



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais e componentes majoritários de *Piper* spp e *Aniba canelilla* e docagem molecular do 1-nitro-2-feniletano

Nayla Nunes dos Santos Silva

BELÉM-PA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais e componentes majoritários de *Piper spp* e *Aniba canelilla* e docagem molecular do 1-nitro-2-feniletano

Autor: Nayla Nunes dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme S. Maia

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Eloisa Helena de Aguiar Andrade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Silva, Nayla Nunes dos Santos.

Atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais e componentes majoritários de *Piper* spp e *Aniba canelilla* e docagem molecular do 1-nitro-2-feniletano / Nayla Nunes dos Santos Silva ; orientador, José Guilherme Soares Maia, co-orientadora, Eloisa Helena de Aguiar Andrade. — 2013

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Belém, 2013.

1. Acetilcolinesterase, 2. Bioautografia. 3. *Aniba canelilla*. 4. 1-nitro-2-feniletano, 5. Docagem molecular. I. Título.

CDD: 22.ed.: 615.321

Nayla Nunes dos Santos Silva

Atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais e componentes majoritários de *Piper spp* e *Aniba canelilla* e docagem molecular do 1-nitro-2-feniletano

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia
Orientador
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPA

Prof.^a Dr.^a Gilmara de Nazareth Tavares Bastos
Membro
Programa de Pós – Graduação em Neurociências – UFPA

Prof.^a Dr.^a Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Membro
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPA

*Às meus pais, Maria Edi & Antonio Olavo Silva
com amor e gratidão.*

*À meu namorado Madson Wagner Santos &
minha avó Eurice Santos, com amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela presença constante em minha vida,

A Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela formação acadêmica.

Ao CNPq / Programa Bionorte e FAPESPA / PA, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. **José Guilherme Soares Maia** pela orientação, oportunidade de crescimento profissional e confiança em mim depositada.

A Prof.^a Dr.^a **Eloísa Helena de Aguiar Andrade** pelas análises dos óleos essenciais e preciosas contribuições, buscando sempre a melhoria deste trabalho.

A Prof.^a Dr.^a **Joyce Kelly do Rosário da Silva** em particular, pela paciência e amizade durante esses anos de convivência e, principalmente, pelos valiosos e imprescindíveis ensinamentos. Obrigada amiga!

A Diretora da Faculdade de Engenharia Química/UFPA, Prof.^a Dr.^a **Marlice Cruz Martelli** e ao responsável pelo Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON) Prof. Dr. **Lênio José Guerreiro de Faria** por disponibilizar o espaço físico e a infra-estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao aluno de doutorado, **José Rogério de Araújo Silva**, pelas análises de docagem molecular e ao Prof. Dr. **Claudio Nahum Alves** pela contribuição na elucidação das análises.

Aos colegas de laboratório **Nathalie Turiel, Jéssica Fernanda, Carol Anjos, Léia Meireles, Shirley Ferreira, Lucas Melo** e **Nádia Silva** pela amizade e companheirismo.

Aos colaboradores do LEPRON: **Rafaela Pinheiro** e **Ferdinando Nascimento** pelo apoio técnico na coleta do material botânico e na rotina do laboratório.

Aos meus pais **Maria Edi** e **Antonio Olavo Silva** por acreditar em meus objetivos e lutar ao meu lado para torná-los realidade. Pelo amor e dedicação durante toda minha vida. Amo muito vocês.

Ao **Wagner Cardoso** pela compreensão, amor, incentivo, e, principalmente, paciência nos momentos de ausência.

Aos colegas de turma pelos momentos compartilhados.

A minha família pelo incentivo, confiança e amor concedido.

As secretárias do PPGCF **Cliciane** e Sr. **Brasília** pela atenção e auxílio.

A todos que colaboraram de alguma maneira para realização e conclusão de mais essa etapa.

*Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes;
porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.*

Josué 1:9

RESUMO

SILVA, N. N. S. **Atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais e componentes majoritários de *Piper spp* e *Aniba canelilla* e docagem molecular do 1-nitro-2-feniletano.** 2013. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

Atualmente, a Doença de Alzheimer (DA) é considerada um dos grandes problemas de saúde pública em todo o mundo e uma das principais complicações da patologia é o déficit de atividade dos neurônios colinérgicos, fato esse, que pode ser revertido e/ou atenuado elevando os níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A maneira mais eficaz de aumentar a quantidade de acetilcolina disponível é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Na busca por novos inibidores colinesterásicos de origem natural, cinco óleos essenciais da região amazônica e seus componentes majoritários foram investigados utilizando o ensaio de inibição da AChE por bioautografia direta. Os óleos e componentes majoritários foram: *Aniba canelilla* (1-nitro-2-feniletano), *Piper aduncum* (dilapiol), *P. callosum* (safrol), *P. divaricatum* (metileugenol) e *P. marginatum* (safrol+3,4-metilenodioxipropiofenona). Os óleos de *A.canelilla* e *P. aduncum* apresentaram halo de inibição enzimática nas quantidades de 0,01 ng e 1ng, respectivamente. O óleo de *P.marginatum* apresentou fraca atividade (~100 ng) e os óleos de *P. callosum* e *P. divaricatum* foram inativos. Dentre os constituintes majoritários que apresentaram atividade estão os fenilpropanóides 1-nitro-2-feniletano isolado do óleo de *A.canelilla*, safrol e elemicina, isolados do óleo de *P. callosum*, que inibiram a AChE nas quantidades de 0,01, 1000 e 1000 ng, respectivamente. Os resultados indicam que o óleo de *A. canelilla* e 1-nitro-2-feniletano inibem a AChE nas mesmas proporções do padrão fisostigmina. O estudo de docagem molecular complementou os resultados experimentais e demonstrou que o grupo nitro do 1-nitro-2-feniletano forma ligação do tipo ponte de hidrogênio com o grupo hidroxila do resíduo de serina catalítica da molécula de AChE, sugerindo que o caráter eletronegativo do 1-nitro-2-feniletano pode ser responsável por esta forte interação química.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, bioautografia, *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-feniletano, docagem molecular.

ABSTRACT

SILVA, N. N. S. 2013. **Anticholinesterase activity of essential oils and majority compounds of *Piper* spp and *Aniba canelilla* and molecular docking of 1-nitro-2-phenylethane**. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

Currently, Alzheimer's disease (AD) is considered a significant public health problem worldwide and the major complication of the disease is the deficit of cholinergic neuron activity, a fact that can be reversed and/or mitigated by raising levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). The most effective way to increase the available amount of acetylcholine is the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme (AChE). In the search for new natural cholinesterasic inhibitors, the essential oils and major components of five aromatic plants occurring in the Amazon region were investigated using the AChE inhibition test by direct bioautography. The oils and major components were obtained from *Aniba canelilla* (1-nitro-2-phenylethane), *P. aduncum* (dillapiole), *P. callosum* (safrole), *P. divaricatum* (methyleugenol) and *P. marginatum* (safrole+3,4-methylenedioxiopropiophenone). The oils of *A. canelilla* and *P. aduncum* showed enzyme inhibition zone in amounts of 0.01 ng and 1ng, respectively. The oil of *P. marginatum* showed weak activity (~ 100 ng) and the oils of *P. callosum* and *P. divaricatum* were inactive. Among the major constituents, who showed activity are the phenylpropanoids 1-nitro-2-phenylethane, isolated from the oil of *A. canelilla*, and safrole and elemicin, isolated from the oil of *P. callosum*, which inhibited the AChE in amounts of 0.01, 1000 to 1000 ng, respectively. The results indicate that the oil of *A. canelilla* and 1-nitro-2-phenylethane inhibited AChE in the same proportion as the pattern physostigmine. The molecular docking study was added to the experimental results, showing that the nitro group of 1-nitro-2-phenylethane can establish hydrogen bonds with the hydroxyl group of the serine residue existing in the catalytic AChE molecule, suggesting that the electronegative character of 1-nitro-2-phenylethane may be responsible for this strong chemical interaction.

Keywords: Acetylcholinesterase, bioautography, *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-phenylethane, molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações percentuais na causa de mortalidades.....	19
Figura 2	Fisostigmina.....	21
Figura 3	Inibidores da acetilcolinesterase aprovados pelo FDA.....	23
Figura 4	Huperzina A.....	25
Figura 5	Espécies submetidas ao ensaio de inibição da AChE.....	27
Figura 6	Reação da acetilcolinesterase com o acetato de naftila.....	38
Figura 7	Estruturas químicas dos compostos majoritários dos óleos essenciais.....	44
Figura 8	Cromatogramas: Óleo essencial de <i>A. canelilla</i> e Fração 14-19.....	45
Figura 9	Cromatogramas: Óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e Fração 17-19.....	45
Figura 10	Cromatogramas: Óleo essencial de <i>P. callosum</i> , Fração 14-17, Fração 18-20, Fração 21-23 e Fração 24-28.....	46
Figura 11	Cromatogramas: (A) Óleo essencial de <i>P. divaricatum</i> . (B) Fração 20-24.....	47
Figura 12	Halos de inibição do alcalóide fisostigmina.....	47
Figura 13	Halo inibitório dos óleos essenciais, frações isoladas e fisostigmina.	49
Figura 14	Bioautografia mostrando a atividade anticolinesterásica do óleo de <i>A. canelilla</i> e da fração fr 14-19, comparado ao padrão fisostigmina.....	50
Figura 15	Docagem molecular de melhor conformação para a fisostigmina e 1-nitro-2-feniletano.....	51
Figura 16	Acoplamento individual e interações conformacionais para fisostigmina e 1-nitro-2-feniletano.....	52
Figura 17	Potencial eletrostático molecular para fisostigmina e 1-nitro-2-feniletano.....	53

LISTA DE QUADRO, TABELAS & CROMATOGRAMAS

Quadro 1	Locais de coleta e código das espécies.....	36
Tabela 1	Composição química dos óleos essenciais.....	40
Tabela 2	Limite de detecção da atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais.....	48
Tabela 3	Energia de docagem obtidos com software MolDock.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS & UNIDADES

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AHA	Análise hierárquica de agrupamento
BChE	Butirilcolinesterase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-DIC	Cromatografia de fase gasosa com detector de ionização de chamas
CG-EM	Cromatografia de fase gasosa com espectrômetro de massas
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
DA	Doença de Alzheimer
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EeAChE	Acetilcolinesterase do peixe elétrico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IR	Índice de retenção
OAc	Óleo essencial de <i>Aniba canelilla</i>
OPa	Óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>
OPc	Óleo essencial de <i>Piper callosum</i>
OPd	Óleo essencial de <i>Piper divaricatum</i>
OPm	Óleo essencial de <i>Piper marginatum</i>
MVD	<i>Software Molegro Virtual Docker</i>
Ser203	Serina catalítica
Å	Angstrom
µg	Micrograma
µL	Microlitro

mL	Mililitro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
Ph	Potencial hidrogeniônico
ZM	<i>Zataria multiflora Boiss</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADRO, TABELAS & CROMATOGRAMAS

LISTA DE ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

1	INTRODUÇÃO	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	A Doença de Alzheimer	19
3.2	Produtos naturais como potenciais inibidores colinesterásicos	24
3.3	Espécies selecionadas para o ensaio	26
3.4	Bioautografia direta.....	29
3.5	Docagem molecular.....	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral	33
2.2	Objetivos Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Equipamentos e acessórios	35
4.2	Reagentes	35
4.2.1	TESTE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE	35
4.2.2	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	36
4.3	Coleta do material botânico.....	36
4.3.1	PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	36
4.3.2	ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	37
4.3.3	ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS.....	37
4.4	Atividade inibitória da AChE.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Composição química dos óleos essenciais.....	41
5.2	Fracionamento e identificação dos compostos isolados.....	45

5.3	Atividade inibitória da acetilcolinesterase.....	47
5.3.1	ENSAIO COM O PADRÃO POSITIVO.....	47
5.3.2	ENSAIO COM AS AMOSTRAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	48
5.3.3	ENSAIO COM OS COMPONENTES MAJORITÁRIOS ISOLADOS.	48
5.3.4	DOCAGEM MOLECULAR.....	50
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, plantas, animais e microrganismos têm sido conhecidos como fontes naturais de substâncias que abrangem desde alimentos ao campo da medicina popular e clínica. Metabólitos naturais provenientes de tais organismos atuam como valiosos agentes na medicina e agricultura, proporcionando uma série de benefícios à humanidade (CRAGG & NEWMAN, 2007).

O grande incremento do uso de plantas para fins medicinais tem provocado renovado interesse pelo conhecimento das características das drogas delas originadas, incluindo sua morfologia, composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade, especialmente quando se trata de plantas brasileiras, considerando a extensa e diversificada flora do país (YUNES, PEDROSA & CECHINEL FILHO, 2007).

Os óleos essenciais, em especial, constituem-se fontes expressivas de estudos que visam identificar atividades biológicas (HERNRIQUES, SIMÕES-PIRES & APEL, 2007). São extraídos das plantas, principalmente, através das técnicas de arraste a vapor e hidrodestilação e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação. São compostos constituídos principalmente de mono e sesquiterpenos e fenilpropanóides, metabólitos estes que conferem suas características organolépticas (BIZZO, HOVELL & REZENDE, 2009).

Os produtos naturais são fontes potenciais de inibidores da acetilcolinesterase (AChE), como demonstram alguns estudos com extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente no nordeste brasileiro, tais como: *Azadiractha indica*, *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Bauhinia forficata* e *Cenostigma macrophyllum* que apresentam atividade anticolinesterásica, antioxidante e anti-inflamatória (FEITOSA, 2008). Outra pesquisa envolvendo extratos de plantas brasileiras demonstrou excelentes resultados com as espécies *Amburana cearensis*, *Paullinia cupana*, *Plathymiscium floribundum* e *Solanum asperum*. Tal estudo apresenta uma revisão de 309 plantas pertencentes a 92 famílias botânicas, que foram testadas quanto a inibição da AChE (TREVISAN & MACEDO, 2003). A literatura relata cerca de 260 moléculas naturais que foram avaliadas quanto sua capacidade de inibir a enzima AChE e, dentre os compostos

testados a sua maioria pertence à classe dos alcalóides (BARBOSA FILHO et al., 2006).

O interesse por inibidores da enzima AChE é justificado pela expressiva relevância da classe dos alcalóides na terapêutica da DA, que começou em meados de 1990 com a utilização da tacrina. A descoberta da segunda geração de fármacos inibidores (donepezil, galantamina e rivastigmina) mais eficazes e menos tóxicos, demonstra mais uma vez a importância dos produtos naturais e estimula as pesquisas de inovação farmacêutica com substâncias provenientes da biodiversidade brasileira (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Outra razão pela procura de novas fontes botânicas é devido ao fato que as substâncias atualmente utilizadas para reduzir os sintomas causados pela DA apresentam efeitos colaterais. Daí a necessidade no desenvolvimento de novos fármacos.

Inibidores da AChE atualmente formam a base das novas drogas disponíveis para o manejo da DA. Eles funcionam, corrigindo uma deficiência do neurotransmissor ACh nas sinapses do córtex cerebral (FORETTE & GHARABAWI, 1999).



REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Doença de Alzheimer

Atualmente a DA é considerada um dos grandes problemas de saúde pública em todo o mundo. Calcula-se que o número de pessoas acometidas pela DA em todo o mundo ultrapassa os 15 milhões de idosos. No Brasil, calcula-se que cerca de 500 mil pessoas sejam acometidas pela doença (MACHADO, 2006).

Dados recentes divulgam que as mortes por DA aumentaram 68% entre os anos 2000 e 2010, ao passo que doenças cardíacas e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) continuam a experimentar declínios significativos (Figura 1). Atualmente, mais de cinco milhões de americanos vivem com a DA e acredita-se que sem avanços científicos que possam impedir, retardar ou interromper a doença. Em 2050, o número de pessoas acometidas pode chegar a 13,8 milhões (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2013).

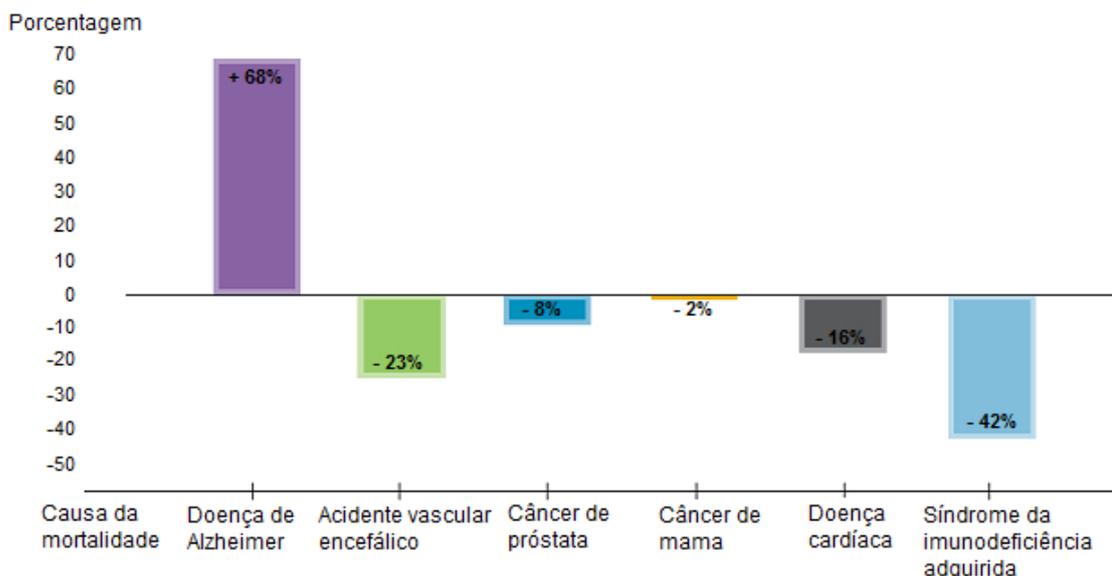


Figura 1. Alterações percentuais na causa de mortalidades selecionadas (de qualquer idade) entre 2000 e 2010 (Alzheimer's Association, 2013).

O neuropatologista alemão Alois Alzheimer (1906), foi o primeiro a descrever a DA, referindo-se como uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível. Os sintomas são perda da memória e diversos distúrbios cognitivos. A progressão da DA pode ser dividida em três fases: inicial, intermediária e terciária.

Na fase inicial observam-se leves esquecimentos, lapsos de memória recente, alteração de personalidade e julgamento, irritabilidade, descuido da aparência pessoal, frustração e desorientação no tempo e no espaço. Na fase intermediária acentua-se o sensível déficit de memória e aprendizagem, dificuldade de reconhecer as pessoas, baixa afetividade, comprometimento de verbalização, tremores e agitação. A fase terciária caracteriza-se por incapacidade de aprendizagem, perda de peso, irritabilidade extrema e intensa restrição ao leito. É totalmente dependente para desempenhar as tarefas mais simples, como utilizar utensílios domésticos, ou ainda para vestir-se, cuidar da própria higiene e alimentar-se (COSTA et al., 2008; ROCKLAND & BORBA, 2005; GALLUCCI NETO, TAMELINI, & FORLENZA, 2005; LOPERA, 2008; INOUE & OLIVEIRA, 2003).

A DA tem sido associada a uma série de fatores genéticos e ambientais, porém as causas ainda são desconhecidas. Existem algumas características histológicas e bioquímicas que são aceitas como intrinsecamente relacionadas à DA (LANE, POTKIN & ENZ, 2005), como:

- Presença de peptídeos β -amilóides que se depositam em placas e causam destruição de neurônios por criar processos inflamatórios crônicos nas regiões afetadas, interferir com a regulação de cálcio, essencial para a condução dos estímulos nervosos, e aumentar a produção de radicais livres, que são tóxicos para as células nervosas.
- Surgimento de emaranhados neurofibrilares no interior dos neurônios formados, principalmente por aglomerados da proteína Tau anômala.
- Queda acentuada na quantidade de neurotransmissores nas regiões sinápticas, principalmente da ACh, o que fundamenta a hipótese colinérgica da DA. O declínio cognitivo observado em pacientes afetados é devido a uma perda extensiva de neurônios colinérgicos, especialmente no neocórtex, hipocampo e tonsila. Sabe-se ainda, que a AChE, enzima que degrada a

acetilcolina, está envolvida na agregação de peptídeos β -amilóides através do seu sítio iônico periférico (KIM, LEE & LEE, 2010; SELKOE, 2004).

A abordagem terapêutica mais eficaz até o momento é o uso de inibidores das colinesterases. Os inibidores aumentam a disponibilidade sináptica de acetilcolina, através da inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil e a butirilcolinesterase (BChE), diminuindo déficit colinérgico (INOUE & OLIVEIRA, 2003).

Com base na teoria da inibição enzimática foram descobertos os primeiros inibidores colinesterásicos. A fisostigmina (Figura 2), um alcalóide inicialmente isolado da espécie *Physostigma venenosum* L., foi o primeiro inibidor reversível da AChE utilizado na terapêutica. Embora a fisostigmina não seja mais utilizada clinicamente devido ao seu curto tempo de meia vida, sua estrutura química forneceu um modelo para o desenvolvimento dos inibidores de segunda geração (MARCO & CARREIRAS, 2006).

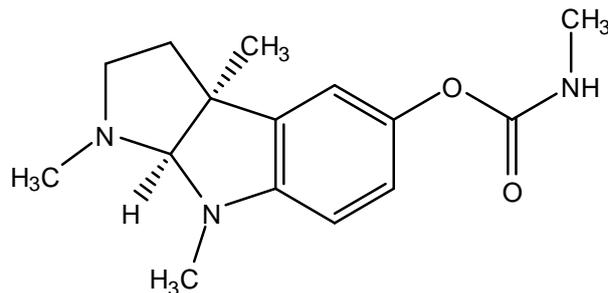


Figura 2. Fisostigmina.

Estudos iniciais com a tacrina documentaram sua eficácia em pacientes com DA e lançaram os alicerces da terapia de reposição colinérgica. A tacrina possui meia-vida curta e seu uso está associado ao elevado risco de hepatotoxicidade, observada em 30% a 50% dos casos, o que ocasionou sua retirada do mercado farmacêutico (FORLENZA, 2005).

O aparecimento de outros anticolinesterásicos de segunda geração, como donepezil, rivastigmina e galantamina, trouxe vantagens sobre a tacrina, devido à diminuição nos efeitos colaterais hepáticos. No entanto, quando administrados em altas doses podem causar náuseas, vômitos, diarreia, anorexia e fraqueza muscular (KNOPMAN, 2002).

Atualmente, no campo farmacológico, apenas quatro inibidores da AChE são aprovados pela agência *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para o tratamento da DA, são eles: inibidores reversíveis donepezil, galantamina e tacrina e o inibidor pseudo-irreversível rivastigmina (VIEGAS JR, BOLZANI & BARREIRO., 2006).

O donepezil (Figura 3) é um inibidor reversível e seletivo da AChE, com meia-vida de aproximadamente 70 horas. Aprovado pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000, o tratamento é iniciado com 5 mg/dia, aumentando-se a dose para 10 mg/dia na dependência de tolerabilidade (WINBLAD et al., 2001; COREY-BLOOM, ANAND & VEACH, 1998)

A galantamina (Figura 3) é um alcalóide extraído da espécie *Galanthus nivalis* e usada popularmente na Bulgária e Turquia no tratamento de condições neurológicas. É um inibidor reversível da AChE e apresenta ação de modulação alostérica de receptores nicotínicos (ENGELHARDT, 2005). Aprovada pelo FDA e pela ANVISA em 2001, tem meia vida de aproximadamente 7 horas, podendo ser administrada em duas doses diárias. É indicado a dose de 4 a 12 mg 2 vezes/dia (ANEKONDA & REDDY, 2005).

A rivastigmina (Figura 3) é um inibidor pseudo-irreversível seletivo da AChE e da BChE. Resultados preliminares envolvendo cerca de 3000 pacientes em 10 países, tratados por seis meses, indicaram que as doses de 6 a 12 mg/dia estavam associadas a melhoria na cognição e nas atividades da vida diária. A inibição simultânea da BChE é um fator que pode eventualmente prolongar o benefício do tratamento (BOTTINO et al., 2002; GIACOBINI et al., 2002).

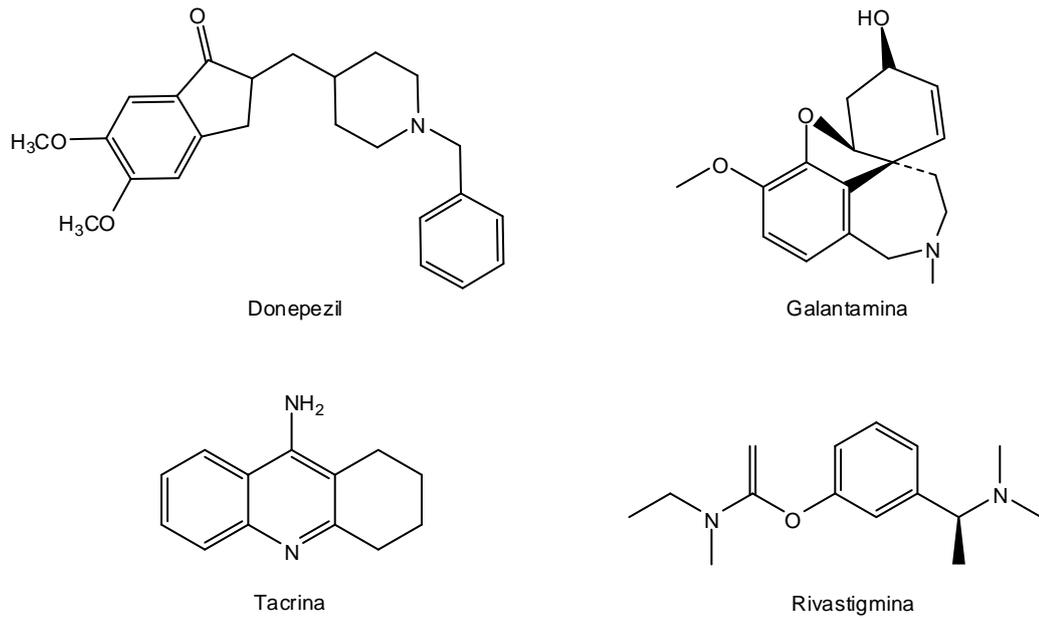


Figura 3. Inibidores da acetilcolinesterase aprovados pelo FDA.

Os inibidores reversíveis da AChE podem ser utilizados no tratamento da DA com intuito de elevar as concentrações de ACh no córtex cerebral e evitar a degradação da colina secretada pelos neurônios colinérgicos sadios (LIRA, 2010). Os inibidores irreversíveis atuam via fosforilação do grupo hidroxila e da serina que ativa a ACh no sistema nervoso central e periférico (PANG et al., 2003; ELHANANY et al., 2001). O mecanismo irreversível resulta no acúmulo de ACh nos sítios de transmissão colinérgica e hiperestimulação das fibras colinérgicas. Os efeitos do acúmulo de ACh pode acarretar em intoxicações fatais por parada respiratória, como ocorre na exposição a longo prazo por organofosforados da classe fosforamidatos (CASTRO, 2002).

O tratamento farmacológico para DA ainda é muito restrito, limitando-se a amenizar os sintomas da doença. A associação de tratamentos não farmacológicos se faz necessário para a melhoria na qualidade de vida do paciente e de seus familiares. Sabe-se que a atividade física, fisioterapia e a terapia de orientação da realidade, em associação à terapia medicamentosa, retarda os efeitos causados pela DA (PINTO et al., 2005; NASCIMENTO & GHIRALDI, 2011).

3.2 Produtos naturais como potenciais inibidores colinesterásicos

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos, acredita-se que a procura por alívio e/ou cura de doenças pela ingestão de ervas tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos proveniente da natureza, o que motivou a busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência (VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006). Esta busca foi intensificada nos anos 90, especialmente nas florestas tropicais onde se concentra grande parte da biodiversidade e especialmente no Brasil, onde algumas espécies continuam sem qualquer estudo químico ou biológico (ROUHI, 1997; CORDELL, 1995).

No Brasil, a biodiversidade denota uma fonte inestimável de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é de fundamental importância, em virtude da riqueza biológica e do amplo potencial em originar novos fármacos, a qual vem despertando a cobiça de laboratórios de pesquisa das empresas farmacêuticas (NEWMAN & CRAGG, 2007). Cerca de 50% das drogas introduzidas no mercado durante os últimos 20 anos são derivadas diretamente ou indiretamente de estudos que utilizam moléculas pequenas de origem natural (BARREIRO & BOLZANI, 2009)

A maioria dos estudos está voltada para o isolamento e a identificação de substâncias, muitas vezes associada a ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos, contribuindo expressivamente para a formação de recursos humanos competentes na área de produtos naturais (PUPO, GALLO & VIEIRA, 2007).

Atualmente, pesquisas envolvendo fármacos inibidores de AChE com ação prolongada, com maior eficácia e com menores riscos de efeitos adversos, ainda permanece o foco de diversos pesquisadores. A diversidade estrutural dos inibidores da enzima AChE já conhecidos e a possibilidade de aperfeiçoar mecanismos de ação diferentes, instigaram estudos fitoquímicos com diversas espécies de plantas e micro-organismos com base no uso popular ou dados etnobotânicos (HOWES & HOUGHTON, 2003; KHALID, ARSHAD & ZAHIR, 2004).

Estudos de revisão demonstraram que cerca de 70% dos extratos de 309 plantas pertencentes a 92 famílias botânicas, bem como, 260 substâncias isoladas

que foram submetidas ao ensaio anticolinesterásico, apresentaram resultados significativos no que se refere à inibição enzimática colinérgica. Das espécies ativas, 12 eram brasileiras e uma das principais classes isoladas capazes de inibir a enzima AChE foram os alcalóides (BARBOSA FILHO et al., 2006).

A huperzina A (Figura 4), um alcalóide isolado da espécie *Huperzia serrata*, uma espécie nativa na China, onde já é utilizada há muitos anos para o tratamento de distúrbios cognitivos, está passando por estudos clínicos para o tratamento da DA e apresentou poucos efeitos colaterais quando comparado com inibidores comerciais (WANG et al., 2009).

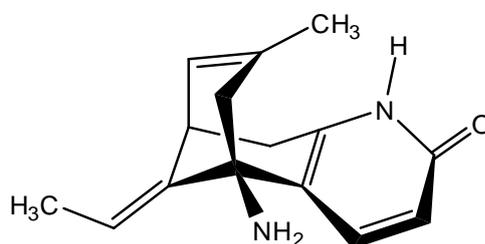


Figura 4. Huperzina A

Estudos utilizando o método de Ellman para investigação anticolinesterásica envolvendo as enzimas AChE e BChE demonstraram que o óleo essencial de *Salvia leiriifolia* possui atividade inibitória significativa, com concentração inibitória mínima (CI₅₀) de 0,32 µL/mL para AChE e 0,29 µL/mL para BChE. Os constituintes principais do óleo de *S. leiriifolia* são cânfora (10,5%), 1,8-cineol (8,6%), canfeno (6,2%) e α-pineno (4,7%) (LOIZZO et al., 2009).

Ensaio biológicos utilizando camundongos injetados com proteína β-amilóide no hipocampo para mimetizar DA, foram utilizados para demonstrar que os óleos essenciais de 09 plantas da tradicional medicina chinesa (SuHeXiang Wan) possuem potencial terapêutico para inalação na prevenção e tratamento da DA, os principais constituintes químicos são endo-borneol (33,3%) e borneol (21,3%) (JEON et al., 2011). Outras pesquisas também evidenciaram a eficácia de monoterpenos como 1,8-cineol, carvacrol, verbenona e, principalmente, mirtenol na inibição da AChE (KAUFMANN, DOGRA & WINK, 2011).

O óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss (ZM) também foi investigado utilizando ratos induzidos com a DA, nesta pesquisa os animais foram submetidos ao ensaio do labirinto aquático e os resultados demonstraram que a administração

de ZM atenuou os efeitos da injeção de β -amilóide nos ratos, sugerindo que óleo essencial de ZM possa ser eficaz no tratamento de DA e os principais componentes do óleo são carvacrol (61,3%) e timol (25,1%) (MAJLESSI et al., 2012).

Estudos envolvendo as folhas de *Citrus aurantifolia* demonstrou que o óleo essencial dessa espécie possui atividade inibitória frente à enzima AChE, atingindo CI_{50} de $139 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seus principais constituintes são monoterpenos incluindo limoneno, L-cânfora, citronelol, *o*-cimeno e 1,8-cineol (CHAIYANA & OKONOJI, 2012).

3.3 Espécies selecionadas para o ensaio

Neste trabalho, para o estudo da inibição da atividade enzimática foram selecionados os óleos essenciais das espécies *Piper aduncum*, *Piper callosum*, *Piper divaricatum* e *Piper marginatum* pertencentes à família Piperaceae e a espécie *Aniba canelilla* pertencente à família Lauraceae (Figura 5).

O critério de seleção das espécies esteve associado tanto ao uso popular, quanto ao teor elevado de compostos fenilpropanoídicos como constituintes majoritários dos óleos essenciais. Os fenilpropanóides constituem uma classe de compostos fenólicos derivados do ácido chiquímico e detentores de três átomos de carbonos ligados a um anel benzóico. Estudos relatam atividade hepatoprotetora (LEE, et al., 2002), anti-helmíntica (PESSOA, et al. 2002), antialérgica (MATSUDA et al., 2003), larvicida (SIMAS et al., 2004), antimicrobiana (ACERO-ORTEGA et al., 2005), fungicida e pró-oxidante (GARCEZ et al., 2009), mas não há relatos que reportem atividade inibitória destes compostos frente à enzima AChE. Os principais fenilpropanóides conhecidos são: eugenol, metileugenol, miristicina, elemicina, chavicol, metilchavicol, dilapiol, anetol, estragol e apiol (SANGWAN et al., 2001).

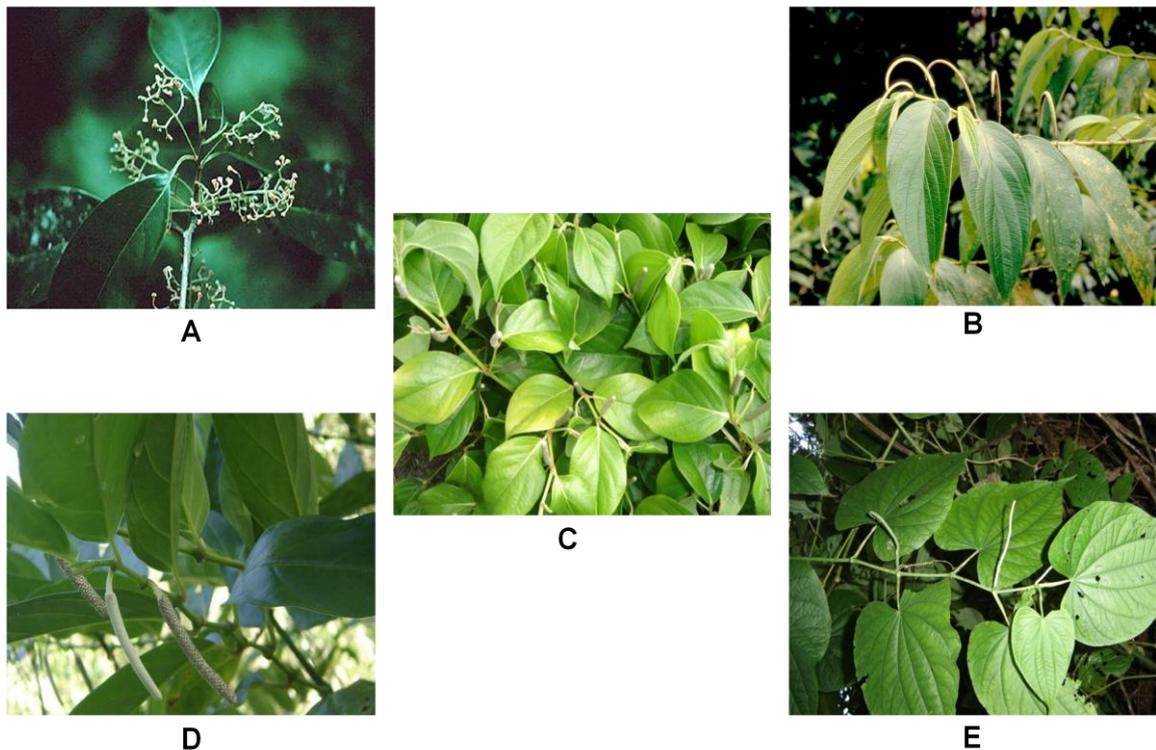


Figura 5. Espécies submetidas ao ensaio de inibição da AChE: **A-***Aniba canelilla*, **B-** *Piper aduncum*, **C-***Piper callosum*, **D-** *Piper divaricatum*, **E-** *Piper marginatum* (Fonte: Base de dados das espécies de Piperaceae da Amazônia; www.tropicos.org).

O gênero *Piper* é o mais representativo da família Piperaceae e abrange cerca de 1000 espécies. Estima-se que das 260 espécies com ocorrência no Brasil, 140 estão distribuídas na Amazônia (JARAMILLO, MANOS & ZIMMER, 2004; GUIMARÃES & GIORDANO, 2004). Espécies de *Piper* são usadas na medicina popular no tratamento de doenças venéreas, desordens intestinais, males geniturinárias, epilepsia e para prevenir concepção (FACUNDO, 2012). Os óleos essenciais de *Piper* são caracterizados pela presença de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides com significativos efeitos biológicos (PARMAR et al., 1997; MARTINS et al., 1998; MOREIRA, GUIMARÃES & KAPLAN, 1998).

P. aduncum é conhecido como “pimenta de macaco”, popularmente é utilizado como diurético, digestivo, para males do fígado, no combate a erisipela, tratamento de úlceras crônicas e antidiarreico, (COIMBRA, 1994, BOLTSBURS, 1997, VIEIRA, 1991). O óleo essencial de *P. aduncum* apresentou atividade contra o fungo *Crinipellis pernicioso*, causador da doença conhecida como “vassoura de bruxa”, que acomete culturas de cacau e cupuaçu (BASTOS, 1997). O extrato etanólico das partes aéreas de *P. aduncum* apresentou efeito bactericida frente a

bactérias gram-positivas (KOKOSKA et al., 2005). As atividades antimicrobianas, larvicida e inseticida são atribuídas ao componente majoritário, o fenilpropanóide dilapiol (MAIA et al., 1997; BASTOS, 1997). O dilapiol mostrou uma ação fungicida contra o fungo *Clinipellis pernicioso*, larvicida e inseticida frente às larvas e os insetos adultos de *Anopheles marajoara* (mosquito da malária) e *Aedes aegypti* (mosquito da dengue) (DE ALMEIDA et al., 2009)

P. callosum é conhecido como “elixir paregórico” e o chá de suas folhas é usado popularmente no tratamento de cólicas menstruais e intestinais, hemorragia local, náusea, picadas de mosquito, diarréia, reumatismo e leucorréia (BERG, 1993; VIEIRA, 1991). O óleo essencial inibiu 100% do crescimento dos fitopatógenos *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici* (SILVA & BASTOS, 2007). A atividade antimicrobiana também foi observada para as flavonas pentaoxigenadas presentes no extrato etanólico (FACUNDO, MORAES & FILHO, 2012).

P. divaricatum, é conhecido como “pau de angola”, as folhas e raízes são utilizadas popularmente em dores reumáticas e cólicas (PECKOLT & PECKOLT, 1888). O óleo essencial mostrou-se alta capacidade antioxidante, atuando como sequestrador de radicais DPPH^{*} e inibidor da peroxidação lipídica no sistema β -caroteno/ ácido linoléico (DA SILVA et al., 2010).

P. marginatum é conhecido como “malvarisco” e usado popularmente como estimulante, diurético, contra as dores de dente, picada de insetos e de cobra (CORRÊA, 1984; DI STASI et al., 1989). O óleo essencial de suas inflorescências revelou potente atividade frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* (AUTRAN et al., 2009). Observou-se efeito inseticida dos óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. marginatum*, *P. divaricatum* e *P. callosum*, contra formigas trabalhadoras de fogo *Solenopsis saevissima* (SOUTO et al., 2012).

A família Lauraceae é constituída por 52 gêneros, com distribuição tropical e subtropical (MARQUES, 2001). Os gêneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea* são importantes economicamente, pois fornecem madeira valiosa, óleos aromáticos e substâncias amplamente utilizadas na indústria farmacêutica e de alimentos (MARQUES, 2001). *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez é uma espécie nativa da Amazônia, conhecida como casca preciosa e canela-cheirosa. O chá de suas cascas é utilizado como digestivo, carminativo e anti-inflamatório (MAIA, ZOGHBI & ANDRADE, 2001). O principal componente do óleo essencial de *A. canelilla* é o 1-nitro-2-feniletano,

uma molécula com ocorrência natural rara, derivada da fenilalanina (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960). Vários estudos reportam a atividade biológica do 1-nitro-2-feniletano, como fungicida, antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório e efeitos hipotensor, bradicárdico e vasodilatador (DA SILVA et al., 2007; DE LIMA, et al., 2009; SIQUEIRA et al. 2010; BRITO et al., 2013).

3.4 Bioautografia direta

A necessidade de tornar mais objetivas e menos dispendiosas as pesquisas por produtos naturais levou ao desenvolvimento de numerosas técnicas de ensaios para monitoramento e seleção de extratos e substâncias bioativas (VIEGAS JR et al., 2004). A cromatografia em camada delgada (CCD), por exemplo, em combinação com métodos de detecção química ou biológica, é uma técnica eficaz e de baixo custo para o estudo de extratos de plantas. A CCD quando combinada com um método de detecção biológica é conhecido como bioautografia.

Historicamente, a técnica da bioautografia é conhecida desde 1946 e se enquadra na categoria dos chamados bioensaios de bancada. Diferentemente da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), várias amostras podem ser avaliadas ao mesmo tempo e nas mesmas condições de análise (VALGAS, 2002).

A bioautografia é um método de detecção pós-cromatográfico, baseada na separação de substâncias por cromatografia em papel ou CCD e tem como finalidade a localização de zonas de inibição de substâncias ou frações que foram aplicadas na cromatoplaça e que possuam atividade inibitória (HOSTETTMANN et al., 2008).

A bioautografia direta pode ser dividida em: cultivo do microorganismo para o teste, a separação cromatográfica e a detecção pós-cromatográfica (HORVÁTH et al., 2010). Neste ensaio, a cultura líquida do microorganismo é borrifada sobre a cromatoplaça e cresce diretamente sobre a mesma (CHOMA, 2005; MASOKO & ELOFF, 2005). A bioautografia direta também é utilizada para triagem de inibidores da AChE, primeiramente foi desenvolvido por Rhee et al (2001) e posteriormente modificado por Marston, Kissling & Hostettmann (2002).

3.5 Docagem molecular

A docagem molecular consiste em prever a conformação bioativa de uma micromolécula (ligante) no sítio de uma macromolécula seguida de avaliação e classificação do modo de ligação proposto (MOITESSIER et al., 2008).

Nesta abordagem, a estrutura do alvo molecular permanece fixa e diversas posições de encaixe possíveis para o ligante são identificadas computacionalmente. A predição do ligante mais adequado pode ser feita a partir da aplicação de funções escores empíricas, que analisam a interação do complexo (SHOICHET, 2004). Uma estratégia bastante difundida que emprega os métodos de docagem molecular é a triagem virtual (VS), nesta aplicação, os programas de docagem molecular são utilizados para identificar e classificar as conformações bioativas de moléculas pertencentes a bases de dados podendo conter centenas de milhares de compostos disponíveis para aquisição comercial ou síntese, a exemplo do *software MolDock* 4.1.0 (MOITESSIER et al., 2008; THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

O software *MolDock* (Molegro Virtual Docker, MVD) é um programa que calcula energias de interação entre ligantes e macromoléculas utilizando as estruturas tridimensionais da proteína e do ligante, que podem ser obtidas através de modelos de homologia ou experimentos de raio-X/RMN. O MVD permite realizar o ancoramento considerando o ligante rígido para melhor acurácia dos resultados (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

O MolDock Score é um algoritmo que fornece uma energia medida em kcal/mol sem alguma interpretação química e é calculada pela equação:

$$E_{score} = E_{intra} + E_{inter}$$

Onde E_{inter} é a energia de interação entre a proteína e o ligante e E_{intra} é a energia interna do ligante.

A E_{inter} é calculada pela seguinte equação:

$$E_{inter} = \sum_{i=ligand} \sum_{j=protein} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right]$$

O termo de E_{PLP} é o potencial “*piecewise linear*” (GEHLHAAR, 1995; YANG & CHEN, 2004) e usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos e outro potencial para a ligação hidrogênio.

A E_{intra} é calculada segundo a equação:

$$E_{intra} = \sum_{i=\text{ligand}} \sum_{j=\text{protein}} [E_{PLP}(r_{ij})] + \sum_{\text{flexible bonds}} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{clash}$$

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à torção da energia, onde θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se diversas torções são determinadas. O último termo, E_{clash} , atribui uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2.0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a capacidade anticolinesterásica dos óleos essenciais e dos constituintes majoritários de *Aniba canelilla*, *Piper aduncum*, *Piper callosum*, *Piper divaricatum* e *Piper marginatum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar os compostos majoritários de óleos essenciais com atividade anticolinesterásica por cromatografia em coluna;
- Identificar a composição química dos óleos essenciais e dos compostos majoritários por cromatografia de fase gasosa com ionização de chamas e cromatografia de fase gasosa com espectrômetro de massas;
- Realizar o estudo de docagem molecular e potencial eletrostático molecular do composto isolado de maior atividade.



MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chamas, FOCUS CG Thermo;
- Cromatógrafo de fase gasosa com espectrômetro de massas, DSQ II Thermo;
- Evaporador rotativo HEIDORPH 400;
- Medidor de umidade, GEHAKA, modelo IV 2500
- Centrífuga FANEM, modelo 206;
- Balança analítica CELTAC, modelo FA2104N;
- Balança semi-analítica BIOPRECISA, modelo BS3000A;
- Pipetadores automáticos LABMATE E EPPENDORF (2-10 μL , 10 – 100 μL , 100- 1000 μL , 1000-5000 μL);
- Placas de alumínio de sílica-gel 60, UV₂₅₄, WHATMAN;
- Borrifador automático para CCDAE – CAMAG, modelo NANOMAT 4;

4.2 Reagentes

4.2.1 TESTE DE INIBIÇÃO DA AChE

- Albumina bovina fração V em pó, 96% de pureza, SIGMA-ALDRICH;
- Acetato de α -naftila, C₁₂H₁₀O₂, SIGMA-ALDRICH;
- Acetilcolinesterase de peixe elétrico, 500U, SIGMA-ALDRICH;
- Cloridrato de trizma grau reagente (Trizma[®]), C₄H₁₁NO₃, 99% de pureza, SIGMA-ALDRICH;
- Corante *Fast Blue* salino, C₁₄H₁₂Cl₄N₄O₂Zn, 95% de pureza, SIGMA-ALDRICH;
- Eserina base livre (fisostigmina), C₁₅H₂₁N₃O₂, SIGMA-ALDRICH.

4.2.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

- Cromatofolhas AL TLC 20 X 20 cm, sílica gel 60 UV₂₅₄, WHATMAN;
- Sílica-gel 70-230 mesh para cromatografia em coluna; VETEC.
- Acetato de etila P.A, C₄H₈O₂, VETEC;
- Hexano P.A, C₆H₁₄, VETEC.
- Metanol P.A, CH₄O, SYNTH.

4.3 Coleta do material botânico

As amostras de plantas foram coletadas em diferentes localidades do Estado do Pará (Quadro 1). O exemplar de cada espécie foi identificado por comparação autêntica com as exsicatas registradas no herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém (PA).

Quadro 1. Locais de coleta e código das espécies.

Espécies	Nº da exsicata	Local de coleta
<i>Aniba canelilla</i>	174904	Ulionópolis-PA
<i>Piper aduncum</i>	184882	Belém-PA
<i>Piper callosum</i>	181312	Barcarena-PA
<i>Piper divaricatum</i>	181309	Breves-PA
<i>Piper marginatum</i>	184921	Barcarena-PA

4.3.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.

O material botânico foi seco em estufa com ventilação por 48h, posteriormente, triturado e moído. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em processo contínuo, com duração de 3h, utilizando aparelho de Clevenger modificado acoplado a sistema de refrigeração com temperatura de 15°C. Os óleos essenciais foram centrifugados e secos com Na₂SO₄ anidro e refrigerados a 5-10°C. A umidade do material foi determinada por um medidor por Infravermelho (GEHAKA, modelo IV 2500).

4.3.2 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise quantitativa da composição química dos óleos e de suas frações foi analisada por CG-DIC (cromatografia de fase gasosa com detector de ionização de chamas), equipamento FOCUS (Thermo electron) equipado com coluna capilar DB-5 (30m x 0,25 mm x 0,25µm), nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,2 mL/min), injeção splitless (split flow 20:1) temperaturas do injetor e detector 250°C e aquecimento da coluna de 60 a 240°C (variação de 3°C/min). A análise qualitativa foi feita nas mesmas condições, usando CG-EM (cromatografia de fase gasosa com espectrometria de massas), equipamento DSQ II, gás de arraste: Hélio, fonte de íons: 70 eV (impacto eletrônico), temperatura da fonte de íons e da linha de transferência de 200°C.

4.3.3 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS

Os óleos essenciais (1,0 g) de *A. canelilla*, *P. aduncum*, *P. callosum* e *P. divaricatum* foram fracionados em coluna em gel de sílica 60 (70 – 230 mesh) para isolamento de seus compostos majoritários. A coluna foi eluída com misturas de hexano/acetato de etila em ordem crescente de polaridade variando de 0 a 15% de acetato de etila. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas por cromatografia em camada delgada e CG-DIC.

4.4 Atividade inibitória da AChE

O método de bioautografia utilizado no ensaio da AChE baseia-se na clivagem do 1-naftil acetato pela enzima AChE para formar 1-naftol, que por sua vez, reage com o sal *Fast Blue B* para dar uma coloração diazônio púrpura (Figura 6). As regiões da placa que contem substâncias capazes de inibir a ação da enzima AChE apresentam uma mancha branca contra a coloração de fundo roxo (MARSTON, KISSLING & HOSTETTMANN, 2002).

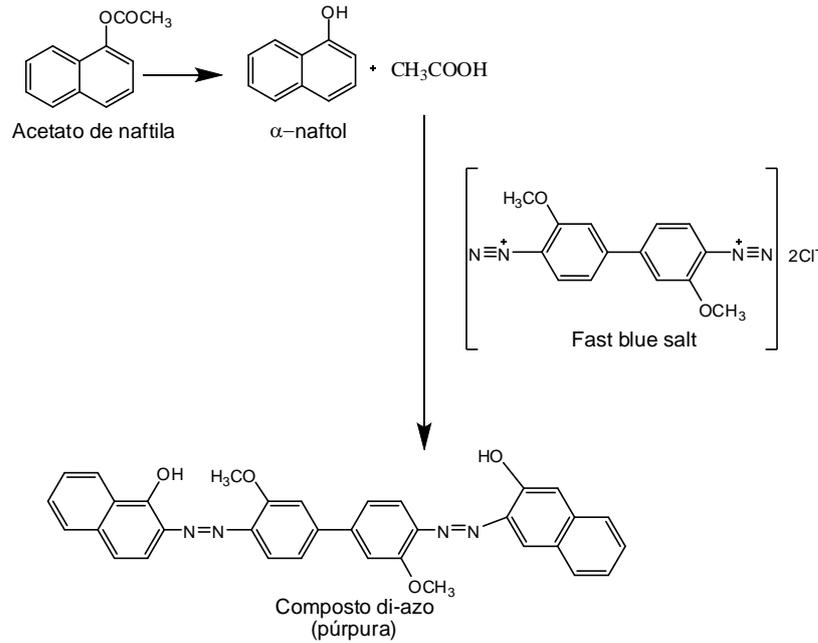


Figura 6. Reação da acetilcolinesterase com o acetato de naftila.

Os óleos essenciais e suas frações foram solubilizados em metanol a uma concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As amostras ($10 \mu\text{L}$) foram aplicadas na placa de CCD de modo a se obter as quantidades de 1000 a $0,01 \text{ ng/spot}$.

A enzima AChE (500U) foi solubilizada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) seguida da adição de 150 mg de albumina de soro bovino para estabilização e armazenada a temperatura de 4°C . As placas foram pulverizadas com solução de AChE e incubadas em ambiente úmido, sem contato direto com água, a temperatura de 37°C por 20 minutos. Posteriormente, foi pulverizada sobre a placa uma mistura das soluções de acetato de naftila (25% em Etanol) e *Fast Blue salt* (25% em água) na proporção de 1:4. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso para evitar a decomposição. Após 3 minutos, as placas apresentaram uma coloração roxa de fundo. As substâncias presentes nas amostras com potencial inibidor apresentaram zonas brancas. O alcalóide fisostigmina foi utilizado como padrão. (MARSTON, KISSLING & HOSTETTMANN, 2002).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química dos óleos essenciais

A identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais de *A. canelilla* (**OAc**), *P. aduncum* (**OPa**), *P. callosum* (**OPc**), *P. divaricatum* (**OPd**) e *P. marginatum* (**OPm**) (Tabela 1) foi realizada por CG-EM, com base na análise dos espectros de massa e do índice de retenção (IR), em comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2007). Foram identificados 75 constituintes, com concentrações de 0,1 a 91,4%. O total identificado nos óleos essenciais variou de 93,2 a 99,3.

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais.

Constituintes	IR	OAc	OPa	OPc	OPd	OPm
sabineno	969			tr		
β -pineno	974		0,1	0,2		
mirreno	988			0,1		
δ -2-careno	1001			0,1		
<i>p</i> -cimeno	1020		0,1	0,1		0,1
limoneno	1024			0,1		
1,8-cineol	1026			0,7		
β -felandreno	1027		0,3			
(Z)- β -ocimeno	1032				0,1	0,3
(E)- β -ocimeno	1044	0,5			1,8	0,77
γ -terpineno	1054		0,2	0,9		0,2
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1065		0,1	tr		
terpinoleno	1086			0,3		
linalol	1095			0,3		
<i>alo</i> -ocimeno	1128					0,2
cânfora	1141			0,1		0,1
<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	1141	0,3				
<i>isoborneol</i>	1155			tr		
borneol	1165			0,2		0,2
terpinen-4-ol	1174			tr		0,1
<i>p</i> -cimen-8-ol	1179					0,1
α -terpineol	1186		0,7	0,2		0,1
metilchavicol	1195					0,2
piperitona	1249		2,2			

safrol	1285	0,5	70,4		29,5
1-nitro-2-feniletano	1327	70,2			
δ -elemeno	1335				3,1
α -cubebeno	1345		0,2		
eugenol	1359	0,8		0,9	
α -ilangeno	1373		0,1		
α -copaeno	1374		0,2	0,1	1,1
β -bourboneno	1387		1,0		0,3
β -elemeno	1389		tr	3,5	0,3
metileugenol	1403	25,8	10,6	89,8	4,2
(E)-cariofileno	1417		1,1	1,0	0,6
β -copaeno	1430				0,3
β -gurjuneno	1431		0,1	0,1	
γ -elemeno	1435		0,1		
<i>trans</i> -muurolo-3.5-dieno	1451		0,1		
α -humuleno	1452		0,5	0,3	
croweacina	1457				8,0
γ -muurolo	1478		0,79		0,1
germacreno D	1484		0,1	1,0	2,0
β -selineno	1489				0,3
(E)-metiliseugenol	1491		0,1		
<i>trans</i> -muurolo-4(14),5-dieno	1493		tr		
<i>epi</i> -cubebol	1493		0,2		
valenceno	1496				0,2
α -muurolo	1500		tr		0,2
biciclogermacreno	1500				3,3
pentadecano	1500		0,5		
β -dihidroagarofurano	1503				0,1
γ -cadineno	1513		tr		0,1
cubebol	1514	0,1	0,1		
δ -cadineno	1522		0,2	0,9	1,0
3,4-metilenodioxipropiofenona	1544				21,7
elemicina	1555	0,1	0,6		2,2
(E)-nerolidol	1561		5,9		2,5
germacreno D-4-ol	1574		0,1		
espatulenol	1577				2,2
óxido de cariofileno	1582	0,2			
viridiflorol	1592		0,3		0,4
hepóxido de humuleno ii	1609	0,1			

dilapiol	1621	91,4				
<i>epi</i> -cubenol	1627		0,1			
<i>epi</i> - α -cadinol	1638		0,1		0,1	
<i>epi</i> - α -murrolol	1640		0,1		0,2	
α -muurolol	1644		0,1		0,2	
α -eudesmol	1652		0,9		0,5	
α -cadinol	1652		1,0		1,0	
selin-11-en-4- α -ol	1660	1,2				
intermedeol	1665				0,5	
apiol	1678		0,4			
2-hidroxi-3,4-metilenedioxipropiofenona	1693				4,9	
<hr/>						
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,5	0,7	1,8	1,9	1,6
Monoterpenos oxigenados		0,3	3,0	1,5		0,6
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			2,1	4,9	6,6	12,7
Sesquiterpenos oxigenados		1,2	0,4	8,7		7,7
Fenilpropanóides		97,3	92,0	81,8	90,7	70,6
Outros				0,5		
Total identificado		99,3	98,2	99,2	99,2	93,2

*tr- traços (< 0,1%)

Os óleos essenciais mostraram-se ricos em fenilpropanóides e, secundariamente, em mono- e sesquiterpenos. A classe de constituintes fenilpropanoídicos variou de 27,1% a 91,4% nos óleos analisados.

O óleo de **OAc** apresentou como constituinte majoritário dois fenilpropanóides: 1-nitro-2-feniletano (70,2%), e metileugenol (25,8%) (Figura 7), esses compostos representam 96,0% da composição total de **OAc**. Estudos anteriores reportam variação no teor percentual dos constituintes majoritários, 1-nitro-2-feniletano e metileugenol, que pode variar de 39,0 a 94,8% e de 0,2 a 45,8%, respectivamente, fato justificado pela da variação sazonal do óleo de **OAc**. (TAVEIRA, et al., 2003). As folhas e os galhos finos da *Aniba canelilla* também evidenciaram a presença de 1-nitro-2-feniletano, 71,2% e 68,2%, respectivamente (LIMA et al. 2004). A presença de 1-nitro-2-feniletano também foi relatada no óleo essencial de *Ocotea pretiosa* (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1959). Nitroderivados encontrados em plantas superiores são raros, no caso de 1-nitro-2-feniletano, a sua biogênese envolve oxidação da fenilalanina seguida por descarboxilação espontânea (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960).

O segundo composto majoritário encontrado no óleo de **OAc** foi o fenilpropanóide metileugenol, comumente encontrado em muitas espécies de plantas, particularmente em especiarias e plantas medicinais. Pode ser convertido em outros úteis fenilpropanóides, como elemicina, miristicina, e, em seguida, no último composto, dilapiol, através da regulação dos dois genes em *Perilla frutescens* (Lamiaceae) (KOEZUKA et al. 1986). Existe um total de mais de 450 espécies de 80 famílias e 38 ordens diferentes de plantas que contêm quantidades de metileugenol em óleos essenciais de folhas, raízes, caules, flores, ou extratos vegetais inteiros (TAN & NISHIDA, 2012)

No óleo de **OPa** predominou o fenilpropanóide dilapiol (91,4%) (Figura 7), o que representa um percentual expressivo da totalidade do óleo essencial. Estes resultados assemelham-se com o “tipo químico A, dilapiol” do estudo que investigou vinte e um espécimes de *P. aduncum* e os agrupou, por técnicas de análise hierárquica de agrupamento (AHA), em quatro tipos químicos: A, B, C e D (ANDRADE, GUIMARÃES & MAIA, 2009). No tipo químico A, predomina o alto teor do fenilpropanóide dilapiol (57,6-96,2%), seguido de piperitona (0,5-7,5%) (MAIA et al., 1998). Estima-se que produção do dilapiol está associada a fatores fisiográficos, com altos teores sendo encontrados nos indivíduos da região amazônica (BERGO, 2010). Em diferentes regiões do estado de Pernambuco o composto majoritário foi o sesquiterpeno oxigenado *E*-nerolidol, variando de 79,2 a 82,5% (OLIVEIRA et al., 2006).

O óleo de **OPc** demonstrou a prevalência do fenilpropanóide, safrol (70,4%) (Figura 7). Os resultados da análise da composição química são corroborados pelo estudo que investigou a composição química e toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* do óleo essencial de *P. callosum* coletado em Marituba (PA), cujo principal constituinte químico é o safrol (78%), os resultados sugerem alta toxicidade do óleo frente às larvas (ANDRADE et al., 2007). Entretanto, os resultados encontrados diferenciam-se dos espécimes cultivados no Peru, que demonstraram o fenilpropanóide asaricina (35,9%) como componente majoritário do óleo essencial das folhas de *P. callosum*, seguido do safrol (20,2%) (VAN GENDEREN et al., 1999).

O fenilpropanóide metileugenol (89,8%) (Figura 7) foi identificado como constituinte majoritário de óleo de **OPd**. O metileugenol também esteve presente em maior concentração (63,8%), seguido do eugenol (23,6%) em espécime coletado no

Marajó (PA) (DA SILVA et al., 2010). Entretanto, a composição química de **OPd** diferenciou-se dos espécimes coletados em Itabuna (BA), com predominância de safrol (98%) (BARBOSA et al., 2012) e daqueles coletados na serra de Guaramiranga (CE), cuja predominância foi de β -pineno (19.3%), linalol (16,5%) e α -pineno (13,6%) (DE ALMEIDA et al., 2007).

O óleo de **OPm** apresentou como constituintes majoritários os fenilpropanóides, safrol (29,5%) e 3,4-metilenodioxipropiofenona (21,7%) (Figura 7), totalizando 51,2% da composição total de **OPm**. Em contraste, espécimes coletadas na Mata Atlântica no estado de Pernambuco apresentaram (*Z*)-asarona (30,4%), álcool patchouli (16%) e elemol (9,7%), como os componentes principais (AUTRAN et al., 2009). Estudos das populações de *P. marginatum* de vários ecossistemas da Amazônia Brasileira agruparam os espécimes em sete quimiotipos diferentes (I a VII), com base em grandes diferenças na composição do óleo essencial das folhas (ANDRADE et al., 2008). Os resultados obtidos na análise dos constituintes químicos de **OPm** demonstram similaridade com o quimiotipo I, cujos componentes majoritários são safrol e 3,4-metilenodioxipropiofenona.

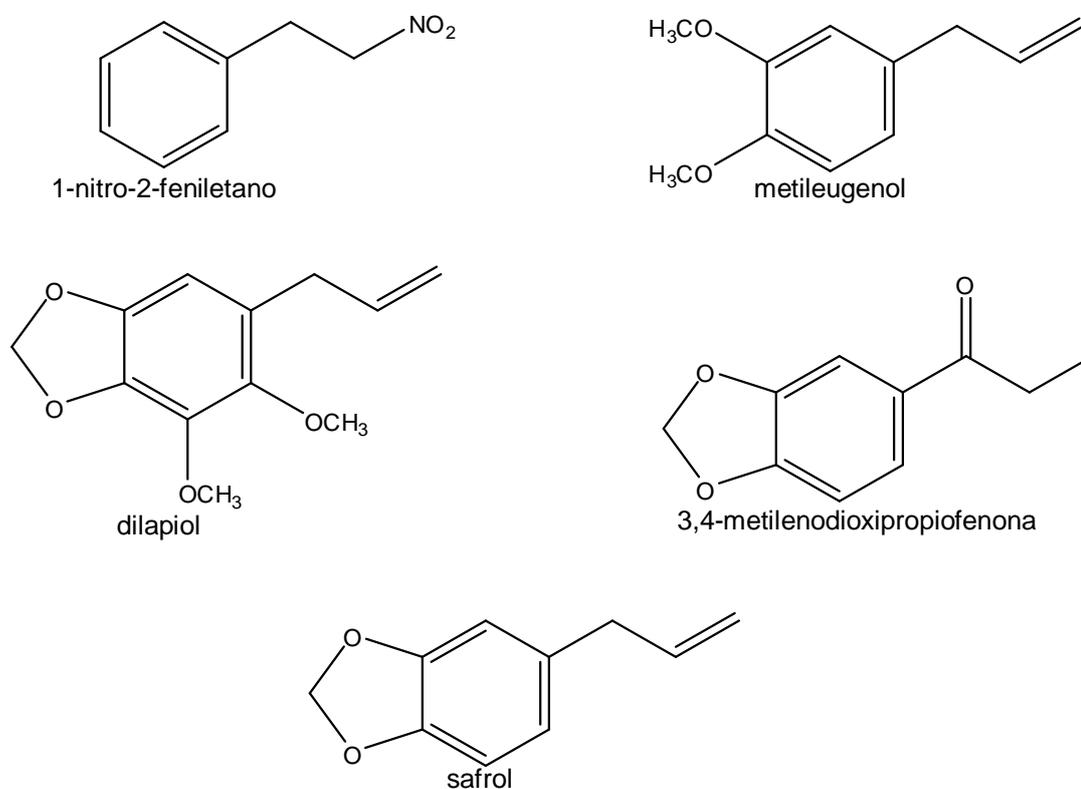


Figura 7. Estruturas químicas dos compostos majoritários dos óleos essenciais.

5.2 Fracionamento e identificação dos compostos isolados

Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas e índice de retenção com aqueles obtidos na identificação do óleo essencial de origem, usando CG-EM.

No fracionamento do óleo essencial de **OAc** foram obtidas quatro frações. O 1-nitro-2-feniletano (87,1%) foi obtido na fração 14-19 (203 mg) com sistema de eluição hexano/acetato de etila 15% (Figura 7).

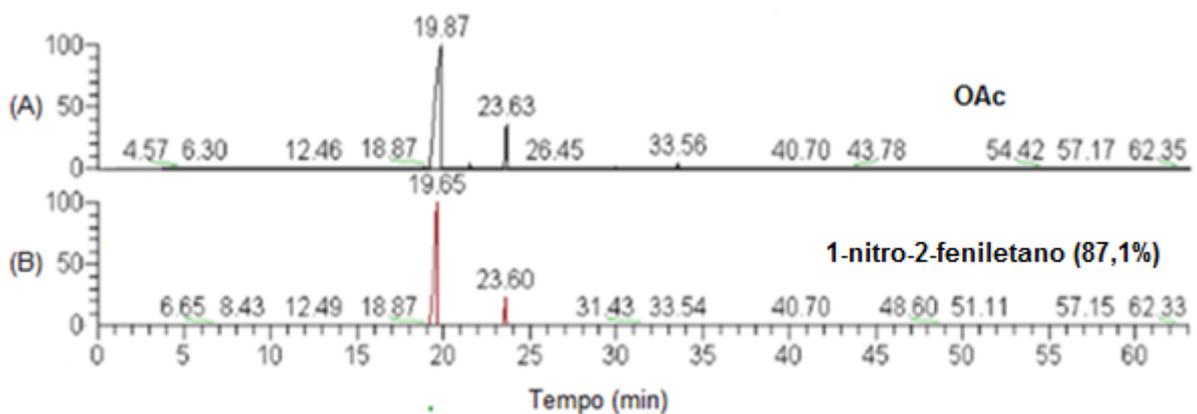


Figura 8. Cromatogramas: (A) Óleo essencial de *A. canellilla*. (B) Fração 14-19

Para o óleo essencial de **OPa**, foram obtidos cinco frações. O dilapiol (95,2%) foi coletado na fração 17-19 (448 mg), eluída em hexano/acetato de etila 5% (Figura 8).

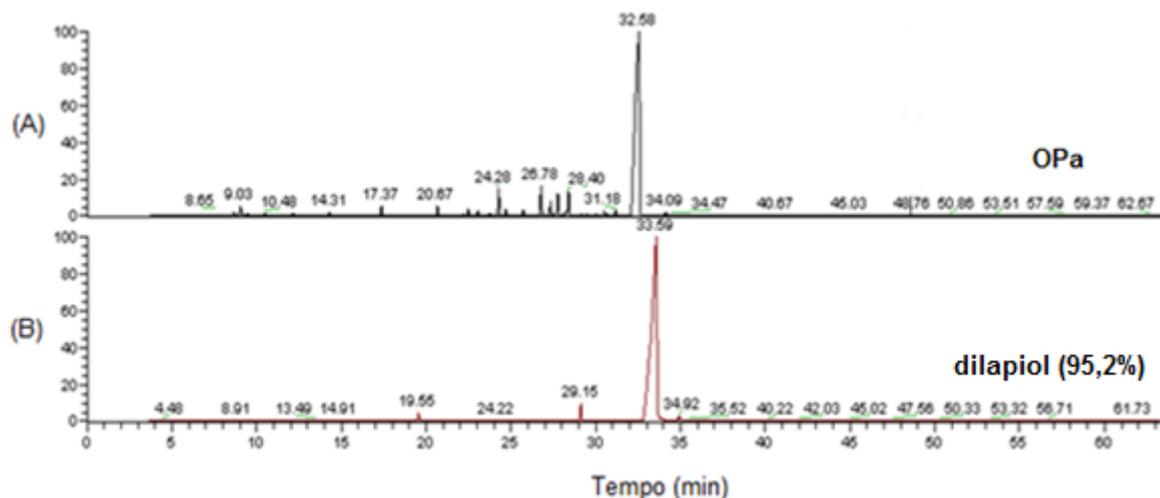


Figura 9. Cromatogramas: (A) Óleo essencial de *P. aduncum*. (B) Fração 17-19

No fracionamento do óleo essencial de **OPc** foram isolados quatro compostos: safrol (97,2%) na fração 14-17 (546 mg), metileugenol (81,3%) na fração 18-20 (355mg), metileugenol (20,3 %) e elemicina (53,6 %) na fração 21-23 (305mg) e elemicina (55,9%), isoelemicina (7,7%) e α -eudesmol (18,7%) na fração 24-28 (282 mg), eluídos em hexano/acetato de etila 10% (Figura 9).

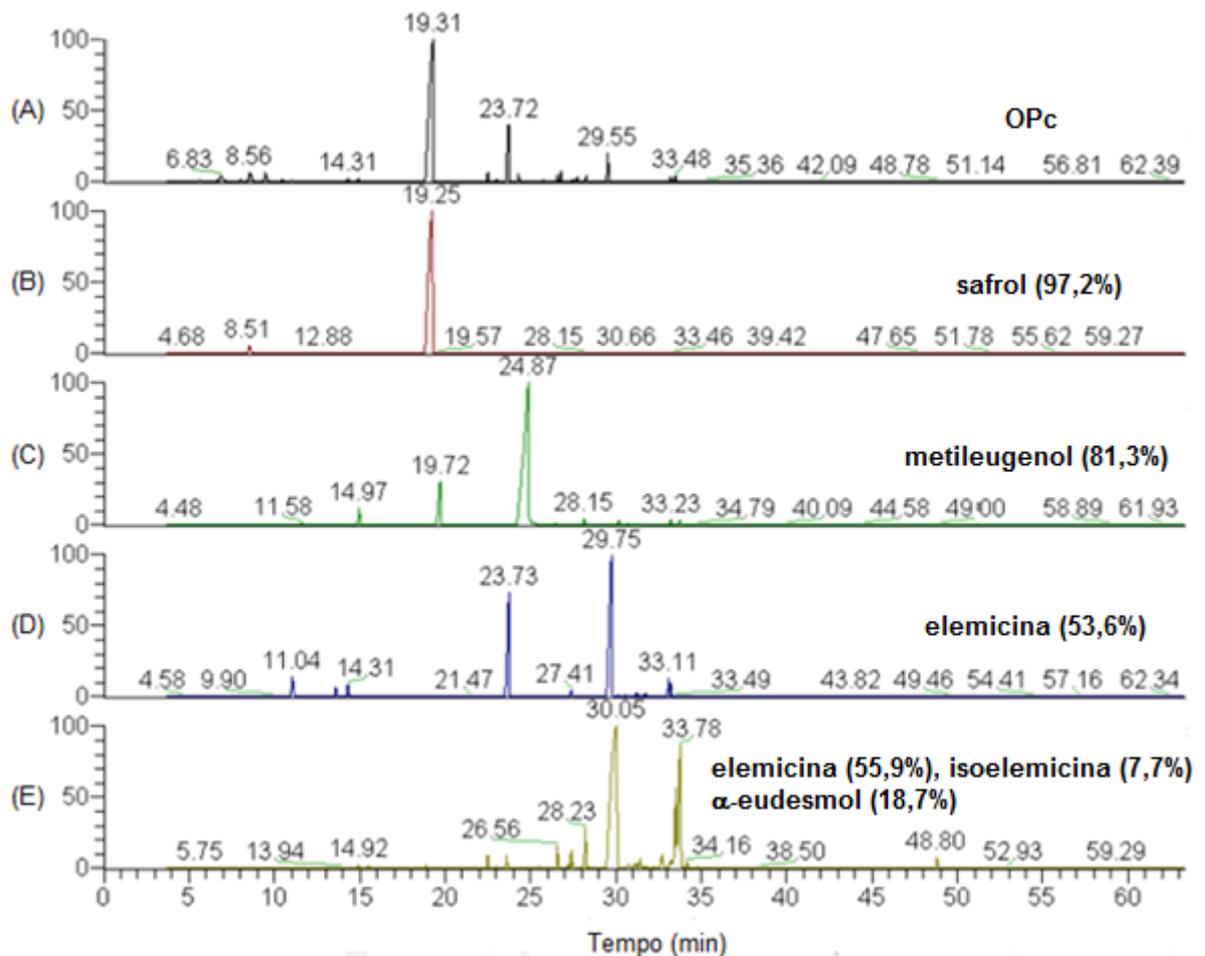


Figura 10. Cromatogramas: (A) Óleo essencial de *P. callosum*. (B) Fração 14-17. (C) Fração 18-20. (D) Fração 21-23. (E) Fração 24-28.

O metileugenol (95,6%) foi obtido na fração 20-24 (537 mg) do óleo essencial de **OPd**, eluído em hexano/acetato de etila 15% (Figura 11).

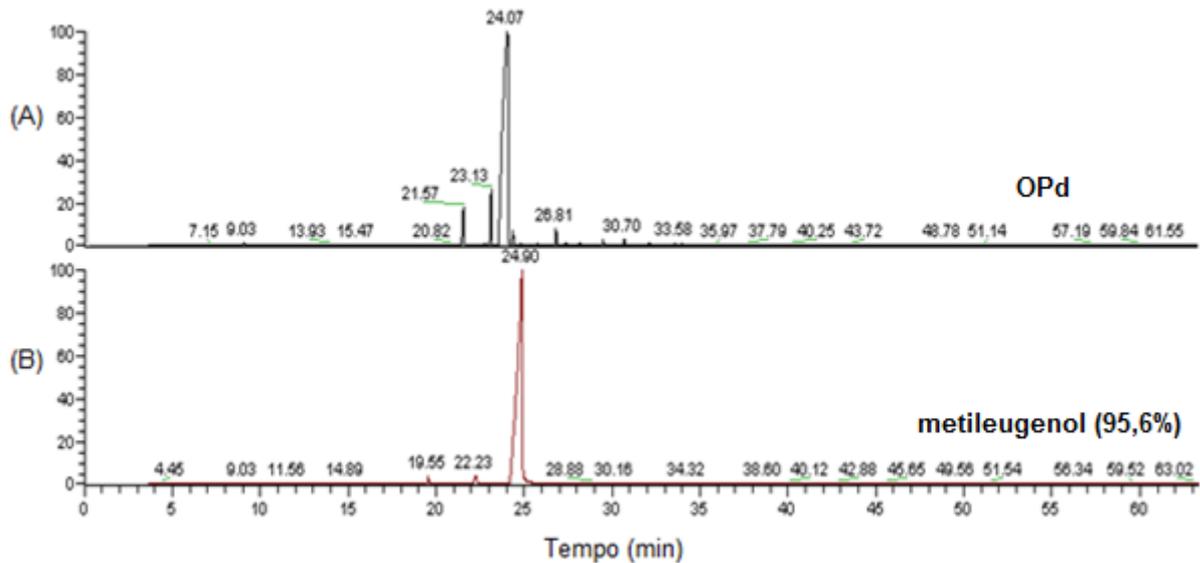


Figura 11: Cromatogramas: (A) Óleo essencial de *P. divaricatum*. (B) Fração 20-24.

5.3 Atividade inibitória da acetilcolinesterase

5.3.1 ENSAIO COM O PADRÃO POSITIVO

O alcalóide fisostigmina foi utilizado como padrão positivo para o teste de inibição da AChE. Foram observados halos de inibição na cromatoplaça em quantidades de 1000 a 0,01 ng (Figura 12), comprovando a reprodutibilidade do ensaio em relação à literatura (MARSTON, KISSILING, HOSTETTMANN, 2002).

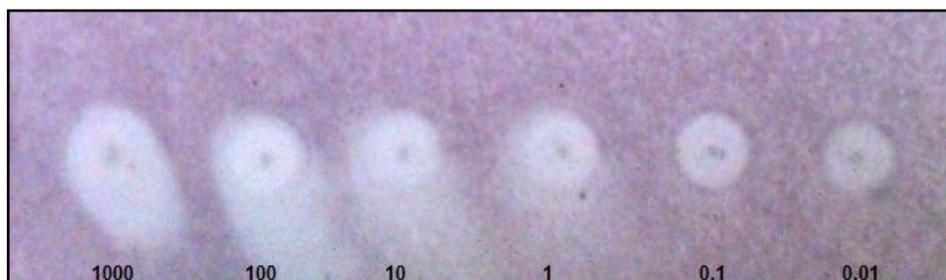


Figura 12. Halos de inibição do alcalóide fisostigmina

5.3.2 ENSAIO COM AS AMOSTRAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

No ensaio utilizando o óleo essencial **OAc** foram detectados halos de inibição em todas as quantidades analisadas, demonstrando ser um excelente inibidor da enzima AChE, semelhante ao padrão fisostigmina. Acredita-se que o componente majoritário, 1-nitro-2-feniletano, seja o principal responsável pela inibição. Estudos envolvendo nitro derivados como inibidores colinesterásicos ainda não foram relatados.

O óleo de *Piper aduncum* (**OPa**) inibiu a enzima em quantidades de 1000 a 1 ng, demonstrando atividade inibitória significativa, porém menor que a do alcalóide fisostigmina e menor que o óleo **OAc**. O óleo de *P. marginatum* (**OPm**) apresentou halo inibitório apenas na quantidade de 100 ng, o que denota fraca capacidade de inibição enzimática. As amostras de *P. callosum* (**OPc**) e *P. divaricatum* (**OPd**) não apresentaram inibição, indicando inatividade enzimática (Tabela 3).

Tabela 3. Limite de detecção da atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais

Amostra	Limite de detecção (ng)
OAc	0,01
OPa	1
OPc	ND
OPd	ND
OPm	100

ND - não detectável

5.3.3 ENSAIO COM OS COMPONENTES MAJORITÁRIOS ISOLADOS

O óleo **OPa** apresentou efeito inibitório, porém seu composto majoritário, o dilapiol (95,2%), foi inativo, sugerindo que a capacidade inibitória do óleo essencial de **OPa** não está associado exclusivamente a presença deste composto. Estudos sugerem existência de interações químicas entre os constituintes dos óleos essenciais que pode resultar em sinergismo ou antagonismo. Isto demonstra que as interações de uma combinação variam de acordo com o as concentrações e proporções entre os agentes (SAVELEV et al., 2003). Desse modo é possível inferir

que a atividade inibitória do óleo essencial de **OPa**, deve-se possivelmente, a combinação de seus constituintes químicos e a ação sinérgica entre eles.

O metileugenol (95,6%) isolado do óleo essencial de **OPd** não apresentou atividade, inferindo que as substâncias que compõem o óleo essencial de **OPd** são inativas tanto isoladas, quanto combinadas em uma matriz complexa.

As frações 14-17 que composta por safrol (97,2%) e 21-23 que continha elemicina (53,6%), como constituintes majoritários do óleo de **OPc** apresentaram inibição enzimática apenas na quantidade de 1000 ng, enquanto que as demais frações foram inativas; sugerindo fraca atividade inibitória (Figura 13). Estudos relatam que as associações 1,8-cineol e α -pineno, bem como o 1,8-cineol e óxido de cariofileno exercem efeito sinérgico, favorecendo a inibição enzimática, enquanto que a associação 1,8-cineol e cânfora apresentam efeito antagonístico (SAVELEV et al., 2003). Estes estudo corroboram os resultados obtidos para o óleo de **OPc** que apresentou-se inativo antes do fracionamento com presença de cânfora (0,1%) e 1,8-cineol (0,7%) e quando fracionado apresentou atividade em duas frações livres dos compostos supracitados.

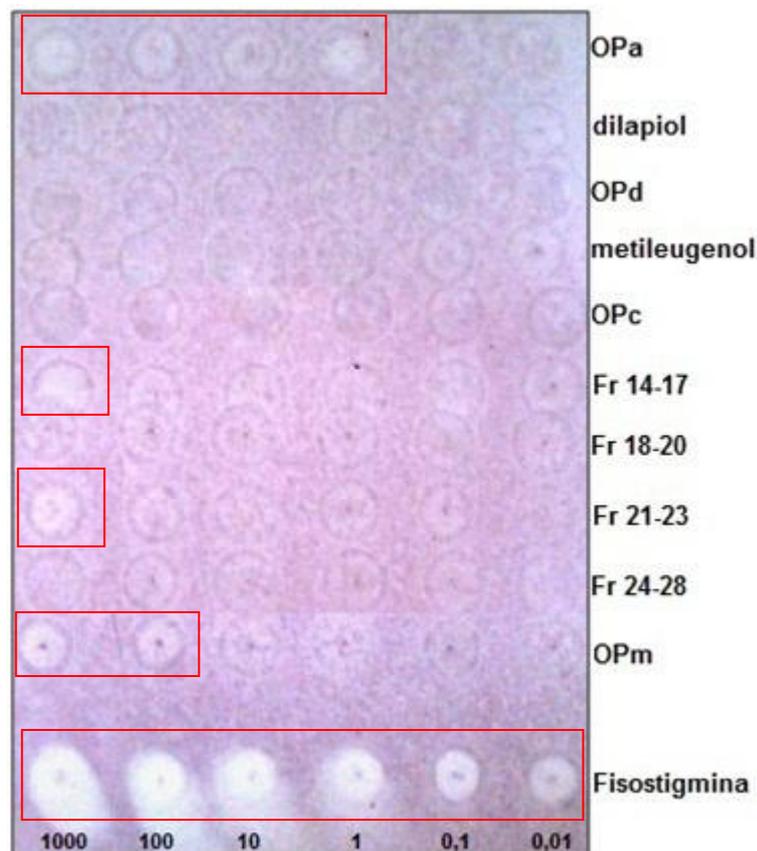


Figura 13: Halo inibitório dos óleos essenciais, frações isoladas e fisostigmina.

De todas as amostras analisadas, o óleo essencial de **OAc** e o seu composto isolado, 1-nitro-2-feniletano (87,1%), apresentaram a maior atividade enzimática, com limite de detecção de 0,01 ng, comparável ao alcalóide fisostigmina (Figura 14), inferindo que a capacidade inibitória enzimática do óleo está intimamente associada os composto majoritário.

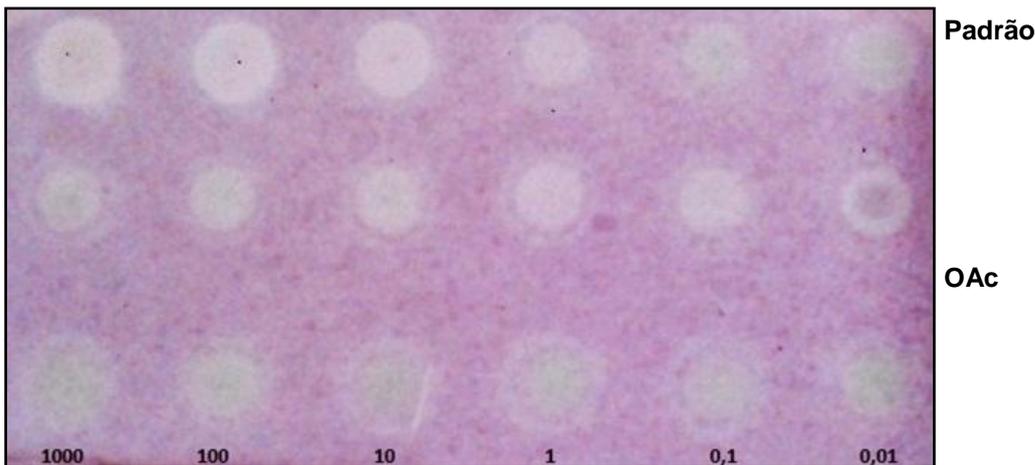


Figura 14. Bioautografia mostrando a atividade anticolinesterásica do óleo de *A. canelilla* e da fração fr 14-19, comparado ao padrão fisostigmina.

5.3.4 DOCAGEM MOLECULAR

O estudo de docagem molecular foi aplicado para o 1-nitro-2-feniletano e comparado com o resultado do padrão fisostigmina, a fim de elucidar e corroborar os resultados do teste bioautográfico. O acoplamento molecular prediz a conformação ideal do complexo enzima-ligante, neste caso a enzima é AChE e os ligantes estão representados pelos inibidores enzimáticos.

Os resultados dos valores de energia indicam que o padrão fisostigmina forma o complexo de maior estabilidade com a AChE, cerca de 1,63 vezes mais que a molécula de 1-nitro-2-feniletano. Os resultados dos cálculos de acoplamento com a função de pontuação MolDock observado para a fisostigmina e 1-nitro-2-feniletano inibidores encontram-se resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Energia de docagem obtidos com *software* MolDock

Inibidores	MolDock (Kcal/mol)
Fisostigmina	-119,80
1-Nitro-2-feniletano	-73,63

Os inibidores, fisostigmina e 1-nitro-2-feniletano, foram submetidos a sobreposição com a cavidade da estrutura cristalográfica em 3D da AChE do peixe elétrico, *Electrophorus electricus* (EeAChE) para obtenção da melhor conformação teórica de cada inibidor (Figura 15). Os resultados sugerem que o *software Molegro Virtual Docker* (MVD) (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006) reproduziu a conformação mais adequada dos inibidores dentro da bolsa de ligação no sítio catalítico da EeAChE.

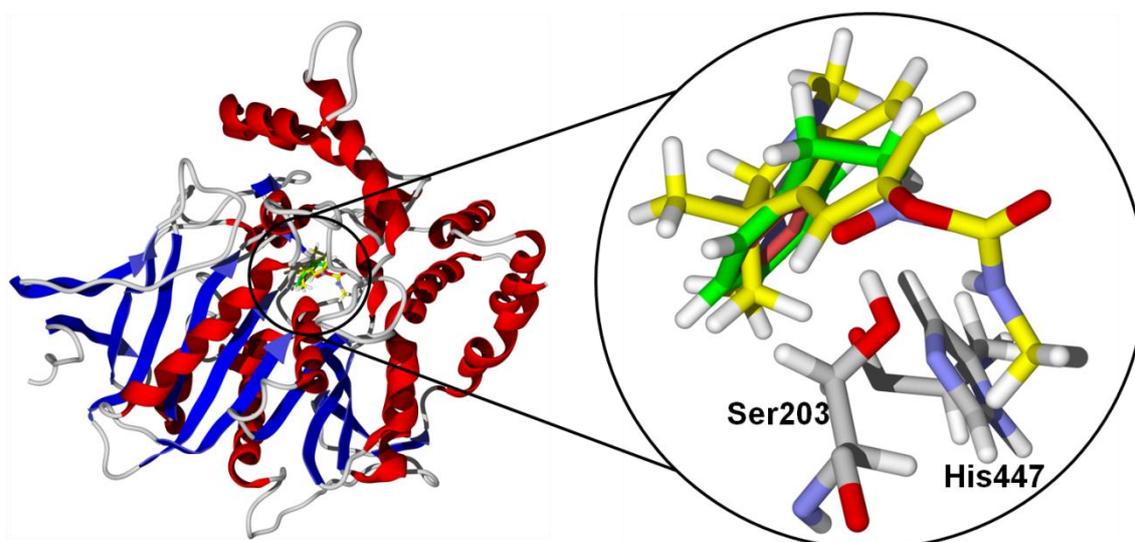


Figura 15. Docagem molecular de melhor conformação para a fisostigmina (átomos de carbono na cor amarela) e 1-nitro-2-feniletano (átomos de carbono na cor prata).

O estudo de docagem indicou que o grupo carbonila da fisostigmina e o grupo nitro do 1-nitro-2-feniletano localizam-se próximo do resíduo de serina catalítica (Ser203) da EeAChE. O grupo carbonila da fisostigmina e o grupo hidroxila do resíduo de serina foram localizados em 2,83 Å, enquanto para os dois átomos de oxigênio do grupo nitro estão em 2,32 e 2,65 Å (Figuras 16A e 16B, respectivamente).

O resultado para a fisostigmina sugere que um ataque nucleofílico pode ocorrer entre a Ser203 e grupo carbonila do inibidor. Esta similaridade existe no mecanismo catalítico padrão da família de AChE (ROSENBERRY, 1975; QUINN, 1987). Enquanto que o grupo nitro forma ponte de hidrogênio com o grupo hidroxila da Ser203. Estudos experimentais demonstram que a inativação da EeAChE pela fisostigmina é conduzido por uma proteína cataliticamente ativa, envolvendo a formação de um derivado acil-enzima com o resíduo de serina catalítica (FRISCH et al., 2004). A principal diferença encontrada em ambas as estruturas de encaixe está localizada no grupo de N-metilformamida do inibidor da fisostigmina (Figura 15). Assim, as conformações selecionadas por cálculos de acoplamento estão em conformidade com os estudos experimentais e estes inibidores podem ter atividades semelhantes, embora por diferentes interações residuais.

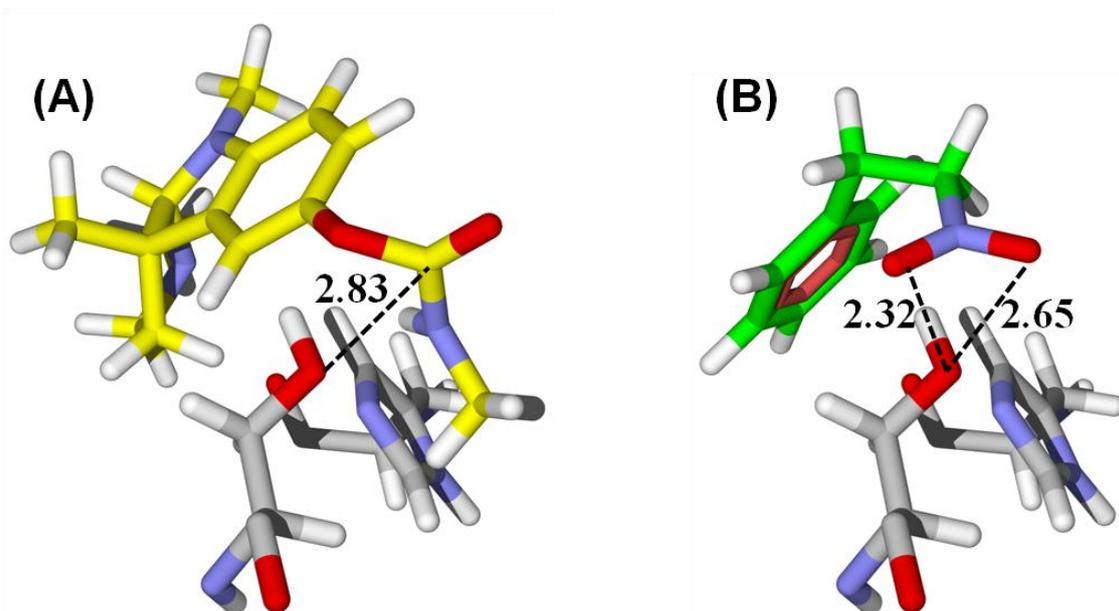


Figura 16. Acoplamento individual e interações conformacionais para a fisostigmina (átomos de carbono amarelo) e 1-nitro-2-feniletano (átomos de carbono prata). * Todas as distâncias em Å.

O potencial eletrostático molecular (MEP) fornece uma ferramenta visual para compreender a polaridade relativa de uma molécula e auxilia a elucidação da ligação de ponte de hidrogênio, reatividade, interações residuais, polarizabilidade e relação estrutura-atividade das biomoléculas e fármacos (SILVA, LAMEIRA & ALVES, 2011; SILVA, LAMEIRA & ALVES, 2012). Na Figura 17, as regiões mais nucleofílicas (potencial eletrostático negativo) são mostrados em vermelho e as

regiões mais eletrofílicas (potencial eletrostático positivo) apresentam coloração verde.

O inibidor de 1-nitro-2-feniletano (Figura 17B) tem um perfil mais eletronegativo que o inibidor fisostigmina (Figura 17A). Sugere-se que este caráter eletronegativo pode ser responsável por manter a forte interação entre o grupo hidroxila do resíduo de serina catalítica e os átomos de oxigênio do grupo nitro do inibidor 1-nitro-2-feniletano.

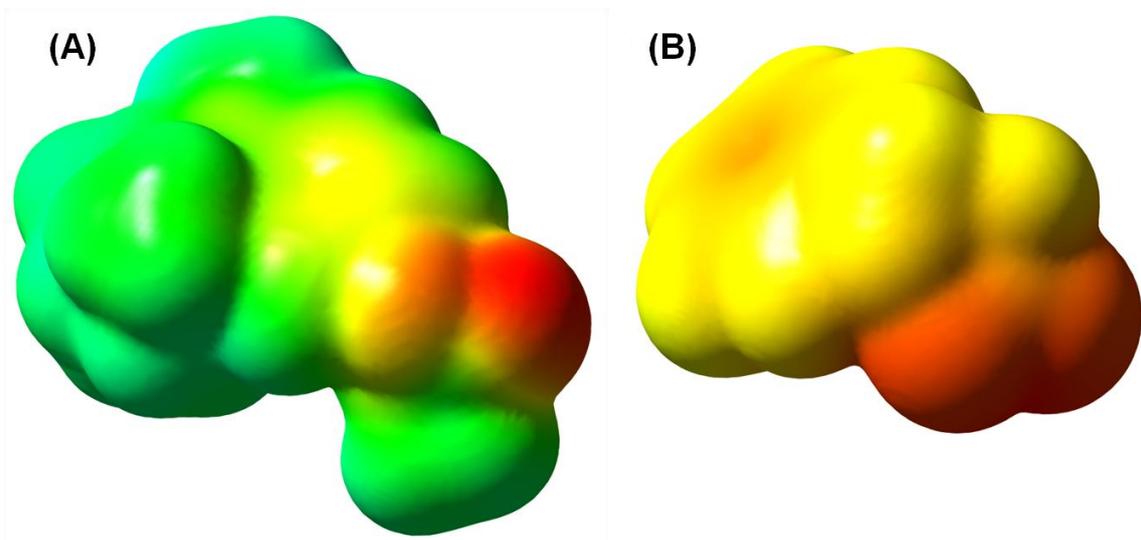


Figura 17. Potencial eletrostático molecular para (A) fisostigmina e (B) 1-nitro-2-feniletano.

 **CONCLUSÃO**

6. CONCLUSÃO

Com respeito às espécies de *Piper*, o óleo essencial de *P. aduncum* demonstrou atividade inibitória enzimática significativa, porém o óleo de *P. marginatum* apresentou fraca atividade. Os óleos de *P. callosum* e *P. divaricatum* foram inativos. De todos os constituintes isolados, apenas o safrol e a elemicina obtidos do óleo de *P. callosum* e o 1-nitro-2-feniletano isolado do óleo de *A. canelilla* demonstraram atividade.

O óleo de *A. canelilla* e seu principal constituinte, 1-nitro-2-feniletano, demonstraram excelente atividade de inibição enzimática frente à enzima AChE, fornecendo resultados semelhantes ao padrão fisostigmina.

Os resultados experimentais foram corroborados pelo estudo de docagem molecular que demonstrou que o grupo nitro de 1-nitro-2-feniletano forma fortes ligações de hidrogênio com o grupo hidroxila do resíduo de serina catalítica da enzima AChE. O inibidor de 1-nitro-2-feniletano mostrou perfil mais eletronegativo que o inibidor da fisostigmina. Esse caráter eletronegativo sugere a forte interação entre a hidroxila do resíduo de serina e os átomos de oxigênio do grupo nitro e, por conseguinte, elucida a atividade de inibição da AChE pelo 1-nitro-2-feniletano e pelo óleo essencial de *A. canelilla*.

Os resultados obtidos ratificam a importância das investigações do potencial amazônico na busca por inibidores naturais da enzima AChE, como alternativa para o tratamento da doença de Alzheimer.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gás chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing corporation, Carol Stream, IL, 804p, 2007.
- ACERO-ORTEGA, C.; DORANTES-ALVAREZ, L. HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Evaluation of phenylpropanoids in tem *Capsicum annum* L. varieties and their inhibitory effects on *listeria monocytogenes* Murray, Webb and Swann Scott A. **Food Science and Technology Internacional**, v.11, n.1, p.5-10, 2005.
- ALZHEIMER A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters (1911). Translated by Förstl H, Levy R. (1991) On certain peculiar diseases of old age. **History of Psychiatry**. v. 2, p. 71-101, 1991.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia**. v.9, p. 17-29, 2013
- AMORIM, C. Z.; FLORES, C. A.; GOMES, B. E.; MARQUES, A. D.; CORDEIRO, R. S. B.; Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 24, p.101, 1988.
- ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; BASTOS, C.N. **Composição química do óleo essencial de *Piper callosum* e sua toxicidade**. In: XLVII CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, Natal-RN, 2007.
- ANDRADE, E.H.A.; CARREIRA, L.M.M.; SILVA, M.H.L.; SILVA, J.D.; BASTOS, C.N.; SOUSA, J.C.; GUIMARAES, E.F. & MAIA, J.G.S. Variability in essential oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**. v. 5, p. 197-208, 2008.
- ANDRADE, E.H.A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J.G.S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de *Piper* da Amazônia**. Belém:FEQ/UFPA, 2009.
- ANEKONDA, T. S.; REDDY, P. H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**, v. 50, p. 361-376, 2005.
- AUTRAN, E.S; NEVES, I.A.; DA SILVA, C.S.B.; SANTOS, G.K.N; DA CÂMARA, C.A.G; NAVARRO, D.M.A.F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2284 - 2288, 2009.
- BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1107-1109, 2009.
- BARBOSA, Q. P. S.; DA CÂMARA, C. A. G.; RAMOS, C. S.; NASCIMENTO, D. C. O.; LIMA-FILHO, J. V.; GUIMARÃES, E. F. Chemical composition, circadian rhythm

and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: A new source of safrole. **Química Nova**. v.35, p. 1806-1808, 2012.

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA CUNHA, E. V.L., ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *P. aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.3, n.22, p.441-443, 1997.

BERG, M. E. V. D. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu. Paraense Emílio Goeldi, 1993.

BERGO, C. L. **Estudos Agronômicos e Fitoquímicos de *Piper hispidinervum* C.DC. e *Piper aduncum* L. para a produção de safrol e dilapiol**. 2010. 138 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 588-594, 2009.

BOLZSAURS, A. S. **As fórmulas mágicas das plantas**. Rio de Janeiro: Record: Nova Era, 1997.

BOTTINO, C. M. C.; CARVALHO, I. A..M.; ALVAREZ, A. M. M. A.; AVILA, R.; ZUKAUSKAS, P. R.; BUSTAMANTE, S. E. Z.; ANDRADE, F. C.; HOTOTIAN, S. R.; SAFFI, F.; CAMARGO, C. H. P. Reabilitação cognitiva em pacientes com doença de Alzheimer. **Arquivos de Neuro-psiQUIATRIA**, v.60, n.1, p. 70-79, 2002.

BRITO, T. S.; LIMA, F. J.B.; ARAGÃO, K. S.; SIQUEIRA, R. J.B. de; SOUSA, P. J.C.; MAIA, J. G. S.; FILHO, J. D.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.C. The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. **Biochemical Pharmacology**. v.85, p.780-788, 2013.

CASTRO, A. T. **Estudos por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurológicos**. 121f. Dissertação de mestrado. IME, Rio de Janeiro, 2002.

CHAIYANA, W.; OKONOGI, S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. **Phytomedicine**. *In press*, 2012.

CHOMA, I. The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. **LC-GC Europe**, v.18, n. 9, p. 482-488, 2005.

COIMBRA, R. **Manual de fitoterapia**. 2 ed. Belém: CEJUP, 1994.

CORDELL, G. W. Natural Products as Medicinal and Biological Agents: Potentiating the Resources of the Rain Forest. In: SEIDL, P. R.; GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. **Chemistry of the Amazon: Biodiversity, natural products, and environmental issues**. American Chemical Society Symposium Series. n.588, Washington, DC, p.8-18, 1995.

COREY-BLOOM J, ANAND R, VEACH J. A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (Rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer disease for the ENA 713 B352 Study Group. **International Journal of Geriatric Psychopharmacology**. v.1, p. 55-65, 1998.

CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v.1-6, 1984.

COSTA, E.G; SILVA, M.C.C; COSTA, M.L.G; BARROS, A.L.S; SOARES, R.F. Análise da deglutição em sujeitos portadores de doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. Suplemento. 22, v.74, n.1, Jan./Fev. 2008.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. **Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos**. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Ed. Itajaí, Universidade do Vale de Itajaí, p. 66-68, 2007.

DA SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. **Natural Product Communications**. v. 5, p.477-480, 2010.

DA SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of Essential Oil and Methanol Extract of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55, p.9422-9426, 2007.

DE ALMEIDA, J. G. L.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. A.; PESSOA, O. D. L. Composição química dos óleos essenciais de *Piper divaricatum*. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2007.

DE ALMEIDA, R. R. P.; SOUTO, R. N. P.; BASTOS, C. N.; DA SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity** v.6. p. 1427-1434, 2009.

DE LIMA, A. B.; SANTANA, M.B., CARDOSO, A. S.; DA SILVA, J. K. R., MAIA, J. G. S.; CARVALHO, J. C. T.; SOUSA, P. J. C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine**. v.16, p.555-559, 2009.

DESMARCHELIER, C.; SLOWING, K.; CICCIA, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract. **Fitoterapia**. v. 71, p.556-558, 2000.

DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M.; HIRUMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. São Paulo, Universidade Estadual Paulista, 194p.1989.

ELHANANY, E.; ORDENTLICH, A.; DGANY, O.; KAPLAN, D.; SEGALL, Y.; BARAK, R.; VELLAN, B.; SHAFFERMAN, A. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. **Chemical Research in Toxicology**. v.14, p.912-918, 2001.

ENGELHARDT, E. Tratamento da doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do departamento científico de neurologia cognitiva e do envelhecimento da academia brasileira de neurologia. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 63, n.4, p. 1104-1112, 2005.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; FILHO, R. B. Flavonóides de *Piper callosum* da Amazônia. <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0765-2/index.html>. Acesso em 15/05/2012.

FEITOSA, C. M. Plantas medicinais são promissoras no tratamento do Mal de Alzheimer. **Sapiência – Informativo Científico da FAPEPI**, n.16, ano V, p.11, 2008.

FERREIRA, M.G.P.R., **Atividade anti-hemorrágica, ação analgésica, atividade de inibição de edema e de crescimento de formas promastigotas de Leishmania amazonensis do ácido 3,4,5-trimetoxi benzenopropanóico isolado do extrato dos frutos de Piper tuberculatum Jacq.** 2006. 35p Dissertação (Programa Mestrado em Biologia Experimental). Fundação Universidade Federal de Rondônia. Rondônia, 2006.

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; ADAMI, Y. L.; ESPÍNOLA-MENDES, E. C.; FIGUEIREDO, M. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of swiss mice in not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. **Experimental Parasitology**.v. 94, p. 243-247, 2000.

FORETTE, A. R., GHARABAWI, G. A phase II study in patients with Alzheimer's disease to assess the preliminary efficacy and maximum tolerated dose of rivastigmine (Exelon). **European Journal of Neurology**. v.6, p.423 – 429, 1999.

FORLENZA, O.V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v.32, n.3, p.137-148, 2005.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY JR., J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI,

X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; ALLAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. **Gaussian 03**, Revisão C.02. In: Wallingford, CT, 2004.

FRISCHKORN, C. G. B., FRISCHKORN, H. E. Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. **Naturwis-senschaften** v.65, p.480-483, 1978.

GALLUCCI NETO, J. TAMELINI, M.G; FORLENZA, O.V. Diagnóstico diferencial das demências. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.32, n.3, p.119-30, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, p.407-411, 2009.

GEHLHAAR, D. K.; VERKHIVKER, G.; REJTO, P. A.; FOGEL, D. B.; FOGEL, L. J. FREER, S. T.. Docking Conformationally Flexible Small Molecules into a Protein Binding Site through Evolutionary Programming. **Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary Programming**. p. 615-627, 1995.

GIACOBINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ, A.; VEROFF, A. E.; CUTLER, N. R. Inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. **Journal Neural Transmission**. v.109, p.1053-1065, 2002

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**. v. 11, p.1537-1570, 1972.

GOTTLIEB, O.R., MAGALHÃES, M.T., Occurrence of 1-nitro-2-phenylethane in *Ocotea pretiosa* and *Aniba canelilla*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 24, p. 2070, 1959.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Essential oil of the bark and the wood of *Aniba canelilla*. Physiological varieties of *Ocotea pretiosa*. II. **Perfumer & Essential Oil Record**. v. 51, 1960.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguesia**, v.55, p. 21- 46, 2004.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na reserva biológica de poço das antas, silva jardim, Rio de janeiro, Brasil. **Rodriguesia**. v. 57, n. 3, p. 567-587. 2006.

HARMAN, D. A hypothesis on the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.786, p. 152-168, 1996.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.A.; APEL, M.A. Óleos essenciais, importância e perspectivas terapêuticas, in YUNES, R.A. e CECHINEL FILHO, V. (Orgs), **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Ed. Univali, Itajaí, 1.ed, p.303, 2007.

HORVÁTH, G.; JÁMBOR, N'; VÉGH, A.; BOSZORMÉNYI, A.; LEMBERKOVICS, É. HÉTHELYI, É.; KOVÁCS, K.; KOCSIS, B. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, p. 178-182, 2010.

HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M.P.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F. **Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products**. Bogota: CYTED, 2008.

HOWES, M.J.; HOUGHTON, P.J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.75, n.3, p.513-527, 2003.

INOUE, K.; OLIVEIRA, G. H.; Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para doença de Alzheimer; **Infarma**; v.15; p.11-12; 2003.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P.S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**. v.165, p.403-416, 2004.

JEON, S.; HUR, J.; JEONG, H.J.; KOO, B.S.; PAK, S.C. *SuHeXiang Wan* Essential Oil Alleviates Amyloid Beta Induced Memory Impairment Through Inhibition of Tau Protein Phosphorylation in Mice. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 39, p.917-932, 2011.

KAUFMANN, D.; DOGRA, A.K.; WINK, M. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 63, p. 1368-1371, 2011.

KHALID, A., M. ARSHAD AND Z. A. ZAHIR. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**. v. 96, p. 473-480

KIM, J; LEE, H.J; LEE, K.W. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. **Journal Neurochemistry** v.112, p.1415-1430, 2010.

KNOPMAN, D. Pharmacotherapy for Alzheimer's Disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 26, n. 2, p. 93-101, 2002.

KOEZUKA Y, HONDA G, TABATA M. Genetic control of phenylpropanoids in *Perilla frutescens*. **Phytochemistry**. v.25, p.2085-2087. 1986.

KOKOSKA, L.; VLKOVA, E.; SVOBODOVA, B.; POLESNY, Z. & KLOUCEK, P. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, p. 309-312, 2005.

LANE, M. L.; POTKIN, S. G.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. **International journal of europsychopharmacology**, v.9, p.1-24, 2005.

LEE, E. J.; KIM, J.; KIM, Y.C. Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl₄ (4) – induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. **Planta Médica**. v.68, n.5, p.407-411, 2002.

LIMA, M. da P.; SILVA, T. M.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G.; ANDRADE, E. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of Aniba canelilla (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. **Acta Amazônica**, v.34, p.329 – 330, 2004.

LIRA, A. F. **Estudos da cinética de inibição anticolinesterásica por dialquilfosforamidatos**. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica RJ. 2010.

LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; CONFORTI, F.; NADJAFI, F.; STATTI, G.A.; FREGA, N.G.; MENICHINI, F. In vitro biological activity of *Salvia leiriifolia* Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Oleo Science**. v. 58, p. 443-446, 2009.

LOPERA, V.E.A. Dilemas éticos en etapas leves de la enfermedad de Alzheimer decirle o no la verdad al paciente. **Revista Latinoamericana de Bioética**. v.8, n.14, p.58-65, 2008.

MCFERREN, M.A., RODRIGUEZ, E., 1998. Piscicidal properties of *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology** 60, 183-187.

MACHADO, J. C. B. Doença de Alzheimer. In: FREITAS, Elizabete Viana de et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 261-280, 2006.

MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; LUZ, A.I.R.; BASTOS, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 13, p. 269-272, 1998.

MAIA, J.G.S., ZOGHBI, M. G. B. & ANDRADE, E. H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais**. Belém PA: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2000.

MAIA, J.G.S., ZOGHBI, M.G.B. & ANDRADE, E.H.A.. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2001.

MAJLESSI, N.; CHOOPANI, S.; KAMALINEJAD, M.; AZIZI, Z. Amelioration of amyloid β -induced cognitive deficits by *Zataria multiflora* Boiss. essential oil in a rat

model of Alzheimer's disease. **CNS Neuroscience & Therapeutics**. v.18, p.295-301, 2012.

MARCO, L.; CARREIRAS, C. M. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**. v.1, p.105-111, 2006.

MARQUES, C.A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente** v. 8, n.1, p.195-206, 2001.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemicals Analysis**. v.13, p. 51-54, 2002.

MARTINS, A.P.; SALGUERO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; CANIGUERAL, S.; CASANOVA, J.; PROENÇA DA CUNHA, A.; ADZET, T. Essential oils from Piper species. **Phytochemistry**. v. 49, n. 7, p. 2019–2023, 1998.

MASOKO, P.; ELOFF, J.N. The diversity of antifungal compounds of six South African Terminalia species (Combretaceae) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.12, p.1425-1431, 2005.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; MANAGI, H.; YOSHIKAWA, M. Antiallergic principles from *Alphitonia galangal*: structural requirements of phenylpropanoids for inhibition of degranulation and release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cell. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**. v.13, n.19, p.3197 – 3202, 2003.

MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; LAWANDI, J.; CORBEIL, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **British Journal of Pharmacology**. v.153, 2008.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do parque nacional do Itatiaia-Brasil: *Manekia* e *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**. v. 60, n. 4, p. 999-1024, 2009

MOREIRA, D.L., GUIMARÃES, E.F., KAPLAN, M.A.C. Essential oil analysis of two Piper species (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.70, n. 4, p. 751–754, 1998.

MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; DOS ANJOS JR, J. F.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; SOUZA NETO, M. A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.35, 2007.

NASCIMENTO, N. H.; GHIRALDI, L. D. Demência de alzheimer: terapêutica farmacológica e Não farmacológica. **Unidade de Ensino Superior de Ingá**. Review. Abr. n. 06. p. 83-91, 2011.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v.70, p.461-477, 2007.

OGER, J. M.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; BOUCHARA, J. P.; FOURNET, A. *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. **Journal Essential Oil Research**. v. 6, n. 5, p. 493-497, 1994.

OLIVEIRA, J. C. S. de; DIAS, I. J. M; Da CÂMARA, C. A. G.; SCHWARTZ, M. O. E. Volatile Constituents of the Leaf Oils of *Piper aduncum* L. from Different Regions of Pernambuco (Northeast of Brazil). **Journal of Essential Oil Research**. v. 18, p. 557-559, 2006.

PANG, Y.P.; KOLLMEYER, T. M.; HONG, F.; LEE, J.C; MAMMOND, P. I.; HAUGALO, K. S.; BRIMJOIN, S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumalidoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. **Chemistry & Biology**. v.10, pp.491-502, 2003.

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**. v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PECKOLT, T.; PECKOLT, G. História das plantas medicinais e úteis do Brasil. Rio de Janeiro, p. 1369, 1888.

PESSOA, L. M., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L., LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 59-63, 2002.

PINTO, C. G.; SÁ, A. B. de.; SOUSA, M.; CRISTINO J.; VILAS S. Avaliação Económica da Terapêutica e do Suporte Não Farmacológico da Doença de Alzheimer. **Arquivos de medicina**. vol.19, n.5/6, p. 183-190, 2005.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984a.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química. Nova**. v. 30, n. 6, p.1446-1455, 2007.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme, structure, reaction dynamics and virtual transition states. **Chemical Reviews**. v.87, p.955-979, 1987.

RHEE, I. K.; VEN DER MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal Chromatography A**. v.915, p.217-223, 2001.

ROCKLAND, A; BORBA, J. **Primeiros passos na fonoaudiologia: conhecer para intervir nas patologias, distúrbios e exames fonoaudiológicos**. Recife: FASA, p. 200, 2005.

ROSENBERRY, T. L. Acetylcholinesterase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. v.43, p.103-218, 1975.

ROUHI, A. M. Seeking drugs in natural products. **Chemical & Engineering News**. v.75, p 14-29, 1997.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**. v.34, p.3-21, 2001.

SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N.S.L.; WILKINS, R.M; PERRY, E.K. Synergistic and antagonistic interactions of antiacetylcholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v. 75, p. 661-668, 2003.

SELKOE, D.J. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. **Annals of Internal Medicine**. v.140 p.627-638, 2004.

SILVA, D.M.H.; BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 32, p. 143-5, 2007.

SILVA J.R.A., LAMEIRA J., ALVES C.N. Insights for design of *Tripanosoma cruzi* GAPDH inhibitors: a QM/MM MD of 1,3-bisphospho-D-glyceric acid analogs. **International Journal of Quantum Chemistry**. v.112, p.3398-3402, 2012.

SILVA N.F., LAMEIRA J., ALVES C.N. Computational analysis of aspartic protease plasmepsin II complexed with EH58 inhibitor: a QM/MM MD study. **Journal of Molecular Modeling**. v.17, p.2631-2638, 2011.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R. Natural products for dengue transmission control: larvicidal activity of *Myroxylon balsamun* (red oil) ando f terpenoids and phenylpropanoids. **Química Nova**. v.27, n.1, p.46 – 49, 2004.

SIQUEIRA, R. J. B. de; MACEDO, F. I. B.; INTERAMINENSE, L. de F. L.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; BRITO, T. S.; DA SILVA, J. K. R., MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats.. **European Journal of Pharmacology**. v.638, p.90–98, 2010.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A.Y.; ANDRADE, E. H. A; MAIA, J. G. S. Insecticidal Activity of Piper Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**. 2012.

SRINIVASAN, K. Black Pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 47, p. 735-748, 2007.

TAN, K. H.; NISHIDA, R. Methyl eugenol: Its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. **Journal of Insect Science**. v. 12, 2012.

TAVEIRA, F. S. N.; DE LIMA, W. N.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.31, p. 69-75, 2003.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.49, p.3315-3321, 2006.

TREVISAN, M.T.S; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**. v.26 p.301-304, 2003.

VAGIONAS, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.; GRAIKOU, K.; GORTZI, O.; CHINOI, I. Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. **Food Chemistry**. v.105, p.1711–1717, 2007.

VALGAS, C. **Avaliação de métodos de Triagem para determinação de atividade antibacteriana de Produtos Naturais**. 2002. 103 p. (Mestrado em Farmácia) – Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

VAN GENDEREN, M. H. P.; LECLERCQ, P. A.; DELGADO, H. S.; KANJILAL, P. B.; SINGH, R. S. Compositional analysis of the leaf oils of *Piper callosum* Ruiz & Pav. from Peru and *Michelia montana* Blume from India. **Spectroscopy**. v. 14, p.51-59, 1999.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p.326-337, 2006.

VIEGAS JR, 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**. v. 27, n. 4, p.655-660, 2004.

VIEIRA, L. S. **Manual de medicina popular. A fitoterapia da Amazônia**. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, p. 248, 1991.

WANG, Z.; MARTIN, J.; ABUBUCKER, S.; YIN, Y.; GASSER, R. B.; MITREVA, M. Systematic analysis of insertions and deletions specific to nematode proteins and their proposed functional and evolutionary relevance. **BMC Evolutionary Biology**. p. 1-14, 2009

WINBLAD, B.; ENGEDAL, K.; SOININEN, H.; VERHEY, F.; WALDEMAR, G.; WIMO, A.; WETTERHOLM, A.L.; ZHANG, R.; HAGLUND, A.; SUBBIAH, P. A1- year, randomized, placebo controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD. **Neurology**. v.57, p.489-495, 2001.

YANG J. E CHEN C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. **Proteins**. v.55, p.288-304, 2004.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v.24, n.1, p.147 – 152, 2007.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. Hoehnea. v. 2, p. 19-366, 1972.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. Hoehnea. v. 3, p. 29-284, 1973.