FM, FOLLETT K, STERN M; HUR K, HARRIS C; MARKS WJ, et al. Bilateral deep brain stimulation vs best medical therapy for patients with advanced Parkinson disease: a randomized controlled trial. *JAMA* ; 301(1): 63-73, 2009.

WOOTEN GF, CURRIE LJ, BOVBJERG VE, LEE JK, PATRIE J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.75(4):637–639. 2004.

XIANG L, XING D, WANG W, WANG R, DING Y, DU L. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry* ;66:2595-2601, 2005.

YUAN H, ZHENG JC, LIU P, ZHANG SF, XU JY, ET AL. Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. *Neurosci Bull* 23: 125–130. 2007.

ZHAO, J. Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application. *Rec. Pat. Biotech.*,1, 75–97; 2007.

ZHU HONGBIN ; WANG YUZHONG ; LIU YUXUAN; XIA YALIN; TANG TIAN; Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food analytical methods*. 1936-976X vol. 3, no2, pp. 90-97. 2010.

XU X., YU L., CHEN G. Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 493–499., 2006.

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM SAÚDE E AMBIENTE

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL DE EXTRATOS DA *Portulaca oleracea* EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON

ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHYTOCHEMISTRY ANALYSIS AND BEHAVIORAL OF *Portulaca oleracea* EXTRACTS FROM AN EXPERIMENTAL MODEL IN PARKINSON'S DISEASE

¹MARTINS, W.B; ¹SILVA, H. K. S; ²RODRIGUES, S. A; ³XAVIER-FILHO, L; ¹GOMES, M.Z

1. Laboratório de Morfologia Estrutural – ITP – UNIT
2. Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Sergipe – IFS
3. Biotecnologia – INNOVATEC'S

RESUMO**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL DE EXTRATOS DA *Portulaca oleracea* EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

WALESKA BARROS MARTINS

A doença de Parkinson (DP) é descrita como uma patologia degenerativa, crônica e progressiva, relacionada ao estresse oxidativo. A *Portulaca oleracea* (PO) é uma planta que apresenta atividade antioxidante e ação sobre o sistema nervoso central. O presente estudo teve como objetivos caracterizar quimicamente os extratos aquoso e etanólico da PO e avaliar sua atividade antioxidante e sua possível ação neuroprotetora em modelo experimental da doença de Parkinson. Todas as partes da PO foram coletadas e processadas para obtenção dos extratos, que foram submetidos às análises de prospecção fitoquímica, cromatografia de camada delgada e análise quantitativa da atividade antioxidante utilizando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Para o ensaio biológico, ratos foram submetidos à aplicação de solução salina ou 6-hidroxidopamina intra-estriatal. No mesmo dia, os animais receberam, por via oral, veículo, extrato aquoso (EAPO, 200 e 400mg/kg) ou extrato etanólico da PO (EEPO, 200 e 400mg/kg) durante vinte e oito dias consecutivos. Ao primeiro e décimo quinto dias após o início dos tratamentos foi realizado teste do campo aberto para verificar o estado motor e emocional dos animais. Os resultados da avaliação comportamental foram submetidos à análise de variâncias múltiplas com medidas repetitivas. À análise fitoquímica foram detectados alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, terpenóides e polissacarídeos. O extrato aquoso apresentou maior ação antioxidante (IC50 EPPO: $162.62 \pm 16.37 \mu\text{g/ml}$; EAPO $463.92 \pm 40.88 \mu\text{g/ml}$). Na avaliação comportamental observou-se diminuição significativa da atividade motora em todos os grupos que receberam 6-OHDA, no primeiro dia após a cirurgia, independente do tratamento realizado por via oral ($P < 0,0001$). Por outro lado, aos quinze dias, os roedores tratados com extratos da PO mostraram recuperação significativa da atividade locomotora, sendo este efeito mais evidente quando administrado o EAPO na dose de 400mg/kg ($P < 0,0001$). Os resultados mostraram que os extratos aquoso e etanólico da PO foram capazes de reverter os déficits comportamentais induzidos por 6-OHDA e que estes efeitos podem estar relacionados às suas características químicas e atividade antioxidante. A PO apresenta-se, portanto como importante alvo de estudo com potencial terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: 6-OHDA; *Portulaca oleracea*; Neuroproteção, dopamina.

ABSTRACT**ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHYTOCHEMISTRY ANALYSIS AND BEHAVIORAL OF *Portulaca oleracea* EXTRACTS FROM AN EXPERIMENTAL MODEL IN PARKINSON'S DISEASE**

WALESKA BARROS MARTINS

Parkinson's disease (PD) is described as a degenerative, chronic and progressive dopaminergic neuronal death related. The *Portulaca oleracea* (PO) is a plant that exhibits antioxidant activity and action on the central nervous system. The present study aimed to characterize chemically the aqueous and ethanol extracts of PO and evaluate its possible neuroprotective activity in an experimental model of Parkinson's disease. All parts of the PO were collected and processed to obtain the extracts, which were analyzed by using phytochemical screening, thin layer chromatography and quantitative analysis of antioxidant activity using the 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazila (DPPH). For the biological assay, male rats underwent stereotaxic surgery for application of saline or 6-hydroxydopamine intra-striatal. On the same day of this procedure, the animals assigned into groups receiving oral administration of vehicle, aqueous extract (EAPO, 200 and 400mg/kg) or ethanol extract of PO (EEPO, 200 and 400mg/kg) for twenty-eight consecutive days. The first and fifteenth day after the initiation of treatment an open field test was conducted to verify the motor and emotional state of the animals. The photochemical analysis showed positive for the reactions of detection of alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, terpenoids and polysaccharides and aqueous extract presented higher antioxidant activity (IC₅₀ EPPO: 162.62 ± 16.37 µg/ml; EAPO 463.92 ± 40.88 µg/ml). In behavioral evaluation a significant decrease in motor activity was observed in all groups that received 6-OHDA, the first day after surgery, regardless of the treatment orally (P <0.0001). Moreover, the fifteenth day, the rodents treated with extracts of PO showed significant recovery of locomotor activity, and this effect was more evident when administered EAPO at a dose of 400mg/kg (P <0.0001). The results suggested that the aqueous and ethanol extracts of PO were able to reverse the behavioral deficits induced by 6-OHDA and that these effects may be related to their chemical composition and antioxidant activity. The PO is therefore an important object of study of therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: 6-OHDA, *Portulaca oleracea*, Neuroprotection, dopamine.

2.1 Introdução

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada por uma degeneração lenta e progressiva de neurónios dopaminérgicos (DA) na parte compacta da substância negra (SNc), resultando na deficiência de dopamina no estriado, causando a maior parte da sintomatologia que decorre na doença (LUQUIN, 2010). Sua etiologia ainda não está completamente esclarecida, contudo, diversos mecanismos de degeneração neuronal têm sido propostos, incluindo a formação de radicais livres, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, a excitotoxicidade, citotoxicidade de cálcio, deficiência de fator trófico, processos inflamatórios, fatores genéticos, fatores ambientais, a ação tóxica do óxido nítrico e apoptose (HIRSCH *et al.*, 2009). Muitas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo podem desempenhar papéis importantes na patogênese da DP, afetando a plasticidade sináptica, morfologia dendrítica e neurogênese em animais, bem como induzindo as características clínicas e anatômicas do dano neurotóxico em seres humanos (AL-QURAI SHY *et al.*, 2012).

A 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) é uma neurotoxina que atinge especificamente os neurónios dopaminérgicos e tem sido amplamente utilizada para produzir modelos experimentais para estudo da DP (GREALISH *et al.*, 2010). A toxina é comumente injetada unilateralmente em áreas específicas ao longo da via nigroestriatal e sua neurotoxicidade é baseada na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), derivadas de sua auto-oxidação, e por seu efeito na cadeia respiratória mitocondrial. Todos estes fatores interagem induzindo um ciclo de toxicidade que causa disfunção neuronal, atrofia e finalmente morte celular (RODRIGUEZ-PALLARES *et al.*, 2007). Como conseqüência, ocorre depleção dopaminérgica nas estruturas alvo e observam-se alterações motoras que podem ser mensuradas em testes comportamentais.

A terapia de reposição com levodopa (L-Dopa), apesar de ainda ser a mais utilizada para o tratamento da DP, apenas alivia os sintomas clínicos. Além disso, os pacientes geralmente apresentam efeitos colaterais graves após uso prolongado. Atualmente não há terapia disponível capaz de parar ou atrasar a neurodegeneração em pacientes (SAHIN; KIRIK 2012).

A *Portulaca oleracea* (PO) é um vegetal nutritivo, utilizado para consumo humano em salada, cozida em sopa ou incluída na dieta de animais (BOSI *et al.*, 2009). Rica em benefícios nutricionais, sua utilização na dieta humana é atribuível a mais de uma razão, a planta contém em minerais, proteínas, carboidratos, beta caroteno, vitaminas, ácidos graxos, substâncias antioxidantes (DKHIL *et al.*, 2011).

Dentre os componentes bioativos e atividades biológicas atribuídas à planta, podem ser destacados a presença de catecolaminas como dopamina e a noradrenalina (CHEN *et al.*, 2003), atividade antioxidante (DKHIL *et al.*, 2011) e ações sobre o sistema nervoso central (SNC) e periférico (AL-QURAI SHY *et al.*, 2012). Os extratos da PO também mostraram proteção frente à hipóxia neural (WANYIN *et al.*, 2011) e as betacianinas presentes na PO diminuíram os déficits cognitivos e o dano oxidativo em cérebros de ratos (WANG *et al.*, 2010). No entanto, a despeito da presença da dopamina e da L-DOPA e de suas ações relacionadas ao SNC, não há estudos mostrando o efeito da administração de extrato da PO sobre a morte neuronal dopaminérgica.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o possível efeito neuroprotetor do extrato aquoso e etanólico da *Portulaca oleracea* sobre a morte de neurônios dopaminérgicos induzida com a neurotoxina 6-OHDA, analisando comparativamente seus padrões comportamentais no teste de campo aberto.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Coleta, herborização e o registro de material botânico

A *Portulaca oleracea* foi coletada na estufa de plantas medicinais da Universidade Tiradentes, Aracaju/SE em junho de 2011 e indentificado por comparação com exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (Figura 1).

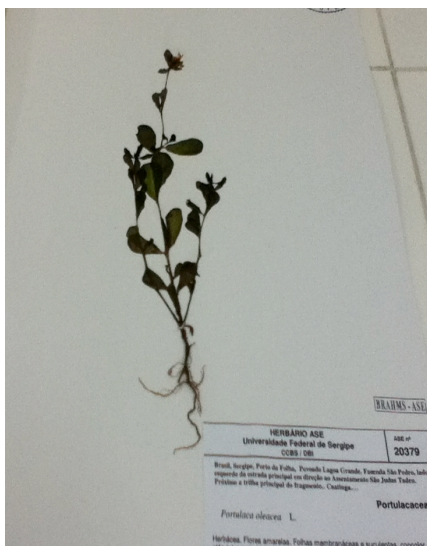


Figura 1: Exsicata da *Portulaca oleracea* depositada no herbário da Universidade Federal de Sergipe.

2.2.2 Obtenção do extrato aquoso

O extrato aquoso foi obtido com base na metodologia descrita por Hozayen *et al.*, (2011), utilizando-se todas as partes da planta, as quais foram picadas manualmente em pedaços de aproximadamente 2,0 cm, pesadas (Figura 2), colocadas em um becker contendo água destilada a 80°C (100 ml para cada 100 g). Após 60 minutos a amostra foi triturada em liquidificador (3 ciclos de 15 segundos). O macerado passou por uma peneira com malha de 2 mm, foi conservado em recipiente autoclavado e congelado. Posteriormente passou pelo processo de liofilização e foi mantido no dessecador evitando o acúmulo de umidade.



Figura 2: *Portulaca oleracea* picadas.

2.2.3 Obtenção do extrato etanólico

O extrato foi obtido utilizando todas as partes da PO, com adaptação a metodologia utilizada por Wanyin *et al.*, (2011), as quais foram picadas manualmente em pedaços de aproximadamente 2,0 cm, pesadas, colocados em frasco fechado ao abrigo da luz por 10 dias contendo etanol a 100%, a quantidade de etanol foi proporcional a quantidade do material vegetal disponível (100 ml para cada 10 g). O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (Figura 3), até a completa evaporação do solvente, sendo o material resultante mantido em dessecador até a sua utilização.



Figura 3: Extrato etanólico da *Portulaca oleracea* em rotoevaporador.

2.2.4 Análise qualitativa da L-DOPA, dopamina e noradrenalina

Para a análise qualitativa da L-DOPA, dopamina e noradrenalina foram utilizados o extratos aquoso, etanólico e a L-DOPA, como controle positivo, diluídos em ácido clorídrico na concentração de 10% em cromatografia de camada delgada (CCD) Como fase móvel utilizou-se 100 ml de uma solução de n-butanol - ácido glacial acético – água destilada (70%; 20%;10%). Após secagem a placa foi observada em luz UV (DIGHE *et al.*, 2008)

2.2.5 Prospecção fitoquímica

Os testes de prospecção fitoquímica (Figura 4) seguiram a metodologia descrita por Harbone (1998).

- A. Alcalóides: 2,00 mL da solução dos extratos foram adicionados a 2,00 mL de HCl (10%), a mistura foi aquecida por 10 minutos e dividida em o filtrado em três tubos de ensaios, nos quais foram também adicionadas algumas gotas dos reativos de Dragendorff, Mayer e Wagner.
- B. Flavonóides: 2,00 mL da solução dos extratos foram adicionados dois fragmentos de Mg (1 mm cada), e agregou-se, pelas paredes do tubo, duas gotas de HCl.
- C. Taninos: 2,00 mL da solução dos extratos foram adicionados a 5,00 mL de água destilada. Após filtragem foram colocadas 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10%.

- D. Saponinas: 2,00 mL da solução dos extratos foram adicionados a 5,00 mL de água fervente. Esfriou-se, agitou-se vigorosamente e foram deixadas em repouso por 20 minutos.
- E. Triterpenos e/ou esteróides: 2,00 mL da dos extratos foram adicionados a 5,00mL de clorofórmio, filtrou-se, dividiu-se o filtrado em duas porções. Em cada um dos tubos realizaram-se as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski.
- F. Polissacarídeos: Em três tubos de ensaio foram colocados 5 mL dos extratos e adicionados 2 gotas de lugol em cada.

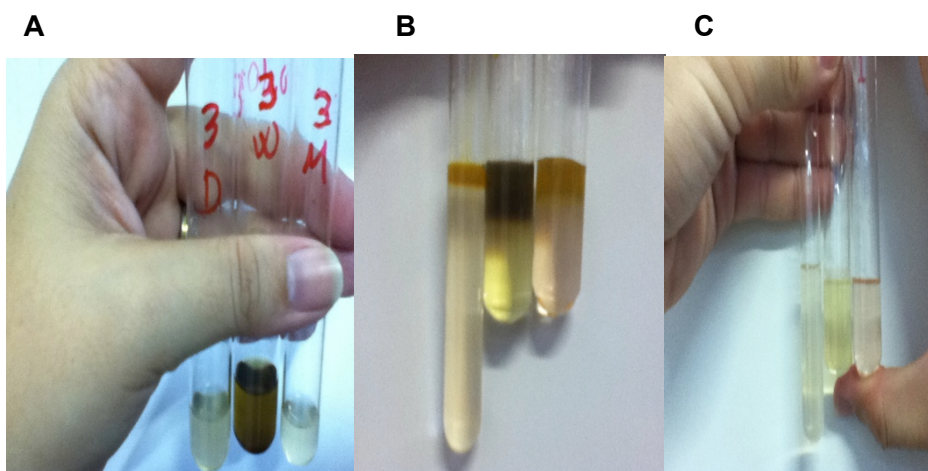


Figura 4: Realização da prospecção fitoquímica. A: Pesquisa de alcaloides; B: Pesquisa de taninos C: Pesquisa de saponinas.

2.2.6 Análise qualitativa da atividade antioxidante

Os extratos foram analisados por CCD, a placa foi eluída em acetato de etila e etanol (50%;50%). Após secagem, foi adicionada a placa uma solução de 0,4 mmol/L do radical DPPH em MeOH. A placa foi observada até o aparecimento de manchas amarelas sobre o fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

2.2.7 Análise quantitativa da atividade antioxidante

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações (SOUSA *et al.*, 2007).

Para a leitura das medidas de absorvância nas amostras foram preparadas soluções dos extratos e do controle positivo em metanol (5mg/ml), diluídas nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 550 µg/mL. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foram feitas a 515 nm, após 40 min de incubação em temperatura ambiente protegida da luz.

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação:

$$\%AA = \frac{[Abs_{\text{controle}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}})] \times 100}{Abs_{\text{controle}}}$$

onde Abs_{controle} é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e Abs_{amostra} é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra).

A eficiência antioxidante foi estabelecida utilizando-se análise de regressão não linear no intervalo de confiança de $p < 0,05$, obtido pelo programa de estatística GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos através do valor do IC50, que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH.

2.2.8 Animais

Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos provenientes do Biotério de Universidade Tiradentes, pesando entre 250 e 300 g. Os animais receberam ração padrão Labina ® e água *ad libitum*, sendo mantidos em gaiolas em grupos de seis animais identificados, separados por grupo experimental (Quadro 1) e mantidos em temperatura controlada de (22°C), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas. A utilização dos animais foi realizada de acordo com as normas didático-científicas, do Manual de Principios no Cuidado e Uso de Animais do American College of Sports Medicine e com a Lei de nº. 6638 de 8 de maio de 1979 e o decreto nº24645 de 10 de julho de 1934. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal através do parecer consubstanciado número 141110 (Anexo 1).

2.2.9 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica com base na metodologia apresentada por Gomes *et al.*, (2008) e Tajiri *et al.*, (2010). Primeiramente, os roedores foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (0,1 mg/g) e xilazina (0,1

mg/g). Uma vez posicionados no estereotaxico (Figura 5.), o procedimento continuou com a desinfecção da pele na região cirúrgica, repetindo três aplicações de iodopovidona, com swabs estéreis. Uma incisão sagital (1,5 cm) foi feita com um bisturi estéril. O periósteo sobre a área de interesse foi cuidadosamente raspado com uma lâmina e o osso limpo com NaCl e algodões. Em seguida, solução salina (NaCl 0,9%) embebida em algodão foi aplicada em ambos os olhos para prevenir o ressecamento das córneas.

Para incisão foram definidos os marcos no crânio partindo do bregma, que é o ponto de intersecção das suturas sagital e coronal. A ponta da agulha com a toxina 6-OHDA foi alinhada verticalmente sendo o ponto zero no bregma e então foi posicionada nas coordenadas desejadas. Os parâmetros utilizados (lado direito) para microinjeção no estriado foram; antero-posterior: 1,0 mm; Lateral: 3,0 mm e Dorso ventral: 5,0 mm, em relação ao Bregma (Paxinos e Watson, 1998). No local marcado no crânio foi aberto um orifício (1,5 mm de diâmetro) com uma broca ortodôntica esterilizada e os fragmentos dos ossos foram cuidadosamente removidos. Foram injetados 20 µg em 2 microlitros (Sigma, USA: GOMES *et al.*, 2008) de uma solução de 6-OHDA ou de salina contendo 0,2 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma, USA), utilizando uma micro seringa Hamilton (50 µl) acoplada ao aparelho estereotáxico.



Figura 5. Animal posicionado em aparelho de estereotaxia.

O crânio foi limpo e a incisão fechada com uma sutura de nylon (Shalon). Os animais foram retirados do estereotáxico e receberam 0,5 ml de solução salina subcutânea, para evitar a desidratação. Ao final da cirurgia, foi aplicada uma injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA) e os animais foram aquecidos por uma lâmpada de 60 W até recuperação da anestesia.

2.2.10 Desenho experimental

Os animais passaram pelo procedimento de cirurgia e no mesmo dia do procedimento cirúrgico, cada grupo recebeu por via oral 1 ml, durante 28 dias, de solução salina (veículo), extrato aquoso da *Portulaca oleracea* (EAPO) ou extrato etanólico da *Portulaca oleracea* (EEPO), seguindo as divisões de grupos experimentais com base no planejamento descrito no quadro 1. No dia seguinte à cirurgia e após o período de 15 dias, todos os grupos foram submetidos ao teste de campo aberto. Ao final do procedimento os animais foram sacrificados (Figura 6).

Quadro 1: Grupos de animais lesionados e tratados com extratos da PO ou veículo.

Grupo (n=6)	Estado (tratamento intracerebral)	Tratamento Oral (Gavagem)
G1	Salina	Veículo
G2	Salina	EAPO Dose 200mg/kg
G3	Salina	EAPO Dose 400mg/kg
G4	Salina	EEPO Dose 200mg/kg
G5	Salina	EEPO Dose 400mg/kg
G6	6-OHDA	Veículo
G7	6-OHDA	EAPO Dose 200mg/kg
G8	6-OHDA	EAPO Dose 400mg/kg
G9	6-OHDA	EEPO Dose 200mg/kg
G10	6-OHDA	EEPO Dose 400mg/kg

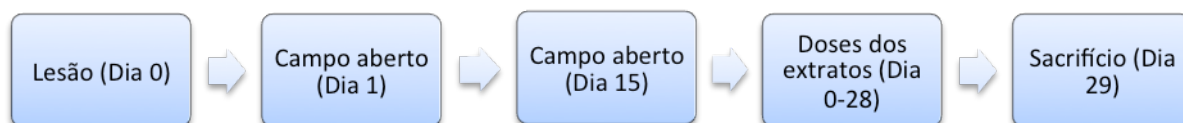


Figura 6: Período de tempo decorrido e fases de experimentação dos grupos de animais estudados.

2.2.11 Teste de campo aberto

Um aparelho de teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade motora e o estado emocional dos animais dentro de um fixo período de tempo. O aparelho consistia de uma câmara retangular, posicionada em ambiente iluminado, na qual os ratos foram colocados no centro em cada análise. O comportamento de cada animal foi observado por um período de 5 minutos. Durante os intervalos dos ensaios, os ratos foram devolvidos a sua gaiola e o campo aberto foi limpo com solução de etanol a 70% para evitar a influencia do odor.

Os parâmetros comportamentais avaliados foram: (1) exploração horizontal: o número quadrantes cruzados na arena durante o período de observação; (2) exploração vertical: o número de vezes em que o rato está sobre as patas traseiras; (3) número de bolos fecais e (4) Grooming: comportamentos de auto limpeza executados (HONGXING *et al.*, 2007).

2.2.12 Sacrifício e obtenção dos encéfalos

Os animais foram decapitados e os encéfalos retirados, desidratados em série de alcoólica crescente, diafanizados em série de xilóis, e incluídos em parafina sob a forma de blocos. Os blocos rígidos levados ao micrótomo(American Optical®), fornecendo cortes, com 5 µm de espessura, após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar sobre uma superfície aquecida, de onde foram colocados sobre lâminas de vidro, e levados para estufa, onde aderem e posteriormente serão corados. Os cortes histológicos foram submetidos à imunocitoquímica para montagem final da lâmina que consiste em depositar uma gota de balsamo sobre o corte que está aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamínula para avaliação das características morfológicas das peças (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.2.13 Reação imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH)

Os cortes histológicos foram marcados com a imunohistoquímica, sendo enxaguados (3x5') com tampão fosfato (pH 7,4), realizando o bloqueio da peroxidase endógena H₂O₂ 1% por 30 minutos, enxague das seções com tampão fosfato(3x5'), bloqueio em tampão contendo Soro Albumina-Bovina (2%) e Soro de Coelho (5%) por 60 minutos, incubação com anticorpo primário (anti-TH, produzido em coelho, 1:1000, 24 horas a 4°C; Peel freeze®). Para aumentar a visualização da ligação foi empregado o método de marcação

indireta, com enxague das seções, incubação com anticorpo secundário marcado com Biotina (anti-coelho, 1:500) por 2 horas à temperatura ambiente, enxágüe das seções (3x5'), incubação com o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (solução A e B, Kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories®) por 120 min, enxague das seções (3x5') com tampão tris (TBS 0,25M, pH 7,4), incubação com usando o tetracloroeto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) na proporção de 10 mg de DAB para 19 ml de TBS 0,1M para 3ul de H₂O₂ por 10 minutos. Observando-se uma reação de oxidação, formando um composto insolúvel, corado marrom e elétron denso que se deposita, marcando assim a localização do anticorpo primário. Finalmente enxaguou-se as seções (3x5') com TBS 0,25M e os cortes foram montados em lâminas para visualização de neurônios dopaminérgicos ao microscópio.

2.2.14 Análise estatística

Foi realizada análise de variância de uma via com medidas repetitivas (one-way ANOVA, repeated measures), pós-teste de Tukey para o fator tratamento. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Os graus de liberdade foram designados por F. Foi utilizado o programa SSPS versão 17.0 para análise dos dados.

2.3 RESULTADOS

Na análise qualitativa da L-DOPA, dopamina e noradrenalina em CCD, observou-se, sobre a luz UV, a formação de três bandas fluorescentes na mesma posição (Figura 7). A primeira formou-se com a amostra do extrato aquoso, a segunda com extrato etanólico e a terceira banda com controle positivo L-DOPA.

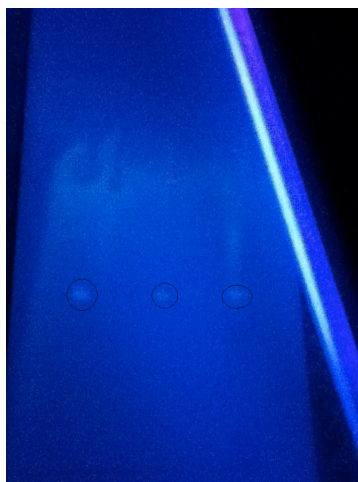


Figura 7: CCD em luz UV na análise qualitativa da L-dopa, dopamina e noradrenalina

Os extratos apresentaram resultados positivos na pesquisa de alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, terpenóides e polissacarídeos (tabela 1).

Tabela 1: Resultado da prospecção fitoquímica.

TESTE	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico
Alcalóides	+	+
Flavonoides	+	+
Saponinas	+	+
Taninos	+	+
Terpenóides	+	+
Polissacarídeos	+	+

A avaliação preliminar qualitativa dos extratos por CCD, revelada com solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH, sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante no EAPO e no EEPO, evidenciadas na cromatoplaca pela presença de manchas amarelas (Figura 8) sobre o fundo púrpureo, resultantes da redução do radical DPPH.

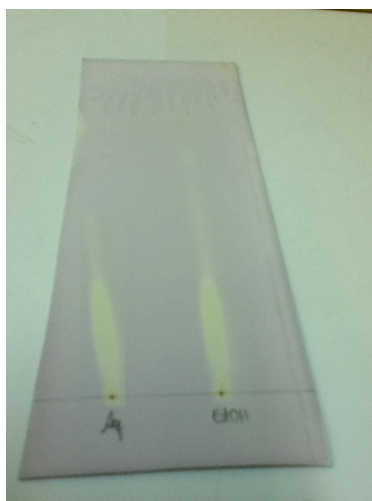


Figura 8: CCD qualitativa para atividade antioxidante.

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) do EEPO e EAPO nas concentrações 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL, determinados pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na figura 9, mostrando que todas as espécies tem atividade

sequestradora do radical DPPH, o EEPO apresenta atividade antioxidante superior a 70% na concentração de 500 µg/mL enquanto o EAPO atinge a marca de 51%. A quantidade de extrato das amostras da PO necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% no EEPO foi de $162,62 \pm 16,37$ µg/ml e do EAPO de $463,92 \pm 40,88$ µg/ml.

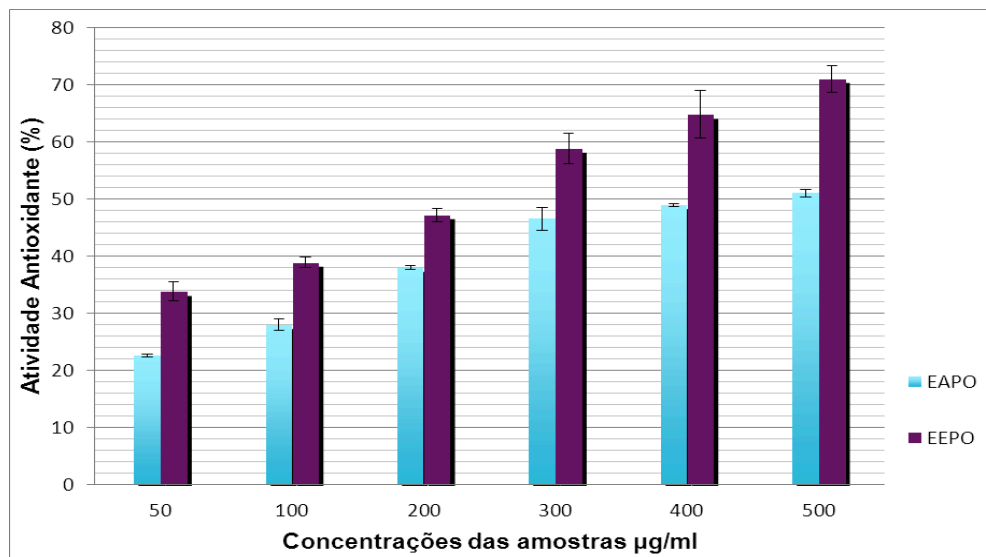


Figura 9: Atividade antioxidante em porcentagem e desvio médio padrão do EEPO e EAPO em diferentes concentrações.

O teste de campo aberto foi realizado em duas etapas, a primeira com 24 horas e a segunda 15 dias após a administração da toxina 6-OHDA ou salina, com o intuito de verificar os efeitos dos tratamentos sobre a degeneração dopaminérgica ao longo do tempo, do ponto de vista comportamental.

A análise estatística de variâncias múltiplas com medidas repetitivas (ANOVA) mostrou interações significativas entre os tratamentos e os tempos de análise, nos parâmetros motores de ambulação (explorações horizontais - EH) e elevações (explorações verticais - EV), bem como nos parâmetros emocionais de auto-limpeza (*grooming*) e bolos fecais.

Com relação aos tratamentos, a análise dos resultados dos testes de campo aberto realizados vinte e quatro horas após a administração da 6-OHDA apresentou diminuição significativa na locomoção em todos os animais submetidos à administração intracerebral da toxina em relação aos roedores tratados com solução salina, independente do tratamento recebido por via oral (EH: $F_{(9-59)} = 45,28$, $P < 0,0001$; EV: $F_{(9-59)} = 14,15$, $P < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey). Adicionalmente, a média de expressão de

comportamentos de auto-limpeza foi diferente entre os grupos 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/EAPO na dose 200mg ($F_{(9-59)} = 2,81$, $P = 0,009$). Os resultados dos testes realizados 24 horas após a cirurgia podem ser observados na tabela 2.

Já no teste realizado aos 15 dias (Tabela 3), foi observada diminuição significativa na ambulação nos animais tratados com 6-OHDA e que receberam veículo, EAPO e EEPO na dose de 200 mg/kg e 400 mg/kg em relação aos grupos que receberam salina intracerebral. No entanto, os animais dos grupos 6-OHDA tratados com ambos os extratos na dose de 400 mg/kg mostraram valores significativamente maiores em relação aos obtidos para os grupos 6-OHDA tratados com veículo e extratos nas doses de 200 mg/kg. Em adição, o grupo 6-OHDA tratado com EAPO a 400mg/kg apresentou valores estatísticos iguais aos controles e aumentados em relação a todos os grupos 6-OHDA (EH: $F_{(9-59)} = 44,52$, $P < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

O número médio de elevações também foi reduzido nos grupos 6-OHDA que receberam veículo, EAPO (200 mg/kg), EEPO (200 mg/kg) e EEPO (400 mg/kg) em relação aos grupos que receberam salina intracerebral, enquanto que o tratamento com EAPO a 400 mg/kg eleva significativamente estes valores (EV: $F_{(9-59)} = 17,00$, $P < 0,0001$). Ainda com relação a este grupo, foi observado um aumento no número médio de bolos fecais expelidos pelos animais quando comparado ao grupo 6-OHDA tratado com veículo ($F_{(9-59)} = 2,31$ $P = 0,03$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

Em nenhum dos tempos analisados foram evidenciadas diferenças entre os roedores dos grupos controle (salina intracerebral) em função dos tratamentos.

Quando comparados em relação aos tempos de 24 horas e 15 dias, apenas animais que receberam aplicação de 6-OHDA acompanhada de tratamentos com os extratos da PO na dose de 400 mg/kg mostraram aumento no número de explorações horizontais (EAPO: $P = 0,001$; EEPO: $P = 0,02$) e verticais (EAPO: $P = 0,002$; EEPO: $P = 0,05$, teste T pareado). Por outro lado, os grupos 6-OHDA e salina tratados com veículo apresentaram diminuição nos comportamentos de auto-limpeza ao longo do tempo ($P = 0,04$ e $P = 0,02$, respectivamente).

Tabela 2: Resultados do teste de campo aberto 24 horas após cirurgia.

grupo (n = 6)	EH	EV	AL	BF
salina/veículo	41,83 a	12,67 a	1,83	2,67
(EPM)	1,68	1,54	0,31	0,42
salina/EAPO 200	37,33 a	11,17 a	1,83	2,17
(EPM)	2,30	1,56	0,54	0,60
salina/EAPO 400	36,83 a	10,50 a	2,50	2,33
(EPM)	1,56	0,76	0,56	0,33
salina/EEPO 200	38,67 a	11,83 a	3,17	2,50
(EPM)	1,05	1,45	0,31	0,43
salina/EEPO 400	38,33 a	10,83 a	2,50	2,83
(EPM)	1,45	1,62	0,67	0,60
6-OHDA/veículo	8,83 b	3,00 b	1,00 a	3,00
(EPM)	3,45	1,41	0,45	0,52
6-OHDA/EAPO 200	10,83 b	2,17 b	0,83 b	0,67
(EPM)	3,67	1,01	0,54	0,21
6-OHDA/EAPO 400	15,00 b	3,67 b	1,33	2,67
(EPM)	2,34	0,49	0,49	0,33
6-OHDA/EEPO 200	5,67 b	3,00 b	2,00	1,50
(EPM)	2,26	1,15	0,63	0,67
6-OHDA/EEPO 400	7,00 b	1,83 b	1,67	1,17
	2	0,65	0,49	0,31

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes. EH: explorações horizontais, EV: explorações verticais, AL: auto-limpeza, BF: bolos fecais expelidos, EPM: erro padrão da média, EAPO: extrato aquoso de *Portulaca oleracea*, EEPO: extrato etanólico de *Portulaca oleracea*, 200 e 400: mg/kg.

Tabela 3: Resultados do teste de campo aberto 15 dias após cirurgia.

grupo (n = 6)	EH	EV	AL	BF
salina/veículo	45,0d	15,0c	1,0	0,83
(EPM)	1,32	1,53	0,37	0,31
salina/EAPO 200	39,3d	11,3cd	1,8	2,2ab
(EPM)	1,78	1,71	0,60	0,17
salina/EAPO 400	41,3d	12,3cd	1,8	2,2ab
(EPM)	1,63	0,67	0,40	0,17
salina/EEPO 200	42,2d	11,0cd	1,2	2,5ab
(EPM)	1,94	0,86	0,48	0,22
salina/EEPO 400	42,5d	10,5cd	1,2	1,8ab
(EPM)	1,41	0,67	0,17	0,40
6-OHDA/veículo	7,3a	2,5a	3,2	1,5a
(EPM)	2,65	0,56	0,75	0,62
6-OHDA/EAPO 200	18,5bc	4,2a	2,7	2,0ab
(EPM)	2,28	0,87	0,71	0,45
6-OHDA/EAPO 400	39,2d	10,2b	0,7	2,3b
(EPM)	2,85	0,60	0,33	0,21
6-OHDA/EEPO 200	12,5ab	4,7a	1,3	1,2ab
(EPM)	1,38	0,88	0,49	0,31
6-OHDA/EEPO 400	23,3c	5,3a	2,3	1,5ab
	3,12	1,09	0,67	0,50

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes. EH: explorações horizontais, EV: explorações verticais, AL: auto-limpeza, BF: bolos fecais expelidos, EPM: erro padrão da média, EAPO: extrato aquoso de *Portulaca oleracea*, EEPO: extrato etanólico de *Portulaca oleracea*, 200 e 400: mg/kg.

A análise qualitativa da reação imunohistoquímica para TH, marcador de neurônios dopaminérgicos, revelou a presença de células positivas na SNc e área tegmentar ventral (VTA) intactas (B) e de fibras positivas no estriado (A) no lado contralateral à lesão. Conforme observado na figura 10, encéfalos de animais que receberam 6-OHDA/veículo mostram redução no número de neurônios positivos na SNc (D) e de fibras imunomarcadas no estriado (C) ipsilateral. Quando é associado o tratamento com EAPO 400mg/kg, observa-

se aumento na quantidade de células marcadas na SNc (F) e de fibra estriatais (E), com aspecto similar aos controles do lado oposto.

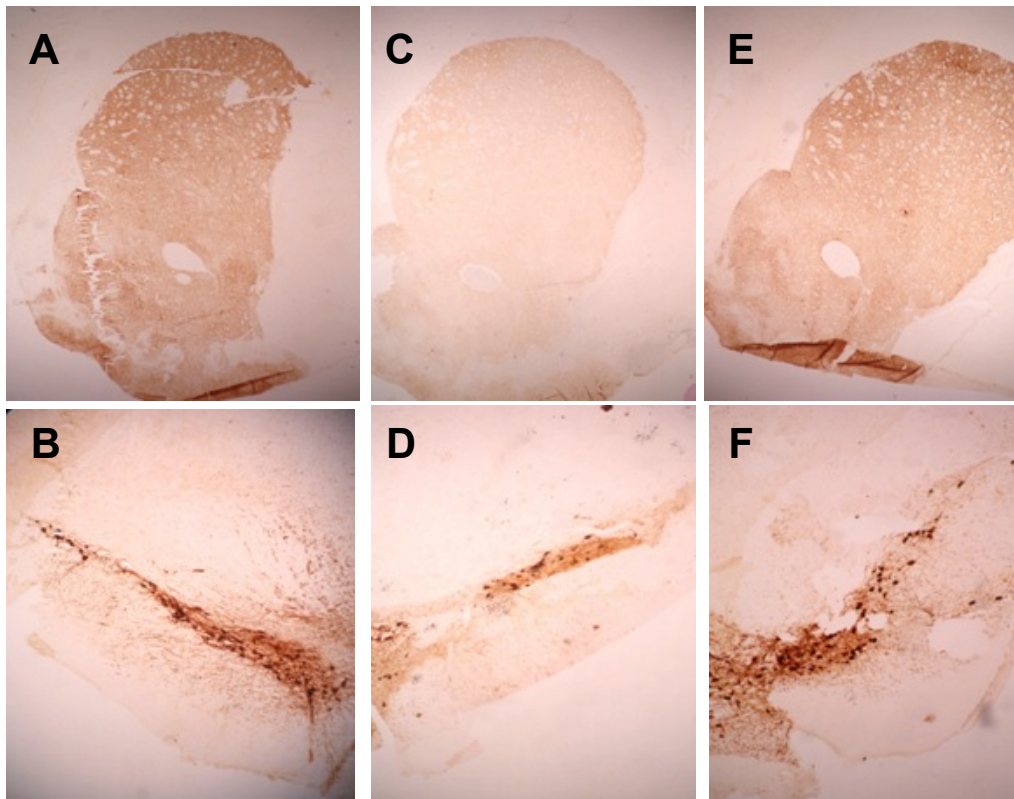


Figura 10: Fotomicrografias do tecido encefálico após imunohistoquímica para TH. Em A, C e E: estriado; em B, D e F: substância negra compacta. A e B representam regiões contralaterais à lesão; C e D representam cortes do grupo que recebeu 6-OHDA e E e F representes do grupo 6-OHDA tratado com extrato aquoso de PO. Aumento de 100X.

2.4 DISCUSSÃO

A DP é uma doença degenerativa, crônica e progressiva, caracterizada pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em déficit de dopamina no corpo estriado (OBESO *et al.*, 2010). O estresse oxidativo tem recebido mais atenção na DP devido ao potencial do metabolismo oxidativo da dopamina em produzir H₂O₂ e outras EROs, que são tóxicas para as membranas celulares e podem induzir apoptose (MILLER, 2009).

A manipulação experimental dos sistemas neuronais permite o estudo das relações existentes entre o cérebro e o comportamento dos animais (DEUMENS *et al.*, 2002). A 6-OHDA é uma neurotoxina específica para neurônios catecolaminérgicos, que quando aplicada no estriado desenvolve um processo de degeneração lento envolvendo a formação de H₂O₂, radicais livres, diminuição da atividade da SOD e aumento da atividade da MAO e toxicidade do complexo mitocondrial (MEREDITH *et al.*, 2008).

O teste com DPPH é uma técnica amplamente utilizada para a investigação do potencial antioxidante de produtos naturais, particularmente para extratos de plantas medicinais. A redução do radical é acompanhada através da diminuição da absorvância em espectrofotometria, ocorrendo quando uma substância é capaz de doar átomos de hidrogênio para o meio, diminuindo a intensidade da coloração violeta (MOLYNEUX *et al.*, 2004). O importante papel dos antioxidantes na dieta para a manutenção da integridade dos organismos vivos tem obtido um reconhecimento cada vez maior (VICENTINO e MENEZES 2008). A atividade antioxidante foi comprovada em ambos os extratos, em CCD qualitativamente e quantitativamente em espectrofotometria, sendo que a capitação do radical DPPH na dose de 500 µg/ml foi maior no EEPO, diminuindo o valor da absorvância controle em mais de 70%, enquanto o EAPO na mesma concentração diminuiu em 51%. A quantidade de extrato das amostras da PO necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% no EEPO foi de 162,62 ± 16,37 µg/ml e para o EAPO atingir o mesmo é necessário uma dose três vezes maior (463,92 ± 40,88 µg/ml).

No presente trabalho, o teste de campo aberto foi realizado 24 horas e 15 dias após a administração da toxina 6-OHDA ou salina. Este teste permite a avaliação da atividade motora dos animais através de uma análise comparativa entre os grupos (DAUER e PRZEDBORSKI 2003). A administração da 6-OHDA mostrou diminuição significativa na locomoção em todos os animais submetidos ao procedimento, em comparação aos roedores que receberam solução salina, corroborando com achados de outros autores (MARTINEZ-CERDENO *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2011).

A deficiência motora é associada à ação oxidante da 6-OHDA que resulta na depleção dopaminérgica, mimetizando o ocorrido na DP (DECRESSAC *et al.*, 2012). Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o EAPO e o EEPO exercem ação sobre o sistema nervoso dos animais lesionados com 6-OHDA. As doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg, de ambos extratos, durante 15 dias consecutivo, aumentaram o comportamento de exploração horizontal e vertical em relação ao grupo tratado com veículo. Os animais dos grupos 6-OHDA tratados com ambos os extratos na dose de 400 mg/kg, mostraram valores significativamente maiores quando comparados aos grupos tratados com veículo e extratos nas doses de 200 mg/kg. A estatística também revela que o grupo 6-OHDA tratado com EAPO a 400mg/kg apresentou valores semelhantes aos observados nos grupos controle e aumentados em relação a todos os grupos 6-OHDA.

Estes dados são indicativos de que a PO pode possuir compostos bioativos capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e ter efeito protetor sobre a degeneração dopaminérgica causada pela toxina 6-OHDA. Segundo AL-Quraishy *et al.* (2012) a PO pode proteger contra a diminuição dos níveis de glutathione, antioxidante natural nos seres vivos, em ratos submetidos ao modelo de Parkinson com rotenona, sendo efetiva contra o estresse oxidativo, fato este atribuído a presença de componentes bioativos que seriam responsáveis pela captação de radicais livres. Para Moneim *et al.* (2012) o EAPO é capaz de aumentar a atividade da acetilcolinesterase e monoaminas devido ao seu conteúdo de melatonina, ácido graxo ômega-3, compostos fenólicos e flavonóides entre outros ingredientes ativos, sugerindo que a PO tem um importante papel na atividade de neurotransmissores. Chen *et al.* (2009) relata que o EEPO é capaz de aumentar a atividade de piruvato quinase, fosfofrutoquinase, lactato desidrogenase possivelmente promovendo a glicólise, gerando mais adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção da atividade celular, protegendo o tecido neural contra a hipóxia induzida.

Dkhil *et al.* (2011) afirmam que o EAPO aumenta significativamente os níveis de glutathione em vários órgãos e sua administração por via oral em ratos aumenta os níveis de SOD e diminui os níveis de MAO, produto final da peroxidação lipídica. Segundo Hongxing *et al.* (2007), a atividade da SOD diminui com o aumento da idade e essa alteração é considerada importante no desempenho de funções na aprendizagem e da memória. Sua pesquisa também demonstrou que o EAPO aumentou significativamente as atividades de enzimas antioxidantes, tais como SOD, e observou-se a diminuição nos níveis de produção de MAO no cérebro de ratos, indicando que o EAPO tenha efeito protetor contra o mecanismo oxidativo do cérebro.

Nas amostras de PO analisadas foram constatadas a presença de alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, terpenóides, polissacarídeos e catecolaminas (dopamina, noradrenalina e L-dopa). Os mesmos compostos foram encontrados na PO por Xiang *et al.* (2005), Zhu *et al.* (2010), Lu *et al.* (2009), CHEN *et al.* (2009) e Dong *et al.*, (2010) respectivamente, comprovando a vasta variedade de compostos bioativos na planta.

O consumo de alimentos ricos em flavonoides está associado há vários efeitos benéficos para a saúde humana, por possuírem propriedades biológicas como ação antioxidante e capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (DOVICH *et al.*, 2011). Segundo Gao *et al.* (2012), seu consumo pode reduzir o risco de desenvolvimento da DP.

As betacianinas são pigmentos hidrossolúveis provenientes do metabolismo secundário, encontrados na PO e pertencente ao grupo dos compostos nitrogenados alcaloides, segundo Wang *et al.* (2010) apresentam atividade neuroprotetora em ratos, diminuindo os níveis de EROs e os danos da peroxidação lipídica, podendo estar envolvida com melhorias na deficiência de aprendizagem e memória. Este fato pode ser correlacionado aos resultados de melhor resposta motora apresentados pelos animais que receberam EAPO 400 mg/kg. Os taninos apresentam uma forte ação antioxidante (SILVA *et al.*, 1999). Polissacarídeos da PO exibem forte eliminação de radicais livres e atividades de efeito protetor contra danos oxidativos (CHEN *et al.*, 2009). Um estudo realizado por Zhu *et al.* (2007) sugere que terpenóides também exercem um papel neuroprotetor a hipoxia induzida.

A análise de catecolaminas é de interesse contínuo devido ao importante papel que desempenham sobre os neurotransmissores no sistema nervoso central. A dopamina, precursor metabólico da noradrenalina, é um neurotransmissor que controla uma variedade de funções, incluindo a atividade locomotora, cognição, emoção, o reforço positivo, o consumo alimentar e regulação endócrina. Esta catecolamina também desempenha múltiplos papéis como modulador da função cardiovascular secreção hormonal, tônus vascular, função renal e motilidade gastrointestinal. Os sistemas dopaminérgicos têm sido o foco de muitas pesquisas, principalmente porque várias condições patológicas, tais como a DP e esquizofrenia, estão ligadas a uma desregulação de transmissão dopaminérgica, enfatizando a necessidade de buscas de medicamentos dopaminérgicos seletivos desprovidos de efeitos adversos (MISSALE *et al.*, 1998). A L-dopa é a substância precursora da dopamina, é a droga mais utilizada no tratamento da DP (SAHIN e KIRIK, 2012) e está presente na composição da PO (DIGHE *et al.*, 2008). Estudos comprovam que a PO é rica em dopamina e noradrenalina (CHEN *et al.*, 2003), sendo sugerido através de

CCD, a presença destas catecolaminas no EEPO e EAPO utilizados para a pesquisa neste trabalho.

Em análise qualitativa a imunohistoquímica revelou que 28 dias após a injeção de 6-OHDA houve uma perda expressiva da imunorreatividade para TH nas fibras dopaminérgicas quando comparadas com o grupo controle e aumento no grupo que recebeu EAPO na dose de 400 mg/kg, sugerindo efetividade no procedimento de indução ao modelo animal de Parkinson e possível ação neuroprotetora do EAPO na dose de 400 mg/kg.

2.5 CONCLUSÃO

Ambos os extratos influenciaram nos resultados da atividade motora dos animais lesionados com 6-OHDA, apresentando resultados semelhantes aos encontrados no grupo controle. A atividade antioxidante foi comprovada em análise qualitativa e quantitativa comprovando a capacidade dos extratos em sequestrar o radical DPPH. O teste em CCD também sugeriu presença de noradrenalina, dopamina e L-dopa nas amostras. A prospecção fitoquímica revelou a presença de alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, terpenóides e polissacarídeos. Todas essas características, os valores estatísticos encontrados e a correlação com os trabalhos preexistentes, demonstram que os extratos da PO exercem ação sobre o sistema motor dos animais sugerindo possível neuroproteção frente à ação oxidante da 6-OHDA. Portanto a PO pode ser um alternativa no tratamento de doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

- AL-QURAI SHY S. A, DKHIL M. A,B, AHMED E. MONEIM B,C. Protective effects of *Portulaca oleracea* against rotenone mediated depletion of glutathione in the striatum of rats as an animal model of Parkinson's disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 103, 108–114, 2012.
- BOSI, G, GUARRERA, PM, RINALDI, R & BANDINI-MAZZANTI, M. Ethnobotany of purslane (*Portulaca oleracea* L.) in Italy and morphobiometric analyses of seeds from archaeological sites in the Emilia Romagna Region (Northern Italy). J-P Morel & AM Mercuri , pp. 129–139, 2009.
- CALIXTO, J.B.. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v. 33, 2000.
- CHEN, CHENG-JIE, WAN-YIN WANG, XIAO-LI WANG, LI-WEI DONG, YI-TIAN YUE, HAI-LIANG XIN, CHANG-QUAN LING AND MIN LI. Anti-hypoxic activity of the ethanol extract from *Portulaca oleracea* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 2, 246—250, 2009.
- CHEN J, SHI YP, LIU JY. Determination of noradrenaline and dopamine in Chinese herbal extracts from *Portulaca oleracea* L. by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1003:127–132, 2003.
- DAUER W, PRZEDBORSKI S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909, 2003.
- DECRESSAC, M., MATTSSON B., BJÖRKLUND A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. Vol 235, Pag 306–315, 2012.
- DIGHE, V; DHOTRE, O; PAREKH, G; GURSALE, A. Quantification of Dopamine in *Portulaca oleracea* Linn. by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Planar Chromatography*. 0933-4173. 2008.
- DING Y., WON L., BRITT J. P., LIM S. A., MCGEHEE D. S., KANG U. J. Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 840–845, 2011.
- DKHIL A MOHAMED., AHMED E. ABDEL MONIEM, SALEH AL-QURAI SHY AND REDA AWADALLAH SALEH. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(9), pp. 1589-1563, 4 May, 2011.
- DORSEY, ER, CONSTANTINESCU, R, THOMPSON, BA, BIGLAN, KM, HOLLOWAY, RG, KIEBURTZ, K, ET AL. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. Jan 30;68(5):384-6, 2007.
- DOVICH I, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoides e Sistema Nervoso Central. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP*, v. 36, n. 2, p. 123-135, 2011.
- DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95. 2002.

GAO X; CASSIDY A; SCHWARZSCHILD M.A; RIMM E.B; ASCHERIO A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* .78:1138-1145; 2012.

GAO, D.; LI, Q.; FAN, Y. Hypoglycemic effects and mechanisms of *Portulaca oleracea* L. in alloxan-induced diabetic rats. *J. Med. Plants Res.*, 4, 1996–2003. 2010.

GOMES MZ., RAISMAN-VOZARI R., DEL BEL EA. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effecra on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostrial pathway. *Brain Res*, 1203:160-9, 2008.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. **3. ed. London: Chapman and Hall**,302 p.1998.

HOZAYEN W, MOUHAMED. BASTAWY, HAIDY.ELSHAFEEY. Effects of Aqueous Purslane (*Portulaca Oleracea*) Extract and Fish Oil on Gentamicin Nephrotoxicity in Albino Rats. *Nature and Science* ;9(2):47-62, 2011.

HAUSER R. A. New considerations in the medical management of early Parkinson's disease: impact of recent clinical trials on treatment strategy. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15(Suppl. 3), S17–S21, 2009.

HIRSCH E.C., HUNOT S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.*, 8, pp. 382–397, 2009.

HONGXING Z, NANCAI Y, GUOFU H, JIANBO S, YANXIA W, HANJU H, Neuroprotective effects of purslane herb aquenous extracts against D-galactose induced neurotoxicity, *Chemical and Biological Interactions*, 170(3), , 145-152. 2007.

HOZAYEN W, MOUHAMED. BASTAWY, HAIDY.ELSHAFEEY. Effects of Aqueous Purslane (*Portulaca Oleracea*) Extract and Fish Oil on Gentamicin Nephrotoxicity in Albino Rats. *Nature and Science* ;9(2):47-62, 2011.

LU JR, HE TR, PUTHETI R. Compounds of Purslane extracts and effects of antikinetic fatigue. *J. Med. Plants Res.* 3: 506-510, 2009.

LUQUIN MR. Tratamiento inicial de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*; 50 (Supl 1): S35-6, 2010.

MARTINEZ-CERDENO V, ET AL. Embryonic MGE precursor cells grafted into adult rat striatum integrate and ameliorate motor symptoms in 6-OHDA-lesioned rats. *Cell Stem Cell*. 2010.

MILLER RL, JAMES-KRACKE M., SUN GY., SUN AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkison's diease. *Neurochem Res*, 34:55-65. 2009.

MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7, 405–410. 2002.

MISSALE C, NASH SR, ROBINSON SW, JABER M, CARON MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189–225. 1998.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, v. 26, n. 2, p. 211-219. 2004.

MONEIM *et al.* Neuronal activities of *Portulaca oleracea* in adult rats. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(16), pp. 3162-3168,2012.

MONTES LV, BROSEGHINI LP, ANDREATTA FS, SANT'ANNA MES, NEVES VM & SILVA AG Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. *Natureza on line* 7 (2): 61- 67, 2009.

NOORDHOUT M A. Traitement de la maladie de Parkinson en 2009. *Rev Med Suisse*;5:160-5;2009.

RANI, N., ET. AL. Cell Suspension cultures of *Portulaca grandiflora* as potent catalysts for biotransformation of L-tyrosine into L-dopa, an anti-aging Parkinson's drug. *Pharm Biol*, 168(12) 1381-8.2007.

RODRIGUEZ-PALLARES, J., PARGA, J. A., MUÑOZ, A., REY, P., GUERRA, M. J. AND LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 103: 145–156, 2007.

ROESLER,R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA C. A. S.; PASTORE, G. M.; Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27(1) p.53-60, 2007.

SAHIN, G.; KIRIK, D. Efficacy of L-DOPA therapy in Parkinson's disease. **Amino acids in human nutrition and health**.pp. 454-463; 2012.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 12, n. 1, p. 21-32, 1999.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; AYRES, C.L.S.C.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, P.B.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H.Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais,*Química nova*, v.30, p.351-355, 2007.

TAJIRI N., YASUHARA T., SHINGO T., KONDO A, YUAN W., KADOTA T., WANG F., BABA T., TAYRA JT., MORIMOTO T., JING M., KIRUCHI Y., KURAMOTO S., AGARI T., MIYOSHI Y., FUJINO H., OBATA F., T AKEDA I., FURUTA T., DATE I. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease mo del os rats. *Brain Research*, 1310:200-207, 2010.

VICENTINO ARR, MENEZES FS. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Rev Bras Farmacogn* 17: 384-387, 2008.

WANG C Q, YANG G Q. Betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine* . 17: 527-532, 2010.

WANYINA W, LIWEIB D, LINA J, HAILIANGC X, CHANGQUANC L, MINA L .Ethanol extract of *Portulaca oleracea* L. protects against hypoxia-induced neuro damage through modulating endogenous erythropoietin expression . *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011.

XIANG L, XING D, WANG W, WANG R, DING Y, DU L. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry* ;66:2595-2601, 2005.

ZHAO, J. Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application. *Rec. Pat. Biotech.* 1, 75–97. 2007.

ZHU, L., WU, X.M., YANG, L., DU, F., QIAN, Z.M. Up-regulation of HIF-1alpha expression induced by ginkgolides in hypoxic neurons. *Brain Research* 1166, 1–8. 2007.

ZHU HONGBIN ; WANG YUZHI ; LIU YUXUAN; XIA YALIN; TANG TIAN; Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food analytical methods*. 1936-976X vol. 3, no2, pp. 90-97. 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 33, n. 6, 2010 .

ANEXOS