**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atividade antioxidante, anticolinesterásica e perfil metabolômico de
diferentes tipos de pimentas: implicações na doença de Alzheimer**

Fúvia de Oliveira Biazotto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2014**

Fúvia de Oliveira Biazotto
Bióloga

Atividade antioxidante, anticolinesterásica e perfil metabólico de diferentes tipos de pimentas: implicações na doença de Alzheimer

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. **JOCELEM MASTRODI SALGADO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Biazotto, Fúvia de Oliveira

Atividade antioxidante, anticolinesterásica e perfil metabólico de diferentes tipos de pimentas: implicações na doença de Alzheimer / Fúvia de Oliveira Biazotto . - - Piracicaba, 2014.

82 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Schinus terebinthifolius* 2. *Piper nigrum* 3. Piperina 4. Doenças neurodegenerativas
5. Envelhecimento 6. Alimentos funcionais I. Título

CDD 613.2
B579a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

DEDICATÓRIA

A aqueles que também se nutrem de ciência.

AGRADECIMENTO

Nas páginas que se seguem serão descritos os louros desta conquista, e aqui, os grandes protagonistas desta vitória:

Aos meus pais (Regina e João) e irmã (Flávia) por sempre apoiarem as minhas loucuras e acreditarem que sou capaz de alcançá-las. Obrigada pelo suporte, exemplo e educação, que me deram e me dão! Vocês são, e sempre serão o motivo pelo qual desejo ser o meu melhor.

À minha orientadora, Dra. Jocelim Mastrodi Salgado, por compartilhar seu conhecimento, pelos inúmeros conselhos e oportunidades oferecidas. A senhora me apresentou e guiou através desta área da ciência, pela qual tenho fascinação. Obrigada pela confiança e espero fazer jus aos ensinamentos.

Agradeço ao meu namorado, Felipe Marques, por todo amor, paciência e carinho. Obrigada por sempre estar ao meu lado, seja segurando a minha mão nos obstáculos ou incentivando a conquista de novos sonhos. Fê, você é fera! E me faz feliz DEMÁS da conta!

Às amigas (os) e companheiras (os) do laboratório. Obrigada pelas aventuras, puxões de orelha e risadas inúmeras, meu dia-a-dia sem dúvida foi mais feliz...mas menos magro! Ao lado de pessoas e profissionais como vocês fica mais fácil crescer e atingir os objetivos. Todo o sucesso do mundo a nós!

À Maressa Caldeira Morzelle e Patrícia Bachiega, por serem minhas companheiras de análises. As horas e as etapas maçantes passam muito mais rápido ao lado de vocês! Desejo tudo o que há de melhor neste Mundão a vocês. E Má, a Helena, com certeza será uma criança muito orgulhosa pela mãe batalhadora que você é e será! Paty, força na peruca, que o doutorado tá aí menina!

À Kélin Schwarz por toda a ajuda e paciência na estatística. Valeu Kéia, desejo a você muito sucesso!

Ao GEAF, Grupo de Estudos em Alimentos Funcionais, por toda receptividade. Em especial Natália Mello, Zilmar Pimenta, Marina Lamounier, Antônio Santana, Jéssica Aranha, Jéssica Scatolin, Alana Rodrigues e Marina Paraluppi.

A todos os funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em especial à Vana, Hellô, Fábio, Ana e Débora.

A CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Aos integrantes da banca pelas inestimáveis contribuições a este trabalho

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate por abrir as portas do seu laboratório, permitindo a realização das análises de metabolômica desta dissertação.

Agradeço com muito carinho a Dr^a Thaís Regiane Cataldi, por toda simpatia e disponibilidade em tirar minhas dúvidas, bem como pelos ensinamentos sobre esta desafiadora área que é a metabolômica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho e que por ventura não mencionei, meu sincero agradecimento.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.
(Marcel Proust)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Envelhecimento mundial e suas implicações sociais	17
2.1.2 Doença de Alzheimer e suas características patológicas.....	19
2.1.3 Cascata amilóide.....	22
2.1.4 Hiperfosforilação da Tau.....	23
2.1.5 Hipótese colinérgica	23
2.1.6 Estratégias terapêuticas: busca por um tratamento efetivo para Doença de Alzheimer ..	24
2.1.7 Inibidores de acetilcolinesterase: presente e futuro	25
2.1.8 Estresse oxidativo e suas implicações na doença de Alzheimer	27
2.1.9 Pimenta do reino e pimenta rosa como candidatas na redução de risco da doença de Alzheimer.	30
2.1.10 Pimenta do reino e seus compostos bioativos <i>versus</i> doença de Alzheimer	31
2.1.11 Pimenta do rosa: uma falsa pimenta do reino.....	34
2.2 Material e Métodos	36
2.2.1 Obtenção da matéria-prima.	36
2.2.2 Elaboração dos extratos	36
2.2.3 Compostos fenólicos totais.....	37
2.2.4 Atividade antioxidante.....	37
2.2.5 Atividade antioxidante pelo método DPPH	37
2.2.6 Atividade antioxidante pelo método ABTS	38
2.2.7 Ensaio pelo método FRAP	38
2.2.8 Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos de pimenta em microplacas.....	38
2.2.9 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	39
2.2.9.1 Extração dos metabólitos.....	39
2.2.9.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	40
2.2.10 Análise estatística	41
2.2.10.1 Análises bioquímicas.....	41
2.2.10.2 Determinação da correlação de Pearson.....	41

2.2.10.3 Metabolômica.....	41
2.3 Resultados e Discussão	42
2.3.1 Caracterização dos extratos de pimenta do reino e pimenta rosa	42
2.3.2 Compostos fenólicos totais	43
2.3.3 Atividade antioxidante	44
2.3.4 Atividade inibitória de AChE	47
2.3.5 Correlação de Pearson.....	51
2.3.6 Análise por LC-MS	53
2.3.6.1 Perfis metabolômicos	53
2.3.6.2 Análise de componentes principais (PCA)	60
2.3.6.3 Importância da variável em projeção	62
3 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

Atividade antioxidante, anticolinesterásica e perfil metabolômico de diferentes tipos de pimentas: Implicações na doença de Alzheimer

A principal forma de tratamento da doença de Alzheimer é através de inibidores sintéticos de acetilcolinesterase. Os inibidores existentes no mercado além, de terem um custo elevado e apresentarem efeitos colaterais não previnem ou curam a doença de Alzheimer, apenas retardam o seu desenvolvimento. A baixa efetividade dos tratamentos existentes e a ausência de prognóstico positivo impulsionaram no mercado uma demanda por novas formas de tratamento e/ou prevenção da doença. Neste cenário, investigar a atividade anticolinesterásica em pimentas do reino e pimenta rosa, bem como seu potencial antioxidante e composição fitoquímica são maneiras de promover tanto o conhecimento sobre estas especiarias como beneficiar o panorama de saúde pública, seja no combate a doença de Alzheimer e/ou outras pandemias existentes. Com o objetivo de avaliar o potencial destas especiarias, extratos metanólicos de pimenta preta, verde, branca e rosa foram avaliados segundo o teor de fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método DPPH, ABTS e FRAP e atividade anticolinesterásica. Posteriormente o perfil metabolômico dos grãos e extratos de pimenta foi analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. As amostras foram ionizadas por “eletrospray” operando em modo negativo e positivo. O extrato de pimenta rosa apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais e a melhor atividade antioxidante e anticolinesterásica em comparação aos demais extratos. Dentre as pimentas do reino, a pimenta verde destacou-se com os maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS. Já a pimenta preta mostrou os melhores resultados para as análises de atividade anticolinesterásica e atividade antioxidante pelo método FRAP. Quanto ao perfil metabolômico as amostras de pimenta foram significativamente distintas entre si. Os espectros obtidos para as amostras de grãos de pimenta foram mais ricos em metabólitos em relação às amostras de extrato em ambos os modos operacionais. O processamento das pimentas do reino induziu modificações quantitativas e qualitativas sobre a composição fitoquímica deste condimento. A pimenta rosa não apresentou nenhum possível metabólito com alto potencial discriminatório, dentre os 15 íons investigados. Em modo operacional negativo, os metabólitos presentes no extrato de pimenta verde, exceto íon de m/z 329,2081, foram responsáveis por todas as contribuições mais significativas entre os perfis metabolômicos gerados. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho é possível afirmar que a pimenta rosa apresenta o maior potencial na redução de risco da doença de Alzheimer, dentre as pimentas investigadas.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*; *Piper nigrum*; Piperina; Doenças neurodegenerativas; Envelhecimento; Alimentos funcionais

ABSTRACT

Antioxidant, anticholinesterase activity and metabolomic profile of different types of peppers: implications in Alzheimer's disease

Synthetic inhibitors of cholinesterase are the main drugs used in the treatment for Alzheimer's disease and besides the high cost and side effects, the current drugs available in the market do not prevent or cure Alzheimer, only retard its development. The absence of positive prognosis and limited effectiveness of existing drugs enhance the demand for new forms of the disease's treatment and/or prevention. In this scenario, investigating *Piper nigrum* and *Schinus terebinthifolius* peppercorns for its acetylcholinesterase and antioxidant activity, as well as its phytochemical composition, are ways to promote both knowledge about these spices and the perspective of health, either in combat of Alzheimer's disease and/or other existing pandemics. In order to evaluate the potential of these spices, black, green, white and pink peppers methanolic extracts were evaluated according to the total phenolic content, antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and anticholinesterase activity. Subsequently the metabolomic profile of the extracts and peppercorns were analyzed by mass spectrometry coupled to liquid chromatography. Samples were ionized by electrospray operating in negative and positive modes. The pink pepper (*Schinus terebinthifolius*) extract showed the highest content of total phenolic compounds and the best antioxidant and anticholinesterase activity compared to the other extracts. Among *Piper nigrum* peppercorns, green pepper stood out as the highest levels of phenolic compounds and antioxidant activity by DPPH and ABTS methods. Black pepper obtained the best results for the analysis of acetylcholinesterase activity and antioxidant activity by FRAP method. Regarding the metabolomic profiles, pepper samples are significantly different from each other. The spectrum obtained for peppercorn's samples were richer in metabolites compared to extract's samples in both operating modes. The processing induced quantitative and qualitative changes on the phytochemical composition of the peppercorns. The pink pepper did not show any possible metabolite with high discriminatory potential, of the 15 ions investigated. In the negative operating mode, the metabolites present in the extracts of green pepper, excluding m/z 329.2081 ion, were responsible for all of the most significant contributions between metabolomic profiles generated. From the results obtained in this study it is possible to affirm that pink pepper has the greatest potential to reduce Alzheimer's disease risk, among peppers investigated.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*; *Piper nigrum*; Piperine; Neurodegenerative disease; Aging; Functional foods

1 INTRODUÇÃO

A doença Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que progressivamente altera a memória e as habilidades cognitivas. A patologia inicia-se silenciosamente e se agrava com o passar dos anos, prejudicando até mesmo o desempenho de tarefas corriqueiras (RIEDEL, 2014; SCOTTI et al., 2014). A exata causa DA ainda não foi elucidada, no entanto, é considerada uma doença multifatorial que tem como principal fator de risco o avançar da idade (KONRATH et al., 2013; SINGH et al., 2013).

A principal forma de tratamento da DA é através de inibidores sintéticos de acetilcolinesterase. A ação da droga consiste em impedir que a acetilcolina, neurotransmissor envolvido na retenção de memória e aprendizagem, seja degradada pela acetilcolinesterase. Os inibidores de acetilcolinesterase existentes no mercado além de terem um custo relativamente elevado, e apresentarem efeitos colaterais não previnem ou curam a DA, apenas retardam o seu desenvolvimento.

A baixa efetividade dos tratamentos existentes e a ausência de prognóstico positivo impulsionaram no mercado uma demanda por novas formas de tratamento e/ou prevenção da doença. Os alimentos funcionais, inseridos nesta perspectiva, têm adquirido espaço, ao conterem em sua composição fitoquímicos valiosos á saúde e ao bem-estar.

Diversas pesquisas vêm demonstrando que dietas ricas em alimentos antioxidantes podem reduzir a incidência da DA ao impedir e/ou neutralizar os efeitos danosos dos radicais livres. Não obstante, alimentos podem ainda atuar como um aliado no combate a progressão da doença ao conter em sua composição fitoquímicos com atividade anticolinesterásica. Dessa forma, investigar a atividade anticolinesterásica em pimentas do reino e pimenta rosa, bem como seu potencial antioxidante e composição fitoquímica são maneiras de promover tanto o conhecimento sobre estas especiarias como beneficiar o panorama de saúde pública, seja no combate a DA e/ou outras pandemias existentes.

Com base nisso, esta dissertação teve por finalidade avaliar os extratos metanólicos de pimentas do reino (preta, branca e verde) e a pimenta rosa quanto ao teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e anticolinesterásica. Posteriormente, os grãos e extratos de pimenta foram avaliados quanto ao perfil metabolômico.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Envelhecimento mundial e suas implicações sociais

Em quase todos os países a proporção de pessoas acima de 60 anos está crescendo mais rapidamente do que qualquer outra faixa etária. A humanidade está presenciando uma situação sem precedentes. Logo, existirão mais idosos do que crianças com menos de 5 anos de idade. Em 2010 o número de pessoas com mais de 65 anos era de aproximadamente 524 milhões de pessoas- 8% da população mundial- estima-se que em 2050 este número triplique para 1.5 bilhões de pessoas, representando cerca de 16% da população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2011).

Apesar dos países mais desenvolvidos deterem o maior percentual de pessoas idosas, não são eles os grandes responsáveis pelo crescimento desta faixa etária no mundo. Entre 2010 e 2050 espera-se que o número de idosos cresça nos países menos desenvolvidos mais de 250%, contrastando com os 71% esperados nos países desenvolvidos. Em alguns países, esta parcela crescente de pessoas com idade avançada irá desafiar as infraestruturas nacionais, principalmente do sistema público de saúde (WHO, 2011).

O Brasil é um país que envelhece a passos largos, sendo as alterações na dinâmica populacional claras, inequívocas e irreversíveis (KÜCHEMANN, 2012). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2011) no Brasil há cerca de 20,6 milhões de idosos, isto é, 11% da população brasileira. Desses 55,5% são mulheres e 44,5% são homens. Acredita-se que em 2020, com cerca de 30,9 milhões de idosos, ou seja, 14% da população brasileira, o país venha a ocupar o sexto lugar na classificação mundial de países com maior número de idosos (BELTRÃO; CAMARANO; KANSO, 2004; INOUE; PEDRAZZANI; PAVARINI, 2008).

À medida que a população envelhece surgem, ao mesmo tempo, questões de fundamental importância: Qual o limite para a expectativa de vida? Será o envelhecimento acompanhado por longos períodos de boa saúde, bem-estar, engajamento social e produtividade, ou é predominantemente despendido em doenças, incapacidade e dependência? Como a velhice afeta os cuidados de saúde e os custos sociais? São estas expectativas inevitáveis, ou há possibilidade para estabelecer uma infra-estrutura física e social capaz de promover uma melhora de saúde e bem-estar? (WHO, 2011).

Algumas evidências crescentes apontam que através de políticas e programas apropriados pessoas em idade avançada podem manter-se saudáveis, independentes contribuindo para suas comunidades e famílias. No entanto, este potencial pode ser mitigado por uma das mais assustadoras consequências do aumento da expectativa de vida, os índices de demência.

Dentre os problemas de saúde relacionados à velhice, a demência tem sido apontada como uma das principais causas de morbidade em idosos. Clinicamente é caracterizada por um declínio progressivo e global de múltiplas funções cognitivas, incluindo memória, aprendizagem, orientação, linguagem, compreensão e julgamento, sem obscurecimento da consciência. As disfunções cognitivas são comumente acompanhadas, e ocasionalmente precedem o descontrole emocional, comportamental e motivacional (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2009). Devido a este quadro patológico, o paciente requer cuidados e auxílios constantes mesmo com as atividades básicas do dia-a-dia, o que implica em significativo fardo econômico e social.

O principal fator de risco para demência é o avançar da idade. A prevalência cresce exponencialmente após os 60 anos de idade e alcança 10% aos 80 anos (HOLMES, 2012). Afere-se que de 25 a 30% da população mundial com mais de 85 anos tenha demência (WHO, 2011). De acordo com os dados de 2010, estima-se que 36 milhões de pessoas sofrerão com esta síndrome. Se novos e mais eficientes tratamentos não forem encontrados prevê-se que este número dobre em 2030 (65.7 milhões) e mais do que triplique em 2050 (115 milhões). O número total de ocorrências de demência ao ano é de aproximadamente 7,7 milhões, o que implica em um novo caso da doença a cada 4 segundos (WHO, 2012). Dentre os tipos de demência a DA é a mais comum, representando cerca de 70 a 75% de todos os casos de demência acima da faixa etária de 65 anos (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2014; QIU; FRATIGLIONI, 2011).

Mundialmente mais de 26 milhões de pessoas sofrem com a DA com perspectivas de dobrar o número de pacientes a cada 40 anos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2012). Segundo o Instituto de Alzheimer Brasil (IAB) não há dados sobre a incidência da doença no país, porém com base em pesquisas realizadas em outros países e dados do IBGE, estima-se que 1,2 milhões de pessoas tenham DA, o que infere ao ano em 100 mil novos casos da doença. O instituto acredita que esses valores possam ser maiores, uma vez que a DA é sub-diagnosticada no Brasil (IAB, 2014).

Postula-se que, caso a DA fosse adiada por em média 2 anos, a prevalência mundial em 2050 teria 22 milhões a menos de casos do que as previsões atuais, reduzindo

significativamente os custos (BROOKMEYER et al., 2011) e o número de portadores da doença. Atualmente a incidência é de 7% em pessoas com mais de 64 anos e de 39% em pessoas com mais de 79 anos (GLASS et al., 2010).

Os números desta síndrome continuam a chocar. Segundo o relatório da Alzheimer's Disease International em 2010 os custos envolvendo a demência excederam 600 bilhões de dólares, incluindo o cuidado informal prestado pelos familiares e amigos (45%), o auxílio prestado pela sociedade e profissionais (40%) e os custos diretos com o tratamento médico (15%). As despesas da doença crescem anualmente mais rapidamente do que a prevalência da doença, projetando-se que até 2030 os gastos aumentem em 85%, o que corresponde a 1,117 bilhões de dólares ao ano. Há 10 anos os pesquisadores dos Estados Unidos estimaram que os custos com a demência no país eram de 18 bilhões de dólares (WHO, 2011, 2012; ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2013).

O desafio será ainda maior em países menos desenvolvidos, onde poucos recursos estão disponíveis. Esforços globais estão em andamento, e atualmente os desafios nesta área incluem a descoberta de métodos de diagnósticos em estágio iniciais da doença e a busca por novos tratamentos para curar ou prevenir a DA (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014) bem como a elucidação dos agentes causais.

2.1.2 Doença de Alzheimer e suas características patológicas

A DA é uma doença neurodegenerativa que progressivamente devasta a memória e as habilidades cognitivas. A patologia inicia-se silenciosamente e se agrava com o passar dos anos, prejudicando até mesmo o desempenho de tarefas corriqueiras (RIEDEL, 2014; SCOTTI et al., 2014). A exata causa da DA ainda não foi elucidada, no entanto, atualmente é considerada uma doença multifatorial (KONRATH et al., 2013; SINGH et al., 2013).

Está bem estabelecido no meio científico que a DA inicia-se com uma fase pré-clínica prolongada de mudanças patológicas assintomáticas, e, previamente ao desenvolvimento da demência em si, progride para um estágio prodromico com subjetivos relatos de perda de memória e comprometimento cognitivo leve (LCC) (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2014). Clinicamente o LCC é considerado um estágio transicional entre o envelhecimento normal e a demência (PETERSEN et al., 2001).

A DA pode ser classificada em início precoce e tardio segundo a idade em que se desenvolve. Casos precoces quantificam cerca de 1 e 6% de todos os casos e manifesta-se na faixa etária de 30 e 60 anos. Já os casos tardios contam com aproximadamente 90% das ocorrências e é incidente em indivíduos com mais de 60 anos (ANANDA; GILL; MAHDI,

2014). A alta incidência em idosos torna o envelhecimento um dos principais fatores de riscos envolvido na DA (SCOTTI et al., 2014), contudo não o único. Dentre as principais causas enumera-se o histórico familiar, traumatismo craniano, existência previa de depressão, diabetes mellitus, hiperlipidemia e doenças vasculares. Fatores genéticos, ambientais e comportamentais também estão envolvidos na etiologia da doença (ANANDA; GILL; MAHDI, 2014; KIVIPELTO et al., 2001). Além da idade, o histórico familiar é o fator mais claramente associado ao Alzheimer. O risco é três vezes maior em indivíduos com parentes de primeiro grau diagnosticado com a doença (HOLMES, 2012).

Indivíduos com Alzheimer apresentam perda de memória progressiva (principalmente de informações recentemente apreendidas), bem como outras deficiências cognitivas, incluindo alterações do comportamento, perda das habilidades visuais-espaciais, fala e capacidade motora. Também são sintomas da doença quadros de depressão, delírios e alucinações, comportamento agressivo, aumento da dependência, disfunções neuronais e demência. A DA ainda confere alguns efeitos secundários aos seus portadores dentre eles inflamação crônica, estresse oxidativo e gliose. A intensidade dos sintomas varia de indivíduo para indivíduo e está correlacionada ao grau de desenvolvimento da doença (AHMED et al., 2013; ALUISE et al., 2010; ANEKONDA; REDDY, 2005; REICHMAN, 2003; SEGHAL, 2009; VIEGAS et al., 2005). Tais deficiências induzem o indivíduo à incapacidade social e mental e impõe a comunidade e a família enorme carga emocional e financeira através de prestação de cuidados e perdas salariais (ANANDA; GILL; MAHDI, 2013; PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014).

A DA é diagnosticada através de avaliações neurológicas e imagens de ressonância magnética (IRM). A confirmação da doença, no entanto, é só obtida “post mortem”. Imagens do cérebro de pacientes com DA podem exibir atrofia cerebral e encolhimento do hipocampo, dependendo do estágio de progressão da doença (CHAKRABARTI et al., 2013). Neuropatologicamente a doença é caracterizada tanto pela perda de neurônios e sinapses quanto pela presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares no córtex cerebral e áreas subcorticais (MAHDY et al., 2012; PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014; RIEDEL, 2014). Posteriormente danos irreversíveis gerados ao tecido cerebral também contribuem para o declínio das funções mentais observadas (POHANKA, 2014).

É importante salientar que o sistema nervoso central (SCN) do indivíduo com DA não é uniformemente prejudicado. Enquanto o cerebelo é altamente resistente o hipocampo e o neocórtex são muito sensíveis ao processo patológico (LAMER, 1997; MU; GAGE, 2011). Por esta razão as habilidades cognitivas são mais afetadas do que, por exemplo, a

movimentação ou a homeostase corporal basal. Sabe-se que região colinérgica é a parte do SNC mais danificada pela DA (POHANKA, 2014).

Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos na DA não terem sido completamente elucidados acredita-se que a progressão da doença ocorra em 3 estágios principais: inicial, intermediário e avançado (MORZELLE, 2012; PALLAS; CAMINS, 2006) como descrito a seguir:

- Estágio inicial: o sistema colinérgico é danificado através de danos seletivos aos neurônios relacionados à memória e neurônios específicos do sistema límbico, ou hipocampo. Durante este processo que pode durar de 2-4 anos há o encolhimento do hipocampo em cerca de 25% do seu volume inicial, sendo o elo de comunicação entre a memória de curto prazo e longo prazo a região mais afetada pela DA. Os sintomas típicos deste estágio são perda leve da memória, principalmente as relacionadas a informações recentemente aprendidas (memória recente) e pequenas dificuldades de comunicação.
- Estágio intermediário: nesta etapa, que dura cerca de 2 a 10 anos, o indivíduo com DA perde a habilidade de armazenar novas informações, tem dificuldade de lembrar fatos que remetem ao seu passado, apresentam alterações na personalidade e no comportamento, confusão, raiva, tristeza e falta de concentração e orientação. Os sintomas exibidos são reflexo da devastação do sistema límbico e do hipocampo, há também declínio nos níveis de acetilcolina (ACh), neurotransmissor relacionado a retenção de memória e aprendizagem.
- Estágio Avançado: com a lesão de grande parte do sistema límbico e o ataque aos neurônios colinérgicos em todo o córtex cerebral o indivíduo esquece quase que por completo de seu passado, amigos e família. Habilidades sociais, como a capacidade de comunicação, são completamente comprometidas, e qualquer recuperação de informação é rara e aleatória. Este estágio da doença tem duração média de 3 anos e termina com o falecimento do paciente.

Diversos mecanismos têm sido propostos como possíveis explicações a DA; depósito extracelular de peptídeos β -amilóides ($A\beta$) também conhecidas como placas senis, hiperfosforilação da proteína *tau*, disfunção colinérgica, estresse oxidativo, disfunção sináptica e inflamação subsequente ao acúmulo de $A\beta$ (MAHDY et al., 2012; POHANKA, 2014; SCOTTI et al., 2014).

2.1.3 Cascata amilóide

Apesar de permanecer incerta a função primária da proteína precursora amilóide (APP - *Amyloid Precursor Protein*) sabe-se que ela se encontra abundantemente distribuída nas membranas onde ocorrem sinapses, supostamente regulando a plasticidade sináptica, a excitabilidade do neurônio e a memória (KORTE et al., 2012; TURNER et al., 2003). A clivagem da APP pela secretases dá origem a diferentes comprimentos de peptídeos A β , sendo os com 39-42 peptídeos os mais comuns. A β (1-42) são peptídeos β -amilóides com 42 aminoácidos de grande citotoxicidade capazes de formar placas duras e insolúveis no tecido neuronal devido a sua natureza hidrofóbica (KADLCIK et al., 2004; MOLL; EL-AMI; COHEN, 2014; POHANKA, 2014). Em condições saudáveis os fragmentos gerados pela quebra da APP são quebrados e eliminados impedindo assim a deposição progressiva dos peptídeos A β .

Após a descoberta de placas senis em pacientes com DA à hipótese amilóide tornou-se uma forte força motriz no meio científico. A hipótese dominante postula que a superprodução de A β (1-42) é a principal responsável pelas demais características neuropatológicas da DA, incluindo a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos pela proteína *tau* hiperfosforilada, processos inflamatórios subjacentes e alterações neuroquímicas generalizadas (CHAKRABARTI et al., 2013; HOLMES, 2012; SINGH et al., 2013).

Diversos indícios corroboram com esta teoria, oligômeros A β e as placas senis são potentes toxinas sinápticas capazes de bloquear a atividade mitocondrial, alterar os níveis intracelulares de cálcio, estimular processos inflamatórios e inibir a função de proteossomos (ações estas que podem levar a disfunção neuronal.). Estudos também demonstraram que A β (1-42) são capazes de induzir estresse oxidativo no cérebro e interagir com rotas metabólicas que regulam a fosforilação da proteína tau (ANDREASEN et al., 1998; BOYD-KIMBALL et al., 2005; BUERGER et al., 2006; SCOTTI et al., 2014).

Apesar de muitos pesquisadores serem partidários desta teoria há aqueles que acreditam que a formação de placas é na verdade consequência de um declínio metabólico no cérebro, sendo esse, portanto, um agente não causador da DA. Contudo, substâncias capazes de inibir a agregação de A β têm sido indicadas para o tratamento de pacientes com a DA nos estágios iniciais da doença (LEUNER et al., 2007; SCOTTI et al., 2014; SINGH et al., 2013; TABNER et al., 2005).

2.1.4 Hiperfosforilação da *Tau*

Emaranhados neurofibrilares são o segundo biomarcador da DA. Contudo, a presença da proteína *tau* precede o início da formação dos emaranhados.

A *tau* é uma das macromoléculas que modulam a estabilidade dos microtúbulos presentes nos axônios. Contudo, sua disfunção provocada por excessiva hiperfosforilação induz a deposição de proteínas *tau* fora dos microtúbulos neuronais. Futuramente este processo acarretará em formação de agregados proteicos e gênese dos emaranhados neurofibrilares dentro de corpos celulares neuronais.

Ao afetar o sistema de transporte do neurônio e induzirem a desintegração dos microtúbulos os emaranhados originados a partir da proteína *tau* hiperfosforilada prejudicam a comunicação bioquímica entre os neurônios e posteriormente levam à morte celular (SINGH et al., 2013). Apesar de ainda não estar bem elucidada a hiperfosforilação da *tau* provavelmente é uma reação ao estresse oxidativo, além disso, com a progressão da doença a degradação da forma hiperfosforilada da *tau* por proteossomos é inibida pelas ações dos A β (POHANKA, 2014; SCOTTI et al., 2014).

O processo de fosforilação e desfosforilação não pode ser facilmente manipulado já que são necessários para homeostase normal do organismo, por isso que ainda nenhum tratamento efetivo capaz de prevenir a deposição de emaranhados neurofibrilares foi encontrado (POHANKA, 2014).

2.1.5 Hipótese colinérgica

A principal função fisiológica da enzima acetilcolinesterase (AChE) é hidrolisar rapidamente a acetilcolina para que haja conclusão do impulso nervoso nas fendas sinápticas e/ou nas junções neuromusculares (JOHNSON; MOORE, 2006). Em pacientes com DA há uma disfunção colinérgica associada a lesões provocadas ao prosencéfalo ou a regiões adjacentes e/ou conectadas a este tecido nervoso. A consequência primária destes danos é baixos níveis de acetilcolina e perda de transmissão colinérgica resultando em déficit de memória e cognição (AGIS-TORRES et al., 2014).

A acetilcolina é um neurotransmissor do sistema nervoso parassimpático encontrado no cérebro e junções musculares. No organismo é responsável pela regulação de batimentos cardíacos, contração dos músculos lisos e dilatação dos vasos sanguíneos; no cérebro esta associada ao controle motor, memória e cognição (MORZELLE, 2012). Sua síntese é realizada pela colina-acetiltransferase (ChAT) através da catalise dos substratos colina e acetil CoA. Esta reação é limitada pela concentração de colina, a qual tem sua concentração

dependente da ação da AChE, enzima que lisa a acetilcolina em colina e acetato (SCOTTI et al., 2014).

No cérebro de indivíduos com DA foram encontradas tanto altas concentrações de AChE como declínio na atividade da ChAT. A constatação destes fatos propiciou o surgimento da hipótese colinérgica e o surgimento dos primeiros fármacos direcionados para o controle da progressão da doença (BIRD et al., 1983; SCOTTI et al., 2014; SHEN et al., 2010).

A acetilcolinesterase segundo alguns estudos está também relacionada à deposição dos A β . Supostamente a AChE atua sobre os A β aumentando sua toxicidade, acelerando a formação dos aglomerados e estabilizando os complexos. Foi também demonstrado que a formação da APP é regulada pelo sistema colinérgico, assim como os A β , os quais por sua vez também modulam este sistema. Contudo, não foi elucidado se o declínio colinérgico precede ou é secundária a formação das placas senis (CARRASQUILLO et al., 2010; MAELICKE; ALBUQUERQUE, 2000; NARAHASHI et al., 2003).

Além da acetilcolina outros neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e ácido gama-aminobutírico também tem seus níveis afetados pela DA (GABA- *Gamma-AminoButyric Acid*) (CHAKRABARTI et al., 2013; VIEGAS JUNIOR et al., 2004).

2.1.6 Estratégias terapêuticas: busca por um tratamento efetivo para doença de Alzheimer

Apesar do Mal de Alzheimer ter sido descoberto pelo médico Alois Alzheimer a mais de um século atrás, até o presente momento não existe cura para esta doença (RAMIREZ-BERMUDEZ, 2012). A multiplicidade dos mecanismos envolvidos na patogênese e os vários comprometimentos ao cérebro do paciente dificultam o estabelecimento de um tratamento efetivo, uma vez que, proporcionam diversas estratégias farmacológicas com múltiplos alvos possíveis (ANANDA; GILL; MAHDI, 2014; SCOTTI et al., 2014; SAUVAÎTRE et al., 2007).

Três principais abordagens terapêuticas têm sido investigadas; restabelecimento dos níveis de neurotransmissores, o uso de antioxidantes e a utilização de agentes capazes de interferir em aspectos mais específicos da doença como cascata amilóide e proteína *tau* (KONRATH et al., 2013). Contudo, destas investidas, a modulação da neurotransmissão continua sendo a principal abordagem para oferecer melhoras sintomáticas ao status clínico do paciente (ANANDA; GILL; MAHDI, 2014).

2.1.7 Inibidores de acetilcolinesterase: presente e futuro

O uso de inibidores de AChE é o método mais bem estabelecido no tratamento da DA (CUSTÓDIO et al., 2013), com potencial para o tratamento de outras doenças neurodegenerativa como Parkinson e Miastenia grave (AHMAD et al., 2006). No mercado existem cinco fármacos aprovados para a comercialização e tratamento da DA, com exceção da Memantina (antagonista do receptor de glutamato), todas as demais drogas se baseiam na atividade anticolinesterásica. Inclusive os inibidores de AChE foram o primeiro grupo de medicamento destinados ao controle da evolução da DA aprovados pela Food and Drug Administration (FDA).

A Tacrina (Cognex[®]) e Donepezil (Aricept[®]) ambos de origem sintética foram liberados em 1993 e 1996, respectivamente. Atualmente a Tacrina é raramente utilizada em virtude dos seus efeitos hepatotóxicos (WATKINS et al., 1994). No ano de 2000 e 2001 a FDA aprovou os primeiros inibidores de AChE de origem natural a Rivastigmina (Exelon[®]) e a Galantamina (Reminyl[®], Razadyne[®]) (MURRAY et al., 2013). A rivastigmina é composta por um análogo da fisostigmina, um alcaloide obtido a partir de sementes de *Physostigma venenosum* Balf., tradicionalmente utilizado como veneno em rituais na África (BRUNETON, 1999) enquanto a galantamina, fármaco mais utilizado no tratamento da DA, é um alcaloide isolado da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) e posteriormente extraído de outras espécies desta família como *Narcissus* sp. e *Leucojum* sp. (SEIDL, 2010).

Todos os fármacos existentes podem ser utilizados nos estágios moderados da doença, enquanto nos casos mais severos é prescrito o Donepezila e a Memantina. A Donepezila é a única droga que pode ser utilizada em todos os estágios da doença. Outra característica em comum são os efeitos colaterais associados à ingestão destes medicamentos, de forma geral com exceção da Memantina eles causam desordens no trato gastrointestinal, como náuseas, vômitos, alterações no apetite e aumento nos movimentos peristálticos. Em singular a Tacrina pode levar a danos hepáticos e a Memantina a dores de cabeça, confusão e constipação (FDA, 2007).

Infelizmente as cinco drogas disponíveis atualmente no mercado apenas tratam a perda cognitiva sem atrasar ou modificar a progressão da doença. Em alguns casos, os medicamentos só funcionam por limitado período de tempo, e para alguns pacientes não oferecem alívio nenhum (ANANDA; GILL; MAHDI, 2014; KONRATH et al., 2013).

Levando-se em conta a origem da Galantamina e Rivastigmina e o fato dos AChE serem uma importante estratégia no tratamento da DA muitos grupos de pesquisas tem focado seus estudos na procura por compostos naturais derivados de plantas como fontes potenciais

de novos ou mais eficazes inibidores de AChE (MURRAY et al., 2013). Isto porque, apesar da terapia colinesterásica ser considerada uma simples intervenção sintomática, dados recentes têm demonstrado que inibidores de AChE são capazes de prolongar os efeitos clínicos por até 1 ano ou segundo dados mais otimistas 3 anos.

Esta estabilização do quadro cognitivo sugere que possivelmente os inibidores de AChE interajam com a cascata amiloide, influenciando a expressão e/ou metabolização das APP, amenizando assim uma das principais etapas patológicas da DA (GIACOBINI, 2002; MUKHERJEE et al., 2007).

Diversas revisões sobre novos inibidores de AChE obtidos de plantas, fungos e organismos marinhos tem sido publicada nos últimos anos. Em sua maioria pertencem ao grupo dos alcaloides incluindo, indol, isoquinolina, quinolizidina, piperidina e alcaloides esteroidais. Entretanto, diversos compostos não alcaloides com potente atividade anticolinesterásica também foram obtidos a partir de fontes naturais, exemplos são os terpenos, xantonas, cumarinas, flavonoides e outros compostos fenólicos (KONRATH et al., 2013; MURRAY et al., 2013).

Desde a antiguidade, fitoquímicos têm sido utilizados na medicina popular para restabelecer as funções cognitivas perdidas nas doenças neurodegenerativas (ADEWUSI; MOODLEY; STEENKAMP, 2010). Extratos obtidos destas plantas têm demonstrado serem excelentes veículos carreadores de substâncias bioativas capazes não somente de exibir atividade anticolinesterásica (ANEKONDA; REDDY, 2005) como também exercer ação antioxidante e anti-inflamatória (ADEWUSI; MOODLEY; STEENKAMP, 2010).

Diversos extratos de plantas foram e estão sendo testados. A Huperzine A, um alcaloide encontrado em *Huperzia* spp., tradicionalmente comercializado na China como suplemento para DA, tem demonstrado resultados promissores quanto a performance cognitiva, eficácia, tolerância e segurança (MURRAY et al., 2013). O eugenol presente em muitas especiarias como o cravo, canela, manjerição e nós-moscada demonstraram ser um potente inibidor de AChE (DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com sálvia e pimenta do reino também têm demonstrado o potencial destes alimentos como anticolinesterásico (ADEWUSI; MOODLEY; STEENKAMP, 2010; AHMED et al., 2013; MAHDY et al., 2012; SENOL et al., 2014).

Dentre os compostos de origem natural os alcaloides são considerados os candidatos mais promissores no tratamento da DA, em virtude de sua complexa estrutura nitrogenada (PEREIRA et al., 2010). Sabe-se que um dos sítios alvos inibitórios da molécula de AChE envolve a interação com átomos positivos de nitrogênio, os quais estão presente nos

alcaloides. Compostos não alcaloides também podem exercer atividade anticolinesterásica ao se ligarem a outros sítios da molécula de AChE (BRUHLMANN et al., 2004; HOSTETTMANN; BORLOZ; MARSTON, 2006; HOUGHTON; REN; HOWES, 2006).

Embora a literatura demonstre ser vasta em estudo com inibidores de AChE, esta questão, continua sendo o centro das atenções, basta conferir o número crescente de artigos publicados a cada ano (MURRAY et al., 2013). Diversos agentes provenientes destes estudos estão sendo clinicamente testados, todavia a taxa de reprovação é alta, fato comum para drogas direcionadas a patologias cerebrais (KONRATH et al., 2013). É por isso que muitos pesquisadores têm direcionado seus esforços pela busca de biomarcadores capazes de oferecer *insights* sobre a progressão da doença, na esperança de encontrar terapias mais precisas que ajam no estágio inicial da doença (BUCKHOLTZ, 2011). Ao mesmo tempo outros pesquisadores buscam na biodiversidade de fitoquímicos ocorrentes na natureza inibidores de AChE que ofereçam ação prolongada, maior segurança, menores efeitos colaterais ou até mesmo a prevenção do surgimento da DA (SEIDL, 2010).

2.1.8 Estresse oxidativo e suas implicações na doença de Alzheimer

O sistema antioxidante é uma complexa rede de reações enzimáticas e não enzimáticas, que atua capturando ou bloqueando radicais livres (RL) potencialmente danosos tais como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS), radicais carbono-centrais, metais de transição e diversos fragmentos derivados de lipídios e proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; MOREL; BAROUKI, 1999).

Sob condições de estresse oxidativo a neutralização destes radicais pelo sistema antioxidante torna-se ineficiente ocasionando alterações nas sinalizações celulares, acúmulo de radicais tóxicos e vários danos á biomoléculas e organelas celulares. A partir destas transformações são geradas moléculas reativas ainda mais potentes que contribuirão para este ciclo vicioso (CHAKRABARTI et al., 2013; DOORN; PETERSEN, 2003). Em linhas gerais estresse oxidativo é, portanto, um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade de neutralização do sistema antioxidante.

Danos oxidativos têm sido associados a diversas doenças crônicas e agudas, inclusive as ocorrentes no cérebro e SNC. O cérebro é notoriamente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio, à abundância de estruturas oxidativas como catecolaminas e ácidos poliinsaturados, presença de metais de transição e deficiente sistema antioxidante (FRIEDMAN, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2014).

Ao mesmo tempo o cérebro e o SNC são responsáveis pela geração de RL. De fato o próprio órgão para manter a homeostase iônica intracelular utiliza cerca de 20% de todo o oxigênio consumido pelo corpo para a produção de ATP e aproximadamente 0,2% deste oxigênio é transformado em ROS por diferentes cadeias respiratórias. O SNC tem alta atividade da NADPH oxidase á qual também é uma importante fonte intracelular de ROS (INFANGER; SHARMA; DAVIDSON, 2006). Em diversas condições patológicas como a isquemia, hipoglicemia, inflamação, doenças neurodegenerativas e envelhecimento foram demonstrados que há uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (BEDARD; KRAUSE, 2007; CHEN et al., 2011; SORCE; KRAUSE, 2009; THAKURTA et al., 2012; TURRENS, 2003).

O estresse oxidativo tem demonstrado ser uma característica patológica importante e inicial em neurônios vulneráveis a DA (MAHDY et al., 2012; PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014). Inúmeros biomarcadores de estresse oxidativo foram constatados em pacientes com Alzheimer, dentre eles excessiva peroxidação lipídica, degeneração neuronal, oxidações proteicas e glico-oxidação e oxidação de RNA e DNA (GELLA; DURANY, 2009; LYRAS et al., 1997; SCOTTI et al., 2014; SMITH et al., 2000).

Estudo realizado com cérebros em diferentes estágios da DA demonstrou aumento dos níveis de peroxidação lipídica já nas fases iniciais da doença (BRADLEY et al., 2012). Evidências indicam que regiões cerebrais severamente degeneradas pela DA apresentam níveis alterados de peroxidação lipídica (BUTTERFIELD et al., 2001; GOOD et al., 1996). Aldeídos altamente reativos gerados a partir da peroxidação lipídica podem facilmente modificar proteínas (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014), e realmente, zonas cefálicas com características histopatológicas típicas de DA demonstram ter níveis elevados de marcadores de oxidação proteica. Contudo, não houve diferença quantitativa entre os estágios da doença, indício este que sugere que o estresse oxidativo seja um evento primário na DA (ANSARI; SCHEFF, 2010; HENSLEY et al., 1995).

Apesar do aumento de radicais oxidativos ser um mecanismo patológico bem reconhecido na DA, a gênese deste processo não é ainda bem esclarecida. Diversas possibilidades podem, no entanto ser inferidas; aumento da produção de NADPH oxidase e de ROS pela mitocôndria, desregulação do metabolismo de metais transicionais e ação pró-oxidativa do peptídeo beta-amilóide (CHAKRABARTI et al., 2013).

Diversos estudos corroboram com esta última hipótese. Ensaios conduzidos em células e em modelo animal demonstraram que o A β 42 é capaz de elevar as taxas de oxidação lipídica e proteica ao combinar-se com os metais de transição Fe³⁺ e Cu²⁺ em seu status redox-

ativo. In vitro estes peptídeos induziram a disfunção mitocondrial, ativaram a micróglia, e desregularam o influxo de íons cálcio nas células (CANEVARI; ABRAMOV; DUCHEN, 2004; JOHNSTONE; GEARING; MILLER, 1999; WAN et al., 2011). Além disso, as espécies reativas de oxigênio geradas pela A β 42 não somente causam danos aos componentes do tecido como também são capazes de modificar a si mesma quanto a sua toxicidade e capacidade de agregação (GOLDSBURY et al., 2008; SMITH et al., 2007).

Contudo, contrária a esta suposição há relatos da presença de biomarcadores de estresse oxidativo antes mesmo do início da deposição de peptídeos A β 42 (NUNOMURA et al., 2000; OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2014; PRATICO et al., 2001). A importância patológica do estresse oxidativo e do acúmulo de peptídeos β -amilóides para o desenvolvimento da DA é indiscutível. Entretanto, é também de fundamental importância definir qual destes dois mecanismos é responsável pelo desenvolvimento da doença, direcionando assim a busca por alvos terapêuticos e o entendimento da progressão da doença.

Evidências obtidas “post-mortem” trouxeram luz a esta questão ao indicar uma separação temporal entre os dois eventos. Segundo os dados obtidos o dano oxidativo ocorre nas fases iniciais da doença, porém é diminuído após a deposição das placas senis. O que corrobora com a ideia de que o acúmulo de peptídeos A β 42 na DA seria na verdade uma defesa do cérebro a prolongada exposição aos RL e metais de transição, que ao longo do tempo induziria a processos tóxicos que culminam com a morte celular e degeneração neuronal (CHAKRABARTI et al., 2013; NUNOMURA et al., 2001; SINHA et al., 2013).

Na DA não somente os índices de estresse oxidativo estão elevados, como há também baixo potencial antioxidante no cérebro, líquido cefalorraquidiano e sangue (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014). Na evolução do estágio inicial do Alzheimer para a demência (estágio final) o sistema antioxidante demonstra estar significativamente debilitado enquanto os marcadores de estresse oxidativo permanecem constantes. Esta descoberta sugere que a progressão da doença é facilitada pela degeneração das moléculas antioxidantes presentes nos tecidos (BALDEIRAS et al., 2010; OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2014).

Estudos com cérebros humanos indicaram que a taxa entre glutatona reduzida e oxidada é diminuída em regiões lesionadas pela DA em comparação aos pacientes normais (BENZI; MORETTI, 1995). Um dos mais importantes antioxidantes endógenos o α -tocoferol (vitamina E), responsável pela proteção contra a peroxidação lipídica igualmente apresenta seus níveis reduzidos (BALDEIRAS et al., 2008). Um dos motivos para baixa atividade da vitamina E advém dos, também, reduzidos valores de ácido ascórbico (vitamina C),

antioxidante hidrofílico presente no plasma responsável pela reativação do α -tocoferol (RINALDI et al., 2003).

Apesar de não existir evidências experimentais contundentes que confirmem o estresse oxidativo como fator desencadeador da DA, sabe-se que a geração de espécies reativas desempenha papel fundamental na progressão da doença. Deste modo, compostos antioxidantes capazes de prevenir a geração de RL têm sido investigados como uma alternativa para o tratamento ou prevenção desta doença, uma vez que, podem pelo menos amenizar o progresso da doença (MAHDY et al., 2012; POHANKA, 2014).

2.1.9 Pimenta do Reino e Pimenta Rosa como candidatas na redução de risco da doença de Alzheimer

A dieta na saúde humana atualmente não mais se restringe a fins nutricionais, pesquisas recentes, principalmente da nutrigenômica, têm demonstrado que a alimentação esta associada através da evolução e da genética ao status saudável da célula, sendo capaz de modular apoptoses, desintoxicar o organismo e conferir apropriada resposta gênica (VIRMANI et al., 2013). As deficiências nutricionais e as doenças oriundas da carência vitamínica e mineral são bem conhecidas, contudo, não somente a deficiência é fator chave ao desenvolvimento de patologias, a presença de outros compostos químicos presentes em frutas, vegetais, gorduras e cereais também desempenham papel fundamental na manutenção da saúde e proteção contra doenças (BOEING et al., 2012).

O uso de substâncias “naturais” é um novo campo de estudos que promete tratar a doença através da modulação das rotas metabólicas e controle das condições patológicas (VIRMANI et al., 2013). Plantas medicinais têm sido tradicionalmente utilizadas no tratamento de diversas doenças e suas propriedades farmacológicas e terapêuticas são atribuídas aos diferentes constituintes químicos isolados de seus extratos brutos (MAHDY et al., 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e órgãos públicos de saúde são grandes incentivadores de estudos com plantas medicinais, uma vez que, essas plantas podem originar medicamentos de maior acessibilidade, em menor tempo e custo (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006), representando alternativa a assistência privada, aos altos custos dos medicamentos, e á precariedade dos serviços públicos associados à saúde (GOMES, 1985; SCHREINER et al., 2009). Além disso, as práticas naturais de saúde, como o uso de plantas medicinais, estão se tornando cada vez mais difundidas devido à busca dos consumidores por tratamentos mais naturais (ALVIN, 1997).

Recentemente, várias plantas medicinais que possuem profundos efeitos no sistema nervoso central e atividade antioxidante têm recebido atenção como alimentos funcionais capazes de melhorar a função cognitiva de pacientes com DA (AHMED et al., 2013; CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010).

Dentre as plantas medicinais, especiarias e seus componentes bioativos são candidatos mais promissores para a inclusão em dietas com intuito de melhorar a saúde (BUTT et al., 2009, 2013). Isto porque, além do baixo custo e da alta acessibilidade, o uso de condimentos não traz estranheza ao consumidor, suas diferentes partes, incluindo as sementes secas, casca, frutas, raízes e flores, há muitos séculos são utilizadas em diversas preparações culinárias conferindo sabor, aroma e cor aos alimentos (SRINIVASAN, 2008; SINGLETARY, 2010).

2.1.10 Pimenta do reino e seus compostos bioativos *versus* doença de Alzheimer

A pimenta do reino (*Piper nigrum*. L) é originária das áreas costeiras da Índia, porém, seu cultivo se estende a outras áreas tropicais e subtropicais do globo (BUTT et al., 2013). Segundo dados da FAO o Brasil é o quarto maior produtor de pimenta do reino, atrás somente da Índia, Indonésia e Vietnã (FAO, 2012). O gênero *Piper* é constituído por cerca de 2000 espécies (GULZAR et al., 2013), sendo muitas delas comumente empregadas no mundo como especiarias, aditivos alimentares e condimentos. Adicionalmente, são considerados importantes ingredientes medicinais, principalmente nos países asiáticos (CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010).

As pimentas branca, verde e preta são os principais tipos de pimenta do reino existentes nos supermercados (GU et al., 2012). Todos esses grãos de pimenta são procedentes da mesma espécie *P. nigrum*, porém distintos segundo período de colheita e processamento empregado (Tabela 1).

Tabela 1 - Procedimentos empregados para a produção dos diferentes tipos de pimento do reino e suas principais formas de comercialização

Pimenta do Reino	Estágio de Maturação	Processamento	Forma de comercialização
Verde	Imaturo	-	Seca, liofilizada e em salmoura
Preta	Imaturo	Tratamento térmico- enzimas escurecimento	Seca
Branca	Maduro	Descascamento	Seca

Fonte: Friedman et al. (2008)

A pimenta preta (PP), também conhecida como “king of spices” (rainha das especiarias) é a especiaria mais importante e comercializada do mundo. Seu aroma e sabor acre, pungente e picante é muito apreciado (GU et al., 2012; GULZAR et al., 2013), tornando-a ingrediente de diversas preparações culinárias, perfumaria, formulações medicinais e até mesmo para cuidados estéticos (SRINIVASAN, 2005; DE-SOUZA et al., 2005).

Os grãos de PP são ricos em vitamina A e K, contém fibras dietéticas, β -caroteno, cálcio, magnésio, potássio, manganês e fósforo. A pimenta preta ainda é rica em ácidos fenólicos e antioxidantes (BUTT et al., 2013). Os compostos fenólicos que compõem a pimenta preta são uma mistura de ácidos fenólicos glicosídeos e flavonoides glicosídeos (RENJIE et al., 2010), dentre eles estão a isoquercetina, quercetina, isorhamnetina 3- β -D-rutenosídeo, kaempferol 3-O- β -galactosídeo, kaempferol 3-arabinosídeo e rutenosídeo 3-O- β -D-quercetina (PARMAR et al., 1997).

Outros constituintes da PP são os terpenos, esteroides, lignanas, flavonas e os alcaloides (MUSENGA et al., 2007; MURTHY; BHATTACHARYA, 2008), como a chavicina, piridina, piperidina e especialmente a piperina (SHAIKH; BHOSALE; SINGHAL, 2006).

Além de conferir o sabor pungente às pimentas do reino a piperina (1-piperoilpiperidina) também presente em *Piper longum* e gengibre (*Zingiber officinale*) (MAHDY et al., 2012; MEGHWAL; GOSWAMI, 2013) é o principal alcaloide e composto bioativo presente nos grãos da PP. Após seu descobrimento, numerosos estudos têm focado em investigar suas propriedades farmacológicas (AHMED et al., 2013). E desde então, a PP ou seu princípio ativo, tem demonstrado experimentalmente, em diversas pesquisas independentes, conter múltiplos efeitos fisiológicos de interesse a saúde humana (SRINIVASAN, 2007).

A pimenta preta tem sido indicada como fonte dietética potencial de antioxidantes, os quais são fortes candidatos a amenizar o estresse oxidativo existente em pacientes com DA. Além da composição rica em fenólicos (reconhecidos compostos antioxidantes) a piperina tem demonstrado também ser um fitoquímico importante no combate aos radicais livres. A DA é um grande problema de saúde mundial, com tendência a se agravar no futuro próximo. A busca por produtos naturais capazes de prevenir e combater esta enfermidade tem direcionado muitas pesquisas científicas, em sua maioria fundamentada pelas hipóteses antioxidante e anticolinérgica.

Estudos realizados *in vitro* demonstraram que este alcaloide, através de sua forte habilidade em doar hidrogênio, foi capaz de inibir e/ou quelar metais, RL e ROS (GULÇIN,

2005). *In vivo* reduziu a peroxidação lipídica, beneficiou o status tiol celular e o número de moléculas e enzimas antioxidantes presentes no organismo em diversos estudos experimentais (MAHDY et al., 2012; SRINIVASAN, 2007; VIJAYAKUMAR; NALINI, 2006). características essas de interesse ao combate a DA.

Estudos farmacológicos conduzidos em animais e ao nível celular demonstraram que a PP e seu princípio ativo, piperina, podem ser úteis contra essas respostas inflamatórias (GUPTA et al., 2000; SABINA et al., 2011; SELVENDIRAN et al., 2003) ao inibir enzima responsáveis pela biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos (BUTT et al., 2013). O processo inflamatório pode induzir o surgimento de diversos males à saúde, como a artrite, DA e Parkinson e até mesmo a reincidência de câncer.

Outra via de combate a DA é o aumento dos níveis de acetilcolina. Os alcaloides em especial têm demonstrado serem efetivos inibidores de AChE (PEREIRA et al., 2010). Alguns estudos têm reportado a ação da piperina sobre as habilidades cognitivas e o humor (SELVENDIRAN, 2003). Esta descoberta, aliada a sua alta atividade antioxidante vêm motivando pesquisas científicas com intuito de compreender os potenciais da suplementação com pimenta preta ou piperina, sobre a neurodegeneração e déficit de memória em pacientes com DA (AHMED et al., 2013).

Os poucos trabalhos existentes, realizados em modelo animal, têm demonstrado que a piperina pode significativamente aprimorar as habilidades colinérgicas e reduzir a neurodegeneração na região do hipocampo. São enumerados como possíveis mecanismos de ação o decréscimo de peroxidação lipídica, inibição da acetilcolinesterase, aumento da densidade neuronal (ação neurotrófico) e atividade inibidora de monoamina oxidase (MAOs) (AHMED et al., 2013; BUTT et al., 2013; CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010).

O potencial antioxidante e a presença de moléculas bioativas como a piperina tornam a pimenta preta uma candidata consideravelmente importante no aprimoramento das funções cerebrais, especialmente em pacientes com DA. Contudo, até o momento, poucos estudos foram realizados nesse sentido. Adicionalmente, outros tipos de pimenta do reino como a branca e verde nunca foram investigadas. De fato, estudos voltados para benefícios à saúde com estas duas pimentas são raros e insuficientes.

Processar um alimento indiscutivelmente altera os compostos bioativos presente na matriz alimentar seja aumentando ou reduzindo a sua biodisponibilidade. A piperina é altamente sensível à luz e facilmente perdida durante o aquecimento, por isso os métodos de estocagem, processamento e extração são extremamente importantes (BUTT et al., 2013;

MEGHWAL; GOSWAMI, 2013). Além deste alcaloide outros fitoquímicos, como os compostos fenólicos, presentes na pimenta podem ser alterados sob estas circunstâncias.

A pimenta verde, branca e preta, pertencerem á mesma espécie, possivelmente apresentam composições bioativas distintas, uma vez que são empregadas diferentes técnicas de colheita e processamento. Saber qual destes tipos de pimenta é capaz de agregar as melhores características contra a DA sem dúvidas irá oferecer informações cruciais a pesquisas futuras.

2.1.11 Pimenta do Rosa: uma falsa pimenta do reino.

Anatomicamente a pimenta rosa é muito semelhante às pimentas do reino. Outras características como sabor pungente, o uso comum na culinária e a comercialização a granel sob a forma desidratada, também reforçam esta similaridade. Apesar de ser muitas vezes confundida como mais um tipo de pimenta do reino, a pimenta rosa (PR) é fruto de uma Anacardiaceae, *Schinus terebinthifolius*.

O gênero *Schinus* é nativo da América do Sul e está principalmente distribuído pela costa brasileira (BARBOSA et al., 2007) desde o nordeste ao sul do país. Dentre as espécies mais abundantes está a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), também conhecida como “aroeira da praia”, “aroeira negra”, “aroeira vermelha”, “aroeira de Minas” e “cor-neiba” (CARVALHO et al., 2013). Representantes desta espécie também podem ser encontrados em outros países e continentes com clima semitropical e tropical como África, Oceania e Estados Unidos (FERRITER, 1997; LORENZI, 1992).

Durante os últimos anos, um número crescente de pesquisas têm demonstrado uma grande variedade de metabólitos secundários na família Anacardiaceae, tornando-a uma candidata promissora na procura por substâncias bioativas naturais (CARVALHO et al., 2013). De fato na medicina popular as folhas, cascas e frutos da aroeira vêm sendo utilizadas há séculos como antiinflamatório, antipiréticos, analgésicos, hemostáticos e agentes depurativos. São ainda utilizados no tratamento do reumatismo, diarreia e doenças do trato gastrointestinal, úlceras dérmicas, gengivite, doenças venéreas e inflamações uterinas e do trato urinário. Existem ainda relatos de sua ação antifúngica, antibacteriana e antialérgica (AFFONSO et al., 2012; BENDAOU et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; SANTOS et al., 2012).

Apesar de seu emprego ser disseminado na medicina popular e crescente uso na culinária, pouca atenção vem sendo dada a esta espécie do ponto de vista farmacológico e fitoquímico (AFFONSO et al., 2012; CARLINI et al., 2010). A maioria dos estudos e

publicações tem se restringido a identificação dos compostos presentes no óleo essencial, extraídos das folhas e/ou fruto. Deste modo, estudos que correlacionem suas propriedades biológicas aos compostos bioativos presentes são sem dúvida um nicho a ser explorado (CARVALHO et al., 2013).

Os poucos estudos existentes têm apontado os polifenóis como responsáveis pelas propriedades farmacológicas. Os mesmos encontram-se distribuídos desigualmente por todos os órgãos vegetais, como a casca, folhas, flores, frutos e semente (SANTOS et al., 2012). Relatam-se ainda a presença de altas concentrações de monoterpenos, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e ácidos graxos principalmente no fruto e nas folhas (AFFONSO et al., 2012; LIMA et al., 2009).

Atualmente a exploração da pimenta rosa está restrita a colheita manual de árvores naturalmente ocorrentes na região, principalmente nas áreas de restinga do litoral brasileiro (LENZI; ORTH, 2004). No entanto a PR tem sido amplamente requisitada pela culinária internacional, fato que tem ocasionado considerável aumento pela demanda destes grãos na indústria de especiarias (SOUZA; ARTHUR; PIRES, 2012). No Brasil, o consumo de pimenta rosa está sendo difundido apesar de incipiente (BERTOLDI, 2006).

O fruto de *S. terebinthifolius* contém óleo essencial que propicia aos grãos flavor suave e levemente picante (AFFONSO et al., 2012; SOUZA; ARTHUR; PIRES, 2012). O condimento seco ou triturado é utilizado em diversas preparações culinárias seja para condimentar carnes, salames e massas, ou conferir exotividade a bebidas e doces (BERTOLDI, 2006). São utilizados ainda na confecção de xaropes, vinagres e vinhos. Em alguns países são utilizados como substitutos ou adulterantes da pimenta preta (*Piper nigrum*) (AFFONSO et al., 2012).

A crescente disseminação do uso de pimenta rosa, aliadas as propriedades fitoterápicas e as poucas informações existentes na literatura científica, impulsionam estudos mais aprofundados sobre esta pimenta a cerca dos seus aspectos naturais capazes de prevenir e combater doenças. Descobrir atividade anticolinesterásica em pimenta rosa (ainda inédito em literatura), bem como seu potencial antioxidante e composição fitoquímica são maneiras, portanto, de promover tanto o conhecimento sobre este fruto como beneficiar o grande panorama de saúde pública, seja no combate a DA e/ou outras pandemias existentes.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção da matéria-prima.

Os grãos de pimenta utilizados para a elaboração dos extratos foram adquiridos no mercado municipal da cidade de Piracicaba, SP. Em seguida, foram selecionados, com a finalidade de homogeneizar a amostra e remover as possíveis sujidades (gravetos, pedúnculos e pedregulhos) presentes. Até o momento da produção dos extratos as pimentas foram armazenadas a -20°C em sacos de polietileno, no intuito de manter intactas as características bioativas.

2.2.2 Elaboração dos extratos

A produção dos extratos seguiu o método descrito por Orhan e Aslan (2009) e Rasheed et al. (2005) com modificações. A proporção amostra/solvente foi alterada para 1:30 (material vegetal [g]: solvente [mL]), e as amostras permaneceram sob agitação constante durante todo o processo de extração.

Os grãos de pimenta rosa, branca, verde e preta foram macerados em almofariz com metanol:água (70:30%). Em seguida a solução grãos mais solvente foi transferida para erlenmeyers, e mantidos a temperatura ambiente sobre agitação constante durante 72h. A mesa agitadora (Modelo ET-1401, Tecnal, Brasil) foi regulada para 150 rpm.

Após 3 dias o sobrenadante foi transferido para frascos de vidros âmbar e o resíduo novamente extraído com metanol: água (70:30%). Ao final do processo os sobrenadantes obtidos foram combinados e o solvente evaporado sob vácuo constante a 45°C em rotaevaporador (Modelo 801, Fisatom, Brasil). Aos extratos brutos foram adicionados 15 mL de água milliQ, após constatar a aderência dos mesmos ao balão do rotaevaporador.

Em seguida os extratos foram centrifugados a 1956,2 g em centrífuga (Modelo NT 825, Nova Técnica, Brasil) e armazenados em frascos âmbar a -20°C até o momento das análises bioquímicas. Durante todo o processo os extratos foram mantidos ao abrigo da luz, uma vez que a luminosidade excessiva pode degradar os compostos de interesse. Denominou-se extrato bruto o produto obtido após a evaporação completa do solvente e solução amostral o produto resultante após a adição aos extratos brutos de 15 mL de água milliQ.

2.2.3 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos presente nos extratos brutos de pimenta foi quantificado segundo o método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965) modificado por Woisky e Salatino (1998) e Stratil, (2007).

Uma alíquota de 0,5 mL de solução amostral foi transferida a tubos de ensaio contendo 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu previamente diluído em água (1:10). A solução resultante foi agitada em agitador de tubos de ensaio (Modelo MX-F – LAB 1000) e deixada em repouso por 5 minutos. Transcorrido este período adicionou-se a solução inicial 2 mL de carbonato de sódio 4%. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 740 nm após 2h da adição da solução de carbonato de sódio.

Durante toda a análise as amostras, tubos de ensaio e os reagentes foram mantidos ao abrigo da luz. O ácido gálico foi utilizado como padrão e as soluções amostrais diluídas em água milliQ nas seguintes proporções 1:100 (PR); 1:50 (PP e PV) e 1:10 (PB).

Após a leitura das absorbâncias os resultados foram calculados segundo curva de calibração de ácido gálico e expressos em mg de ácido gálico mL⁻¹ de extrato bruto.

2.2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) dos extratos de pimenta do gênero *Piper* e *Schinus* foi determinada segundo três metodologias; sequestro dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e, 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfônico (ABTS) e potencial redutor do íon férrico (FRAP).

2.2.5 Atividade Antioxidante pelo método DPPH

A determinação da AA dos extratos de pimenta do reino e pimenta rosa foi realizada através do método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

Aos tubos de ensaio foram adicionados sequencialmente uma alíquota de 500 µL de solução amostral, 3 mL de etanol e 300 µL da solução etanólica de DPPH (2000 µM/L) . Após 45 minutos foram realizadas as leituras da absorbância 517nm em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil). Os resultados obtidos foram expressos em µM Trolox mL⁻¹ de extrato bruto e os valores calculados segundo equivalência a curva padrão de trolox.

A análise foi realizada em ambiente com baixa luminosidade e as soluções amostrais diluídas em água milliQ nas seguintes proporções 1:500 (PR); 1: 100 (PP e PV); 1:10 (PB).

2.2.6 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante também foi mensurada através da reação dos antioxidantes presentes na amostra e o radical ABTS segundo metodologia descrita por Embrapa (2007).

Em uma série de tubos foram pipetados uma alíquota de 20 μL de amostra e 2 mL de solução aquosa de ABTS (2000 $\mu\text{M/L}$). Em seguida foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 734 nm. Os valores foram calculados segundo curva padrão e os resultados expressos em μM Trolox g^{-1} de extrato bruto.

A análise foi realizada em ambiente com baixa luminosidade e as soluções amostrais diluídas em 1:50 (PR) e 1:10 (PP, PV e PB).

2.2.7 Ensaio pelo método FRAP

A determinação da atividade antioxidante total por meio de redução do ferro (FRAP) foi baseada na metodologia descrita pela Embrapa (2006). Para a realização da análise, uma alíquota de 90 μL da amostra foi adicionada a 2,7 mL de reagente FRAP. Em seguida a solução foi homogeneizada e mantida em banho-maria (Modelo Dubnoff SL-157 - Solab) a 37 °C por 30 minutos. Transcorrido este período, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 595 nm. A curva de calibração foi realizada com sulfato ferroso (500-2000 μM) e os resultados expressos em μM sulfato ferroso mL^{-1} de extrato bruto.

A análise foi realizada ao abrigo de luz e as soluções amostrais diluídas nas seguintes proporções 1:100 (PR e PP); 1:25 (PV); 1:5 (PB).

2.2.8 Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos de pimenta em microplacas

Foi adotado o método de Ellman et al. (1961) modificado por Ingkaninan et al. (2003) para a determinação da atividade anticolinesterásica. O método se fundamenta na quantificação do ânion de cor amarelada formado a partir da reação da tiocolina com o reagente de Ellman. A tiocolina é um subproduto da hidrólise da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase. Valores baixos de absorbância estão associados a maiores porcentagens de inibição enzimática.

Atividade anticolinesterásica foi realizada em microescala em microplacas de 96 poços (Thermo Scientific), tendo como controle negativo água milliQ e controle positivo a fisostigmina na concentração 0,1 mg mL^{-1} . Para a determinação do IC50 os extratos de

pimentas foram utilizado como solução mãe e as diluições posteriores realizadas em água milliQ.

Foram pipetados em sequência 25 µl ATCI (15 mM), 125 µl de uma solução do reagente de Ellman (DTNB 3mM), 50 µl de tampão e 25 µl de amostra (controle positivo ou controle negativo ou extrato). Em seguida as absorbâncias foram monitoradas em leitor de microplacas a cada 10 s durante 230 s a 412 nm.

Após a leitura foi adicionado a todos os poços 25 µl de uma solução aquosa da enzima AChE. As absorbâncias foram novamente monitoradas a cada 10 s durante 230 s a 412 nm.

As taxas das reações foram calculadas utilizando software GraphPad Prism versão 5.0 e as porcentagens de inibição através da comparação entre as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da fórmula: % inibição = 100 (taxa da reação amostra/taxa da reação controle x 100).

Os valores de IC50 foram determinados segundo equação da reta do gráfico “concentração versus porcentagem de inibição”. Cada concentração de cada amostra foi analisada em oito repetições e os resultados obtidos através de média ± desvio padrão.

2.2.9 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

2.2.9.1 Extração dos metabólitos

2.2.9.1.2 Extração dos metabólitos em grãos de pimenta

Os grãos de pimenta (100µg) foram pré-triturados em almofariz com nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizados em moinho de bola (Retch MM400) a 22 hertz por 1 minuto. Após esse procedimento foi adicionado 1 ml de solvente de extração (99,875% (v/v) de metanol: 0,125% (v/v) de ácido fórmico) (DE VOS et al., 2007), seguido de homogeneização em vórtex e moinho de bola.

Posteriormente as amostras de grãos de pimenta foram sonicadas (Ultracleaner 1600A) por 15 minutos em gelo e centrifugadas (Eppendorf centrifuge 5415R) por 10 minutos à velocidade de 16.000 g e 4° C de temperatura. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millex (MilliQ) de PVDF (fluoreto de polivinilideno) e 0,22 µm de porosidade. Denominou-se o produto da extração dos grãos de EG.

2.2.9.1.2 Extração dos metabólitos em grãos de pimenta

Para o preparo das amostras de extrato de pimenta foi adicionado diretamente 1 ml de solvente de extração (99,875% (v/v) de metanol: 0,125% (v/v) de ácido fórmico) (DE VOS et al., 2007), não havendo necessidade do pré-tratamento. Em seguida as amostras de grãos de pimenta foram sonicadas (Ultracleaner 1600A) por 15 minutos em gelo e centrifugadas (Eppendorf centrifuge 5415R) por 10 minutos à velocidade de 16.000 g e 4° C de temperatura. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millex (MilliQ) de PVDF (fluoreto de polivinilideno) e 0,22 µm de porosidade. Denominou-se o produto da extração dos extratos de EE.

2.2.9.2 Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de Massas (LC-MS)

Os metabólitos foram analisados por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC-MS) acoplada a espectrômetro de massas. Foi usado um equipamento Q-TOF Ultima da Waters de alta resolução, com ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo e negativo, nas condições: temperatura da fonte de 150°C, temperatura de dessolvatação de 450°C, voltagem do capilar de 3 kV e a voltagem do cone 35 V. O fluxo de nitrogênio no cone foi de 50 L/hr e de desolvatação foi de 550 L/hr. Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z de 100-1000. As amostras foram diluídas da seguinte forma: 1:10 (EG) e 1:40 (EE), e cada amostra contou com 3 repetições biológicas.

A cromatografia foi realizada com um cromatógrafo Acquity (Waters) com uma coluna de fase reversa (Acquity UPCL HSS 1,8 µm, 2.1x100 mm) condicionada a 35°C. Os solventes de eluição são A: acetonitrila dopado com 0,1% de ácido fórmico e o B: água com 0,1% de ácido fórmico. No início da corrida, o gradiente foi de 80% A e 20% B. Depois o gradiente aumentou de forma linear para 50% A e 50% B no próximo 1 minuto. Na sequência, o gradiente mudou para 35% A e 65% B pelos próximos 3 minutos. Inverteu-se a polaridade de 20% A e 80% B, permanecendo nessa condição por 6 minutos. 3% A e 97% B foram estabelecidos pelos próximos 6 minutos. A condição inicial foi restabelecida para a lavagem da coluna por 1 minuto. O tempo total da corrida foi de 17 minutos. O fluxo dos solventes foi de 0,5 mL.min⁻¹.

2.2.10 Análise estatística

2.2.10.1 Análises bioquímicas

Os dados de compostos fenólicos, atividade antioxidante e potencial anticolinesterásico, foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e da homogeneidade das variâncias pelo teste de Box-Cox, quando necessário foram realizadas as transformações indicadas. Após esta etapa realizou-se à análise de variância (ANOVA), utilizando o software SAS (SAS INSTITUTE, 2003). As características que apresentaram médias com diferença significativa pelo teste F ($p < 0,05$) foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

2.2.10.2 Determinação da correlação Pearson

Para avaliar o grau de associação entre as características (compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e anticolinesterásica) foram estimados coeficientes de correlação de Pearson, para cada par de características, com os níveis de significância obtidos pelo teste t (1 e 5%) utilizando o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2003).

2.2.10.3 Metabolômica

O pré-processamento dos dados obtidos por LC-MS foi realizado em software MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK). Cada espectro das amostras foi processado para a remoção do background, do smoothing e para a centralização dos picos. Os espectros foram, em seguida, deisotopizados considerando-se uma carga máxima de +1. A lista de íons obtida foi transferida para uma planilha do Excel para o tratamento dos dados. Íons que apresentaram valor de intensidade 0,0 em mais de 50% das amostras de cada grupo, foram removidos.

Os valores de intensidade foram normalizados por Pareto Scaling. O processamento estatístico foi realizado com auxílio do software MetaboAnalyst 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). A análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante pelos quadrados mínimos (PLS-DA) foram aplicadas ao conjunto de dados. Um alfa de 5% foi adotado. Os valores de R² (representação do quanto há de variação, dentro do conjunto de dados, é explicada pelos componentes do modelo) e Q² (potência de projeção do modelo) encontrados através da validação cruzada, foram utilizados para determinar a qualidade dos modelos formados por PLS-DA.

Os modelos de PLS-DA foram construídos e a importância da variável na projeção (VIP) foi utilizada para identificar os 15 íons que tiveram maior efeito discriminatório entre os grupos.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização dos extratos de pimenta do reino e pimenta rosa

Os extratos produzidos apresentaram coloração e aroma semelhantes à matéria-prima de origem (Figura 1). Quanto ao fator solubilidade, pré-requisito para realização da análise da atividade anticolinesterásica, observou-se alta afinidade pela água.

Figura 1 - Aspecto visual das soluções amostrais de pimenta verde (PV), rosa (PR), branca (PB) e preta (PR)

Após revisar a literatura constatou-se que o metanol é um dos solventes mais utilizado para extração dos compostos inibitórios de AChE em plantas (ADEWUSI et al., 2010; HRITCU et al., 2014; INGGANINAN et al., 2003; MAHDY et al., 2012; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2006; MURRAY et al., 2013; PAPANDREOU et al., 2009). A escolha do metanol como solvente neste e em outros trabalhos revisados indica que possivelmente os compostos com atividade anticolinesterásica sejam em sua grande maioria de origem polar (ADEWUSI et al., 2010). A piperina, alcaloide presente nas pimentas do reino, é um exemplo de composto com atividade anticolinesterásica com afinidade a solvente polar (CHONPATHOMPIKUNLERT et al., 2010).

Assim como os anticolinesterásicos os compostos com atividade antioxidante são em geral de natureza polar. Logo, o uso de metanol como solvente também permitirá a extração de antioxidantes, atingindo assim os anseios estabelecidos neste trabalho.

2.3.2 Compostos fenólicos totais

Os valores obtidos para os compostos fenólicos totais presentes nos extratos de pimentas do reino e pimenta rosa estão apresentadas na Tabela 2.

Dentre os extratos de pimenta o PR destacou-se dos demais apresentando os maiores teores de compostos fenólicos. Em relação às três pimentas do reino, o extrato de PV foi o que apresentou os melhores resultados, embora, três vezes menores aos obtidos para PR.

Tabela 2 - Compostos fenólicos totais dos extratos brutos de pimentas do reino e pimenta rosa

Extrato	Composto Fenólicos Totais
	(mg ácido galíco mL ⁻¹ de extrato bruto)
Pimenta Rosa (PR)	49,51±2,62 ^a
Pimenta Verde (PV)	16,98±0,33 ^b
Pimenta Preta (PP)	13,68±0,87 ^c
Pimenta Branca (PB)	2,7±0,06 ^d

Resultados são a média ±D.P

*Letras diferentes na coluna diferem entre si a 5% de significância

Apesar de estatisticamente distinta, a diferença numérica encontrada entre os extratos de pimentas do reino foram menores entre os extratos PV e PP e maiores em relação ao PB. Isto sugere que o amadurecimento e o descascamento dos grãos de pimenta, são variáveis capazes de reduzir de forma mais significativa os teores de fenólicos do que o escurecimento enzimático aplicado à pimenta preta.

Agbor et al. (2006) também observaram valores reduzidos de compostos fenólicos nos grãos de pimenta branca em relação a preta. Segundo os autores as diferenças encontradas podem ser atribuídas à maturidade do grão e ao processamento empregado. Além de corroborar com os dados obtidos neste trabalho, o estudo conduzido por Agbor et al. (2006) demonstraram que a diferença encontrada é inerente aos grãos de pimenta, e não foi alterada pelo processo de obtenção dos extratos realizado neste trabalho.

A pequena diferença observada entre PV e PP, possivelmente, é reflexo do processo de escurecimento enzimático. Contudo, ressalta-se que uma composição distinta de fenólicos também pode justificar a disparidade encontrada. O método de Folin-Ciocalteu é um ensaio rápido e amplamente utilizado para investigar o conteúdo total de fenólicos, contudo, sabe-se a resposta ao método pode diferir entre os vários compostos fenólicos existentes (KÄHKONEN et al., 1999).

Um estudo realizado por Orhan et al. (2007), sobre a atividade anticolinesterásica de compostos fenólicos isolados, demonstrou que a taxa de inibição varia de acordo com o fitoquímico testado, sendo a quercetina o composto mais promissor (77%). Também foram encontradas atividade anticolinesterásica para ácido gálico (15%) e luteolin-7-O-galactoside (24%).

Portanto é recomendado que seja procedido a identificação dos fenólicos presentes nos extratos de PP, PV, PB e PR, de maneira a viabilizar a extração otimizada de substâncias de interesse. As poucas informações sobre os grãos de pimenta rosa, juntamente aos resultados obtidos nesta pesquisa, devem servir de incentivo para que outros trabalhos sejam desenvolvidos no sentido de melhor elucidar a composição fitoquímica deste condimento. É de desconhecimento desta pesquisa outro estudo que tenha realizado a quantificação de fenólicos em extratos derivados de grão de pimenta rosa.

Sabe-se que o emprego de temperatura, solvente, e tempo de extração são características fundamentais para obtenção de extratos com alto rendimento de fenólicos (DAI; MUMPER, 2010), por isso, é esperado que valores encontrados em literatura sejam divergentes.

Apesar dos teores de compostos fenólicos contidos nos extratos de pimenta do reino e pimenta rosa serem inferiores aos encontrados em outras ervas e condimentos (LU et al., 2011; MAISUTHISAKUL; PASUK; RITTHIRUANGDEJ, 2008; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007), ressalta-se a importância de uma visão holística sobre o material de estudo. Os compostos fenólicos, apesar de exercerem atividade antioxidante e/ou anticolinesterásica, não são os únicos metabólitos capazes de promover a redução do risco de DA, sendo necessária uma investigação mais profunda sobre a potencialidade destes alimentos sobre essa doença.

2.3.3 Atividade antioxidante

Extratos vegetais apresentam natureza complexa, sendo constituídos por diversos fitoquímicos de polaridades, grupos funcionais e reatividades distintas. A adoção de mais de um ensaio para a quantificação total de antioxidantes é, portanto, uma ferramenta mais elucidativa e indispensável (OZTURK, 2012), uma vez que, dificilmente um único método será capaz de contemplar todas as moléculas antioxidantes presentes em uma amostra (HUANG; OU; PRIOR, 2005; PRIOR; CAO, 1999).

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos de pimenta rosa e pimenta do reino determinadas segundo 3 métodos DPPH, ABTS e FRAP estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antioxidante dos extratos de pimenta do reino e pimenta rosa

Extrato	DPPH	ABTS	FRAP
	($\mu\text{M Trolox mL}^{-1}$ de extrato bruto)	($\mu\text{M Trolox mL}^{-1}$ de extrato bruto)	($\mu\text{M sulfato ferroso mL}^{-1}$ de extrato bruto)
Pimenta Rosa (PR)	695,73 $\pm$ 7,74 ^a	663,74 $\pm$ 13,88 ^a	2.235,60 $\pm$ 25,27 ^a
Pimenta Verde (PV)	126,51 $\pm$ 4,40 ^b	132,74 $\pm$ 2,77 ^b	150,15 $\pm$ 6,03 ^c
Pimenta Preta (PP)	37,92 $\pm$ 5,65 ^c	111,27 $\pm$ 4,04 ^c	351,60 $\pm$ 4,50 ^b
Pimenta Branca (PB)	7,12 $\pm$ 0,42 ^d	37,47 $\pm$ 4,04 ^d	67,53 $\pm$ 0,49 ^d

Resultados são a média $\pm$ D.P

*Letras diferentes na coluna diferem entre si a 5% de significância

Independentemente do teste utilizado o PR e PB apresentaram sempre o maior e o menor AA, respectivamente. O extrato PV, dentre as pimentas do reino, destacou-se para os ensaios de DPPH e ABTS, contudo, foi inferior a PP pelo método FRAP.

Quanto aos valores de AA, o ensaio FRAP, apresentou para todas as pimentas analisadas os maiores valores, quando comparados aos teores obtidos por DPPH e ABTS. Estes resultados podem ser indicativos da presença de substâncias antioxidantes com maior afinidade para reduzir os íons ferro. Entretanto, o FRAP, assim como outros ensaios, tem limitações e uma delas está justamente relacionada à superestimação de resultados.

De acordo com estudos, qualquer substância presente no extrato, mesmo sem propriedades antioxidantes, com potencial redox menor do que o par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ pode contribuir para os valores obtidos via FRAP, induzindo a valores falso-positivos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2009; KARADARG; OZCELIK; SANER, 2009; NILSSON et al., 2005). Ao mesmo tempo, subestimações também são possíveis. O FRAP é incapaz de mensurar polifenóis e tióis de baixa reatividade com o ferro, como a quercetina e os ácidos caféico, ferúlico e tânico, durante o tempo pré-determinado para realização da análise, em média 4 min (BARTOSZ, 2010; JERKOVIC; MARIJANOVIC, 2010; MOMIRUZZAMA et al., 2012; OU et al., 2002).

Apesar dos vieses, a quantificação pelo método FRAP dá uma ideia de como o extrato se comportaria perante aos íons ferro, um dos metais de transição envolvidos na cadeia oxidativa da DA. Embora o aumento do estresse oxidativo seja um mecanismo patológico bem reconhecido na DA, a gênese deste processo não foi bem esclarecida e diversas possibilidades foram inferidas, uma delas seria a presença de metais de transição (CHAKRABARTI et al., 2013).

Nos extratos de pimenta do reino a piperina pode ser responsabilizada por parte da atividade antioxidante encontrada. Estudos realizados *in vitro* demonstraram que este alcaloide, através de sua forte habilidade em doar hidrogênio, é capaz de inibir e/ou quelar metais, RL e ROS (GÜLÇİN, 2005).

Quanto aos ensaios por DPPH e ABTS, as discrepâncias foram menores quando comparados às encontradas para o FRAP. Com exceção do extrato de pimenta rosa, os resultados obtidos para AA foram maiores empregando-se o método ABTS. É característica dos radicais ABTS a capacidade de reagir com compostos lipofílicos e hidrofílicos enquanto o radical DPPH detém apenas afinidade por compostos hidrofílicos (ARNAO, 2000; MONIRUZZAMAN et al., 2012). Tal disparidade pode justificar os maiores teores obtidos pela técnica ABTS.

O PR diferentemente das pimentas do reino apresentou valores mais elevados pelo ensaio DDPH. No entanto, como pode ser observado na Tabela 3, a variação foi baixa, cerca de $30\mu\text{M trolox mL}^{-1}$ de extrato bruto. Como um mesmo antioxidante pode demonstrar reatividades diferentes em vários ensaios (BARTOSZ, 2010), infere-se que a variação encontrada esteja relacionada à seletividade de cada método aos compostos presentes na amostra.

Á exemplo, os carotenoides, em relação aos compostos fenólicos, não são bons supressores de radicais peroxil, mas são excelentes capturadores de oxigênio singlete. Deste modo, a resposta destes antioxidantes perante aos diferentes radicais ou fontes de radicais, pode diferir (KARADARG; OZCELIK; SANER, 2009), contribuindo para os valores discrepantes observados entre métodos.

Através da quantificação de AA, igualmente constatou-se a influência do processamento sobre os compostos bioativos presentes nos extratos de pimenta do reino. Assim como houve redução abrupta dos teores de compostos fenólicos em PB, houve também nestes ensaios uma diminuição significativa em relação a AA. Pesquisas têm demonstrado que frequentemente as cascas de frutos têm alta atividade antioxidante e que o descascamento, como o ocorrido nos grãos de pimenta branca, pode diminuir as AA dos frutos (CHINNICI et al., 2004; EBERHARDT et al., 2000; SALGADO et al., 2012; WU et al., 2004).

A diferença encontrada entre os extratos de pimenta verde e preta foi menor pelo método ABTS em relação ao DPPH. Como já discutido neste item, a avaliação de antioxidantes naturais deve ser cuidadosamente interpretada de acordo com o sistema e o método analítico utilizado, pois pode haver reatividade e seletividade distinta entre os antioxidantes presentes nos extratos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Apesar deste trabalho não ter analisado a ação do extrato perante peroxidação lipídica é de interesse que a mesma seja desempenhada, uma vez que, a oxidação lipídica é um dos fatores relacionados ao estresse oxidativo em cérebros de pacientes com DA.

Outra etapa de igual importância é a realização de ensaios biológicos *in vivo*. Somente a quantificação da atividade antioxidante não é capaz de oferecer informação suficiente sobre o desempenho do extrato no organismo, afinal um composto com atividade antioxidante também apresenta outras funções fisiológicas, não necessariamente equivalentes (BARTOSZ, 2010).

Testes *in vitro*, todavia, é uma etapa inicial importante para averiguar o potencial dos extratos estudados. E a partir dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que em termos de antioxidantes o extrato de pimenta rosa, dentre os analisados é o mais indicado.

2.3.4 Atividade inibitória de AChE

Dentre os extratos de pimenta testados somente a PB não apresentou comportamento dose-dependente, variando não linearmente entre 25 a 28% de inibição entre a maior e menor dosagem testada. Os gráficos de % de inibição x concentração podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 - Gráficos da inibição da acetilcolinesterase *versus* concentração de extrato bruto. PR (pimenta rosa); PP (pimenta preta); PV (pimenta verde) e PB (pimenta branca)

A partir da equação da reta foram calculados os valores de IC₅₀ para cada extrato de pimenta (Tabela 4). O extrato de pimenta rosa apresentou os melhores resultados, maior porcentual de inibição em menor dosagem ($p \leq 0,05$).

Em relação às pimentas do reino o extrato de PP destacou-se em relação a PV, apresentando respectivamente 32 e 20% de inibição enzimática na concentração de 1 mg mL^{-1} . Na mesma concentração o extrato de pimenta rosa atingiu 89% de inibição. Os valores de IC₅₀ para PB não foram calculados, pois o extrato apresentou atividade inibitória inferior a 50% (Figura 2).

Tomando como referência as % de inibição classifica-se os extratos PR, PP e PV, como fortes inibidores de AChE e PB como moderado inibidor enzimático. Extratos derivados de plantas com porcentagens de inibição enzimática maiores que 60% são considerados fortes inibidores de AChE (KHAN et al., 2006), entre 15-50% de ação moderada (ADSERSEN et al., 2006) e menores que 15% de ação insignificante (ADEWUSI et al., 2010).

Tabela 4 - Valores de IC₅₀ (mg) dos extratos de pimenta do reino e pimenta rosa

Extrato	IC ₅₀ (mg)
Pimenta Rosa (PR)	0,50 ^a
Pimenta Preta (PP)	1,94 ^b
Pimenta Verde (PV)	4,21 ^c
Pimenta Branca (PB)	-

Resultados são a média $\pm$ D.P

*Letras diferentes representam diferença estatística ao nível de 5% de significância

Quando comparados a fisostigmina, padrão positivo, os extratos necessitaram de concentrações mais elevadas para atingirem as mesmas % de inibição. Possivelmente a diferença encontrada deve-se a presença de compostos inertes a atividade anticolinesterásica e/ou interação negativa entre moléculas componentes dos extratos de pimenta.

O processo de fracionamento ao excluir da amostra moléculas inativas e interferentes, proporciona maior eficácia em menor dosagem, podendo ser uma ferramenta interessante para reduzir os IC₅₀ dos extratos de pimenta. Em estudo com *Tabernaemontana catharinensis*, Nicolai et al. (2013) avaliaram a atividade anticolinesterásica do extrato bruto e frações derivadas. Os resultados demonstraram que em geral as frações obtiveram valores IC₅₀ ($2\text{-}18 \mu\text{g mL}^{-1}$) menores que o extrato bruto ($261 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Contudo, ao mesmo tempo em que a heterogeneidade e complexidade presente em amostras de alimentos e extratos derivados podem reduzir a atividade anticolinesterásica, ressalta-se que ações sinérgicas favoráveis também podem ocorrer. Os resultados obtidos para atividade anticolinesterásica de *Nelsonia canescens* podem ser citados como exemplo, todos os extratos testados obtiveram % de inibição maiores aos encontrados para substâncias isoladas como a quercetina, ácido cinâmico, cafeico e P-cumárico, apigenina, luteolina, rutina e quercetina na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ (OUATTARA et al., 2014).

Apesar do uso de concentrações menores serem desejáveis pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos funcionais, ao implicarem em redução de custos e facilidade de ingestão pelo consumidor, extratos de natureza complexa, como os investigados neste trabalho podem ser mais interessantes do ponto de vista holístico da DA. Isso porque, carregam em sua composição substâncias que podem atuar em outros pontos-chaves da DA, como estresse oxidativo e processos inflamatórios.

O uso de anticolinesterásicos apesar de ser a principal via de tratamento da DA é criticado justamente por não atuar prevenindo e combatendo outras alterações fisiológicas provocadas por esta patologia (ANANDA; GILL; MAHDI, 2014; KONRATH et al., 2013). É precisamente neste ponto que os extratos naturais devem se inserir e diferenciarem-se.

Até o momento nenhum trabalho relatou ou avaliou a atividade anticolinesterásica nas pimentas branca, verde e rosa, sendo, portanto, os resultados alcançados inéditos. Quanto à pimenta preta foram encontrados taxas de inibição de 58% (INGKANINAN et al., 2003), 50% (TAPPAYUTHPIJARN; ITHARAT; MAKCHUCHIT, 2012) e 26% (YANG et al., 2011) na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, valores estes superiores aos 17% obtidos neste trabalho.

Comparações entre resultados são difíceis e pouco ilustrativas. Afinal modificações, mesmo que pequenas, sejam no cultivo e manejo das pimentas, preparo da amostra, metodologia aplicada e/ou escolha do solvente de extração podem implicar em variações nos resultados (GRACE et al., 2014; LUTHRIA, 2009; MARTÍNEZ-ESPLÁ et al., 2014; RATHNAWATHIE; BUCKLE, 1983; TAN; TAN; HO, 2013).

Adicionalmente a piperina durante o armazenamento ou sob luz direta é convertida em seus isômeros (KOZUKUE et al., 2007). Como este alcaloide tem sido descrito como principal agente anticolinérgico presente em pimenta preta (AHMED et al., 2013; CHONPATHOMPIKUNLERT et al., 2010; MAHDY et al., 2012; RASOOL et al., 2014), modificações isoméricas podem ser responsáveis pela redução ou aumento da atividade anticolinesterásica observada.

Estudos sobre a pimenta rosa são escassos em literatura, principalmente quando o objeto de pesquisa é o fruto. Poucos artigos relatam sua composição fitoquímica, tornando difícil inferir que composto(s) estão associado(s) a sua atividade anticolinesterásica. Os trabalhos existentes têm apontado os polifenóis como responsáveis pelas propriedades farmacológicas, todavia compostos como os monoterpenos, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e ácidos graxos também foram encontrados em altas concentrações (AFFONSO et al., 2012; LIMA et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

Em espécies de salvia (*Salvia* sp), erva cidreira (*Melissa officinalis*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) os terpenos têm sido apontados como os principais integrantes como potencial para o aprimoramento cognitivo e/ou atividade anticolinesterásica (ADEWUSI et al., 2010; AHMED et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2007; MURRAY et al., 2013; ORHAN; ASLAN, 2009). Até 2006, apenas alguns diterpenos tinham demonstrado potencial inibitório (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006), entretanto, pesquisas mais recentes têm demonstrado que diversos compostos pertencentes a este grupo tem capacidade de exercer tanto forte como moderada atividade anticolinesterásica (MURRAY et al., 2013).

Além dos terpenos, outros fitoquímicos presentes no extrato de pimenta rosa também podem ser responsáveis pela % de inibição observada. Compostos fenólicos, flavonoides esteróis também são reconhecidos como agentes promissores no combate a DA ao possuírem atividade anticolinesterásica (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; MUKHERJEE et al., 2007; MURRAY et al., 2013; ORHAN et al., 2009; WILLIAMS; SORRIBAS; HOWES, 2011).

Apesar dos resultados em pimenta preta não serem inéditos, este estudo destaca-se por ter demonstrado que o extrato de PP, entre as pimentas do reino, é a mais indicada como inibidora de AChE, e conseqüentemente para a DA. Dentre os compostos existentes na pimenta do reino, a piperina, tem sido o principal composto associado a atividade anticolinesterásica e os benefícios a DA.

Ao quantificar os teores de piperina em pimenta do reino estudos demonstram que as concentrações deste alcaloide são maiores em pimenta verde, seguida da pimenta preta e branca (FRIEDMAN et al., 2008; RATHNAWATHIE; BUCKLE, 1983). Como atividade anticolinesterásica neste trabalho foi maior em PP acredita-se a piperina não é a única substância atuante. Outros compostos como os terpenos, esteróides e compostos fenólicos e outros alcaloides (MUSENGA et al., 2007; MURTHY; BHATTACHARYA, 2008) presentes nesta pimenta e seu extrato derivado, possivelmente podem atuar sinergicamente a piperina conferido as % de inibição encontrada.

Outra hipótese admissível seria o comportamento não dose dependente da piperina. Neste caso, após nível ótimo, concentrações mais elevadas seriam responsáveis pela queda nas % de inibição. A quantificação da piperina nos extratos e o estudo sobre o potencial anticolinesterásico da piperina isolada podem oferecer respostas mais contundentes sobre esta questão.

Quanto às razões pela diferença encontrada entre as porcentagens de inibição em pimenta do reino acredita-se que sejam justificáveis pelos distintos processamentos empregados nas pimentas preta, verde e branca. Diversos estudos, assim como este trabalho (AGBOR et al, 2006; FRIEDMAN et al., 2008) têm demonstrado que procedimentos pós-colheita são capazes de alterar quantitativamente e qualitativamente os metabólitos presentes nos alimentos, processo este que consequentemente altera a atividade biológica dos alimentos e extratos derivados.

Os resultados alcançados a partir desta análise demonstram a importância destas pimentas como agentes anticolinesterásicos. Dentre as pimentas estudadas a pimenta rosa se destaca, sendo a candidata mais promissora ao desenvolvimento de produtos alimentares ou farmacológicos destinados a redução do risco da DA. Estudos posteriores sobre a composição de metabólitos presentes nestes extratos poderão oferecer informações valiosas sobre quais compostos presentes nestes extratos são responsáveis pelo potencial encontrado. Neste trabalho o processo de identificação foi iniciado e os resultados obtidos podem ser observados no item 2.3.6.

2.3.5 Correlação de Pearson

Não foram encontradas correlações estatisticamente significativas aos níveis de 5 % de probabilidade para todas as variáveis estudadas (Tabela 5).

Em frutas e vegetais os compostos fenólicos têm sido apontados como os principais bioativos relacionados à atividade antioxidante, inclusive, muitos trabalhos têm relatado uma forte correlações positivas entre estas duas variáveis. No entanto os compostos fenólicos não são os únicos compostos a exercerem esta atividade, e por este motivo, correlações não significativas, como as obtidas neste trabalho, também já foram relatadas. No caso das amostras de pimenta do reino, além dos compostos fenólicos existe a piperina, alcaloide reconhecidamente antioxidante. Os terpenos presentes em pimenta rosa e pimenta do reino também podem ser responsáveis por parte da atividade antioxidante observada.

Tabela 5 - Matriz de correlação entre compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP e inibição da acetilcolinesterase em extratos de pimenta do reino e pimenta rosa

	Fenólicos	DPPH	ABTS	FRAP	Acetilcolinesterase
Fenólicos	1	-0.27 ^{ns}	-0.63 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	0,63 ^{ns}
DPPH	ns	1	0,9 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,56 ^{ns}
ABTS	ns	ns	1	-0,23 ^{ns}	0,18 ^{ns}
FRAP	ns	ns	ns	1	-0,45 ^{ns}
Acetilcolinesterase	ns	ns	ns	ns	1

ns=não significativo p < 0,05

Além da existência de outras moléculas antioxidantes, a inexistência de correlação significativa entre o teor de fenólicos e AA pode estar relacionada à inatividade antioxidante de alguns fenólicos presentes na amostra. Acredita-se que os fenólicos não sejam ativos até que hidroxilações orto-ou-para tenham aumentado a densidade de elétrons no grupo hidroxila e diminuído a energia de ligação entre o oxigênio e o hidrogênio, aumentando assim a sua reatividade (GÜLÇİN, 2012). Fatores como a posição e o número de hidroxilas são também determinantes da eficácia desta molécula perante o radical oxidante (HEINONEN; LEHTONEN; HOPIA, 1998).

Assim como os compostos fenólicos não são os únicos fitoquímicos responsáveis pela AA, a existência de outros compostos também pode ter influenciado na atividade anticolinesterásica observada, justificando a ausência de correlação significativa entre estas duas variáveis. De fato em pimenta do reino a piperina têm sido citada como principal contribuinte (AHMED et al., 2013; BUTT et al., 2013; CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010).

A razão pela ausência de correlação significativa encontrada neste trabalho, entre os métodos de avaliação da AA pode ser justificada pela peculiaridade de cada método. Como discutido no item 2.3.3 as técnicas para mensurar AA têm distinta seletividade aos compostos antioxidantes presentes na amostra, ao mesmo tempo, em que estes apresentam respostas diferentes perante distintos radicais ou fontes de radicais.

A inexistência de correlação entre os três métodos para mensurar AA e atividade anticolinesterásica demonstraram que não necessariamente os compostos capazes de reduzir radicais livres são também responsáveis pela inibição da enzima AChE. Sob o ponto de vista da DA é de interesse que os compostos presentes no extrato exibam atividade biológica

direcionada, seja reduzindo o estresse oxidativo ou inibindo a AChE, pois desta forma evita-se que haja competição entre estes dois pontos chave desta patologia.

2.3.6 Análise por LC-MS

Mediante as resultados obtidos nas análises bioquímicas, este trabalho, julgou importante analisar alguns questionamentos:

- São as diferenças encontradas nas análises bioquímicas provenientes de uma composição fitoquímica diferencial entre os grãos de pimenta preta, verde, branca e rosa?
- No caso das pimentas do reino, foi o processamento capaz de modular a composição de metabólitos secundários?
- O procedimento de produção do extrato foi responsável pela perda de compostos biologicamente ativos?

Dentre as técnicas capazes de mensurar estas mudanças esta a análise do perfil metabolômico. Para tal foi realizada a análise de LC-MS em amostras de pimentas do reino e pimenta rosa submetidas ao processo de extração dos grãos (EG) e extração do extrato (EE). Como alimentos são matrizes complexas de alta diversidade química as amostras foram analisadas nos modos operacionais ESI (+) e ESI (-).

Neste trabalho foram realizadas comparações entre os perfis metabolômicos, análise dos componentes principais e da importância da variável em projeção. Em passos futuros será realizada a identificação dos possíveis metabólitos via espectrometria de massas sequencial (MS/MS).

2.3.6.1 Perfis metabolômicos

Comparando cromatogramas de EG, para o MS operando no ESI (+), na Figura 3, nota-se que as pimentas do reino apresentam uma maior diversidade de compostos (indicado pelo número de picos cromatográficos) em relação à pimenta rosa. Corrobora com esta afirmação o fato de terem sido contabilizados para a pimenta preta, verde, branca e rosa, respectivamente 277, 278, 271 e 30 possíveis metabólitos. Estes valores foram obtidos após o tratamento dos dados processados pelo software Markerlynx (Water) e podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Número de possíveis metabólitos em pimenta do reino e pimenta rosa

Modo Operacional	Amostra	Nº metabólitos na extração dos grãos de pimenta	Nº metabólitos na extração do extrato de pimenta
POSITIVO	Pimenta Rosa	30	12
	Pimenta Preta	277	51
	Pimenta Verde	278	51
	Pimenta Branca	271	43
NEGATIVO	Pimenta Rosa	135	37
	Pimenta Preta	124	48
	Pimenta Verde	136	69
	Pimenta Branca	115	17

Figura 3 - Comparação entre os cromatogramas obtidos via ESI (+)-MS, característicos das amostras de pimenta do reino e pimenta rosa com extração do grão (EG). PB (pimenta branca); PP (pimenta preta); PV (pimenta verde) e PR (pimenta rosa)

Figura 4 - Comparação entre os cromatogramas obtidos via ESI (+)-MS, característicos das amostras de pimenta do reino e pimenta rosa com extração do extrato (EE). PB (pimenta branca); PP (pimenta preta); PV (pimenta verde) e PR (pimenta rosa)

É possível observar a semelhança entre as amostras de pimenta do reino através do perfil cromatográfico obtido, os quais estão bem distribuídos por todo o tempo de corrida. Quanto ao espectro de pimenta rosa observa-se menor abundância de metabólitos ionizados (30 íons), estando os picos concentrados nas faixas de 6 a 8 minutos e de 11 a 14 minutos. Uma boa distribuição dos picos pelo cromatograma demonstra que o tempo de corrida adotado foi o ideal para os propósitos deste trabalho.

Dentre as similaridades observadas entre os cromatogramas das amostras EG de pimenta do reino e pimenta rosa, para o MS operando no ESI (+) estão os picos retidos no tempo de 13,27 de m/z 550,6325 e 6,03 minutos de m/z 256,2697. Apesar de estarem presentes em todas as pimentas estudadas a intensidade do pico de m/z 550,6325 variou e encontrar-se mais intenso na pimenta rosa (Figura 3).

Igualmente nos cromatogramas das amostras EE, para o MS operando no ESI (+), (Figura 4) houve uma maior paridade entre os extratos de pimenta do reino. Contudo, interessante, foram comuns as amostras de PB, PP, PV e PR os picos retidos em 11,9 de m/z 522,6199 e 13,03 minutos de m/z 550,6505. Além destes dois picos as amostras PP e PB apresentaram em comum o pico de m/z 531,4352 a 13,88 minutos de corrida, porém em intensidades distintas.

Dentre as pimentas do reino dois picos foram exclusivos, um para PV (m/z 334,3277 a 7,36 min) e outro para PB (m/z 338,3521 a 9,38 min). Em termos de diversidade novamente os EE de pimenta do reino se destacaram em relação à pimenta rosa. Após o tratamento dos dados foram obtidos para pimenta preta, verde, branca e rosa, respectivamente 51, 51, 43 e 12 possíveis metabólitos. Quanto à distribuição houve uma maior concentração de metabólitos no início da corrida para os extratos de pimenta do reino.

Entre as amostras de EG, para o MS operando no ESI (-), Figura 5, foi igualmente observado similaridade entre os picos para as pimentas do reino, sendo estas repetições biológicas visualmente distintas a pimenta rosa. Contudo, neste modo operacional, as amostras EG para pimenta rosa exibiram número próximo de possíveis metabólitos as demais pimentas analisadas. Foram contabilizados para a pimenta preta, verde, branca e rosa, respectivamente 124, 136, 115 e 135 íons. Houve também uma maior concentração de picos entre os 9 primeiros minutos de corrida, para a pimenta rosa.

Figura 5 - Comparação entre os cromatogramas obtidos via ESI (-)-MS, característicos das amostras de pimenta do reino e pimenta rosa com extração do grão (EG). PB (pimenta branca); PP (pimenta preta); PV (pimenta verde) e PR (pimenta rosa)

Figura 6 - Comparação entre os cromatogramas obtidos via ESI (-)-MS, característicos das amostras de pimenta do reino e pimenta rosa com extração do extrato (EE). PB (pimenta branca); PP (pimenta preta); PV (pimenta verde) e PR (pimenta rosa)

Diferentemente dos espectros anteriores, em que existia uma sugestão de similaridade entre as amostras de pimenta do reino, as amostras EE no MS operando no ESI (-) sugerem uma maior disparidade entre todas as amostras avaliadas (Figura 6). Os possíveis metabólitos foram detectados somente no início da corrida, sendo as amostras EE para o PB a menos diversa em metabólitos. Foram contabilizados para a pimenta preta, verde, branca e rosa, respectivamente 48, 69, 17, 37 íons.

Comparativamente os espectros obtidos para as amostras EG, sejam no MS operando no ESI (-) ou ESI (+), foram mais ricos em metabólitos do que EE (Tabela 6). Este resultado demonstra que o processo empregado para obtenção dos extratos PB, PP, PV e PR induziu uma perda significativa de compostos. Identificar quais metabólitos estão ausentes nestes extratos permitirá avaliar se houve também perda de compostos relacionados a DA. Dentre as variáveis possivelmente responsáveis pela perda de fitoquímicos estão o solvente, período de extração prolongado e emprego de temperatura elevada.

Com exceção das amostras de EE no ESI (-) é possível notar que em todos os cromatogramas das repetições biológicas de pimenta do reino, o pico mais intenso observado no perfil (pico base) tem tempo de retenção 2,2 e valor de m/z 286,1209 (Figuras 3, 4 e 5). Foi possível identificar, com um erro no valor de massa menor que 0,05, e adulto $[M+H]^+$ através do banco de dados HMDB (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB29377>) que este m/z (286,1209), possivelmente é referente à piperina, alcaloide típico deste condimento de formula molecular $C_{17}H_{19}NO_3$ que está relacionado às atividades anticolinesterásicos e antioxidante.

2.3.6.2 Análise de componentes principais (PCA)

Os dados obtidos via LC-MS (espectros de massas e os cromatogramas) foram processados através da análise multivariada. Nas Figuras 7 e 8 podem ser observados os gráficos de PCA, gerados para os grupos EG e EE.

O PCA é uma ferramenta estatística exploratória e não supervisionada que agrupa as amostras de acordo com suas maiores similaridades (CANEVAROLO, 2012). Esta análise muito empregada em análises de “fingerprints” de metabólicos (BAILEY et al., 2003; DEFERNEZ; COLQUHOUN, 2003) busca reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados iniciais, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível (DA SILVA, 2011; WISHART, 2008). Os gráficos de PCA não refletem necessariamente a segregação originalmente estabelecida, mas sim a segregação mais significativa do ponto estatístico (CANEVAROLO, 2012).

Figura 7 - Gráficos de PCA 3D score plot obtidos para LC-MS operando no modo positivo (ESI (+)). As amostras com extração do grão EG são representados no gráfico (A) e as amostras com extração do extrato EE no gráfico (B). PR (pimenta rosa); PP (pimenta preta); PV (pimenta verde) e PB (pimenta branca)

Figura 8 - Gráficos de PCA 3D score plot obtidos para LC-MS operando no modo positivo (ESI (-)). As amostras com extração do grão EG são representados no gráfico (A) e as amostras com extração do extrato EE no gráfico (B). PR (pimenta rosa); PP (pimenta preta); PV (pimenta verde) e PB (pimenta branca)

Os grupos de amostras são considerados significativamente distintos, quando a variância, soma dos dois primeiros componentes principais (PCs), é superior a 50%. No ESI (+) obteve-se para as amostras EG e EE, variância de 85% e 84%, respectivamente. No ESI (-) os valores obtidos foram 55% para o grupo EG e 53% para o grupo EE. Apesar de ser

esperada esta diferença entre as pimentas do reino e pimenta rosa, por serem frutos de ordens vegetais distintas, não se esperava uma distinção tão significativa entre as pimentas do reino, frutos da mesma espécie.

Estes resultados, no entanto, corroboram os observados nas análises bioquímicas, tornando evidente que o processamento empregado nas pimentas do reino é capaz de modular o perfil de metabólitos ao ponto de separá-las em grupos distintos.

Apesar da variância, é possível observar que no grupo EG houve agrupamento das amostras de pimentas do reino em mesmo plano, estando mais distantes à pimenta rosa do que entre si. Esta tendência é visível em ambos os modos (ESI (+) e ESI (-)). Ao mesmo tempo, nota-se que nos PCAs gerados para o grupo EG, as amostras estão claramente melhor separadas e delimitadas do que em relação ao conjunto de dados EE, no qual houve aproximação de algumas amostras.

No grupo EE, no ESI (+), o extrato de pimenta preta se aproximou ao extrato de pimenta verde. Esta disposição permaneceu no ESI (-), contudo, menos intensa. Foi também notada uma nítida tendência de aproximação do extrato PR ao PP.

Como discutido no item 2.3.6.1 o processo de extração empregado neste estudo evidentemente reduziu a diversidade de metabólitos. Esta “homogeneização”, consecutivamente, aumenta a tendência de aproximação entre as amostras, as quais foram visualizáveis nos PCAs gerados para as amostras EE. Ressalta-se, no entanto, que o procedimento empregado para a obtenção dos extratos ainda permitiu a separação das amostras, vide variâncias, não sendo os perfis metabólicos iguais uns aos outros.

2.3.6.3 Importância da variável em projeção (VIP - *Variable Importance in Projection*)

A análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é descrita como uma ferramenta estatística que busca evidenciar as similaridades ou diferenças específicas através da organização de PCs. No caso, a presença e/ou ausência de determinados metabólitos em pimenta do reino e pimenta rosa. Diferentemente do PCA, o PLS-DA é um método supervisionado de reconhecimento de padrões (CANEVAROLO, 2012).

Figura 9 - Os 15 íons que mais contribuiu para a variância entre os grupos obtidos para LC-MS operando no modo positivo (ESI (+)) e negativo (ESI (-)). As amostras com extração do grão EG são representados no gráfico (A) e as amostras com extração do extrato EE no gráfico (B). A cor verde indica maior intensidade relativa no respectivo grupo e a vermelha menor intensidade relativa no grupo. R (pimenta rosa); P (pimenta preta); V (pimenta verde) e B (pimenta branca)

Assim como o PCA, o PLS-DA demonstrou uma significativa separação dos grupos amostrais EG e EE em ambos os modos operacionais do MS ((ESI (+) e ESI (-)). Os valores de variância obtidos no ESI (+) para as amostras EG e EE foram ambos de 85%. Enquanto no ESI (-) os valores obtidos foram 52% para o grupo EG e 48 % para o grupo EE. Igualmente

ao PCA houve também no PLS-DA uma maior segregação dos grupos no ESI (+) do que no ESI (-).

Para identificar quais variáveis foram responsáveis pelas segregações o parâmetro VIP foi utilizado para selecionar as variáveis que apresentam contribuição mais significativa para discriminar os perfis de metabolômicos gerados. O VIP, em linhas gerais explica a importância da variável para todo o modelo (BOGDANOV et al., 2008). Os VIPs contendo os 15 íons com maior efeito discriminatório entre as amostras EG e EE de pimenta do reino e pimenta rosa podem ser visualizados na Figura 10.

A partir destes 15 íons será realizada a análise de fragmentação via MS/MS, com o intuito de identificar os íons responsáveis pelo efeito discriminatório observado.

Embora não tenha sido realizada a identificação dos metabólitos algumas informações interessantes puderam ser extraídas comparando os VIPs. A pimenta rosa, apesar de ter apresentado os melhores resultados nas análises bioquímicas não apresentou nenhum possível metabólito com alto potencial discriminatório, dentre os 15 íons investigados. Outro fato interessante é que no ESI (-) as amostras EE de pimenta verde foram responsáveis, como exceção do íon m/z 329,2081, por todas as contribuições mais significativas entre os perfis de metabolômicos gerados.

Quando comparados os VIPs de EG e EE notou-se que alguns dos possíveis metabólitos foram mantidos mesmo após o procedimento de produção do extrato. No ESI (+) foram encontrados os seguintes íons em comum m/z 362,3556; 272,1434 e 334,3273. O primeiro tendo alto valor discriminatório em pimenta branca e preta, o segundo somente em pimenta branca e terceiro em pimenta verde e preta.

Igualmente foram encontrados três íons presentes em ambas às amostras do grupo EC e EE no ESI (-), são eles m/z 504,4510; 520,2457 e 476,2669. Estes possíveis metabólitos sempre apresentaram maior valor discriminatório na pimenta verde.

Pelos dados obtidos até o momento pode-se concluir que o processamento empregado para a extração foi capaz de modular o perfil metabólito das pimentas do reino. Respondendo a um das questões levantadas no item 2.3.6. Contudo somente a identificação dos compostos poderá responder se a diferença de composição está relacionada aos resultados obtidos nas análises bioquímicas, bem como se houve perda de compostos biologicamente ativos durante o processo de produção do extrato. Em trabalhos futuros a elucidação estrutural dos metabólitos com alto potencial discriminatório será realizada através do experimento de MS/MS.

3 CONCLUSÃO

Do presente trabalho foram sugeridas as seguintes conclusões:

O extrato de pimenta rosa apresenta o maior teor de compostos de fenólicos totais, a melhor atividade antioxidante e anticolinesterásica em comparação aos extratos de pimenta do reino.

Dentre as pimentas do reino, a pimenta verde destaca-se com os maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS.

A pimenta preta, das pimentas do reino investigadas, apresenta os melhores resultados para as análises de atividade anticolinesterásica e atividade antioxidante pelo método FRAP.

As correlações entre os métodos antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP), atividade anticolinesterásica e teor de compostos fenólicos totais foram não significativas.

As pimentas preta, verde, branca e rosa são significativamente distintas entre si quanto ao perfil metabolômico.

O espectro obtido para as amostras EG, seja no MS operando no ESI (-) ou ESI (+), foram sempre mais ricos em metabólitos do que EE.

O m/z 286,1209 presente nas amostras de pimenta do reino possivelmente se refere à piperina, alcaloide típico deste condimento.

O processamento das pimentas do reino induz modificações quantitativas e qualitativas sobre a composição fitoquímica deste condimento.

A pimenta rosa não apresentou nenhum possível metabólito com alto potencial discriminatório, dentre os 15 íons investigados.

No ESI (-) as amostras EE de pimenta verde foram responsáveis, exceto íon de m/z 329,2081, por todas as contribuições mais significativas entre os perfis de metabolômicos gerados.

A pimenta rosa apresenta o maior potencial na redução de risco da DA, dentre as pimentas investigadas.

REFERÊNCIAS

- ADEWUSI, E.A.; MOODLEY, N.; STEENKAMP, V. Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: a review. **African Journal of Biotechnology**. Nairobi, v. 9, n. 49, p. 8257–8276, Dec. 2010.
- AFFONSO, C.R.; FERNANDES, R.M.; OLIVEIRA J.M.G. de; MARTINS, M-C.C.; LIMA, S.G. de; SOUSA JÚNIOR G.R. de; FERNANDES, M-Z.L.C.M; ZANINI, S.F. Effects of the essential oil from fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) on reproductive functions in male rats. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. São Paulo, v. 23, n. 1, p.180–185, Jan. 2012.
- AGBOR, G.A.; VINSON, J.A.; OBEN, J.E.; NGOGANG, J.Y. Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of white and black pepper. **Nutrition Research**. New York, v. 26, n. 12, p. 659-663, Dec. 2006.
- AGIS-TORRES, A.; SÖLLHUBER, M.; FERNANDEZ, M.; SANCHEZ-MONTERO J.M. Multi-target-directed ligands and other therapeutic strategies in the search of a real solution for alzheimer's disease. **Current Neuropharmacology**. San Francisco, v. 12, n. 1, p. 2–36, Jan. 2014.
- AHMAD, B.; KHAN, H.; BASHIR, S.; NISAR, M.; HASSAN, M. Inhibition activities of colchicum luteum baker on lipoxygenase and other enzymes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. London, v. 21, n. 4, p. 449–452, Aug. 2006.
- AHMED, H.H.; SALEM, A.M.; SABRY, G.M.; HUSEIN, A.A.; KOBOT, S.E. Possible therapeutic uses of *Salvia triloba* and *Piper nigrum* in Alzheimer's disease-induced rats. **Journal of Medicinal Food**. Larchmont, v. 16, n. 5, p. 437-446, May, 2013.
- ALUISE, C.D.; ROBINSON, R.A.; BECKETT, T.L.; MURPHY, M.P.; CAI, J.; PIERCE, W.M.; MARKESBERY, W.R.; BUTTERFIELD, D.A. Preclinical Alzheimer's disease: brain oxidative stress, amyloid-beta peptide and proteomics. **Neurobiology of Disease**. Orlando, v. 39, n. 2, p.221-228, Aug. 2010.
- ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; VIDALAND, A.; BATTINO, M. Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 5, n. 4, p. 293-302, Oct. 2009
- ALVIN, N.A. **Enfermagem e as práticas naturais de saúde**: um estudo de representações docentes. 10. ed. Rio de Janeiro: Grafiline, 1997. 190 p.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia : the Journal of the Alzheimer's Association**, Orlando, v. 8, n. 2, p. 131–168, Mar. 2012.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **World alzheimer report 2009**. Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2014.

_____. **World Alzheimer report 2013 journey of caring: an analysis of long-term care for dementia.** Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2013.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2014.

ANANDA, R.; GILL, K.D.; MAHDI, A.A. Neuropharmacology therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 76, p. 27-50. Jan. 2014.

ANEKONDA, T.S.; REDDY, P.H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 361-376, Dec. 2005.

ANDREASEN, N.; VANMECHELEN, E.; VAN DE VOORDE, A.; DAVIDSSON, P.; HESSE, C.; TARVONEN, S.; RÄIHÄ, I.; SOURANDER, L.; WINBLAD, B.; BLENNOW, K. Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**. London, v. 64, n. 3, p. 298-305, Mar. 1998.

ANSARI, M.A.; SCHEFF, S.W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. Baltimore, v. 69, n. 2, p. 155-167, Feb. 2010.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v. 11, n. 1, p. 419-421, Nov. 2000.

BALDEIRAS, I.; SANTANA, I.; PROENÇA, M.T.; GARRUCHO, M.H.; PASCOAL, R.; RODRIGUES, A.; DURO, D.; OLIVEIRA C.R. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. Amsterdam, v.15, n. 1, p. 117-128, Sept. 2008.

_____. Oxidative damage and progression to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. **Journal of Alzheimer's Disease**. Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 1165-1177, Aug. 2010.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D.; PAULA, V.F.; ISMAIL, F.M.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, May 2007.

BARTOSZ, G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine. **Free Radical Research**, London, v. 44, n. 7, p. 711-720, July 2010.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, n. 1, p. 245-313, Jan. 2007.

BELTRÃO, K.I.; CAMARANO, A.A.; KANSO, S. **Dinâmica populacional brasileira na virada do século XX**. Rio de Janeiro: IPEA, 2004. 69 p. (Texto para Discussão, 1034).

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 6, p. 466-472, Aug. 2010.

BENZI, G.; MORETTI, A. Age-and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.19, n. 1, p. 77–101, July 1995.

BERTOLDI M. C. **Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 2006. 116 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) — Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BIRD, T.D.; STRANAHAN, S.; SUMI, S.M.; RASKIND, M. Alzheimer's disease: choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups. **Annals of Neurology**, Boston, v. 14, n. 3, p. 284-293, Sept. 1983.

BOEING, H.; BECHTHOLD, A.; BUB, A.; ELLINGER, S.; HALLER, D.; KROKE, A.; LESCHIK-BONNET, E.; MÜLLER, M.J.; OBERRITTER, H.; SCHULZE, M.; STEHLE, P.; WATZL, B. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 51, n. 6, p. 637–663, Sept. 2012

BOYD-KIMBALL, D.; SULTANA, R.; ABDUL, H.M.; BUTTERFIELD, D.A. γ -glutamylcysteine ethyl ester-induced up-regulation of glutathione protects neurons against A β (1–42)-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Research**, New York, v. 79, n. 5, p. 700-706, Mar. 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, July 1995.

BROOKMEYER, R.; EVANS, D.A.; HEBERT, L.; LANGA, K.M.; HEERINGA, S.G.; PLASSMAN, B.L.; KUKULL, W.A. National estimates of the prevalence of Alzheimer's disease in the United States. **Alzheimer's & Dementia: the Journal of the Alzheimer's Association**. Orlando, v. 7, n. 1, p. 61–73, Jan. 2011.

BUCKHOLTZ, N.S. Perspective: in search of biomarkers. **Nature**, London, v. 475, n. 7355, p. 8, July 2011.

BUERGER, K.; EWERS, M.; PIRTILA, T.; ZINKOWSKI, R.; ALAFUZOFF, I.; TEIPEL, S.J.; DEBERNARDIS, J.; KERKMAN, D.; MCCULLOCH, C.; SOININEN, H.; HAMPEL, H. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. **Brain: a Journal of Neurology**, London, v. 129, n. 11, p. 3035-3041, Nov. 2006.

BRADLEY, M.A.; XIONG-FISTER, S.; MARKESBERY, W.R.; LOVELL M.A. Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 33, n. 6, p. 1034–1044, June 2012.

BRÜHLMANN, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P.A.; TESTA, B. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 1, n. 6, p. 819–829, June 2004.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales**, Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1999. 1112 p.

BUTT, M.S.; SULTAN, M.T.; BUTT, M.S.; IQBAL, J. Garlic: nature's protection against physiological threats. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 49, n. 6, p. 538–551, June 2009

BUTT, M.S.; PASHA, I.; SULTAN, M.T.; RANDHAWA, M.A.; SAEED, F.; AHMED W. Black pepper and health claims: a comprehensive treatise black pepper and health claims. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 53, n. 9, p. 37-41, Sept. 2013.

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

CANEVARI, L.; ABRAMOV, A.Y.; DUCHEN, M.R. Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. **Neurochemical Research**, New York, v. 29, n. 3, p. 637–650, Mar. 2004

CARLINI, E.A.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 140-146, Apr./May 2010.

CARRASQUILLO, M.M.; BELBIN, O.; ZOU, F.; ALLEN M.; ERTEKIN-TANER, N.; ANSARI, M.; WILCOX, S.L.; KASHINO, M.R.; MA, L.; YOUNKIN, L.H.; YOUNKIN, S.G.; YOUNKIN, C.S.; DINCIN, T.A.; HOWARD, M.E.; HOWELL, C.C.; STANTON, C.M.; WATSON, C.M.; CRUMP, M.; VITART, V.; HAYWARD, C.; HASTIE, N.D.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; POLASEK, O.; BROWN, K.; PASSMORE, P.; CRAIG, D.; MCGUINNESS, B.; TODD, S.; KEHOE, P.G.; MANN, D.M.; SMITH, A.D.; BEAUMONT, H.; WARDEN, D.; HOLMES, C.; HEUN, R.; KÖLSCH, H.; KALSHEKER, N.; PANKRATZ, V.S.; DICKSON, D.W.; GRAFF-RADFORD, N.R.; PETERSEN, R.C.; WRIGHT, A.F.; YOUNKIN, S.G.; MORGAN, K. Concordant Association of Insulin Degrading Enzyme Gene (IDE) variants with IDE mRNA, A β , and Alzheimer's disease. **PloS one**, San Francisco, v. 5, n. 1, p. 8764, Jan. 2010.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 158-169, May 2013.

CHAKRABARTI, S.; SINHA, M.; THAKURTA, I.G.; BANERJEE, P.; CHATTOPADHYAY, M. Oxidative stress and amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease: intervention in a complex relationship by antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 20, n. 37, p.4648-4664, 2013.

CHEN, H.; YOSHIOKA, H.; KIM, G.S.; JUNG, J.Y.; OKAMI, N.; SAKATA, H.; MAIER, C.M.; NARASIMHAN, P.; GOEDERS, C.E.; CHAN, P.H. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 14, n. 8, p.1505-1517, Apr. 2011.

CHINNICI, F.; BENDINI, A.; GAIANI, A.; RIPONI, C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 15, p. 4684–4689, July 2004.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S.; Piperine: The main alkaloid of Thai black pepper protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 798-802, Mar. 2010.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, Oct. 2010.

DE SOUZA, A.R.M.; ARTHUR, V.; PIRES, D.N. The effect of irradiation in the preservation of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 81, n. 8, p.1082-1083, Aug. 2012.

DE SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA, J. M. Jr. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 549–558, July 2005.

DE VOS, R.C.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J.J.; BINO, R.J.; HALL, R.D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 4, p. 778-791, Apr. 2007.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 10, p. 4313-4318, May 2009.

DOORN J.A.; PETERSEN, D.R. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 143/144, p. 93–100, Feb. 2003.

EBERHARDT, M.V.; LEE, C.Y.; LIU, R.H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**. London, v. 405, n. 6789, p. 903–904, June 2000.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v. 7, n. 2, p. 88-95, July 1961.

EMBRAPA. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza, 2006. 4 p. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/cot_125.pdf>. Acesso em: 11 out. 2013.

_____. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza, 2007. 4 p. Disponível em: <www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf>. Acesso em: 10 out. 2013.

FAO. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 18 jun. 2014.

FERRITER, A. **Brazilian peppertree management plan for Florida**. Task Force: Florida Exotic Pest Plant Council, Brazilian Peppertree, Florida, 1997. 27 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Alzheimer's disease: FDA's role in new product development**. 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm110879.htm>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

FRIEDMAN, J. Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? In: GADOTH, N.; GÖBEL, H.H. (Ed.). **Oxidative stress and free radical damage in neurology**. New York: Humana Press, 2011. p. 19-28.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C.E.; LEE, S.U.; LEE, J.S.; OHNISI-KAMEYAMA, M.; KOZUKUE, N. Analysis by HPLC and LC/MS of pungent piperamides in commercial black, white, green, and red whole and ground peppercorns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 9, p. 3028-3036, May 2008.

GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adhesion & Migration**, Austin, v. 3, n. 1, p. 88-93, Jan. 2009.

GLASS, C.K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M.C.; GAGE, F.H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 918-934, Mar. 2010.

GRACEA, M.A.; YOUSEFA G.G.; GUSTAFSONA, S.J.; TRUONGB, V-D.; YENCHOC, G.C.; LILA M.A. Phytochemical changes in phenolics, anthocyanins, ascorbic acid, and carotenoids associated with sweet potato storage and impacts on bioactive properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 145, p. 717-724, Feb. 2014.

GOLDSBURY, C.; WHITEMAN, I.T.; JEONG, E.V.; LIM, Y.A. Oxidative stress increases levels of endogenous amyloid-beta peptides secreted from primary chick brain neurons. **Aging Cell**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 771-775, Oct. 2008.

GOMES, D.L.S. A fitoterapia e a homeopatia como práticas médicas alternativas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 38, p. 329-348, 1985.

GOOD, P.F.; WERNER, P.; HSU, A.; OLANOW, C.W.; PERL, D.P. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 149, n. 1, p. 21-28, July 1996.

GU, F.; TAN, L.; WU, H.; FANG, Y.; WANG, Q. Analysis of the blackening of green pepper (*Piper nigrum* Linnaeus) berries. **Food Chemistry**, Barking, v. 138, n. 2/3, p. 797-801, June 2013.

GULZAR, T.; UDDIN, N.; SHAHEEN, B.S.; NAQVI, S.N.S.; BEGUM S.; TARIQE R.M. New constituents from the dried fruit of *Piper nigrum* Linn., and their larvicidal potential against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, London, v. 6, n. 2, p. 219-223, May 2013.

GÜLÇİN, I. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 56, n. 7, p. 491-499, Nov. 2005.

_____. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 86, n. 3, p. 345-391, Mar. 2012.

GUPTA, S.K.; BANSAL, P.; BHARDWAJ, R.K.; VELPANDIAN, T. Comparative antinociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, London, v. 41, n. 6, p. 657-662, June 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 888 p.

HEINONEN, M.; LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A.I. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 46, n. 1, p. 25-31, Jan. 1998.

HENSLEY, K.; HALL, N.; SUBRAMANIAM, R.; COLE, P.; HARRIS, M.; AKSENOV, M.; AKSENOVA, M.; GABBITA, S.P.; WU, J.F.; CARNEY, J.M.; LOVELL, M.; MARKESBERY, W.R.; ALLAN, BUTTERFIELD, A. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 2146-2156, Nov. 1995.

HOLMES, C. Dementia. **Medicine**, Baltimore, v. 40, n. 11, p. 628-631, Nov. 2012.

HOSTETTMANN, K.; BORLOZ, A.U.; MARSTON, A. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 10, n. 8, p. 825-847, May 2006.

HOUGHTON, P.J.; REN, Y.; HOWES, M.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Report**, London, v. 23, n. 2, p. 181-199, Feb. 2006.

HRITCU, L.; NOUMEDEM J.A.; CIOANCA, O.; HANCIANU, M.; KUETE, V.; MIHASAN, M. Methanolic extract of *Piper nigrum* fruits improves memory impairment by decreasing brain oxidative stress in amyloid beta (1-42) rat model of Alzheimer's disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v. 34, n. 3, p. 437-449, Apr. 2014.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

INSTITUTO ALZHEIMER BRASIL. **Entendendo a doença de Alzheimer (DA) através de estudos realizados com populações (Epidemiologia)**. 2014. Disponível em: <<http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br>> Acesso em: 15 maio 2014

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sinopse do senso demográfico de 2010**. Rio de Janeiro, 2011. 270 p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/resultados_do_universo.pdf> Acesso em: 10 jun. 2014.

INFANGER, D.W.; SHARMA, R.V.; DAVIDSON, R.L. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation and function. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 8, n. 8/9, p. 1583-1595, Sept./Oct. 2006.

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 89, n. 2/3, p. 261-264, Dec. 2003.

INOUE, K.; PEDRAZZANI, E.S.; PAVARINI, S.C.I. Octogenários e cuidadores: perfil sócio-demográfico e correlação da variável qualidade de vida. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 17 n. 2, p. 350-357, abr./jun. 2008.

JERKOVIC, I.; MARIJANOVIC, Z. Oak (*Quercus frainetto* Ten.) honeydew honey-approach to screening of volatile organic composition and antioxidant capacity (DPPH and FRAP Assay). **Molecules**, Basel, v. 15, n. 5, p. 3744-3756, May 2010.

JOHNSON, G.; MOORE, W.S. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 12, n. 2, p. 217-225, 2006.

JOHNSTONE, M.; GEARING, A.J.; MILLER, K.M. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 93, n. 1/2, p. 182-193, Jan. 1999.

KÄHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 3954-3962, Sept. 1999.

KADLCIK, V.; SICARD-ROSELLI, C.; MATTIOLI, T.A.; KODICEK, M.; HOUÉE-LEVIN, C. One-electron oxidation of beta-amyloid peptide: sequence modulation of reactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 37, n. 6, p. 881-891, Sept. 2004.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, New York, v. 2, n. 1, p. 41-60, Mar. 2009.

KONRATH, E.L.; PASSOS, S.; KLEIN-JÚNIOR, L.C.; HENRIQUES, A.T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 65, n. 12, p. 1701-1725, Dec. 2013.

KIVIPELTO, M.; HELKALA, E.L.; LAAKSO, M.P.; HANNINEN, T.; HALLIKAINEN, M.; ALHAINEN, K.; SOININEN, H.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **British Medical Journal**, London, v. 322, n. 7300, p. 1447-1451, June 2001.

KÜCHEMANN, B.A. Envelhecimento populacional, cuidado e cidadania: velhos dilemas e novos desafios. **Revista Sociedade e Estado**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 165-180, jan./abr. 2012.

- KORTE, M.; HERRMANN, U.; ZHANG, X.; DRGUHN, A. The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. **Experimental Brain Research**, Berlin, v. 217, n. 3/4, p. 435-440, Apr. 2012.
- LAMER, A.J. The cerebellum in Alzheimer's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, Basel, v. 8, n. 4, p. 203-209, Jan. 1997.
- LENZI, M.; ORTH, A.I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis-sc, brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 198–201, ago. 2004.
- LEUNER, K.; HAUPTMANN, S.; ABDEL-KADER, R.; SCHERPING, I.; KEIL, U.; STROSZNAJDER, J.B.; ECKERT, A.; MÜLLER, W.E. Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 9, n. 10, p. 1659-1675, Oct. 2009.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. v. 1.
- LIMA, L.B.; VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; LEITE, V.R.; FERREIRA, P.A.; ANDRADE, B.A.; ARAÚJO, E.L.; XAVIER, H.S.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 126, n. 3, p. 468-473, Dec. 2009.
- LYRAS, L.; CAIRNS, N.J.; JENNER, A.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 68, n. 5, p. 2061-2069, May 1997.
- MAELICKE, A.; ALBUQUERQUE, E.X. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 393, n. 1/3, p. 165-170. Mar. 2000.
- MAHDY, K.; SHAKER, O.; WAFAY, H.; NASSAR, Y.; HASSAN, H.; HUSSEIN, A. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 16, n. 3, p. 31-42. July 2012.
- MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 4, p. 1409-1418, Jan. 2006.
- MAISUTHISAKUL, P.; PASUK, S.; RITTHIRUANGDEJ, P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, n. 3, p. 229–240, May 2008.
- MARTÍNEZ-ESPLÁ, A.; ZAPATA, P.J.; VALERO, D.; GARCÍA-VIGUERA, C.; CASTILLO, S.; SERRANO, M. Preharvest application of oxalic acid increased fruit size, bioactive compounds, and antioxidant capacity in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62 n. 15, p. 3432-3437, Apr. 2014.
- MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T.K. *Piper nigrum* and piperine: an update. **Phytotherapy Research**, London, v. 27, n. 8, p. 1121-1130, Aug. 2013.

MEI L.; YUAN, B.; ZENG, M.; CHEN, J. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 2, p. 530–536, Mar. 2011.

MOLL, L.; EL-AMI, T.; COHEN, E. Selective manipulation of aging: a novel strategy for the treatment of neurodegenerative disorders. **Swiss Medical Weekly**, Basel, v. 144, n. w13917, Feb. 2014. Disponível em: < <http://www.smw.ch/content/smw-2014-13917/>>. Acesso em: 08 jun. 2014.

MONIRUZZAMAN, M.; KHALIL M.I., SULAIMAN, S.A.; GAN S.H. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, Ile-Ife, v. 9, n. 1, p. 36-42, Oct. 2012.

MOREL, Y.; BAROUKI, R. Repression of gene expression by oxidative stress. **The Biochemical Journal**, London, v. 342, n. pt3, p. 481-496, Sept. 1999.

MORZELLE, C.M. **Resíduos de romã (*Punica granatum*) na prevenção da doença de Alzheimer**. 2012. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MU, Y.; GAGE, F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, London, v. 6, n. 85, Dec. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3261815/pdf/1750-1326-6-85.pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2014.

MURRAY, A.P.; BELÉN, M.B.; CASTRO, M.J.; ALZA, N.P. CAVALLARO, V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. **Current Neuropharmacology**, London, v. 11, n. 4, p.388-413, July 2013.

MURTHY, C.T.; BHATTACHARYA, S. Cryogenic grinding of black pepper. **Journal of Food Engineering**, London, v. 85, n. 1, p. 18-28, Mar. 2008.

MUSENGA, A.; MANDRIOLI, R.; FERRANTI, A.; D'ORAZIO, G.; FANALI, S.; RAGGI, M.A. Analysis of aromatic and terpenic constituents of pepper extracts by capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 4, p. 612–619, Mar. 2007.

NARAHASHI, T.; MARSZALEC, W.; MORIGUCHI, S.; YEH, J. Z.; ZHAO, X. Unique mechanism of action of Alzheimer's drugs on brain nicotinic acetylcholine receptors and NMDA receptors. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 74, n. 2/3, p. 281–291, Dec. 2003.

NICOLA, C.; SALVADOR, M.; GOWER, A.E.; MOURA, S.; ECHEVERRIGARAY, S. Chemical constituents antioxidant and anticholinesterasic activity of *Tabernaemontana catharinensis*. **The Scientific World Journal**, Boynton Beach, v. 2013, n. 2013, p. 10, July 2013.

- NILSSON, J.; PILLAI, D.; ONNING, G.; PERSSON, C.; NILSSON, A.; AKESSON, B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6- sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 49, n. 3, p. 239-246, Mar. 2005.
- NUNOMURA, A.; PERRY, G.; PAPPOLLA, M.A.; FRIEDLAND, R.P.; HIRAI, K.; CHIBA, S.; SMITH, M.A. Neuronal oxidative stress precedes amyloid-beta deposition in Down syndrome. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, New York, v. 59, n. 11, p. 1011–1017, Nov. 2000.
- NUNOMURA, A.; PERRY, G.; ALIEV, G.; HIRAI, K.; TAKEDA, A.; BALRAJ, E.K.; JONES, P.K.; GHANBARI, H.; WATAYA, T.; SHIMOHAMA, S.; CHIBA, S.; ATWOOD, C.S.; PETERSEN, R.B.; SMITH, M.A. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, New York, v. 60, n. 8, p. 759-767, Aug. 2001.
- OBULESU, M.; JHANSILAKSHMI, M. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: an understanding of physiology and pathology. **International Journal of Neuroscience**. London, v. 124, n. 4, p. 227-235, Apr. 2014.
- OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39-41, jun. 2006.
- ORHAN, G.; ORHAN, I.; SUBUTAY-OZTEKIN, N., AK, F.; SENER, B. Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, Saif Zone, v. 4, n. 1, p. 43-51, Jan. 2009.
- ORHAN, I.; KARTAL, M.; TOSUN, F.; SENER, B. Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 62, p. 829-832, Nov./Dec. 2007.
- ORHAN, I.; ASLAN, M. Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 122, n. 2, p. 327–332, Mar. 2009.
- OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; AMIANO, P.; ELBUSTO, A.; URDANETA, E.; MARTÍNEZ-LAGE, P. Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 53, n. 1, p. 1-23, Feb. 2014.
- OU, B.X.; HUANG, D.J.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, May 2002.
- OZTURK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, n. 1, p. 48–54, Sept. 2012.

PALLAS, M.; CAMINS, A. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 12, n. 33, p. 4389-4408, Nov. 2006.

PAPANDREOU, M.A.; DIMAKOPOULOU, A.; LINARDAKI, Z.I.; CORDOPATIS, P.; KLIMIS-ZACAS, D.; MARGARITY, M.; LAMARI, F.N. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 198, n. 2, p. 352-358, Mar. 2009.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus piper. **Phytochemistry**, New York, v. 46, n. 4, p. 597-673, Oct. 1997.

PEREIRA, D.M.; FERRERES, F.; OLIVEIRA, J.M.; GASPAR, L.; FARIA, J.; VALENTÃO, P.; SOTTOMAYOR, M.; ANDRADE, P.B. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 8/9, p. 646-652, July 2010.

PERSSON, T.; POPESCU, B.O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. New York, v. 2014, n. 2014, p. 1-11, Jan. 2014.

PETERSEN RC, DOODY R, KURZ A, MOHS RC, MORRIS JC, RABINS PV, RITCHIE K, ROSSOR M, THAL L, WINBLAD B. Current concepts in mild cognitive impairment. **Archives of Neurology**, Chicago, v. 58, n. 12 p. 1985-1992, Dec. 2001.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, Tarrytown, v. 27, n. 11/12, p. 1173-1181, Dec. 1999.

POHANKA, M. Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 21, n. 3, p. 356-364, Feb. 2014.

PRATICO, D.; URYU, K.; LEIGHT, S.; TROJANOSWKI, J.Q.; LEE, V.M. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, Washington, v. 21, n. 12, p. 4183-4187, June 2001.

QIU, C.; FRATIGLIONI, L. Dementia: treatments and developments. In: McNAMARA, P. (Ed.). **Treatments and developments**. Oxford: ABC-CLIO, 2011. v. 3, p. 1-33.

RAMIREZ-BERMUDEZ, J. Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. **Archives of Medical Research**, New York, v. 43 n. 8, p. 595-599, Nov. 2012.

RASHEED, M.; AFSHAN, F.; TARIQ, R.M.; SIDDIQUI, B.S.; GULZAR, T. MAHMOOD, A.; BEGUM, S.; KHAN, B. Phytochemical studies on the seed extract of *Piper nigrum* Linn. **Natural Product Research**, London, v. 19, p. 703-712, Oct. 2005.

RASOOL, M.; MALIK, A.; QURESHI, M.S.; MANAN, A.; PUSHPARAJ, P.N.; ASIF, M.; QAZI, M.H.; QAZI, A.M.; KAMAL, M.A.; GAN, S.H.; SHEIKH, I.A. Recent updates in the treatment of neurodegenerative disorders using natural compounds. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, New York, v. 2014, n. 2014, p. 7, Apr. 2014.

RATHNAWATHIE, M.; BUCKLE, K.A. Determination of piperine in pepper (*Piper Nigrum*) using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 264, n. 2, p. 316-320, July 1983.

REICHMAN, W.E. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. **Annals of General Hospital Psychiatry**, London, v. 2, n. 1, p. 1-14, Jan. 2003.

RENJIE, L.; SHIDI, S.; YONGJUN, M. Analysis of volatile oil composition of the peppers from different production areas. **Medicinal Chemistry Research**, New York, v. 19, n. 2, p. 157-165, Mar. 2010.

RIEDEL, W.J. Preventing cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 14, p. 18-22, Feb. 2014.

RINALDI, P.; POLIDORI, M.C.; METASTASIO, A.; MARIANI, E.; MATTIOLI, P.; CHERUBINI, A.; CATANI, M.; CECCHETTI, R.; SENIN, U.; MECOCCHI, P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 24, n. 7, p. 915-919, Nov. 2003.

SAS INSTITUTE. **SAS/Stat 9.1.3 Service Pack 2**. Cary, 2003. 1 DVD-ROM.

SABINA, E.P.; NAGAR, S.; RASOOL, M. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation-an experimental model of gouty arthritis. **Inflammation**, New York, v. 34, n. 3, p. 184-192, June 2011.

SALGADO, J.M.; FERREIRA, T.R.B.; BIAZOTTO, F.O.; DIAS, C.T.S. Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica granatum*) peel. **Plants Food for Human Nutrition**, New York, v. 67, n. 1, p. 39-43, Mar. 2012.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 121-137, June 2002.

SANTOS, O.J.; BARROS-FILHO A.K.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; SANTOS, R.H.; SANTOS, R.A. *Schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae) in the healing process of gastrorrhaphy in rats. **ABCD: Brazilian Archives of Digestive Surgery**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 140-146, July/Sept. 2012.

SAUVAÎTRE, T.; BARLIER, M.; HERLEM, D.; GRESH, N.; CHIARONI, A.; GUENARD, D.; GUILLOU, C. New potent acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 50, n. 22, p. 5311-5323, Nov. 2007.

SCHREINER, F.; RETZLAFF, G.; SIQUEIRA, M.F.R.; REZENDE, E.C.; SIMÃO, L.C.; KOZLOWSKI-JUNIOR, V.A.; SANTOS, E.B. Uso do chá de *Punica granatum* (romã) no controle da aderência de bactérias orais em ligaduras ortodônticas. **Robrac**, Goiânia, v. 18, n. 45, p. 56-61, Jan. 2009.

SCOTTI, L.; MENDONÇA-JUNIOR F.J.B.; DA SILVA M.S.; R. PITTA, IR.; SCOTTI, M.T. Biochemical changes evidenced in Alzheimer's disease: a mini-review. **Letters in Drug Design & Discovery**, Saif Zone, v. 11, n. 12, p. 240-248, Feb. 2014.

SEHGAL, N. Resolution of neuroinflammation by cytochrome P4504F: implication in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, Orlando, v. 5, n. 4, p. P483, July 2009.

SEIDL, C. **Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase**. 2010. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SELVENDIRAN, K.; SINGH, J.P.; KRISHNAN, K.B.; SAKTHISEKARAN, D. Cytoprotective effect of piperine against benzoo[a]pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in swiss albino mice. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.74, n. 1/2, p. 109–115, Feb. 2003.

SENL, F.S.; ORHAN, I.E.; ERDEM, S.A.; KARTAL, M.; SENER, B.; KAN, Y.; CELEP, F.; KAHRAMAN, A.; DOGAN, M. Evaluation of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of wild and cultivated samples of sage (*Salvia fruticosa*) by activity-guided fractionation. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 14, n. 11, p. 1476-1483, Nov. 2011.

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 1, p. 105–110, Jan. 2006.

SHEN, S.; CALLAGHAN, D.; JUZWIK, C.; XIONG, H.; HUANG, P.; ZHANG, W. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, New York, v. 114, n. 6, p. 1590-1604, July 2010.

SINGLETARY, K. Black pepper: overview of health benefits. **Nutrition Today**, Baltimore, v. 45, n. 1, p. 43–47, Feb. 2010.

SIGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, Feb. 1965.

SINGH, M.; KAUR, M.; KUKREJA, H.; CHUGH, R.; SILAKARI, O.; SINGH, D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 70, p. 165-188, Dec. 2013.

SINHA, M.; BHOWMICK P.; BANERJEE, A.; CHAKRABARTI, S. Antioxidant role of amyloid beta protein in cell-free and biological systems: implication in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 56, p. 184-192, Mar. 2013.

SMITH, D.P.; CICCOTOSTO, G.D.; TEW, D.J.; FODERO-TAVOLETTI, M.T.; JOHANSEN, T.; MASTERS, C.L.; BARNHAM, K.J.; CAPPAL, R. Concentration dependent Cu²⁺ induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-β peptide. **Biochemistry**, Washington, v. 46, n. 3, p. 2881-2891, Mar. 2007.

SMITH, M.A.; ROTTKAMP, C.A.; NUNOMURA, A.; RAINA, A.K.; PERRY, G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1502, n. 1, p. 139-144, July 2000.

SORCE, S.; KRAUSE, K-H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 11, n. 10, p. 2481-2504, Oct. 2009.

SRINIVASAN, K. Role of spices beyond food flavoring: nutraceuticals with multiple health effects. **Food Reviews International**, New York, v. 21, p. 167-88, 2005.

_____. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London v. 47, n. 8, p. 735-748, Nov. 2007.

_____. Reason to season: spices as functional food adjuncts with multiple health effects. **Indian Food Industry**, New Delhi, v. 27, n. 2, p.36-47, 2008.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 3, p. 607-616, 2006.

TABNER, B.J; EL-AGNAF, O.M.; TURNBULL, S.; GERMAN, M.J.; PALEOLOGOU, K.E.; HAYASHI, Y.; COOPER, L.J.; FULLWOOD, N.J.; ALLSOP, D. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. **The Journal of Biological Chemistry**. Baltimore, v. 280, n. 34, p. 35789-35792, Oct. 2005.

TAN, M.C.; TAN, C.P.; HO, C.W. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 20, n. 6, p. 3117-3123. Sept. 2013.

TAPPAYUTHPIJARN, P.; ITHARAT, A.; MAKCHUCHIT, S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Thai traditional nootropic remedy and its herbal ingredients. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v. 94, n. 7, p. 183-189. Dec. 2011.

THAKURTA, I.G.; CHATTOPADHYAY, M.; GHOSH, A.; CHAKRABARTI, S. Dietary supplementation with N-acetyl cysteine, α -tocopherol and α -lipoic acid reduces the extent of oxidative stress and proinflammatory state in aged rat brain. **Biogerontology**, Dordrecht, v. 13, n. 5, p. 479-488. Oct. 2012.

TURNER, P.R.; O'CONNOR, K.; TATE, W.P.; ABRAHAM, W.C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1- 32, May 2003.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, London, v. 552, n. 2, p. 335-344, Oct. 2003.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA; C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 655-660, July/Aug. 2004.

VIJAYAKUMAR, R.S.; NALINI, N. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from *Piper Nigrum* on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats. **Cell Biochemistry and Function**, Oxford, v. 24, n. 6, p.491–498, Nov./Dec. 2006.

VIRMANI, A.; PINTO, L.; BINIENDA, Z.; ALI, S. Food, nutrigenomics, and neurodegeneration-neuroprotection by what you eat! **Molecular Neurobiology**, Clifton, v. 48, n. 2, p. 353-362, Oct. 2013.

WAN, L.; NIE, G.; ZHANG, J.; LUO, Y.; ZHANG, P.; ZHANG, Z.; ZHAO, B. β -Amyloid peptide increases levels of iron content and oxidative stress in human cell and *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer disease. **Free Radical Biology & Medicine**, Tarrytown, v. 50, n. 1, p. 122–129, Jan. 2011.

WATKINS, P.B., ZIMMERMAN, H.J., KNAPP, M.J., GRACON, S.I., LEWIS, K.W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 271, n. 13, p. 992-998, Apr. 1994.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M.J. Natural products as a source of Alzheimer's drugs leads. **Natural Product Reports**, London, v. 28, n. 1, p. 48-77, Jan. 2011.

WIMO, A.; WINBLAD, B.; AGUERO-TORRES, H.; VON STRAUSS, E. The magnitude of dementia occurrence in the world. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, Lawrence, v. 17, n. 2, p. 63-67, Apr./June 2003.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 37, n. 2, p. 99-105, June 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health and aging**. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/ageing/publications/global_health.pdf?ua=1>. Acesso em: 10 maio 2014.

_____. **Dementia a public health priority**. 2012. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf>. Acesso em: 10 maio 2014.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, June 2004.