

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

LETÍCIA DE SOUZA

**ESTUDO PILOTO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ÓLEOS VEGETAIS  
NA ATIVIDADE DA ENZIMA BUTIRILCOLINESTERASE *IN VITRO***

CAMPO MOURÃO

2022

**LETÍCIA DE SOUZA**

**ESTUDO PILOTO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ÓLEOS VEGETAIS  
NA ATIVIDADE DA ENZIMA BUTIRILCOLINESTERASE *IN VITRO***

**Pilot study: evaluation of the effects of vegetable oils on the *in vitro*  
butyrylcholinesterase activity**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovações tecnológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Março.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Porto Ineu.

**CAMPO MOURÃO**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



LETICIA DE SOUZA

**ESTUDO PILOTO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ÓLEOS VEGETAIS NA ATIVIDADE DA  
ENZIMA BUTIRILCOLINESTERASE IN VITRO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovações Tecnológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Inovações Tecnológicas.

Data de aprovação: 15 de Setembro de 2022

Dr. Paulo Henrique Marco, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Aline Coqueiro, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Livia Bracht, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 16/09/2022.

[https://sistemas2.utfpr.edu.br/dpls/sistema/aluno03/mpCADEDocsAssinar.pcTelaAssinaturaDoc?p\\_pesscodnr=171122&p\\_cadedocpesccodnr=91551&p\\_cadedoccodnr=93830&p\\_cargo=&p\\_tipo=3&p\\_retorno=](https://sistemas2.utfpr.edu.br/dpls/sistema/aluno03/mpCADEDocsAssinar.pcTelaAssinaturaDoc?p_pesscodnr=171122&p_cadedocpesccodnr=91551&p_cadedoccodnr=93830&p_cargo=&p_tipo=3&p_retorno=)

## RESUMO

Os neurônios colinérgicos estão relacionados a importantes funções neurológicas que são prejudicadas nos casos de deficiência na secreção do neurotransmissor acetilcolina (ACh), um dos primeiros neurotransmissores descobertos e amplamente difundido no Sistema Nervoso Central (SNC). A ação da ACh é interrompida quando a mesma é hidrolisada pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), presente na fenda sináptica. Desta forma, o objetivo deste estudo piloto foi analisar a inibição causada pelos óleos de chia, linhaça dourada, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de cannabis na atividade enzimática *in vitro* da BuChE. A avaliação foi conduzida pelo método espectrofotométrico de Ellman et al. (1961), com algumas adaptações. Foram utilizadas as concentrações de 0,00025; 0,0025; 0,025 e 0,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para cada óleo. Os resultados obtidos mostraram que houve inibição na atividade da BuChE para todos os óleos e em todas as concentrações, sendo os óleos de chia e o de girassol aqueles que mais efetivamente inibiram a atividade da BuChE. A partir de um levantamento de informações sobre a composição dos óleos com relação ao perfil em ácidos graxos, observou-se que estes dois óleos são mais abundantes em C18:0, C20:4, C18:3n3 e C22:0. Portanto, o estudo sugere que estes ácidos graxos devem ser testados com relação à capacidade inibitória específica, a fim de avaliar a possibilidade de serem utilizados como compostos ativos na prevenção, ou como coadjuvantes no tratamento da DA.

**Palavras-chave:** acetilcolina; doença de Alzheimer; óleo de Chia; óleo de girassol; butirilcolinesterase.

## ABSTRACT

Cholinergic neurons are related to important neurological functions that are impaired in cases of deficiency in the secretion of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), one of the first neurotransmitters discovered and widespread in the Central Nervous System (CNS). The action of ACh is interrupted when it is hydrolyzed by the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), present in the synaptic cleft. Thus, the aim of this pilot study was to analyze the inhibition caused by chia, golden linseed, olive oil, sunflower oil and cannabis oil on the in vitro enzymatic activity of BuChE. The evaluation was conducted by the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961), with some adaptations. Concentrations of 0.00025 were used; 0.0025; 0.025 and 0.25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  for each oil. The results obtained showed that there was inhibition of BuChE activity for all oils and at all concentrations, with chia and sunflower oils being the ones that most effectively inhibited BuChE activity. From a survey of information on the composition of the oils in relation to the profile in fatty acids, it was observed that these two oils are more abundant in C18:0, C20:4, C18:3n3 and C22:0. Therefore, the study suggests that these fatty acids should be tested for specific inhibitory capacity, in order to assess the possibility of being used as active compounds in the prevention, or as adjuvants in the treatment of AD.

**Keywords:** acetylcholine; Alzheimer's disease; chia oil; sunflower oil; butyrylcholinesterase.

## LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

$\Delta$ 9-THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BuChE	Butirilcolinesterase
CNB	Canabinol
CBD	Canabidiol
DA	Doença de Alzheimer
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
PPA	Proteína precursora amiloide

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Síntese e hidrólise da Acetilcolina.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2 - Transmissão do impulso Nervoso pela Acetilcolina.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3 - Resultados Teste de Inibição da enzima BuChE .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4 - Resultado Aplicação da PCA.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 5 - Potencial Médio de Inibição da enzima BuChE.....</b>	<b>36</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Aspectos Gerais da Doença de Alzheimer</b> .....	<b>11</b>
3.1.1	Epidemiologia e Aspectos Clínicos do Alzheimer.....	11
3.1.2	Patogênese da Doença de Alzheimer.....	12
<b>3.2</b>	<b>Sistema Colinérgico na Doença de Alzheimer</b> .....	<b>13</b>
3.2.1	Acetilcolina e Colinesterases.....	13
3.2.2	Hipótese Colinérgica na Patogênese do Alzheimer.....	15
<b>4</b>	<b>ÓLEOS VEGETAIS E SEUS CONSTITUINTES</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Óleo de Chia</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Óleo de Linhaça Dourada</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3</b>	<b>Azeite de Oliva</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4</b>	<b>Óleo de Girassol</b> .....	<b>19</b>
<b>4.5</b>	<b>Óleo de <i>Cannabis</i></b> .....	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>5.1</b>	<b>Óleos Vegetais Utilizados</b> .....	<b>21</b>
<b>5.2</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>21</b>
<b>5.3</b>	<b>Atividade <i>in vitro</i> da enzima Butirilcolinesterase (BuChE)</b> .....	<b>21</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
	<b>Referências</b> .....	<b>30</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas são patologias que afetam diretamente a substância cinzenta do córtex cerebral, com perda progressiva de neurônios que culmina em diversos prejuízos cognitivos na rotina diária dos indivíduos afetados.

Dentre as doenças neurodegenerativas destaca-se a doença de Alzheimer (DA), caracterizada pela redução irreversível da capacidade cognitiva associada à demência, perda de memória, déficit de atenção, redução da habilidade visual-espacial, perda de capacidade de julgamento e alterações de personalidade e linguagem (NITRINI & BACHESCHI, 2008; KUMAR; ABBAS, ASTER., 2016).

Por se tratar de uma doença progressiva e de caráter irreversível, estudos com enfoque na prevenção e no tratamento da DA são de grande relevância no cenário médico-científico atual e podem contribuir para qualidade de vida dos pacientes.

A butirilcolinesterase (BChE) e acetilcolinesterase (AChE) são as enzimas colinesterásicas encontradas no sistema nervoso que juntas catalisam a hidrólise da acetilcolina (ACh), reduzindo os níveis do neurotransmissor responsável pela comunicação entre as células nervosas, ocasionando a diminuição da função cerebral e perda de habilidades intelectuais. A enzima BChE tem menor afinidade pela ACh se comparada a AChE, porém é fundamental para o processo de hidrólise da ACh com o declínio nos níveis de AChE nos estágios mais avançados da DA (ZILBEYAZ, 2018).

No cérebro saudável, a AChE é a principal enzima responsável pela regulação da ACh. No entanto, em estágios avançados da DA, o nível de AChE no cérebro diminui gradativamente até 90%, enquanto a BuChE aumenta em até 165% dos níveis normais, demonstrando o caráter compensatório da BuChE na ausência de AChE e, conseqüentemente, sua relevância para a hidrólise da ACh em fase tardia da DA. Assim, os inibidores seletivos de BuChE são avaliados como potenciais candidatos para o tratamento desta doença (MUSHTAQ et al., 2014).

Atualmente, não há cura para a DA, ainda que existam tratamentos que visam amenizar os sintomas da doença. O principal tratamento consiste em inibir a atividade da AChE e BuChE, potencializando a sinapse e diminuindo os déficits cognitivos (ALMEIDA et al., 2016).

Os fármacos mais indicados para o tratamento da DA são geralmente galantamina, donepezil e rivastigmina. Um detalhe muito importante destes medicamentos é que nenhum desses diminui o declínio cognitivo, sendo efetivos somente nos estágios iniciais da DA. Além disso, apesar dos bons resultados obtidos nos estágios iniciais, todas essas substâncias ocasionam inúmeros efeitos colaterais importantes, principalmente hepáticos, o que intensifica a busca por novas opções que possam inibir a ação da AChE e BuChE, ocasionando menos efeitos adversos aos pacientes (CARACI et al., 2018; SCHELTENS et al., 2016; AMOAH et al., 2015).

Com isso, estudos envolvendo potenciais inibidores da BuChE são de grande importância, por possibilitarem novas abordagens terapêuticas contra a progressão da DA, principalmente em estágios mais avançados. Por outro lado, no cenário atual são poucos os estudos referentes ao assunto, ainda que a demanda por opções ao tratamento de DA seja urgente.

Dentre as opções práticas, a abordagem que envolve substâncias ativas presentes em alimentos é uma das possibilidades viáveis para estudos, principalmente pela facilidade de introdução na rotina diária do paciente. Por exemplo, o óleo vegetal de chia já foi avaliado quanto ao potencial inibidor da enzima AChE, mostrando-se uma possibilidade de uso (SOUZA et al., 2017). A partir deste, outros óleos vegetais podem ser testados para avaliar a influência destes na atividade enzimática não apenas da AChE mas também da BuChE, a qual geralmente fica à margem da discussão.

Portanto o objetivo deste estudo é avaliar a inibição causada pelos óleos de chia, linhaça dourada, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de cannabis, em diferentes concentrações, na atividade enzimática *in vitro* da butirilcolinesterase (BuChE).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi analisar a inibição causada pelos óleos de chia, linhaça dourada, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de cannabis, em diferentes concentrações, na atividade enzimática *in vitro* da butirilcolinesterase (BuChE) isolada de equino.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a influência das diferentes concentrações de cada um dos óleos na inibição da atividade enzimática da BuChE;
- Comparar o efeito produzido pelos diferentes óleos vegetais;
- Selecionar os óleos vegetais com maior atividade anticolinesterásica BuChE.
- Relacionar a composição dos óleos estudados com o efeito inibitório observado;
- Indicar quais são os compostos mais relevantes associados aos óleos mais efetivos na inibição da BuChE.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Aspectos Gerais da Doença de Alzheimer**

A DA é a principal causa de demência, definida como um padrão individual de redução de memória e prejuízo de pensamento que afeta pelo menos dois domínios de cognição. Sua descoberta ocorreu no ano de 1901 quando o médico alemão Alois Alzheimer avaliou um paciente de 51 anos de idade que apresentava sinais de demência, delírios e importante perda cognitiva, cujo óbito ocorreu após quatro anos de evolução do quadro clínico (NITRINI & BACHESCHI, 2008).

Atualmente são conhecidos diversos fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença, dentre os quais destacam-se idade avançada, mutações e polimorfismos genéticos específicos, além de diabetes, tabagismo, estresse oxidativo, hábitos alimentares, acidente vascular cerebral, lesões traumáticas do sistema nervoso central e imunodeficiências (BARNES et al., 2011).

##### **3.1.1 Epidemiologia e Aspectos Clínicos do Alzheimer**

Estima-se que 60-70% dos casos de demência ao redor do mundo sejam decorrentes do Alzheimer e estudos demonstram que no ano de 2015 aproximadamente 45 milhões de pessoas viviam com demência, o que gerou mais de 800 milhões de dólares em gastos públicos. Com o aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, o aumento da população idosa mundial, os números de casos de DA devem atingir níveis ainda mais elevados nas próximas décadas (PRINCE, 2015; ZHAO et al., 2002).

Grande parte dos casos diagnosticados são esporádicos, não apresentando caráter familiar, o que é observado em apenas 5-10% dos casos. Esses casos familiares, embora não sejam comuns, contribuíram sobremaneira para o estudo da fisiopatologia da doença (KUMAR et al., 2010; NITRINI & BACHESCHI, 2008). Na maioria dos casos as manifestações clínicas iniciam-se após os 65 anos de idade e os pacientes diagnosticados antes disso são considerados precoces e correspondem a menos de 5% dos casos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019).

Em termos clínicos, o Alzheimer sintomático clássico é caracterizado por redução progressiva da memória e aprendizado, seguida ou acompanhada de anormalidades visuais e espaciais, dificuldade de linguagem e alterações de comportamento social que afetam a vida diária do indivíduo. De caráter claramente progressivo, as manifestações clínicas iniciais de perda de memória podem progredir para desorientação progressiva e afasia, com casos graves que chegam a total afasia e imobilidade (HUANG et al., 2020; KUMAR et al., 2018; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2016).

### 3.1.2 Patogênese da Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa de etiologia multifatorial caracterizada pela deposição extra e intracelular de agregados proteicos: no domínio extracelular há acúmulo de proteína beta amiloide na forma de placas neuríticas ou senis, já no domínio intracelular há formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais de proteínas tau hiperfosforilada. Esses agregados proteicos acumulam-se em regiões cerebrais características, que se inicia no córtex transtentorial e prossegue através do hipocampo para outras zonas do cérebro (KUMAR ET AL., 2018; KUMAR; ABBAS, ASTER, 2016).

De acordo com a hipótese da cascata amiloide, a neurodegeneração nos pacientes com DA ocorre por produção excessiva ou remoção defeituosa das proteínas amiloide e tau. A proteína beta amiloide é derivada de uma glicoproteína de membrana denominada proteína precursora amiloide (PPA), cuja clivagem inicial pela enzima alfa-secretase resulta na produção de produtos de clivagem normal, enquanto a clivagem inicial pela beta-secretase resulta na produção de um produto de clivagem patológico. Após essa clivagem inicial ocorre uma segunda clivagem por ação da enzima gama-secretase, que culmina na produção de um pequeno fragmento chamado p3 e da proteína beta amiloide (HERMS et al., 2004). O depósito extracelular de proteína beta amiloide seria o ponto-chave do desenvolvimento da doença, sendo acompanhado pela formação de filamentos neurofibrilares resultantes da hiperfosforilação da proteína tau, importante constituinte do citoesqueleto (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016). Morfologicamente, as placas neuríticas ou senis são formadas por peptídeos beta-amiloides com 37-43

aminoácidos que se acumulam em fibrilas de 8-10 nm de comprimento no espaço extracelular. Já os emaranhados neurofibrilares são constituídos por filamentos helicoidais de proteína tau hiperfosforilada, com uma pequena porção de filamentos lisos (FITZPATRICK et al., 2017; DICKSON; VICKERS, 2001).

Adicionalmente, na patogênese da DA tem-se a hipótese colinérgica, na qual os pacientes seriam afetados por degeneração dos neurônios colinérgicos associada à redução de marcadores colinérgicos, especialmente as enzimas acetiltransferase e a acetilcolinesterase, que apresentaram níveis reduzidos no líquido cefalorraquidiano de pacientes com Alzheimer (SERENIKI, 2008). Nesse contexto, sabe-se que a Ach é um neurotransmissor altamente relacionado ao processo de memória, incluindo ações na codificação de memória, no armazenamento de consolidação e no processo de recuperação da memória.

### **3.2 Sistema Colinérgico na Doença de Alzheimer**

#### **3.2.1 Acetilcolina e Colinesterases**

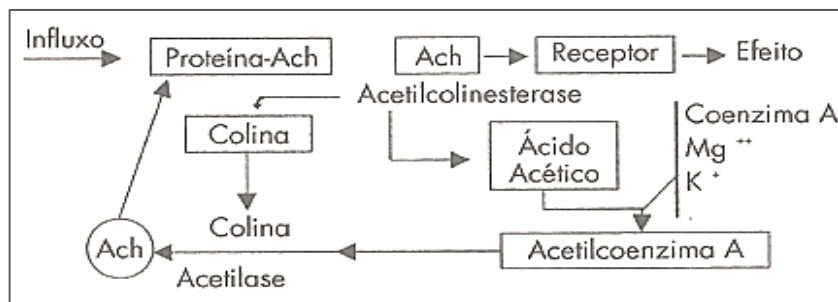
A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso, atuando tanto no sistema nervoso central quanto periférico, estando relacionado no desenvolvimento e em diversas atividades do córtex cerebral, além de participar ativamente na modulação cognitiva dos processos de aprendizagem, concentração e memória (SCHLIEBS; ARENDT, 2011).

A síntese da ACh ocorre principalmente nos neurônios terminais das células piramidais do córtex cerebral e em neurônios dos gânglios basais e muitas células pré-ganglionares e pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo. Tal processo é dependente da enzima colina acetil transferase, que faz a acetilação da colina com a coenzima A. Após a síntese, a ACh é armazenada em vesículas e sua liberação na fenda sináptica ocorre por despolarização dependente da abertura de canais de  $Ca^{2+}$  (ABREU-VILLACA et al., 2011).

A ação da ACh como neurotransmissor depende da ligação à receptores específicos denominados receptores nicotínicos e muscarínicos e a modulação dessa ação na fenda sináptica ocorre pela presença das enzimas colinesterases,

que atuam na hidrólise da ACh em colina e acetato. A síntese e hidrólise da acetilcolina são demonstradas na Figura 1.

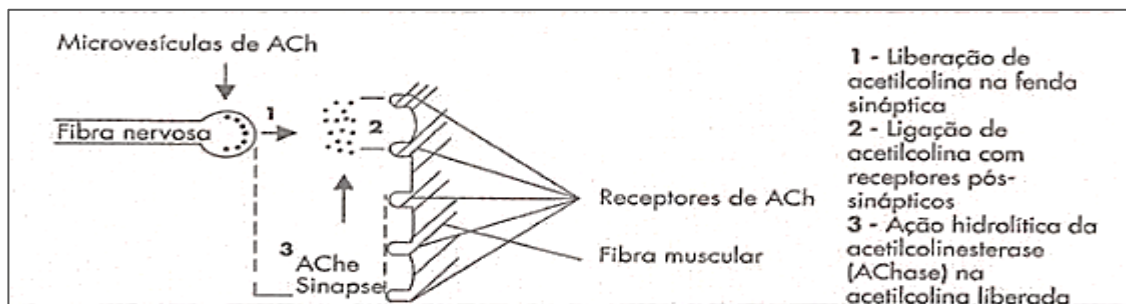
**Figura 1 - Síntese e hidrólise da acetilcolina.**



Fonte: CALDAS (2000, p. 12).

O mecanismo de transmissão sináptica pela ACh é demonstrado na Figura 2.

**Figura 2 – Transmissão do impulso nervoso pela acetilcolina.**



Fonte: Caldas (2000, p.13).

As duas colinesterases descritas no sistema colinérgico são denominadas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) (GUYTON; HALL, 2017). A AChE é encontrada principalmente em tecidos musculares e cerebrais e é codificada pelo gene AChE localizado no braço longo do cromossomo 7, cujo splicing alternativo dá origem às formas catalíticas T, H e R (HASIN et al., 2004). A BuChE, por sua vez, é codificada pelo gene BuChE localizado no braço longo do cromossomo 3, sendo expressa pela maioria dos tipos de tecidos humanos (ABBASI et al., 2012).

### 3.2.2 Hipótese Colinérgica na Patogênese do Alzheimer

A redução da atividade da AChE em neurônios corticais parece estar proporcionalmente associada à gravidade da perda cognitiva e a progressão das manifestações clínicas da DA (HERHOLZ et al., 2004; DAVIS et al., 1999; MESULAM et al., 1987). Nesse sentido, Campanari e colaboradores (2014) demonstraram redução de 40% na atividade de AChE no cérebro de indivíduos afetados pelo Alzheimer, sem que fosse detectada redução na expressão proteica da enzima, o que sugere que possa haver inativação catalítica de parte das enzimas produzidas. Por outro lado, várias pesquisas não encontraram associação entre a redução da atividade enzimática de AChE e a DA. Tal discrepância pode, em partes, ser explicada por variações metodológicas entre as diversas pesquisas, bem como por diferenças na coleta e no armazenamento do líquido cefalorraquiano utilizado como amostra, além de possíveis diferenças na constituição das populações de estudo.

Outro aspecto interessante em relação à associação da AChE com o desenvolvimento do Alzheimer é que, embora haja uma redução da atividade geral dessa enzima nos pacientes afetados pela doença, parece haver aumento localizado dos níveis da enzima nas regiões das placas neuríticas e dos emaranhados neurofibrilares, o que sugere possível participação da AChE na formação desses depósitos proteicos em pacientes com DA ou que a presença dos agregados proteicos influencie a expressão enzimática local (SANTOS, 2019; MORAN et al., 1994).

Ao longo dos anos inúmeros inibidores de AChE têm sido empregados rotineiramente no tratamento da DA, principalmente galantamina (Razadyne®), o donepezil (Aricept®) e a rivastigmina (Exelon®) (PATTERSON, 2018; NASCIMENTO et al., 2017; HERRMANN et al., 2011). Embora o uso de tais inibidores resulte em melhorias cognitivas significativas, há diversos efeitos adversos importantes, o que reduz significativamente a adesão ao tratamento.

Os inibidores aumentam a disponibilidade sináptica de acetilcolina, mediante a inibição das suas principais enzimas catalíticas, AChE e BuChE, tendo como resultado concentrações mais elevadas de acetilcolina, ocasionando um acréscimo



da comunicação junto as células nervosas, melhorando ou estabilizando os sintomas da demência (BARBOSA et al., 2020).

Dessa forma, estudos têm sido conduzidos na busca de novas substâncias potencialmente ativas e potenciais fármacos para o tratamento da DA, principalmente de origem natural (LIMA et al., 2019; TAKAO et al., 2017; HUANG et al., 2010; CAMPS et al., 2009).

## 4 ÓLEOS VEGETAIS E SEUS CONSTITUINTES

O uso de inúmeros óleos vegetais especiais, também chamados de óleos funcionais, tem ganhado destaque devido à grande quantidade de propriedades nutricionais e efeitos biológicos associados ao seu consumo. Os óleos vegetais são formados principalmente por ácidos graxos e apresentam em sua composição pequenas quantidades de fosfolipídios, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres (BRASIL, 2005).

Os óleos utilizados na pesquisa foram selecionados com base em sua composição majoritária, pelo conteúdo e ácidos graxos como ácido linolênico (Ômega-3), ácidos linoleicos (Ômega-6), pois vários estudos indicam a relação do consumo desses compostos com a saúde do cérebro e memória (CREMONINI et al., 2019).

### 4.1 Óleo de Chia

A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) é nativa da região centro-oeste do México até a Guatemala, onde seu uso alimentar foi amplamente disseminado pelos nativos (AYERZA; COATES, 2011; AYERZA, 1995). O óleo extraído das sementes de chia apresenta importantes propriedades nutracêuticas em decorrência da composição rica em ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, fibras e polifenóis com atividade antioxidante. Estima-se que a cada 100 g de chia é possível extrair 30 g de óleo, cuja composição apresenta 60-70% de ácido linolênico (Ômega-3) e 20% de ácido linoleico (Ômega-6) (MARTÍNEZ et al., 2012; IXTAINA et al., 2011; AYERZA; COATES, 2011).

Com base na composição do óleo de chia é possível verificar que os compostos majoritários são gorduras poli-insaturadas, ácido linolênico (Ômega-3) e ácido linoleico (Ômega-6).

### 4.2 Óleo de Linhaça Dourada

A linhaça (*Linun usitatissimum* L) é um vegetal cujo cultivo data de mais de cinco mil anos a.C na região da Mesopotâmia. Apesar de sua origem asiática,

atualmente a linhaça é amplamente cultivada e utilizada como alimento em todo o mundo. É um alimento vegetal rico em ácidos graxos, especialmente ácido linolênico (Ômega-3), além de apresentar quantidades significativas de fibras, proteínas e compostos fenólicos. São descritas duas variedades distintas de linhaça, dourada e marrom, que diferem entre si devido à quantidade de pigmentos na parte externa da semente. Embora haja diferença na cor da semente, a composição química das linhaças dourada e marrom parece ser bem semelhante (MUELLER et al., 2010; COSKUNER & KARABABA, 2007; THOMPSON & CUNNANE, 2003).

O óleo de linhaça dourada é composto por 57% de ácidos graxos ômega-3, 16% de ômega -6, 18% de ácidos graxos monoinsaturados e somente 9% de ácidos graxos saturados. A predominância de ômega -3 é três vezes superior ao ômega-6, sendo a maior fonte vegetal de ácido linolênico (OOMAH, 2001; RAMCHARITAR et al., 2005). Também é fonte de outros compostos benéficos à saúde, como tocoferóis (20 a 70 mg/100g) e carotenoides (50 mg/1000g) (MOHANAN; NICKERSON; GHOSH, 2018).

### **4.3 Azeite de Oliva**

O azeite de oliva, extraído dos frutos da oliveira (*Olea europaea* L.), é utilizado na culinária mundial desde 3000 anos a.C, sendo considerado um óleo nobre e de grande destaque em relação aos demais óleos vegetais comestíveis. Seu odor e sabor característicos fazem parte da rotina alimentar dos brasileiros. Dentre suas propriedades nutracêuticas destaca-se a grande quantidade de ácidos graxos insaturados, especialmente o ácido oleico, que atua no controle do LDL, popularmente conhecido como colesterol ruim. Adicionalmente, sua composição conta com elevados níveis de antioxidantes como os compostos fenólicos simples e polifenóis (DUTRA et al., 2013; FITO et al., 2007).

Em sua composição encontram-se ácidos graxos monoinsaturados e compostos fenólicos, os quais possuem a capacidade de prevenir e/ou retardar várias patologias, dentre elas o câncer, doenças cardíacas, envelhecimento, estresse oxidativo e Alzheimer (FOSCOLOU et al., 2018; ROMÁN, et al., 2019). O azeite de oliva é composto majoritariamente, até 99 % do peso total por triacilgliceróis, e possui uma fração minoritária formada por hidrocarbonetos, álcoois

alifáticos, ceras, esteróis, compostos fenólicos, tocoferóis, pigmentos e compostos voláteis, os quais desempenham um importante papel na qualidade, autenticidade e na rastreabilidade do azeite de oliva (GARCÍA-GONZALEZ, 2017).

O ácido oleico (C18:1) é o ácido graxo mais abundante no azeite, seguido pelo palmítico (C16:1), linoleico (C18:2) e esteárico (C18:0), os quais representam cerca de 88% da composição total de ácidos graxos (CHIANG et al., 2017). Segundo informações do CODEX (2003), os ácidos graxos presentes no azeite de oliva extra virgem são: ácido oleico (55,00 a 83,00%) (C18:1), ácido linoleico (3,50 a 21,00 %) (C18:2), ácido palmítico (7,50 a 20,0 %) (C16:0), ácido palmitoleico (0,30 a 3,50 %) (C16:1) e ácido esteárico (0,50 a 5,00%) (C18:0). Outros ácidos graxos, como o ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\leq 1,00$  %) (C18:3), normalmente estão presentes na constituição do azeite de oliva, mas em quantidades inferiores a 1% (BRASIL, 2012).

Em estudo realizado o azeite de oliva foi caracterizado pelo alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, sendo o ácido oleico o majoritário, além de ácidos graxos poliinsaturados e saturados, que constituem 98% do conteúdo total. Entre os componentes minoritários, mas que desempenham papel importante no sabor e na estabilidade oxidativa do azeite encontram-se os compostos fenólicos, tocoferóis, fitosterol e pigmentos (BRUSCATTO et al., 2017).

#### 4.4 Óleo de Girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma planta originária das Américas inicialmente empregada na alimentação da população nativa em mistura com outros vegetais, sendo posteriormente levada para Europa e Ásia como planta ornamental. É uma oleaginosa bem resistente à seca, ao frio e ao calor, o que favorece seu cultivo em todas as regiões continentais. Os frutos do girassol são conhecidos como sementes, que podem ser categorizadas como oleosas e não oleosas. As sementes oleosas são menores que as não oleosas e correspondem a 20-30% do total dos frutos. Em média as sementes do girassol apresentam em sua composição cerca de 24% de proteínas, 48% de óleo, 20% de carboidratos e 4% de minerais (MANDARINO et al., 2005).

O óleo de girassol apresenta excelentes propriedades nutricionais, sendo composto por 60% de ácido linoleico (Ômega-6), essencial para o funcionamento do

organismo. Além disso, possui em sua composição outros ácidos graxos, tais como ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico (SOUZA, 2018; MANDARINO et al., 2005).

#### 4.7 Óleo de *Cannabis*

A *Cannabis sativa* é um arbusto que cresce facilmente em áreas de clima tropical, sendo cultivada há mais de 4 mil anos para fins medicinais, religiosos e lúdicos. No Brasil foi inicialmente conhecida como cânhamo da Índia, sendo posteriormente denominada popularmente como maconha. Na composição do óleo produzido a partir da semente de *Cannabis* são encontrados mais de 400 componentes diferentes, dentre os quais se destacam os canabinoides, em especial canabinol (CBN), canabidiol (CBD) e delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) (SUERO-GARCIA et al., 2015; RADWAN et al., 2009).

Dentre seus, o  $\Delta$ 9-THC produz efeitos alucinógenos, de modo que o cultivo e o consumo da cannabis foram proibidos a partir do ano de 1937. Entretanto, mais recentemente muito se têm discutido acerca da utilização dos derivados da *C. sativa* para fins terapêuticos em inúmeras patologias crônicas, especialmente no contexto de controle da dor oncológica e neuropática, além de patologias neurológicas como esclerose múltipla, Parkinson e doença de Alzheimer (SILVA, 2021).

Estudos têm demonstrado que os canabinoides proporcionam neuroproteção, através da diminuição dos efeitos relacionados ao acúmulo de placas amiloides, tanto indiretamente, reduzindo a neuroinflamação, estresse oxidativo e morte celular, quanto diretamente, atuando sobre o processamento e remoção dos peptídeos  $\beta$ -amiloides. Também foi identificado que THC e análogos atuam como inibidores da acetilcolinesterase, aumentando a disponibilidade de ACh, proporcionando efeito similar aos causados pelos medicamentos atualmente utilizados (REQUES, 2017).

Como outros óleos vegetais, o óleo extraído da semente de *Cannabis* consiste majoritariamente de triacilglicerídeos (TAG), aproximadamente 98% de sua composição, e possui uma fração insaponificável de aproximadamente 2%. Possui uma variedade de ácidos graxos, incluindo os ácidos graxos essenciais insaturados linoleico (18:2, cis-9,12,  $\omega$ -6) e  $\alpha$ -linolênico (cis-9,12,15,  $\omega$ -3), sendo estes dominantes (ZHAO et al., 2022).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Óleos Vegetais Utilizados

Foram adquiridos óleos de 4 espécies vegetais diferentes, todos eles comerciais. O óleo de chia foi doado por uma empresa de extração de óleo de chia, sendo extraído por solvente. O azeite de oliva extra virgem foi adquirido no comércio de Campo Mourão - PR, da marca Andorinha Portugal, com processo de extração a frio. O óleo de linhaça dourada da marca Santo Óleo foi adquirido via *e-commerce* (mercado livre) prensado a frio. O óleo de girassol foi adquirido no comércio de Campo Mourão - PR, da marca Mazola, utilizando solvente para extração do óleo. O óleo de *Cannabis* também foi produzido com a técnica de extração a frio, sendo adquirido na cidade de Halifax, Estado da Nova Escócia, Canadá, em março de 2019.

Os óleos utilizados na pesquisa foram diluídos em metanol, sendo preparadas quatro concentrações diferentes: 0,00025, 0,0025, 0,025 e 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após as diluições, os óleos não apresentavam separação de fases no sistema, produzindo uma mistura homogênea.

### 5.2 Materiais

Os reagentes ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico, iodeto de butiriltiocolina, tampão fosfato de potássio, metanol e enzima butirilcolinesterase isolada de equino (liofilizada) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os equipamentos para leitura de microplacas, placa aquecedora, micropipetas, ponteiras, e entre outros materiais utilizados para a realização dos experimentos estão disponíveis na UTFPR – Campus Campo Mourão – Paraná no laboratório de pesquisas do programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos-PPGTA.

### 5.3 Atividade *in vitro* da enzima Butirilcolinesterase (BuChE)

A avaliação *in vitro* da atividade da BuChE na presença dos óleos vegetais utilizados foi conduzida pelo método descrito previamente por Ellman et al., (1961)

com algumas adaptações. O meio de reação foi constituído de tampão fosfato de potássio (100 mM), ácido 5'-5'-ditiobis 2-nitrobenzóico (0,8 mM), substrato iodeto de butiriltiocolina (0,8 mM) e enzima BuChE com volume final de 200 µL. Os óleos vegetais foram dissolvidos em metanol e adicionados em diferentes concentrações ao meio de reação (0,00025 0,0025, 0,025 e 0,25 µg. mL<sup>-1</sup>). A reação foi iniciada com a adição do substrato, sendo a cinética da reação monitorada através de leitura das absorbâncias em 405 nm a cada 3 minutos, durante o período de 9 minutos, em leitor de microplacas.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata com no mínimo quatro repetições. A técnica empregada tem como objetivo avaliar a degradação da butiriltiocolina pela BuChE em butirato e tiocolina seguida da reação da tiocolina com o DTNB para formar TNB, que é um composto de coloração amarelada. Assim, quanto maior for a concentração de tiocolina formada, maior será a atividade da BuChE.

#### **5.4 Análise estatística**

A análise de variância (ANOVA) de uma via foi executada com a finalidade de verificar a existência de diferença significativa entre os grupos estudados. O teste de comparação múltipla de SNK foi o *post hoc* selecionado para identificar os pares de médias que diferiram entre si. Para isso, foi utilizado o software GraphadPrism versão 9.0 considerando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Foi aplicada a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) (Bro & Smilde, 2014) para avaliação das semelhanças inibitórias entre os óleos nas concentrações estudadas. Para isso, foi utilizado o software Matlab 2019 ® de propriedade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, aplicando-se o PCA a partir do PLSToolbox de propriedade do orientador, fornecido pela Embrapa Solos do Rio de Janeiro.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3 apresenta os resultados para o teste de inibição da enzima BuChE pelos óleos vegetais. Na Figura 3A estão apresentados os resultados obtidos para o óleo de *Cannabis*. Observou-se uma inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade da BuChE em todas as concentrações utilizadas, indicando que o óleo de cannabis tem potencial inibidor para a atividade da BuChE. Destaca-se ainda que ocorreu uma semelhança na inibição da atividade enzimática nas concentrações  $0,00025$ ,  $0,0025$  e  $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Os resultados obtidos para a ação do óleo de linhaça dourada perante a enzima BuChE estão apresentados na Figura 3 – B. Da mesma forma que observado para o óleo de *Cannabis*, os resultados indicam uma inibição significativa causada pelo óleo de linhaça dourada na atividade enzimática da BuChE em todas as concentrações testadas, sendo que a maior atividade inibitória foi vista na concentração de  $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Com relação ao potencial de inibição da BuChE pelo azeite de oliva, os resultados estão apresentados na Figura 3 – C. Novamente, observou-se uma inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade enzimática que foi similar em todas as concentrações utilizadas.

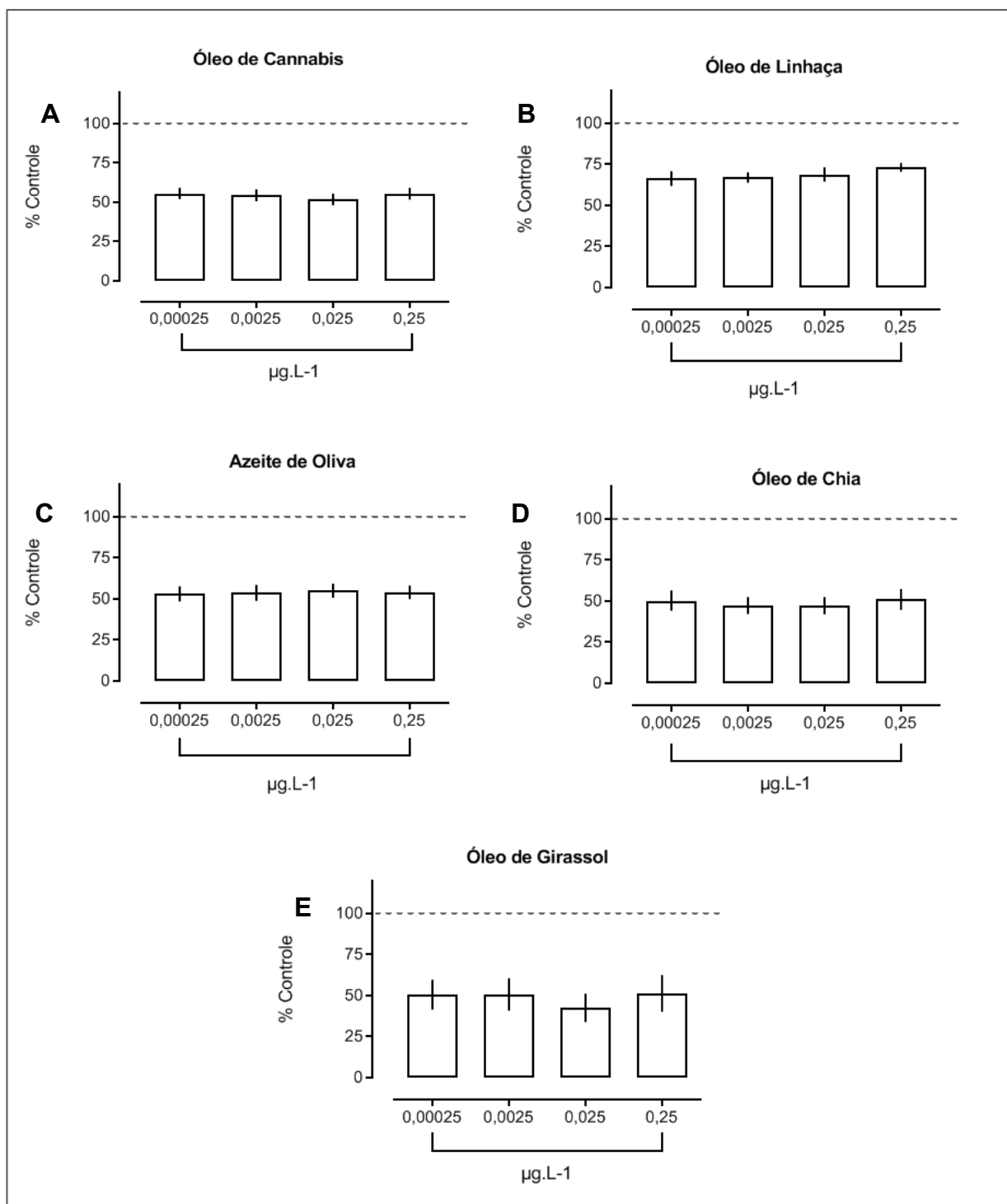
A Figura 3 – D apresenta os resultados para a aplicação do óleo de chia, mostrando inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade da BuChE em todas as concentrações testadas. Neste caso, observou-se uma inibição levemente mais acentuada na concentração de  $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

No caso do óleo de girassol, os resultados estão apresentados na Figura 3 – E. A inibição apresentou-se como significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade da BuChE nas concentrações  $0,00025$ ,  $0,0025$  e  $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$  para o óleo de girassol, com inibição menos significativa na concentração  $0,025 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

O comportamento apresentado com relação a concentração utilizada não segue uma lógica facilmente interpretável, uma vez que, para alguns casos, as soluções mais diluídas se comportaram da mesma forma que as soluções concentradas. Para tanto, foram pesquisadas as composições dos óleos a partir dos diferentes perfis em ácidos graxos, cujos resultados estão discutidos a seguir.



**Figura 3 - Inibição provocada pelos óleos Vegetais sobre a atividade da enzima butirilcolinesterase (BuChE).** (A) Óleo de cannabis; (B) óleo de linhaça dourada; (C) azeite de oliva; (D) óleo de chia e (E) óleo de girassol. Os resultados foram representados como média  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados em ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de SNK, com índice de significância de  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle).



Fonte: Autoria própria (2022).

Avaliando a composição majoritária dos óleos vegetais, destaca-se a presença de ácidos graxos poli-insaturados como ácido linolênico (Ômega-3), ácidos linoleicos (Ômega-6) e ácido oleico (Ômega-9) de forma significativa, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1 - Composição majoritária de ácidos graxos em porcentagem dos óleos vegetais.**

Amostras	Ácidos graxos				
	C16:0 - Ácido Palmítico	C18:0 - Ácido Esteárico	C18:1 - Ácido Oleico Ômega-9	C18:2 cis - Ácido Linoleico Ômega-6	C18:3n-3 cis - Ácido $\alpha$ -linolênico Ômega-3
Chia	7.57	2.84	5.93	20.74	61.84
Girassol	5.28	3.45	46.49	42.87	ND
Linhaça	6.69	5.06	31.17	18.13	36.99
Azeite de Oliva	13.3	2.29	66.49	14.23	0.44
Óleo de Cannabis	6.17	2.26	10.24	58.04	17.73

**Fonte: Leme (2018).**

Dentre os óleos utilizados nos experimentos, o azeite de oliva é o que apresenta maior conteúdo de Ômega-9 (66,49%), quando comparado com os demais (LEME, 2018). Em relação ao Ômega-6 o óleo de cannabis teve a maior porcentagem (58,04%), enquanto o óleo de chia apresentou composição majoritária de Ômega-3 (61,84%). Por outro lado, todos os óleos estudados apresentam composição semelhante com relação ao conteúdo total de ácidos graxos poli-insaturados.

Estudos têm demonstrado que óleos e gorduras ricos em ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) como ômega-3 ( $\omega$ -3) e ômega -6 ( $\omega$ 6) podem ser benéficos à saúde, além de proporcionarem energia e serem carregadores de vitaminas lipossolúveis. Os AGPIs desempenham um papel vital na manutenção da saúde,

minimizando o risco de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ORSAVOVA, et al., 2015).

Dentre os óleos de origem vegetal ricos em AGPIs destacam-se os óleos de linhaça e a chia. O óleo de linhaça dourada contém cerca de 53% de ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3 n-3) e 13% de ácido linoleico (18:2 n-6) e o óleo de chia 60% de ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3 n-3) e 20,4% de ácido linoleico (18:2 n-6) (CIFTCI; PRZYBYLSKI; RUDZINSKA,2012).

Estudos demonstram que os ácidos graxos poli-insaturados são um componente fundamental da membrana externa das células cerebrais, e podem auxiliar na prevenção da Doença de Alzheimer (DA), devido a sua função antioxidante, a qual evita a formação das placas amiloides no cérebro. O consumo apropriado de alguns alimentos é benéfico para a prevenção e retardo da DA, pois diversos estudos têm mostrado os efeitos positivos dos ácidos graxos ômega 3 e micronutrientes como as vitaminas do complexo B, vitaminas E, C e D sobre os neurônios (PRINCE et al.,2015, NAN et al.,2013; SERENIKI; VITAL, 2008; BALBINO, 2021; CROUS-BOU et al., 2017). Além disso, nutrientes como vitaminas, alguns minerais, ácidos graxos saturados se mostram eficientes no retardamento da evolução da DA (BALBINO, 2021; CÂMARA, 2019).

Em um outro estudo, foram avaliadas mais de 5 mil pessoas com idades maiores que 55 anos, entre os quais 197 pessoas apresentaram demência e 146 a DA, com vários ajustes feitos de idade, sexo masculino e feminino, entre outros elementos avaliados. Após finalizarem a pesquisa chegaram à conclusão de que a utilização de suplementos antioxidantes, como as vitaminas E e C, estavam relacionadas a uma queda de 43% no risco de desenvolver a DA (THOMAZ; VIEBIG, 2021).

Por outro lado, não foram encontrados estudos que evidenciem alguma relação entre estes compostos e a inibição da atividade da BuChE, ainda que o potencial antioxidante de algumas substâncias presentes em maior concentração no tecido cerebral promova melhor desenvolvimento neural com efeito neuroprotetor, retardando o desenvolvimento da DA (OTA et al.,2019; PHILLIPS et al., 2021; MOHAMED et al.,2019; LIU et al.,2021; MORRILL; GIBAS, 2018).

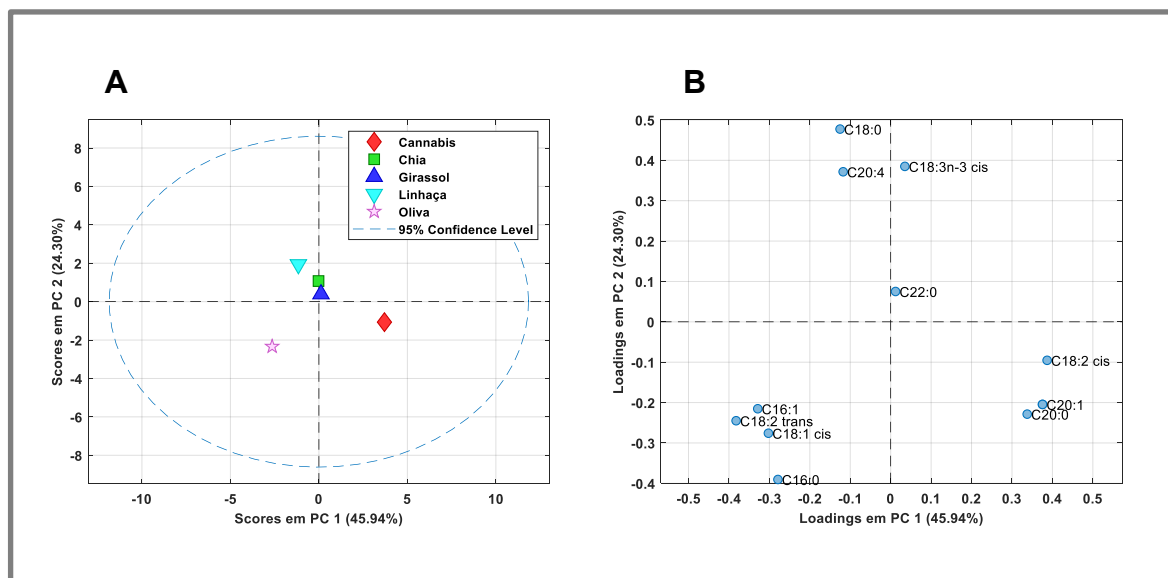
Desta forma, na tentativa de encontrar alguma relação entre o potencial de inibição observado e a composição em ácidos graxos dos óleos estudados, fez-se

uma análise de componentes principais no perfil em ácidos graxos encontrado na literatura, e os resultados estão apresentados na Figura 4.

Observou-se, a partir dos scores (Figura 4A), que a composição em ácidos graxos do óleo de *Cannabis*, que se apresenta com valores de scores positivos em PC1 e negativos em PC2, simultaneamente, está relacionada aos teores de C18:2 cis, C20:1 e C20:0. O azeite de oliva, com score negativo em PC1 e PC2 simultaneamente, tem sua composição associada a teores elevados de C16:0, C16:1, C18:2 – trans e C18:1 – cis. Os óleos de chia e girassol, com valores de score próximos ao zero em PC1 mas positivos em PC2 se assemelham com relação aos teores de C22:0. Já o óleo de linhaça dourada, com valor de score negativo em PC1 e positivo em PC2, simultaneamente, se diferencia dos demais com relação aos teores de C18:0 e C20:4. Para facilitar a comparação, a Figura 5 apresenta o potencial médio de inibição da BuChE pelos diferentes óleos vegetais.

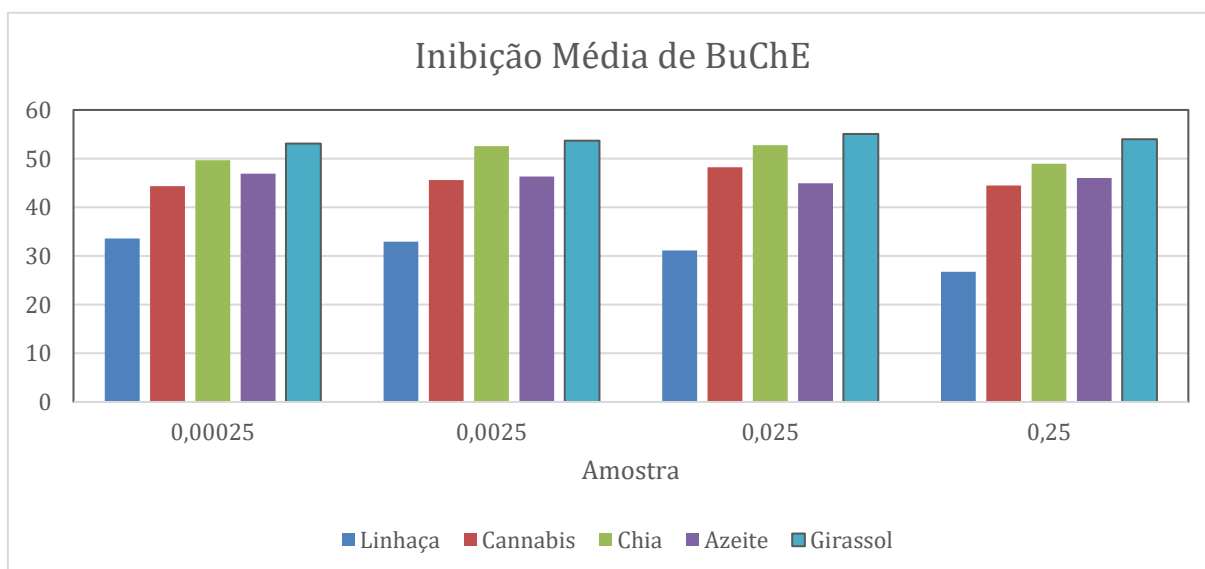
O óleo de linhaça dourada foi o que menos inibiu a atividade da enzima BuChE, enquanto o óleo de girassol foi o mais eficiente na inibição, seguido pelo óleo de chia. Desta forma, relacionando-se o potencial de inibição com a composição dos óleos estudados, pode-se sugerir que, em relação ao perfil em ácidos graxos, o teor de C22:0 pode ser importante na inibição da enzima BuChE. Considerando ainda os ácidos graxos com valores positivos em PC2, pode-se associar os teores de C18:0, C20:4 e C18:3n3 cis como sendo importantes na diferenciação do efeito produzido por estes dois óleos dos demais abordados.

**Figura 4 – Resultado da aplicação de PCA nos dados pesquisados na literatura sobre os óleos vegetais, avaliados com relação ao potencial de inibição da atividade da BuChE. (A) Scores e (B) respectivos loadings.**



Fonte: Autoria própria (2022).

**Figura 5 - Potencial médio de inibição da enzima BuChE pelos diferentes óleos vegetais.**



Fonte: Autoria própria (2022).

## 7 CONCLUSÃO

Todos os óleos avaliados apresentaram atividade anticolinesterásica *in vitro*, apresentando inibição média para a enzima BuChE maiores que 40% nas concentrações testadas, exceto no caso do óleo de linhaça dourada. Desta forma, sugere-se que estes óleos podem ser fontes importantes de compostos ativos para prevenção a doenças neurodegenerativas, nas quais a inibição da BuChE possa atuar.

As concentrações estudadas não se mostraram como diferenciadoras de potencial inibitório neste estudo, de modo que tanto a menor concentração utilizada ( $0,00025 \mu\text{g. L}^{-1}$ ) quanto a maior ( $0,25 \mu\text{g. L}^{-1}$ ) produziram efeitos semelhantes.

Baseados na composição majoritária dos óleos que mais efetivamente inibiram a atividade da BuChE, sugere-se que os ácidos graxos C18:0, C20:4, C18:3n3 e C22:0 possam estar relacionados com a atividade inibitória.

O óleo de linhaça dourada se mostrou o menos efetivo na inibição da atividade enzimática da BuChE, enquanto o azeite de oliva e o óleo de cannabis apresentaram atividade enzimática satisfatória, porém inferiores àquela observada para os óleos de chia e girassol.

Este trabalho sugere que os efeitos benéficos associados ao consumo de óleos vegetais na prevenção, ou como coadjuvantes no tratamento da DA, podem também estar relacionados com a inibição da BuChE.

Portanto este estudo pode servir como base para novos estudos que investiguem o efeito dos ácidos graxos específicos abundantes nestes óleos, em especial dos óleos de girassol e chia, sobre a inibição desta enzima.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, S. W. *et al.* In silico pharmacophore model generation for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 9, p. 2716-2722, 2012.
- ABREU-VILLACA, Y. *et al.* Developmental aspects of the cholinergic system. **Behavioral Brain Research**, v. 221, n. 2, 2011.
- ALMEIDA, C. C. *et al.* Acesso aos medicamentos para tratamento da doença de Alzheimer fornecidos pelo Sistema Único de Saúde em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 7, 2016.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2019 Alzheimer's Disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 15, p. 321-387, 2019.
- AMOAHA, S. K. S. *et al.* Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and sesquiterpene alcohol aromadendrane-4 $\beta$ , 10 $\alpha$ -diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. **European Journal of Pharmacology**, v. 769, p. 195- 202, 2015.
- AMPUERO, I. *et al.* Risk factors for dementia of Alzheimer type and aging associated cognitive decline in a Spanish population-based sample, and in brains with pathology confirmed Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 14, n. 2, p. 179-191, 2008.
- AYERZA, R. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.), from five northeastern locations in northwestern Argentina. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 72, p. 1079-1081, 1995.
- AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1366 - 1371, 2011.
- BALBINO, C.S. A influência da alimentação no tratamento da doença de Alzheimer. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 4, n. 3, p.10279- 10293 may./jun. 2021.
- BARBOSA, M. G. A. *et al.* O uso do composto de Canabidiol no tratamento da doença de Alzheimer (revisão da literatura). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e442986073-e442986073, 2020.
- BARNES, D.E.; YAFFE, Y. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. **Lancet Neurology**, v. 10, n. 9, p. 819-829, 2011.
- BARTHOLOMEW, J., HOLROYD, S., & HEFFERNAN, T. M. Does cannabis use affect prospective memory in young adults? **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 241–246, 2010.

BHATTI, G. K. et al. Lifestyle Modifications and Nutritional Interventions in Aging-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2020.

BLAES, S. L. et al. Enhancing effects of acute exposure to cannabis smoke on working memory performance. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 157, p. 151-162, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.12.001>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal". D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. (2005), n. 1, de 30 de janeiro de (2012). Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva. *In*: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012.

BRO, R., & SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 2812-2831, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>. Acesso em: 20 mai. 2022.

BRUSCATTO, M. H. et al. Chemical characterization and oxidative stability of olive oils extracted from olive trees of Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 1231-1240, 2017.

CALDER, P.C. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.72, p. 326-336, 2013.

CAMPS, P. Pyrano[3,2-c] quinoline - 6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase-and  $\beta$ -amyloid directed anti-Alzheimer compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5365-5379, 2009.

CARACI, F.; NICOLETTI, F.; COPANI, A. Metabotropic glutamate receptors: the potential for therapeutic applications in Alzheimer's disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 38, p. 01- 07, 2018.

CHIANG, P. S.; LEE, D. J.; WHITELEY, C. G., HUANG, C. Y. Antioxidant phenolic compounds from *Pinus morrisconicola* using compressional-puffing pretreatment and water-ethanol extraction: Optimization of extraction parameters. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 7-14, 2017.

CIFTCI, O. N. PRZYBYLSKI, R.; RUDZINSKA, M. Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.114, n.7, p.794-800, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive Pomace Oil. Standard for olive oils and olive pomace oils. **Codex Stan**, p. 33-1981. Roma, Itália, rev. 2, 2003.



CORNUTIU, G. The Epidemiological scale of Alzheimer's Disease. **Journal of Clinical and Medical Research**, v. 7, n. 9, p. 657-666, 2015.

COSKUNER, Y.; KARABABA, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 1067-1073, 2007.

CROUS-BOU, M.; MINGUILLÓN, C.; GRAMUNT, N. *et al.* Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. **Alzheimer Research e Therapy**, v.9, n. 71, 2017. Disponível em: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-017-0297-z>. Acesso em: 23 mai. 2022.

CUTTLER, C. *et al.* Joint effects of stress and chronic cannabis use on prospective memory. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 6, p. 1973 -1983.

DICKSON, T. C.; VICKERS, J. C. The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 105, n. 1, p. 99-107, 2001.

DINGOVA, D. *et al.* Low plasma cholinesterase activities are associated with deficits in spatial orientation, reduced ability to perform basic activities of daily living, and low body mass index in patients with progressed Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 51, n. 3, p. 801-813, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rprs/a/LNQzKPVKxLSsibTnBCps4XM/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 11 mai. 2022.

DUTRA, L. B. *et al.* Tendency of the olive oil consumer's profile. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 72, n. 4, p. 322-336, 2013. **Ensino Agrícola**, Campinas SP, 1996.

ELLMAN *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1991.

ERATTE, D. *et al.* In-vitro digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. **Food Chemistry**, v. 227, p. 129–136, 2017.

FITO, M. *et al.* Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 43, n. 4, p. 375-381, 2007.

FITZPATRICK, A. W. P. *et al.* Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 547, n. 7662, p. 185-190, 2017.

FOSCOLOU, A.; CRITSELIS, E.; PANAGIOTAKOS, D. Olive oil consumption and human health: A narrative review. **Maturitas**. v. 118, p. 60–66, 2018.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 13º ed. ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2017.

HASIN, Y. *et al.* A paradigm for single nucleotide polymorphism analysis: the case of the acetylcholinesterase gene. **Human Mutation**, v. 24, n. 5, p. 408-416, 2004.

HERMS, J. *et al.* Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 2, p. 4106-4115, 2004.

HERRMANN, N. *et al.* Current and emerging drug treatment options for  
HUANG *et al.* Clinical trials of new drugs for Alzheimer Disease. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 18, 2020.

HUANG, L. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of berberine derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. 629, p. 1-12, 2019.

IXTAINA, V. Y. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. **The Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 166-174, 2011.

KUMAR, K. *et al.* Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 297-307, 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 9 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2016.

LEME, L. M. Metodologia para avaliação rápida e não invasiva de cápsulas de óleo utilizando espectrofotômetro ultracompacto para a região do infravermelho próximo. 2018. 51 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3970>> Acesso em: 17 mai. 2022.

LIMA, J. A.; HAMERSKI, L. Alkaloids as potential multi-target drugs to treat Alzheimer's Disease. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 61, p. 301-334, 2018.

LIU, X. *et al.* Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) study: Rationale, design and baseline characteristics of a randomized control trial of the MIND diet on cognitive decline. **Contemporary Clinical Trials**, v. 102, mar. 2021. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1551714421000069?via%3Dihub>  
Acesso em: 20 mai. 2022.

MARTIN PRINCE A. *et al.* The Global Impact of Dementia- An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and. **World Alzheimer Report 2015**.

MARTÍNEZ, M. L. *et al.* Chia (*Salvia hispanica L.*) oil extraction: Study of processing parameters. **Food Science Technology**, v. 47, n. 47, p. 78-82, 2012.

MOHAMED, W.A. *et al.* A pilot study on the effect of lactoferrin on Alzheimer's disease pathological sequelae: Impact of the p-Akt/PTEN pathway. **Biomedicine e**

**Pharmacotherapy**, v. 111, p. 714-723, mar. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333221836935X?via%3Dih>  
Acesso em: 22 abr. 2022.

MOHANAN, A.; NICKERSON, M. T.; GHOSH, S. Oxidative stability of flaxseed oil: Effect of hydrophilic, hydrophobic and intermediate polarity antioxidants. **Food Chemistry**, v. 266, p. 524–533, 2018.

MORAN, M. A. *et al.* Cholinesterases colocalize with sites of neurofibrillary degeneration in aged and Alzheimer's brains. **Acta Neuropathology**, v. 87, n. 3, p. 284-292, 1994.

MORRILL, S. J.; GIBAS, K. J. Ketogenic diet rescues cognition in ApoE4+ patient with mild Alzheimer's disease: A case study. **Diabetes Metabolic Syndrome: Clinical Research e Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1187-1191, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871402118306684>.  
Acesso em: 19 mai. 2022.

MUELLER, K. *et al.* Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 453-460, 2010.

MUSHTAQ, F.; GREIG, N. H.; KHAN, J. A.; KAMAL, M. A.; Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, 2014.

NAN, H. *et al.* Nutrition and the Risk of Alzheimers Disease. **BioMed Research International**, v. 2013, Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/524820>. Acesso em: 20 mai. 2022.

NASCIMENTO, E. C. M. *et al.* Binding analysis of some classical cetylcholinesterase inhibitors: insights for a rational desing using free energy perturbation method calculations with QM/MM MD simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.57, p.958-976, 2017.

NITRINI, R.; BACHESCHI, L. A. A neurologia que todo médico deve saber. 2 ed. Atheneu: Rio de Janeiro, 2008.

OOMAH, B. Dave. Flaxseed as a functional food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.889-894, 2001.

ORSAVOVA, J. *et al.* Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.6, p. 12871-12890, 2015.

OTA, M. *et al.* Effects of a medium-chain triglyceride-based ketogenic formula on cognitive function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 18, n.690, p. 232-236, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394018307304?via%3Dih>.

Acesso em: 10 mai. 2022.

PATTERSON, C. The world Alzheimer Report 2018; **Alzheimer's Disease International**: London. p. 1-48, 2018.

PHILLIPS, M.C.L. *et al.* Randomized crossover trial of a modified ketogenic diet in Alzheimer's disease. **Alzheimer Research Therapy**, v. 13, n. 51, 2021. Disponível em: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-021-00783-x>. Acesso em: 05 mai. 2022.

POTTER, P. E. *et al.* Pre and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. **Acta of Neuropathology**, v. 122, n. 1, p. 49-60, 2011.

POUZET, A. Presentation of some results of the Concerted Action on the management of oilseed crops in the European Union. OCL - **Oleagineux Corps Gras Lipides**, v.6, n.1, p.6-21, 1996.

PRINCE, M. J. World Alzheimer report 2015: the global impact of dementia: na analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London: **Alzheimer's disease international**; 2015.

PUZZI, D. Abastecimento e armazenagem de grãos. **Instituto Campineiro de Ensino Agrícola**, Campinas SP, 1996.

RADWAN, M. M. *et al.* Biologically activ cannabinoids fram high-potency Receptores neurais e a doença de Alzheimer: uma revisão sistemática da literatura sobre as famílias de receptores mais associadas a doença, suas funções e áreas de expressão. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000242>. Acesso em: 15 mai. 2022.

RAMCHARITAR, Anisa *et. al.* Consumer acceptability with Muffind flaxseed (linum usitatissimum). **Journal of food Science**, v.70, n.7, 2005.

RADWAN, M. M. *et al.* Biologically activ cannabinoids fram high-potency Receptores neurais e a doença de Alzheimer: uma revisão sistemática da literatura sobre as famílias de receptores mais associadas a doença, suas funções e áreas de expressão. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000242>. Acesso em: 21 mai. 2022.

REQUES, A.H. Inhibidores de la acetilcolinesterasa: potencial de los cannabinoides en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. 2017. 20 f. Monografia (Graduação) da Universidad Complutense. Madrid, 2017. Disponível em: <https://eprints.ucm.es/56411/>. Acesso em: 18 mai. 2022.

ROMÁN, G.C. *et al.* Extra-virgin olive oil for potential prevention of Alzheimer disease. **Revista de Neurologia**. v. 175, p. 705–723, 2019.

sABBAGH, M.; CUMMINGS, J. Progressive cholinergic decline in Alzheimer's Disease: consideration for treatment with donepezil 23 mg in patients with moderate to severe symptomatology. **BMC Neurology**, v. 11, n. 21, 2011.

SCHELTENS, P. *et al.* Alzheimer's Disease. **The Lancet**, v. 388, p. 505-517, 2016.

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 em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 555-563, 2011.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1, p. 0-0, 2008.

SERENIKI, A.; VITAL, M.A.B. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista Psiquiatria Rio Grande do Sul**, v. 30, 1 supl., 2008.

SILVA, A. C. S. Derivados da *Cannabis sativa* no tratamento do dor crônica. 2021. 33f. Monografia (Graduação em Fisioterapia) - Universidade Santo Amaro, São Paulo, 2021.

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 em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

SOUZA, L. de. Avaliação *in vitro* do óleo da semente de chia (*Salvia Hispânica L.*) na atividade de enzimas antioxidantes em ratos. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2017.

SUERO-GARCIA, C. *et al.* Efeito neuroprotetor dos canabinoides nas doenças neurodegenerativas. **ARS Pharmaceutica**, v. 56, n. 2, p. 77-87, 2015.

TANZI, R.E.; MOIR, R.D.; WAGNER, S.L. Clearance of Alzheimer's A $\beta$  Peptide: The many roads to perdition. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 605-608, 2004.

TEIPEL, S. J. *et al.* The cholinergic system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an in vivo MRI and DTI study. **Human Brain Mapp**, v. 32, n. 9, p. 1349-1362, 2011.

THOMAZ, F. S.; VIEBIG, R. F. Nutrição para doença de Alzheimer: Como utilizar a nutrição para melhoria da qualidade de vida dos portadores desta doença. **M. Books**, 2021.

THOMPSON, L.U.; CUNNANE, S.C. Flaxseed in human nutrition. 2.ed. Champaign, Illinois: AOCS, 2003. 458p.

TOSCO, G. Os Benefícios da “chia” em Humanos e Animais. **Atualidades Ornitológicas**, México, n. 119, p. 7, 2004.

VREDEVELDT, A. et al. Effects of cannabis on eyewitness memory: A field study. **Applied Cognitive Psychology**, v. 32, n. 4, p. 420–428., 2008.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M. J. R. Natural products as a source of Alzheimer’s drug leads. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 48–77, 2011.

WIMO, A., L. *et al.* The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimers Dement**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2013.

ZHAO, J., WANG, W., LI, Y., SUN, X., WANG, D., 2022. Nutritional and chemical composition of industrial hemp seeds. **IND Hemp**, p. 73–93. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00013-0>. Acesso em: 20 mai. 2022.

ZHAO, Q.; TANG, X.C. Effects of huperzine A on an acetylcholinesterase isoform *in vitro*: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **European Journal of Pharmacology**, v. 455, n. 2-3, p. 101-107, 2002.