

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PPGTA**

SIRLEI PATRICIA DE SOUZA

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS FENÓLICOS DA
SEMENTE DE QUINOA (*Chenopodium quinoa Willd*) E AVALIAÇÃO
DOS EFEITOS SOBRE O DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR
ESCOPOLAMINA EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2018

SIRLEI PATRICIA DE SOUZA

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS FENÓLICOS DA
SEMENTE DE QUINOA (*Chenopodium quinoa Willd*) E AVALIAÇÃO
DOS EFEITOS SOBRE O DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR
ESCOPOLAMINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra
Co-orientador: Prof. Dra. Jociani Ascari

MEDIANEIRA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S729p

Souza, Sirlei Patricia de

Potencial antioxidante dos extratos fenólicos da semente de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) e avaliação dos efeitos sobre o déficit de memória induzido por escopolamina / Sirlei Patricia de Souza. – 2018.

72 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Gustavo Petri Guerra

Coorientador: Jociani Ascari

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Compostos bioativos. 2. Flavonoides. 3. Antioxidantes. 4. Alimentos – Dissertações. I. Guerra, Gustavo Petri, orient. II. Ascari, Jociani, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664



TERMO DE APROVAÇÃO

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS FENÓLICOS DA SEMENTE DE QUINOA (*Chenopodium quinoa Willd*) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE O DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA

Por

Sirlei Patricia de Souza

Essa dissertação foi apresentada às 14:00 horas, do dia 16 de maio de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof(a). Dr. Gustavo Petri Guerra (Orientador – PPGTA)

Prof(a). Dr. Rafael Porto Ineu (Membro Interno – PPGTA)

Profa. Dra. Sara Cristina Sagae (Membro Externo – UTFPR)

* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

Dedico este trabalho à todos que
verdadeiramente amam a ciência.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só pôde ser realizado devido ao suporte e auxílio de várias pessoas. É justo, que os devidos créditos sejam dados a elas.

Agradeço a minha família e meu marido pela compreensão e apoio, vocês são minha base e meu porto seguro. As minhas amigas Rosane Vaniski e Caroline Mariana de Aguiar por me incentivarem a trilhar este caminho, vocês foram fundamentais nesta escolha.

Agradeço todo o conhecimento repassado, dedicação e sabedoria do meu orientador Gustavo Guerra Petri e co-orientadora Jociani Ascari.

A Secretaria do Curso, pela cooperação e a todos do laboratório de química da UTFPR/Santa Helena, em especial, a Andreine Roos, sua ajuda foi de grande valia.

Agradeço também a professora Amanda Leitão Gindri da Universidade Regional Integrada do Campus de Santiago, por auxiliar nos experimentos e todos que de forma direta ou indireta que contribuíram nesta trajetória, certamente levarei os amigos que fiz para uma vida toda!

“Ser humano apaixonado pela ciência,
futuro cientista apaixonado pelo ser
humano”.

Autor desconhecido

RESUMO

SOUZA, Sirlei Patricia de. **Potencial antioxidante dos extratos fenólicos da semente de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) e avaliação dos efeitos sobre o déficit de memória induzido por escopolamina**. 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2018.

A quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) é um pseudocereal que apresenta elevada quantidade de compostos bioativos (CBAs). A cocção da semente de quinoa pode provocar a redução nos níveis de CBAs e conseqüentemente do potencial antioxidante. Neste contexto, a obtenção de extratos surge como alternativa para melhorar o aproveitamento dos CBAs, visto que sua ação antioxidante está associada ao combate de doenças e benefícios à saúde. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial antioxidante dos extratos etanólicos das sementes de quinoa branca (WQ) e vermelha (RQ) e analisar o efeito do extrato com maior potencial antioxidante, sobre o déficit de memória induzido por escopolamina (SCP) em camundongos na tarefa de reconhecimento de objetos. Obteve-se quatro extratos etanólicos com WQ e RQ, ambas de origem Peruana, adquiridas no comércio local, com extrações utilizando etanol como solvente, realizadas por soxhlet a 60°C (S) e sob agitação a temperatura ambiente (SRT). Nos extratos, quantificou-se os compostos fenólicos totais (CFT) pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu, sendo expresso como equivalente ácido gálico (EAG) e o total de flavonoides, expresso como equivalente quercetina (EQ). Em seguida, a avaliação do potencial antioxidante, determinada pelo método DPPH e por ABTS, expressas por equivalente Trolox. O extrato RQ-S apresentou maior conteúdo de CFT e flavonoides (26,07 ± 0,70 mg EAG.g⁻¹ e 93,80 ± 0,43 mg EQ.g⁻¹, respectivamente), assim como maior potencial antioxidante medido por DPPH (18,48 ± 0,80 µmol Trolox.g⁻¹), e não houve diferença significativa para o ABTS. A análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada no extrato RQ-S, confirmou a presença de ácidos fenólicos e flavonóides. Camundongos Swiss machos, foram aleatoriamente divididos em dois grupos receberam RQ-S (100 mg/kg) ou solução salina (10 mL/kg) por gavagem oral, uma vez ao dia, por 7 dias. No dia 8, cada grupo foi novamente dividido aleatoriamente em dois grupos recebendo SCP (1 mg/kg) ou solução salina (10 mL/kg) por administração intraperitoneal, 30 minutos antes da sessão de treinamento na tarefa de reconhecimento do objeto. Os animais foram submetidos à sessão de teste na tarefa de reconhecimento de objetos 24 horas após a sessão de treino. Após o teste comportamental, o hipocampo e o córtex cerebral foram removidos para a determinação de indicadores de estresse oxidativo (superóxido dismutase, catalase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e atividade da acetilcolinesterase (AChE). A administração de SCP induziu o déficit de memória e alterou a atividade da AChE e indicadores de estresse oxidativo no hipocampo e no córtex cerebral. A administração oral de RQ-S (100 mg/kg durante 7 dias) preveniu o déficit de memória, as alterações da atividade da AChE e os indicadores de estresse oxidativo induzidos pela SCP. Estes resultados fornecem evidências de que o extrato RQ-S é um tratamento alternativo para os déficits de memória induzidos por SCP e sugerem o envolvimento do estresse oxidativo e do sistema colinérgico.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Extratos etanólicos. Estresse oxidativo. Memória. Quinoa.

ABSTRACT

SOUZA, Sirlei Patricia de. **Antioxidant potential of quinoa seed extracts (*Chenopodium quinoa* Willd) and evaluation of the effects on scopolamine induced memory deficit.** 2018. 72 f. Trabalho de Qualificação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2018.

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) is a pseudocereal in which shows a high amount of bioactive compounds (CB). The quinoa cooking improves the taste and palatability, however, it provokes a reduction in the levels of CB and consequently of the antioxidant potential. In this context, the production of these extracts comes as an alternative to improve the use of BC, whereas its antioxidant action is associated to the combat of diseases and health benefits. Thus, the objective of this study is to evaluate by the antioxidant potential of ethanolic extracts of white (WQ) and red (RQ) seeds and analyzed the extracts with the greatest antioxidant potential, on the memory deficit induced by scopolamine (SPC) in mice in the object recognition task. Four ethanolic extracts were obtained with WQ and RQ, both of Peruvian origin, they were purchased in the local market and the extractions, using hexane and ethanol as solvent, were performed by soxhlet at 60 °C (S), and under shaking at room temperature (SRT). In the extracts was made the quantification of total phenolic compounds (CFT) by the Folin-Ciocalteu colorimetric method, being expressed as gallic acid equivalent (EAG) and the total flavonoids, expressed as quercetin equivalent (EQ). And then, the evaluation of the antioxidant potential was determined by the DPPH method expressed as Trolox equivalent. Next, the evaluation of the antioxidant potential was determined by the DPPH method and by ABTS both techniques expressed by Trolox equivalent. The extract of RQ-S, presented higher content of CFT and flavonoids (26.07 ± 0.70 mg EAG.g⁻¹ and $93,80 \pm 0,43$ mg EQ.g⁻¹, respectively), as well as greater antioxidant potential measured by DPPH (18.48 ± 0.80 μ mol Trolox.g⁻¹), and was not significant enough for ABTS. Swiss mice were randomly divided into two groups receiving RQ-S (100 mg/kg) or saline (10 mL/kg) by oral gavage once daily for 7 days. On day 8 each group was again randomly divided into two groups receiving either SCP (1 mg/kg) or saline (10 mL/kg) by single intraperitoneal administration, 30 min before the training session on the object recognition task. The animals were submitted test session on the object recognition task 24 h later. After behavioral test, the hippocampus and cerebral cortex were removed for the determination of oxidative stress indicators (superoxide dismutase, catalase and TBARS) and acetylcholinesterase (AChE) activity. SCP administration induced a memory deficit, altered AChE activity and oxidative stress indicators in the hippocampus and the cerebral cortex. Oral administration of RQ-S (100 mg/kg during 7 days) prevented memory deficit, the changes of AChE activity and oxidative stress indicators induced by SCP. These results provide evidence that quinoa extract is an alternative treatment for SCP-induced memory deficits, and suggest the involvement of oxidative stress and cholinergic system.

Keywords: Bioactive compounds. Ethanolic extracts. Memory. Oxidative stress. Quinoa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura básica dos compostos fenólicos	19
Figura 2- Estrutura básica dos flavonoides	20
Figura 3- Subdivisão dos compostos fenólicos	21
Figura 4- Cultivo de quinoa	22
Figura 5- Seção longitudinal da semente de quinoa	23
Figura 6- Mecanismo de formação e manutenção da memória	29
Figura 7- Classificação da memória	31
Figura 8- Fluxograma dos processos e análises realizadas durante o trabalho de extração da semente de quinoa	35
Figura 9- Extração da semente de quinoa por soxhlet	36
Figura 10- Extração da semente de quinoa por agitação	37
Figura 11- A) Representação esquemática do protocolo experimental para curva dose-resposta do extrato RQ-S. B) Administração do extrato RQ-S (30, 100 e 300 mg/kg) por 7 dias no índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objetos. Os dados são as médias \pm EPM, para $n = 8$ animais em cada grupo. *Indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).	48
Figura 12- A) Representação esquemática do protocolo experimental para administração do extrato RQ-S e escopolamina (SCP). B) Administração de extrato RQ-S (100 mg/kg), PCS (1 mg/kg) e a coadministração de extrato de SCP e RQ-S no índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objetos. Os dados são as médias \pm SEM, com $n = 8$ animais em cada grupo. * Indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).	49
Figura 13- Administração de extrato RQ-S (100 mg/kg), escopolamina (SCP - 1 mg/kg) e a co-administração de extrato de SCP e RQ-S em indicadores de estresse oxidativo A) Superóxido Dismutase, B) Catalase e C) Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico no hipocampo e D) Superóxido Dismutase, E) Catalase e F) Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico no córtex cerebral de camundongos. Os dados são as médias \pm EPM, para $n = 5$ animais em cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).	50
Figura 14- Administração de extrato RQ-S (100 mg/kg), escopolamina (SCP - 1 mg/kg) e a coadministração de extrato de SCP e RQ-S na atividade da AChE no hipocampo A) hipocampo B) córtex cerebral de camundongos. Os dados são as médias \pm EPM, para $n = 5$ animais em cada grupo. *Indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).	51
Figura 15- Esquema da indução ao déficit de memória por escopolamina e efeito do extrato etanólico de quinoa vermelha em camundongos	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos CBAs com os principais efeitos fisiológicos e fontes alimentares.....	18
Tabela 2: Identificação das amostras de quinoa	34
Tabela 3: Compostos fenólicos, teor de flavonóides e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) de extratos etanólicos de quinoa.	46
Tabela 4: Metabólitos identificados no extrato de quinoa etanólico por HPCL-DAD-MS.....	46
Tabela 5: Efeito da administração do extrato RQ-S (30, 100, 300 mg/kg) por 7 dias no teste de comportamento exploratório de animais (<i>crossing</i> e <i>rearing</i> respostas) durante a sessão de habituação da tarefa de reconhecimento de objeto.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácidosulfónico)
- ACh – Acetilcolina
- AChE – Acetilcolinesterase
- CAT - Catalase
- CBAs - Compostos bioativos
- CFT - Compostos fenólicos totais
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DA – Doença de Alzheimer
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- DP - Doença de Parkinson
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DTNB - 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
- EAG - Equivalente de ácido gálico
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EQ - Equivalente de quercetina
- ERO - Espécie reativa de oxigênio
- ERN - Espécie reativa de nitrogênio
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
- FT - Flavonoides totais
- MDA – malondialdeído
- Q-TOF - quadrupolo-tempo de voo
- RQ – Quinoa vermelha
- RQ-S – Extrato de quinoa vermelha obtido por soxhlet
- RQ-SRT – Extrato de quinoa vermelha obtido por agitação e temperatura ambiente
- R² - Coeficiente de correlação
- S - Soxhlet
- SCP - Escopolamina
- SDS - Dodecilsulfato de sódio
- SOD - Superóxido dismutase
- SRT - Agitação e temperatura ambiente
- TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

WQ- Extrato de quinoa branca

WQ-S – Extrato de quinoa branca obtido por soxhlet

WQ-SRT – Extrato de quinoa branca obtido por agitação e temperatura ambiente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 GERAL.....	16
2.2 ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS	17
3.1.1 Compostos fenólicos.....	18
3.1.2 Flavonoides.....	20
3.2 QUINOA.....	22
3.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	24
3.4 ESTRESSE OXIDATIVO	25
3.4.1 Estresse oxidativo e compostos fenólicos	28
3.5 MEMÓRIA.....	28
3.6 DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 ANIMAIS E REAGENTES.....	34
4.2 REAGENTES E MATRIZ PARA O EXTRATO.....	34
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS SEMENTES DE QUINOA	35
4.3.1 Extração com soxhlet.....	35
4.3.2 Extração com agitação	36
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS	37
4.4.1 Compostos fenólicos totais	37
4.4.2 Flavonoides totais.....	38
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	38
4.5.1 Método DPPH.....	38
4.5.2 Método de captura do radical livre ABTS.....	39
4.5.3 Identificação de compostos presentes no extrato etanólico RQ-S por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	39
4.6 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	40
4.7 DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE.....	41
4.7.1 Preparação dos tecidos	41
4.7.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	41
4.7.3 Atividade de catalase (CAT)	42
4.7.4 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	42
4.7.5 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	42
4.8 DESENHO EXPERIMENTAL.....	43
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5 RESULTADOS	45

5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - <i>IN VITRO</i>	45
5.2 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC	46
5.3 DESENHO EXPERIMENTAL 1.....	46
5.4 DESENHO EXPERIMENTAL 2.....	48
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	55
8 REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O conjunto de memórias de cada pessoa influencia a sua personalidade, esse sistema complexo e múltiplo combinado por arranjos de condições ou subsistemas, permitem armazenar e recuperar informações no cérebro (BADDELEY; HITCH, 1974). Embora as informações sejam armazenadas em lugares diferentes, existem regiões do cérebro para onde todas elas convergem, dentre elas destaca-se: amígdala, córtex órbito-frontal, hipocampo e hipotálamo (EICHENBAUM; YONELINAS; RANGANATH, 2007).

As memórias não são armazenadas de forma integral e, mesmo quando estabelecidas e consolidadas, não são permanentes (ROBERTSON, 2002; TAKASHIMA, 2012). Este é o fenômeno do esquecimento: somos melhores na generalização e na abstração de conhecimentos do que na retenção de um registro literal de eventos. O esquecimento é fisiológico e ocorre continuamente, enfraquecendo o traço de memória do que foi aprendido. De fato, esquecer é uma função essencial ao bom funcionamento da memória (ROBERTSON, 2002; SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1988).

Doenças que causam comprometimento cognitivo e comportamental como as doenças neurodegenerativas acometem, em maior grau, pessoas com idades mais avançadas (HARMAN, 1956), e é alvo de preocupação para a saúde pública, uma vez que a idade média da população mundial está aumentando (ARAUJO et al., 2015). A deficiência de memória na velhice é uma característica do estágio inicial da doença de Alzheimer (DA) que acomete 44 milhões de pessoas em todo o mundo (KAMKWALALA; NEWHOUSE, 2017). A segunda desordem neurodegenerativa mais comum é a doença de Parkinson (DP), estima-se que 1% da população com idade superior a 60 anos e 4% das pessoas com mais de 80 anos possuem a DP (CHEN et al., 2014; MUÑOZ-SORIANO; PARICIO, 2011; WIRDEFELDT et al., 2011).

O cérebro dos mamíferos apresenta baixa defesa antioxidante quando comparada a outros tecidos do corpo, considerado-o sensível ao estresse oxidativo, e por este motivo, é associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013). Considera-se que o DNA (ácido desoxirribonucléico) humano receba, a cada dia, cerca de 10 mil impactos oxidativos, mostrando que o estresse oxidativo é onipresente (AMES; SHIGENAGA;

HAGEN, 1993), sendo ele causado pelo desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e a produção de radicais livres, resultando em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos (SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013; SIES, 1986).

O mecanismo antioxidante do sistema de defesa do organismo humano envolve métodos de prevenção executado por proteínas extracelulares, de reparo, por meio de enzimas (como a superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase) e de intercepção, agentes antioxidantes, como as vitaminas C, E, os carotenóides e compostos fenólicos (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016; KONDAKÇI et al., 2013). Dietas ricas em antioxidantes podem prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo, pois, os mesmos interagem com os radicais livres no metabolismo celular (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Devido à elevada concentração de compostos bioativos (CBAs) presentes na quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) e seus benefícios, este pseudocereal de origem andina, usado primariamente para subsídio dos povos locais, tem um crescente aumento no interesse de seus produtos e consumo da semente, principalmente, em produtos de panificação, como complemento ou substituto a farinha de trigo e arroz, visando à obtenção de alimentos funcionais (BHARGAVA; SHUKLA; OHRI, 2006; GRAF et al., 2014; OGUNGBENLE, 2003).

A quinoa, assim como outras sementes, geralmente passa pelo processo de cocção antes do consumo, buscando melhorar o sabor e a palatabilidade, entretanto, este procedimento provoca a redução nos níveis de CBAs e conseqüentemente da atividade antioxidante (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010). A extração surge como alternativa para o melhor aproveitamento destas substâncias, podendo inclusive potencializar sua atividade antioxidante. Além disso, existe uma escassez de trabalhos investigando a extração de compostos fenólicos da quinoa e sua atividade antioxidante em doenças neurodegenerativas *in vivo*.

Assim, torna-se importante a avaliação do potencial antioxidante *in vivo* de extratos obtidos a partir da quinoa, uma vez que, podem servir como alternativa para desenvolvimento de drogas e nutracêuticos capazes de prevenir danos neuronais e um possível tratamento ao déficit de memória.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial antioxidante dos extratos orgânicos das sementes de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) branca e vermelha e analisar o extrato com maior potencial antioxidante *in vitro* sobre o déficit de memória induzido por SCP em camundongos na tarefa de reconhecimento de objetos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter extratos etanólicos da semente de quinoa branca e vermelha por diferentes métodos de extração;
- Quantificar os compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos etanólicos obtidos;
- Determinar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos através dos métodos DPPH e ABTS;
- Identificar os compostos presentes no extrato etanólico com maior potencial antioxidante *in vitro* por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar o efeito do extrato com maior potencial antioxidante *in vitro* sobre o déficit de memória induzido por SCP em camundongos na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Avaliar alterações nos indicadores de estresse oxidativo (CAT, SOD e TBARS) e na atividade da AChE induzido pela administração de SCP e uma possível prevenção, deste efeito, pelo extrato etanólico com maior potencial antioxidante *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

CBAs são constituintes extranutricionais (BERNHOF, 2010; KITTS, 1994), presentes em pequenas quantidades principalmente nos alimentos de origem vegetal e amplamente consumidos na alimentação (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Estas substâncias orgânicas, provenientes dos metabólitos secundários sintetizadas durante o desenvolvimento das plantas, estão relacionadas ao sistema de defesa, por este motivo, podem apresentar quantidades variadas que dependem dos fatores de cultivos como: estresse, radiação ultravioleta, tipo de solo, irrigação, agressões de insetos e patógenos (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005). Os CBAs podem ser encontrados em várias partes das plantas, tais como, folha, caule, flor, talo, fruta e semente (AZMIR et al., 2013).

Substâncias bioativas, compostos funcionais e fitoquímicos são terminologias que referem aos CBAs, e possuem ação funcional no organismo humano, ou seja, atuam no metabolismo e fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos à saúde (BERNHOF, 2010; CARRATÙ; SANZINI, 2005; KITTS, 1994). Podem variar de estrutura química e conseqüentemente a função biológica, dentre as principais atribuições e funções desses compostos destacam-se o potencial antioxidante, antiviral, antimicrobiano, antitumoral e atividades antibacterianas (BERNHOF, 2010; ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007; KITTS, 1994; KRIS-ETHERTON et al., 2002; MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 2002).

Algumas evidências apontam para o importante papel dos CBAs na manutenção da saúde e na redução do risco de doenças crônicas, sem o surgimento de efeitos colaterais (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007; REIN et al., 2013). A Tabela 1 descreve os principais efeitos e fontes alimentares de alguns CBAs.

Tabela 1- Relação dos CBAs com os principais efeitos fisiológicos e fontes alimentares

CBAs	Efeitos fisiológicos	Fontes alimentares
Ácidos graxos n-3, n-6 e n-9	Redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares	Azeite de oliva, oleaginosas, sardinha
Tocoferóis	Atividade antioxidante	Óleos
Carotenoide e antocianinas	Atividade antioxidante e anticancerígena	Frutas e hortaliças
Flavonoide	Redução do risco de doenças	Vinho, chás, cacau e maçã
Fitoestrógenos e resveratrol	Redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer	Semente de abóbora, linhaça, gergelim, soja e uva

Fonte: Baur et al. (2016); Kris-Etherton et al. (2002); Marshall, Van (2018); Sem, Khanna, Roy (2007); Young, Woodside (2001).

Boas quantidades de CBAs são encontrados nos cereais, que constituem importante grupo alimentar na dieta humana, devido à grande variedade de nutrientes, e estima-se que 35% da energia diária derivam dessa fonte alimentar (FAO, 2017). Sementes similares aos cereais são conhecidos como pseudocereais, que pertencem a família das gramíneas (REPO-CARRASCO-VALENCIA et al., 2010) e apresentam quantidades aproximadas de carboidratos quando comparados aos cereais e destacam-se por serem livres de glúten, conter alto teor de proteína e também CBAs (AMAYA-FARFAN; MARCÍLIO; SPEHAR, 2005; INGLETT; CHEN; LIU, 2015).

3.1.1 Compostos fenólicos

Os CBAs são subdivididos em: carotenoides, glicosinolatos e compostos fenólicos (CARRATÙ; SANZINI, 2005; KRIS-ETHERTON et al., 2002). Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, são substâncias que apresentam uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático (Figura 1), podendo ser encontrados na forma isolada (agliconas) ou complexa e estarem ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. Entre os principais tipos de compostos fenólicos estão os flavonoides, taninos, ligninas e ácidos fenólicos (MANACH et al., 2004; PANDEY; RIZVI, 2009). Ao todo são contabilizados mais de 8000 e são largamente distribuídos na natureza (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

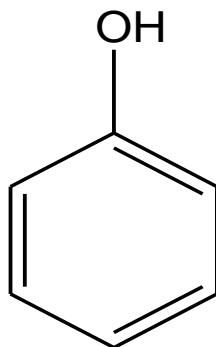


Figura 1- Estrutura básica dos compostos fenólicos
Fonte: Manach et al. (2004); Pandey e Rizvi (2009)

Os compostos fenólicos são responsáveis por diferentes características sensoriais, como o sabor amargo, adstringência e cor dos alimentos em geral (HAN; SHEN; LOU, 2007), entretanto, seu interesse, ocorre devido ao seu potencial antioxidante, que permite o combate aos radicais livres, desenvolvendo um importante papel na proteção das células contra os danos oxidativos e por estar associada com alguns benefícios a saúde (RISPAIL; MORRIS; WEBB, 2005; YOUNG; WOODSIDE, 2001).

Algumas evidências demonstram que a suplementação ou dieta rica em compostos fenólicos, implica em efeito protetor para pacientes com refluxo gastroesofágico (ALECCI et al., 2016), hipertireoidismo (PARK et al., 2016), fibromatose gengival (MORIN; GRENIER, 2016) e efeito anti-inflamatório em células intestinais (SERRA; ALMEIDA; DINIS, 2016), além de diminuir significativamente o estresse oxidativo em crianças diagnosticadas com síndrome de Down (MANNA et al., 2012).

Além disso, existe um crescente interesse pelo potencial dos compostos fenólicos sobre a melhora da memória e o tratamento de doenças neurodegenerativas (LIBRO et al., 2016; PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016). A suplementação da dieta com extrato de compostos fenólicos de mirtilos e uvas (500 ou 2500 mg.kg⁻¹), durante quatro meses, previne o déficit de memória associado a doenças relacionadas com a idade, como a DA (DAL-PAN et al., 2016). A administração oral de extratos fenólicos de *Trichilia catiguá* (200 e 400 mg.kg⁻¹) melhora a memória de camundongos na tarefa de esQUIVA inibitória (CHASSOT et al., 2011).

Adição de extratos de *Bougainvillea glabra Choisy* (120 µg.mL⁻¹) na dieta apresenta efeitos neuroprotetores, quando comparados ao grupo controle como, a

diminuição da depleção da dopamina, a melhora do desempenho locomotor e a diminuição do estresse oxidativo, em *Drosophila melanogaster*, após a indução da DP. Esses efeitos são associados aos compostos antioxidantes encontrados no extrato, como o phytol, α , γ -tocoferol, esqualeno, estigmasterol, geranylgeraniol, quercetina e cafeína, ácido vanílico, cumárico e ferúlico (SOARES et al., 2017).

O mecanismo de ação dos antioxidantes presentes em extratos de plantas possui papel importante na redução da oxidação lipídica em tecido vegetal e animal, pois quando incorporados na alimentação humana não conservam apenas a qualidade do alimento, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de algumas patologias (SOUSA et al., 2007).

3.1.2 Flavonoides

A palavra flavonoide é originada do latim *flavus*, que significa amarelo, e inicialmente era designada somente para compostos que apresentavam coloração amarelada, porém, sabe-se que os grupos pertencentes a essa classe incluem várias colorações e até mesmo incolores. Estes absorvem radiações na região do ultravioleta e do visível, desempenhando assim o papel de defesa nas plantas contra as radiações solares, podendo apresentar uma barreira química contra micro-organismos (PETERSON; DWYER, 1998; RICE-EVANS, 2004).

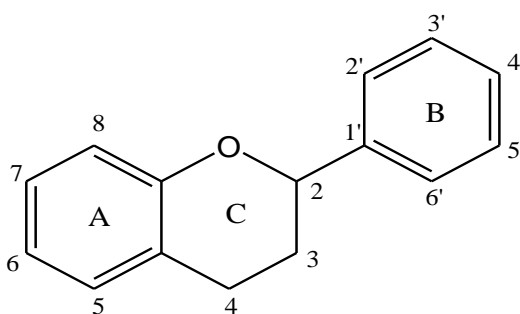


Figura 2- Estrutura básica dos flavonoides
Fonte: Bravo (1998)

Estima-se que existam cerca de 5000 flavonoides com estruturas diferentes, essas moléculas de baixo peso molecular são consideradas como os mais abundantes na dieta por serem encontrados em grandes variedades de frutas,

hortaliças, cereais, chá preto, vinho, suco de uva, pólen, própolis, entre outros (IGNAT et al., 2011; PETERSON; DWYER, 1998).

Os flavonoides possuem como estrutura básica $C_6-C_3-C_6$ (Figura 2) e pertencem a uma das classes mais diversificadas do reino vegetal. Nesse grupo as classes mais comuns são: flavonóis, flavanas, flavononas, isoflavonas e antocianinas, conforme Figura 3 (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

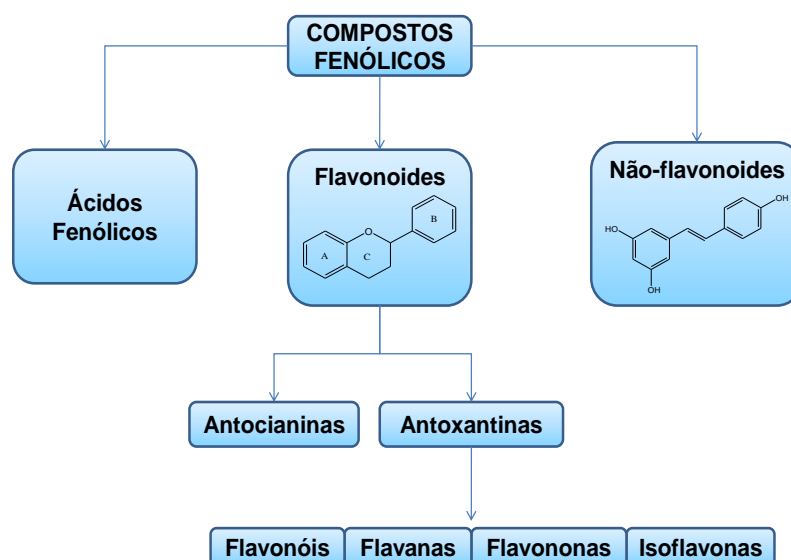


Figura 3- Subdivisão dos compostos fenólicos
 Fonte: Adaptado de Ataie, Shadifar e Ataee (2016)

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que os flavonoides são compostos fenólicos importantes com propriedades antioxidantes, anti-microbiana e anti-inflamatórias, agem como neuroprotetores contra lesões e na regeneração neural (MIRANDA et al., 2014; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; WU et al., 2017). Em doenças neurodegenerativas, como a DA, regula os fatores de transcrição de sobrevivência e a indução da expressão de genes específicos no hipocampo (BAKHTIARI et al., 2017). A atividade dos flavonoides também está ligada à modulação da função neuronal e na prevenção da DP (DATLA et al., 2001).

3.2 QUINOA

A quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*), denominada pseudo-oleagenosa ou pseudocereal, pertence à família da *Chenopodium* de origem andina, cultivada na América do Sul e tradicionalmente utilizada como fonte de subsistência e alimentação dos povoados locais (GRAF et al., 2014). Apresenta fácil adaptação no cultivo, desde o nível do mar, clima subtropical, até em altas montanhas, climas frios e aos mais diversos solos, o que a torna uma planta resistente, explorada e cultivada em diversos países (Figura 4) (BHARGAVA et al., 2006; REPO-CARRASCO-VALENCIA et al., 2010; TANG et al., 2015; VEGA-GÁLVEZ et al., 2010).



Figura 4- Cultivo de quinoa
Fonte: EMBRAPA (2016)

A seca e a salinidade têm influência sobre o conteúdo de metabólitos secundários da quinoa. Observa-se um aumento do conteúdo de compostos fenólicos com a falta de irrigação, indicando que esse efeito é provavelmente uma resposta à geração de espécies oxidativas. Entretanto, o conteúdo de composto fenólico total (CFT) é ligeiramente inferior nas amostras com tratamentos de solução salina. A irrigação com água salgada produz uma pequena diminuição nos compostos fenólicos livres, mas, apesar disso, a quinoa é tolerante as condições salinas (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2012). Diferentes épocas de colheitas também podem influenciar o conteúdo de flavonoides, conforme estudo com extratos metanólicos da quinoa do Japão, que obtiveram quantidades que variaram de 130,1

a 192,8 mg.100 g⁻¹ do extrato de quinoa para colheita realizada no inverno e no verão, respectivamente (HIROSE et al., 2010).

Em reconhecimento às práticas ancestrais do povo andino, a Assembléia Geral das Nações Unidas declarou 2013 como o "Ano Internacional da Quinoa" e diante do desafio de aumentar a produção de alimentos de qualidade para suprir a demanda da população mundial, considerando o contexto desfavorável da mudança climática, a quinoa torna-se uma alternativa para países que sofrem dessa insegurança alimentar (FAO, 2017).

A semente de quinoa (Figura 5), a parte comestível é classificada conforme cultivares podendo apresentar variações e intensidade de cores como: branca, amarela, rosa, vermelha e preta (VAUGHAN; GEISSLER; NICHOLSON, 2009). Nutricionalmente, a quinoa está incluída na categoria de "semente integral" (MCKEOWN et al., 2013). A composição de carboidratos apresenta a maior fração (67% a 74% do material seco), seguida por proteínas (15%) que apresentam aminoácidos essenciais (1,1%), e ainda contêm fibras dietéticas (16,3%) e gorduras (5 - 7%), além de micronutrientes, como o cálcio e ferro, presentes em maiores concentrações comparado com outros cereais (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010; GORINSTEIN et al., 2007; REPO-CARRASCO-VALENCIA; SERNA, 2011; RUALES et al., 2002).

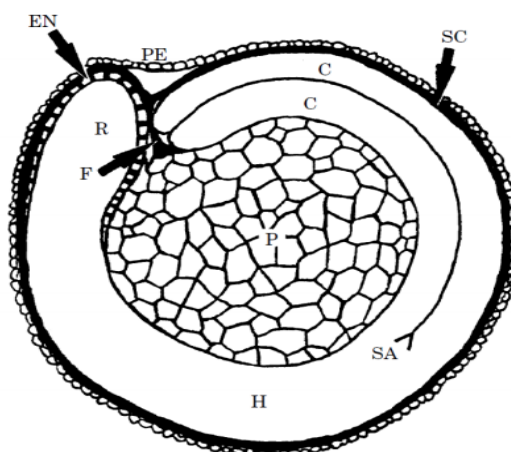


Figura 5- Seção longitudinal da semente de quinoa
Pericarpo (PE), testa (T), cotilédones (C), endosperma (EN), radícula (R) e perisperma (P)
Fonte: Prego, Maldonado e Otegui (1998)

A quinoa apresenta quantidades superiores de compostos fenólicos (71,7 mgEAG.100 g⁻¹ do extrato) quando comparada a outros pseudocereais andinos como Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*), a Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) (REPO-

CARRASCO-VALENCIA et al., 2010), o amaranto (*Amaranthus spp*) (21,2 mgEAG.100 g⁻¹ do extrato) e também quando comparada a cereais tradicionais, como trigo (53,1 mgEAG.100 g⁻¹ do extrato) (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010).

Vários compostos extraídos da quinoa reforçam a importância desse pseudocereal ser tão poderoso, alguns exemplos de compostos são as betalaínas (TANG et al., 2015; ABDERRAHIM et al., 2015), o canferol (SIMONE et al., 1990) a quercetina, o ácido benzóico (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2014; LI; WANG; ZHU, 2016), e as saponinas (CARCIOCHI; MANRIQUE, 2015). A presença de betalaínas está associada com a coloração da semente vermelha (TANG et al., 2015), porém, a intensidade da cor pode não estar relacionada com a quantidade de betalaínas, mas, relacionadas com impurezas da semente (ABDERRAHIM et al., 2015).

As sementes de quinoa coloridas (vermelhas de vários cultivares) do Altiplano peruano mostraram valores de compostos fenólicos livres entre 1,23 e 3,41 mgEAG.g⁻¹ do extrato de quinoa (ABDERRAHIM et al., 2015), valores menores quando comparados com a quinoa vermelha cultivada no Canadá, que apresentou valores entre 4,2 mgEAG.g⁻¹ do extrato de quinoa (TANG et al., 2015), e próximos quando comparado com o pseudoscereal canihua (*Chenopodium pallidicaule*), que apresentou valores de 2,5 mgEAG.g⁻¹ do extrato de canihua (ABDERRAHIM et al., 2012).

Com a inovação tecnológica há um interesse crescente nos produtos derivados da quinoa, sua aplicação estende desde a alimentação até os produtos cosméticos e nota-se o interesse desde 1985 com o aumento significativo do número de pedidos de patente (GRAF et al., 2015).

3.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O processo de cocção de sementes, cereais e pseudoscerais é uma prática comum para melhorar o sabor e a palatabilidade desses alimentos. Entretanto, este procedimento pode provocar a redução nos níveis de CBAs e conseqüentemente a atividade antioxidante (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010; MORAIS et al., 2017).

A obtenção de extratos bioativos surge como uma alternativa para melhorar o aproveitamento dos constituintes nutricionais dos alimentos. Diversos parâmetros podem influenciar nas extrações, tais como, temperatura, tempo, polaridade e

volume do solvente, pH, preparação e tamanho da partícula da amostra, número de etapas da extração (SOUZA-SARTORI et al., 2013; ZHAO et al., 2016).

O rendimento das extrações pode estar associado aos fatores supracitados em especial ao tipo de solvente e ao método empregado (RISPAIL et al., 2005; SOUZA-SARTORI et al., 2013), fatores esses importantes para fornecer uma extração completa das substâncias de interesse e evitar modificações químicas entre elas (SUN; HO, 2005).

As polaridades dos compostos fenólicos variam de polar para não polar. Assim, uma ampla gama de solventes, como hexano, acetato de etila, metanol, etanol, acetona, água e suas misturas podem ser utilizadas para a extração (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005). No entanto, o uso de solventes tóxicos, como o metanol, deve ser evitado para reduzir os riscos para a saúde e o meio ambiente (DURLING; SVENSSON; ABRAMSSON-ZETTERBERG, 2007; FINKELSTEIN; VARDI, 2002). Solventes como etanol e água são frequentemente usados devido seu caráter polar, que resulta em afinidade com alguns compostos fenólicos (FINKELSTEIN; VARDI, 2002; PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006). A concentração do solvente, como o etanol, considerado biodegradável e não tóxico, demonstra ser o parâmetro-chave para obtenção do extrato da semente de quinoa (CARCIOCHI; MANRIQUE, 2015).

Extração de CBAs de matriz vegetal pode ser realizada por vários processos convencionais, tais como: maceração, infusão e extração por soxhlet ou outras tecnologias como: extração de ultrassom assistida por microondas e de fluido supercrítico (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005). Entretanto a extração por ultrassom não parece ser apropriada para extração de antioxidantes como os compostos fenólicos de sementes de quinoa (CARCIOCHI; MANRIQUE, 2015). Após obter os extratos é importante mantê-los protegidos da luz e armazenados sob temperatura controlada até a análise, para que não ocorram perdas significativas dos compostos a serem analisados (ABDERRAHIM et al., 2015).

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes com a produção de compostos oxidativos, de maneira que os radicais

livres, predominantes, resultam em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos que podem causar danos aos tecidos (NESPOLO, 2017; SIES, 1986). As alterações oxidativas, podem gerar danos celulares nas proteínas, carboidratos, lipídios e DNA do organismo, além das substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias, pois os níveis de oxidação destas biomoléculas são considerados importantes para avaliação deste processo (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; RAY; HUANG; TSUJI, 2012; SIES, 1986).

Diversas doenças crônicas estão associadas ao estresse oxidativo e desordens inflamatórias, ocorre redução nas atividades enzimáticas como, superóxido dismutase, catalase e glutationala/glutationala peroxidase ou diminuição do alfa-tocoferol e do nível de urato (a.k.a. ácido úrico) (LANGEMANN; KABIERSCH, 1991). Influencia os processos de envelhecimento, transformação e morte celular, além disso, inclui diminuição da cognição e raciocínio, perda de memória e prejuízo da linguagem (BAKHTIARI et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2007).

Os radicais livres, “espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados”, são altamente reativos devido à instabilidade estrutural decorrente de elétrons não pareados (HALLIEWELL; GUTTERIDGE, 2007). Podem ser definidos ainda como “espécies reativas”, pois inclui além dos radicais livres, outras espécies que não possuem elétrons desemparelhados, mas que são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (SIES, 1986).

As EROs (espécies reativas de oxigênio) são átomos, moléculas ou íons, que contêm um átomo de oxigênio na sua constituição, incluindo os radicais: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$), peroxila ($RO_2\cdot$), alcoxila ($RO\cdot$) e não radicais tais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (1O_2). Sob estas condições, as EROs podem oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando a morte celular (HALLIEWELL; GUTTERIDGE, 2007; HARMAN, 1956; VALKO et al., 2007). Além das EROs, existem as ERNs (espécies reativas de nitrogênio) que contêm um átomo de nitrogênio na sua constituição e são representadas pelos radicais: óxido nítrico ($NO\cdot$) e dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$) e os não radicais, tais como ácido nitroso (HNO_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e ânion nitroxil (NO^-) (HALLIEWELL; GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007).

A geração de espécies reativas dentro de certos limites é fundamental para manter a homeostase celular, tendo um papel como mensageiros em vias de

sinalização de insulina, hormônio de crescimento, citocinas, entre outras vias (HEKIMI; LAPOINTE; WEN, 2011; LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007). Como as vias que regulam a atividade das enzimas antioxidantes e até mesmo controlando a expressão de alguns grupos de genes, como os envolvidos no metabolismo mitocondrial (LIM et al., 2005; SOHAL; ORR, 2012).

As mitocôndrias são as maiores fontes endógena de produção de radicais livres nos eucariontes (HEKIMI; LAPOINTE; WEN, 2011). Porém, quando ocorre uma produção intensificada, o organismo necessita de um sistema antioxidante eficiente para conseguir controlar e restabelecer o equilíbrio normal (DEY et al., 2016).

Vários compostos possuem capacidade de sequestrar e inativar espécies reativas, tanto de oxigênio, quanto de nitrogênio para a prevenção do estresse oxidativo (DEY et al., 2016; TRIPATHI et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007). Antioxidantes são substâncias que retardam ou diminuem a velocidade da oxidação, sempre que presente em menor concentração quando comparada a substância oxidável de interesse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os principais mecanismos da ação dos antioxidantes ocorrem com a depleção de radicais livres e complexação de metais. Atuam contra a toxicidade dos radicais livres e manutenção da homeostase entre a produção e a eliminação desses compostos (CIFONE et al., 1995).

Os antioxidantes estão ligados ao sistema de defesa do organismo e classificam-se em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Já o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico e outros, ingeridos por alimentação regular ou via suplementação como ácido ascórbico, alfa-tocoferol, betacaroteno e grupos fenóis (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2009).

Os nutrientes antioxidantes diminuem a peroxidação lipídica (ABDEL-SALAM et al., 2017) e a oxidação das proteínas, inibem a produção de ERO, e previnem a disfunção mitocondrial e a fragmentação do DNA (RAY et al., 2012), reduzem a neurotoxicidade, a apoptose e a morte neuronal (GOVERDHAN; SRAVANTHI; MAMATHA, 2012). Eliminam diretamente os radicais livres ou aumentam indiretamente as defesas antioxidantes celulares endógenas, por

exemplo, favorece a ativação do fator nuclear do fator de transcrição derivado de eritrócitos 2 (KELSEY; WILKINS; LINSEMAN, 2015).

3.4.1 Estresse oxidativo e compostos fenólicos

Muitos antioxidantes derivados de produtos naturais demonstram atividade neuroprotetora em modelos *in vitro* e/ou *in vivo* como: compostos fenólicos do tipo flavonoides (KELSEY; WILKINS; LINSEMAN, 2015). Sua ação antioxidante está baseada na geração de um radical fenoxilo ou um complexo redox com um íon de metal de transição, os radicais de fenoxilo podem reagir com oxigênio para gerar O_2 , H_2O_2 e uma combinação complexa de semiquinonase quinonas (HODNICK et al., 1988). E também ao controle da peroxidação lipídica, dano de DNA e apoptose em células normais e cancerígenas, sequestrar radicais livres ou quelar íons metálicos envolvidos na sua produção (ZHENG et al., 2009).

A suplementação da dieta com curcumina (5 e 50 $mg.kg^{-1}$ do rato), um composto fenólico, inibe significativamente a peroxidação lipídica e protege as células do hipocampo contra a neurotoxicidade da homocisteína em ratos (ATAIE et al., 2016). Em outro estudo, avaliando a suplementação da dieta com o extrato da planta *Epimedium koreanum Nakai* (100 $mg.kg^{-1}$ do camundongo), especificamente as frações de flavonoides totais, demonstra proteção contra a morte dos neurônios dopaminérgicos, além de reverter expressões de proteínas, em camundongos induzidos a DP (WU et al., 2017).

3.5 MEMÓRIA

A memória não é um processo único e sua formação compreende em aquisição, consolidação e evocação de informações, processo fundamental do ser humano que determina quem somos, sem memória, apenas teríamos reflexos simples e comportamentos estereotipados (ABEL; LATTAL, 2001; ROBERTSON, 2002; SQUIRE, 2004).

A fase da aquisição, chamada de aprendizado ou aprendizagem, é onde primeiramente se expõe a experiência ou estímulo. A consolidação se trata do período em que o traço mnemônico deixa de ser lábil e passa a ser estável, fazendo

o processo de armazenado. A evocação, também chamada de recordação, lembrança ou recuperação, é o processo de avaliação da memória e o uso da informação consolidada (ABEL; LATTAL, 2001; IZQUIERDO et al., 2006).

Outra forma de classificar a memória é pela duração, dividida assim em curto prazo e em longo prazo (Figura 6). A estimulação de aprendizagem leva à memória de curto prazo, que duram algumas horas, faz referência a experiências recém-vividas e conhecimentos adquiridos há pouco tempo, com o seu armazenamento por um período limitado de tempo, e pode ser convertida em memória de longo prazo, através do processo de consolidação (ROBERTSON, 2002; VESELIS, 2015).

A memória ativa é formada pela recuperação e atualização da memória de longo prazo. Esta, atualizada, torna-se memória de longo prazo através de um processo de reconsolidação. A reconsolidação é um processo dependente da síntese proteica que é necessário para atualizar a memória reativada e para manter a memória de longo prazo (ROBERTSON, 2002; TAKASHIMA, 2012).

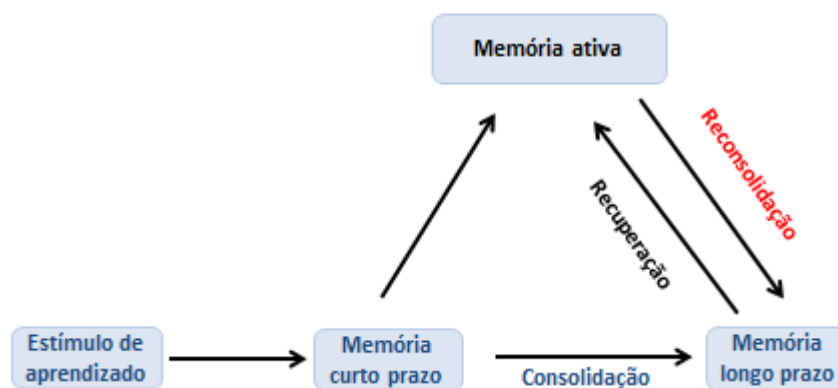


Figura 6- Mecanismo de formação e manutenção da memória
 Fonte: Adaptado de Takashima (2012)

A memória operacional, conhecida como memória de trabalho, constitui um tipo de memória de curto prazo, envolve o processamento de informações para realizar uma tarefa específica. Quando necessário, ela é evocada para ser usada em procedimentos que necessitem de competências motoras e intelectuais. Esse tipo de memória se desenvolve quando há um aprendizado operacional pela repetição de uma tarefa (CAMINA; GÜELL, 2017). O armazenamento tem capacidade limitada, e manipula a informação temporariamente, mas, pode ser consolidada em memória de longo prazo (ROBERTSON, 2002).

A memória de longo prazo é dividida em declarativa e não declarativa (Figura 7) (AMEEN-ALI; EASTON; EACOTT, 2015; SQUIRE, 2004). A declarativa, também conhecida como memória explícita, ocorre de maneira consciente, podendo ser verbalizada e é subdividida em duas categorias: episódica, memória para acontecimentos que ocorreram em nossa vida, como uma viagem ou uma festa; e semântica, de conhecimento geral, não ligada a um evento específico, mas sim ligada a conhecimentos de palavras e seu uso, objetos, conceitos e fatos (AMEEN-ALI; EASTON; EACOTT, 2015; ROBERTSON, 2002). As estruturas cerebrais envolvidas nesse tipo de memória incluem áreas do lobo temporal medial e do diencéfalo, sendo que suas funções estão comprometidas em indivíduos com amnésia e demências (SQUIRE, 2004).

Outra classificação é da memória não declarativa, conhecida como memória implícita, ocorre de maneira inconsciente, não podendo ser verbalizada. Nesta categoria está incluída a memória de procedimento, relacionada com hábitos, habilidades motoras e comportamentos, como andar de bicicleta ou dirigir um automóvel, mesmo que ele possa ter surgido de fatos inerentes ao indivíduo, depois de um tempo a ação torna-se quase automática (AMEEN-ALI; EASTON; EACOTT, 2015; SQUIRE, 2004; SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1988). Há diversas áreas neurais envolvidas na memória não declarativa, sendo o corpo estriado relacionado aos hábitos e habilidades, o neocórtex no aprendizado perceptivo, e a amígdala e o cerebelo nas respostas emocionais e esqueléticas, respectivamente (Figura 7).

Em geral, a memória declarativa é frequentemente formada, necessitando de poucas exposições ao aprendizado, mas instável, podendo ser esquecida, enquanto, a formação da memória não declarativa requer repetição e prática durante um período mais longo, embora costuma ser mais duradoura (PEIGNEUX et al., 2004; TENG; SQUIRE, 1999).

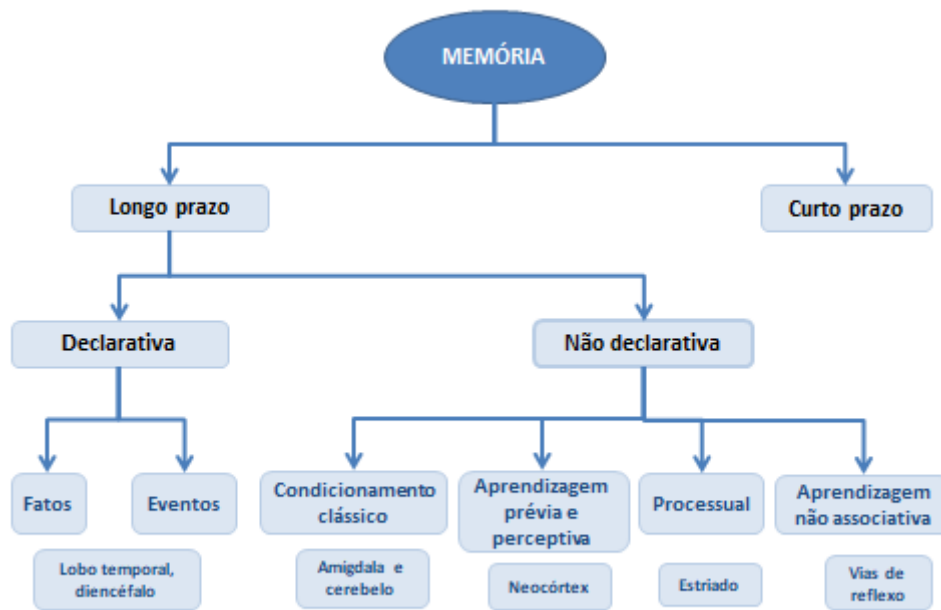


Figura 7- Classificação da memória

Fonte: Adaptado de Robertson (2002); Squire e Zola-Morgan (1988)

Diferentes regiões do cérebro participam da codificação, armazenamento e recuperação de experiências, eventos, fatos e habilidades particulares. Durante a recuperação de uma memória, várias áreas do cérebro são simultaneamente ativadas, o que resulta em uma memória unificada (ROBERTSON, 2002).

O córtex cerebral e o hipocampo são estruturas de grande importância para os processos de aprendizado e formação da memória (DEIANA; PLATT; RIEDEL, 2011; WARBURTON; BROWN, 2015). O córtex cerebral é a camada mais externa do cérebro dos vertebrados, sua divisão se dá em quatro áreas com funções diferenciadas e especializadas (CAMINA; GÜELL, 2017; HENSON; GAGNEPAIN, 2010). O hipocampo, identificado como área central para nossa capacidade de memória declarativa é formado por duas camadas de neurônios, dobradas uma sobre a outra, sendo uma chamada de giro denteado e a outra de corno de Amon (CORKIN, 1984; TONG; BI-XIAN; FENGLIAN, 1999).

Baixos níveis de neurotransmissor no hipocampo têm efeito no funcionamento cognitivo e amnésico, observado na DA (BARTUS, 2000), assim como uma elevação na sua transmissão tem efeito pró-mnésico (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). Dessa forma, a modulação por agonistas dos receptores de acetilcolina (ACh) tem impacto na aquisição e possivelmente na consolidação de características

do objeto em testes de memória de reconhecimento realizados em roedores (DERE; HUSTON; SOUZA, 2007).

3.6 DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA

A neurotransmissão colinérgica é amplamente conhecida por ser essencial para muitas formas de aprendizado e envolvem proteínas relacionadas na síntese, estocagem, transporte e degradação do neurotransmissor ACh (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). A síntese desse neurotransmissor ocorre no citoplasma dos neurônios colinérgicos, a partir de acetil-coenzima A e colina. À medida que o neurônio colinérgico é despolarizado, a ACh é liberada na fenda sináptica, por exocitose, ativando seus receptores. Esse neurotransmissor é rapidamente inativado pela acetilcolinesterase (AChE), enzima que está geralmente presente na membrana plasmática de neurônios da fenda sináptica (DEIANA et al., 2011). Os mecanismos de inativação dessa enzima são bem particulares, visto que cada AChE pode hidrolisar cerca de 5.000 moléculas de ACh por segundo. Isso faz com que ela seja uma das enzimas mais cineticamente eficientes (POTTER; MEEK; NEFF, 1983). A AChE é transcrita principalmente nos músculos e no cérebro, mas pode também ser expressa em células sanguíneas e epidermais (SEIDMAN et al., 1995).

A escopolamina (SCP) é uma droga anti-colinérgica, antagonista muscarínico, que induz a desregulação da atividade colinérgica e compromete o funcionamento da memória, resultando em déficits na aprendizagem, na aquisição da memória a curto prazo além da retenção de tarefas de memória espacial (DEIANA et al., 2011; EBERT et al., 1998; HARVEY; GORMEZANO, 1983). Receptores muscarínicos estão distribuídos em todo o organismo e, pressupõe que os subtipos M1 e M5 estão mais presentes no cérebro. Portanto, os efeitos centrais desse fármaco são mediados por esses dois subtipos (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010).

O prejuízo de aprendizado ocasionado pela administração de SCP é demonstrado em humanos (DEIANA et al., 2011), embora não seja um fármaco indicado, devido aos seus efeitos adversos, danos cognitivos reversíveis são observados conforme dose e tempo-dependente (EBERT et al., 1998; KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010). Em animais, é amplamente usada como

modelo farmacológico experimental de dano cognitivo (AIGNER; WALKER; MISHKIN, 1991; HARVEY; GORMEZANO, 1983; LEE et al., 2017). Em ratos, nota-se interferência nos déficits de desempenho no labirinto radial (BURESOVÁ; BOLHUIS; BURES, 1986), no labirinto aquático (WHISHAW, 1989), no labirinto em T elevado (DE-MELLO; CAROBREZ, 2002), no labirinto em cruz elevado (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004) e no reconhecimento de objetos (BELL; CUEVAS, 2012),

O dano causado por SCP desempenha papel importante na redução volume do hipocampo e está associado com DA (YAMADA et al., 2008). DA também está correlacionada com a perda de neurônios colinérgicos e diminuição dos níveis de ACh (FRANCIS et al., 1999; HUANG; MUCKE, 2013). As lesões resultam em diminuição da ACh e, assim, causa disfunção da aprendizagem e memória (MOHAPEL et al., 2005). A inibição da AChE é usada como estratégia para o tratamento de doenças neurodegenerativas como, DA e DP. As drogas aprovadas para a terapia da DA, proporcionam alívio sintomático, melhorando o funcionamento cognitivo e o aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro (HEINRICH; TEOH, 2004). No entanto, o número de medicamentos aprovados para o uso de tratamento de pacientes com deficiência de memória é limitada, devido aos seus efeitos colaterais, tais como dor, náuseas e vômitos (ANEKONDA; REDDY, 2005; FRANCIS et al., 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E REAGENTES

Todos os experimentos relatados neste estudo foram conduzidos de acordo com a legislação nacional e internacional, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e da Política de Atenção Humanitária e Uso de Animais de Laboratório do Serviço de Saúde Pública dos EUA (Política PHS). Camundongos machos Swiss (peso: 25-30 g) foram mantidos a temperatura ambiente constante (21 ± 1 °C) com livre acesso a água e alimentos sob um ciclo claro/escuro de 12:12 h (luzes acesas às 07:00 h). Testes comportamentais foram conduzidos durante a fase de luz do ciclo (das 9:00 às 17:00). A SCP foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e diluído em solução salina (0,9% NaCl).

4.2 REAGENTES E MATRIZ PARA O EXTRATO

Todos os reagentes utilizados apresentaram grau analítico. As amostras de quinoa branca e vermelha, de origem peruana, foram adquiridas em comércio local (Oeste - Paraná/Brasil) para a obtenção dos quatro extratos etanólicos. Os códigos de identificação das amostras estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Identificação das amostras de quinoa

Código	Coloração da semente	Processo de extração
WQ-S	Branca	Soxhlet (60 °C)
WQ-SRT	Branca	Agitação com temperatura ambiente
RQ-S	Vermelha	Soxhlet (60 °C)
RQ-SRT	Vermelha	Agitação com temperatura ambiente

Fonte: Autoria própria (2017)

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS SEMENTES DE QUINOA

As amostras foram preparadas previamente por processo de trituração, em liquidificador (tipo doméstico da marca Philips), para obtenção da quinoa moída. As amostras moídas de quinoa branca (WQ) e vermelha (RQ) foram submetidas às extrações utilizando duas metodologias, soxhlet (60 °C) e agitação a temperatura ambiente de 24°C (SRT). O esquema do processo de obtenção e análise química dos extratos está apresentado na Figura 8.

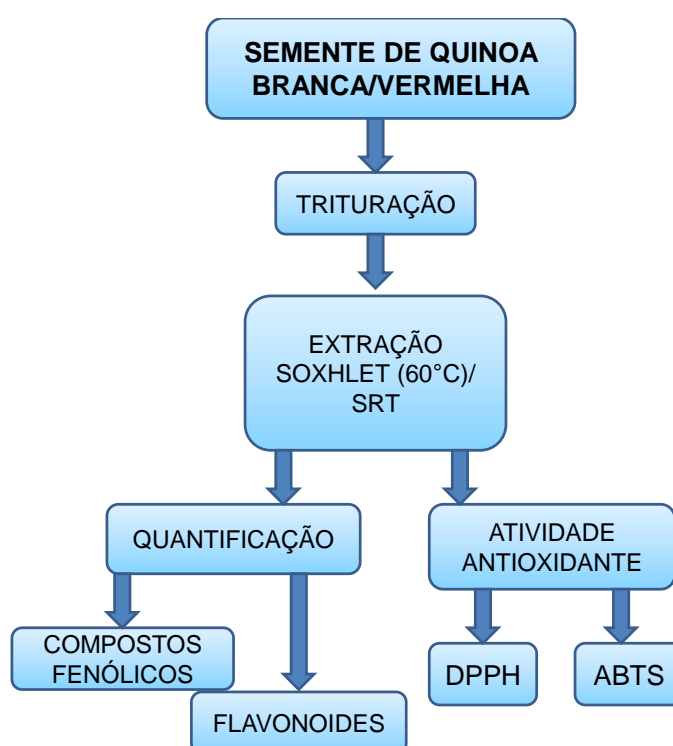


Figura 8- Fluxograma dos processos e análises realizadas durante o trabalho de extração da semente de quinoa

Fonte: Autoria própria (2017)

4.3.1 Extração com soxhlet

A extração por soxhlet (Figura 9) foi realizada baseada na metodologia de Nsimba, Kikuzaki e Konish (2008), com algumas adaptações. As amostras foram pesadas (140,2 g WQ e 140,4 g RQ), e submetidas ao processo de extração. Utilizando primeiramente solvente apolar (600 mL de hexano por 2 horas, à temperatura de 60 °C), após este período, a amostra foi extraída com solvente polar

(600mL de etanol por 3 horas à temperatura de 60°C). Em seguida, o extrato etanólico de ambas as amostras foram rotaevaporados com temperatura controlada até a completa remoção do solvente. Os extratos etanólicos foram armazenados sob refrigeração até a realização das análises posteriores.



Figura 9- Extração da semente de quinoa por soxhlet
Fonte: Autoria própria (2017)

4.3.2 Extração com agitação

A extração com agitação (24 °C) (Figura 10) foi realizada baseada na metodologia de Nsimba e Konish (2008) com algumas adaptações. As amostras foram pesadas (140,2 g WQ e 140,4 g RQ), e submetidas ao processo de extração. Utilizando primeiramente solvente apolar (600 mL de hexano por 2 horas sob agitação constante em *shaker* a 300 rpm), após este período a mistura foi filtrada, separando o extrato hexânico da amostra. A amostra foi submetida novamente a extração com solvente polar (600 mL de etanol por 3 horas sob agitação em *shaker* a 300 rpm).

Em seguida, os extratos etanólicos de ambas as amostras foram rotaevaporados com temperatura controlada até a completa retirada do solvente. Os extratos etanólicos armazenados sob refrigeração até a realização das análises posteriores.



Figura 10- Extração da semente de quinoa por agitação
Fonte: Autoria própria (2017)

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

4.4.1 Compostos fenólicos totais

A quantificação dos CFT dos extratos etanólicos da quinoa branca e vermelha foi realizada baseada na metodologia de Nsimba, Kikuzaki e Konishi (2008), com algumas adaptações. Uma alíquota de 0,5 mL das amostras previamente diluídas em etanol foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10 g.L⁻¹. Após reagir por 5 minutos, foram adicionados 2,0 mL de Na₂CO₃ 40 g.L⁻¹. As soluções foram mantidas em local escuro, à temperatura ambiente por 60 min e em seguida foi medida a absorvância em 760nm. Para o branco utilizou-se etanol.

O conteúdo de CFT foi quantificado por comparação com a curva de calibração, sendo o ácido gálico o padrão utilizado, e os resultados expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama da amostra dos extratos (mg EAG.g⁻¹). A curva padrão analítica foi construída nas concentrações de 5 a 100 mg.L⁻¹ de ácido gálico. Todas as leituras foram realizadas em triplicatas.

4.4.2 Flavonoides totais

Os flavonoides totais (FT) dos extratos etanólicos da quinoa branca e vermelha foram quantificados por ensaio colorimétrico com metodologia adaptada de Tang e colaboradores (2015), Carciochi e Manrique (2015). Em alíquota de 0,25 mL da solução padrão quercetina (20, 40, 60, 80, 100 e 120 mg.L⁻¹) adicionou-se 2 mL de H₂O destilada e 0,15 mL de NaNO₂ (5%) e aguardou-se por 5 min. Após, adicionou-se 0,15 mL de uma solução aquosa de AlCl₃ (10%) e deixou-se reagir por 6 min, em seguida adicionou-se 1 mL de NaOH 1M à mistura com 1,2 mL de água destilada e agitou-se manualmente. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 510 nm. Para o branco utilizou-se água. Para a quantificação das amostras foi preparada a curva padrão analítica com quercetina como padrão de referência. As quantificações dos FT, dos extratos, foram expressos como mg equivalentes de quercetina (mg EQ.g⁻¹) da amostra dos extratos.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Método DPPH

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos foi determinada por redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), baseado no método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Nsimba, Kikuzaki e Konishi (2008) com algumas adaptações. Uma alíquota de 0,5 mL das amostras, previamente diluídas em etanol, foi adicionado com 0,3 mL da solução do radical DPPH, depois agitou-se manualmente e deixou-se reagir por 45 minutos ao abrigo da luz. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 517 nm. Para o branco utilizou-se etanol. Para a quantificação das amostras foi preparada uma curva padrão analítica com o

antioxidante sintético Trolox como padrão de referência, nas concentrações 15 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μmol de Trolox por grama da amostra do extrato ($\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$).

4.5.2 Método de captura do radical livre ABTS

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos foi determinada pelo método ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], segundo metodologia descrita por Granato e Nunes (2017) com algumas modificações. O radical ABTS é formado pela reação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25 °C e no escuro, durante 12 – 16h. Uma vez formado o radical, foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorvância de $0,700 \pm 0,200$ a 734 nm. Um volume de 3,0 mL da solução de radical ABTS^{•+} foi acrescentado a 30 μL de cada diluição das amostras. Realizaram-se as leituras das absorvâncias após seis minutos de reação em espectrofotômetro a 734 nm. Para o branco utilizou-se etanol. Para a quantificação das amostras foi preparada uma curva padrão analítica com o antioxidante sintético Trolox como padrão de referência, nas concentrações 15 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μmol de Trolox por grama da amostra do extrato ($\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$).

4.5.3 Identificação de compostos presentes no extrato etanólico RQ-S por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A identificação dos compostos do extrato RQ-S foi baseado na metodologia de Vieira e colaboradores (2001) com pequenas modificações. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM) correspondeu a um Shimadzu Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um Auto-Sampler (SIL-20AHT), duas bombas alternativas Shimadzu LC-20ADT conectadas ao degaseificador DGU20A3R, integrador CBM20A, detector UV-VIS DAD SPD-M20A, e forno CTO-20A. O sistema de CLAE foi acoplado ao analisador de massa compacto de tempo de voo quadrupolo (Q-TOF) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), que foi controlado usando o software OtofControl. Os parâmetros para análise foram ajustados usando modos iônicos

negativos com espectros adquiridos em uma ampla faixa de 50 a 1.200 m/z. Os valores ótimos dos parâmetros ESI-MS foram tensão capilar de 4500 V, temperatura do gás de secagem de 215 °C, fluxo de gás de secagem de 10,0 L/min, pressão de nebulização de 5,0 Bar, RF de colisão de 150 Vpp, tempo de transferência de 70 ls e um armazenamento pré-pulso de 5 ls. Adicionalmente, experimentos automáticos de MS/MS foram realizadas utilizando gás de colisão e ajustando os valores de energia de colisão como se segue: m/z 100, 20 e V; m/z 500, 30 e V; e m/z 1000, 35 e V. Os dados de MS foram analisados usando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas na coluna C-18 (4,6 mm x 250 mm, Merck, Alemanha) envolvendo partículas de 5 µm de diâmetro e na pr-coluna C-18 (RP 18 5, Merck, Alemanha). A primeira fase móvel, fase A, foi de dois por cento de ácido acético a um pH de 4,2. A segunda fase móvel, fase B, utilizou metanol, ácido acético e água destilada na proporção de 18:1:1, respectivamente. O gradiente de diluição foi de 0 min: 20 % de B, 0-25 min: 50% de B, 25 min: 20 % de B, 30 min: 20 % de B (fim da corrida), taxa de fluxo de 0,8 ml/min. Os picos foram identificados comparando os presentes resultados com os tempos de retenção e espectros de massa da biblioteca de software e padrões externos. Os padrões externos incluíram 40 % de isoflavonas (Daidzin: 3,1%, Glycitin: 1,56%, Genistin: 0,98 %, Daidzein: 35,49 %, Glycitein: 0,1% e Genistein: 0,03 % - Dongming Hui ren Biological Products, Shandong, China). Entre 0,156 e 2,34 mg/mL de glicitina, 3,5-53,2 mg/mL de daidzeína, 3 a 4,5 µg/mL de genisteína e níveis de ácido caféico, ácido gálico, ácido clorogênico, catequina, luteolina, cumarina, quercetina e rutina (todos os padrões da Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) entre 1,5 e 24 µg/mL. Todas as amostras e os padrões foram testados em triplicata.

4.6 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A tarefa, realizada em uma caixa de madeira (60 x 40 x 30 cm), consiste de três fases distintas, habituação, treino e teste. Na sessão de habituação, com duração de 10 minutos, os animais foram permitidos explorar a caixa livremente. Nesta sessão foram contados o número de cruzamentos (*crossing*) e as respostas de levantar (*rearing*), para avaliação da atividade locomotora e exploratória dos

animais. Para esta avaliação a caixa de madeira teve o assoalho marcado, dividindo a mesma em 12 áreas iguais. Na sessão de treino, realizada 24 horas após a habituação, o animal foi apresentado, durante 10 minutos, a dois objetos idênticos. Na sessão de teste, realizada 24 horas após o treino, um dos objetos foi substituído por um novo. Durante ambas as sessões (treino e teste), foram determinados os tempos de exploração do animal com os objetos, sendo considerado exploração quando o animal ficava com o focinho até 0,5 cm do objeto. O índice de discriminação foi então calculado, pela diferença do tempo gasto para explorar o objeto novo (B) e o objeto familiar (A) x 100 dividido pela soma do tempo gasto para explorar o objeto novo (B) e o familiar (A), e usado como um parâmetro cognitivo $\{[T \text{ novo (B)} - T \text{ familiar (A)}] / [T \text{ novo (B)} + T \text{ familiar (A)}] \times 100\}$.

4.7 DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

4.7.1 Preparação dos tecidos

Imediatamente após a sessão de teste da tarefa de reconhecimento de objetos, os animais foram eutanasiados, o hipocampo e córtex cerebral foram removidos, pesados, e homogeneizados em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). O homogenato resultante foi então centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C para a determinação dos indicadores enzimáticos e não enzimáticos do estresse oxidativo. O teor de proteína foi medido colorimetricamente utilizando o método de Bradford (1976), e a albumina de soro bovino foi utilizada (1 mg/mL) como padrão.

4.7.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por Misra e Fridovich (1972). Este método baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação da adrenalina em adrenocromo. Resumidamente, a fração do sobrenadante (20-60 µl) foi adicionada a um meio contendo tampão de glicina (50 mM; pH 11) e adrenalina (1 mM). A análise cinética da SOD foi iniciada após a adição de adrenalina, a 38 °C, e a reação de cor foi medida a 480 nm. Uma unidade

de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a velocidade de auto-oxidação da epinefrina em 50% a 38 °C, e os resultados foram expressos em unidades (U) SOD/mg de proteína.

4.7.3 Atividade de catalase (CAT)

A atividade de CAT foi analisada por espectrofotômetro pelo método proposto por Aebi, (1984), que envolve o monitoramento do desaparecimento de H_2O_2 na presença de sobrenadante a 240 nm. A reação enzimática foi iniciada adicionando o sobrenadante e o substrato H_2O_2 (0,3 mM) num meio contendo tampão, fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para monitorar o desaparecimento de H_2O_2 . A atividade enzimática foi expressa em Unidades (U)/mg de proteína (1U decompõe 1 μ mol H_2O_2 /min em pH 7 a 25 °C).

4.7.4 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi estimada pela medição de TBARS e foi expressa em termos de conteúdo de malondialdeído (MDA), de acordo com o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Neste método, o MDA, um produto final da peroxidação dos ácidos graxos, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo corado. O conteúdo de TBARS foi medido em um meio contendo 100 μ l do homogenato de tecido do hipocampo ou do córtex cerebral, 15 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 60 μ L de tampão de ácido acético (2,5 M, pH 3,4), e 115 μ L de TBA 0,81%. A mistura foi aquecida a 95 °C durante 120 minutos em banho-maria. Após o resfriamento até temperatura ambiente, a absorbância foi medida no sobrenadante a 532 nm. Os resultados foram calculados como μ mol de MDA/mg de proteína.

4.7.5 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi medida pelo método descrito por Ellman e colaboradores (1961), utilizando o iodeto de acetiltiocolina como substrato em homogenatos do hipocampo e córtex. Cada amostra foi realizada em triplicata. A

taxa de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina foi medida a 412 nm através da libertação de compostos tiol, que reagiram com o ácido 5,5-ditiobis- (2-nitrobenzóico) (DTNB), produzindo o produto colorido ácido tionitrobenzóico.

4.8 DESENHO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Efeito do extrato do RQ-S no desempenho da tarefa de reconhecimento de objetos

Uma curva dose-resposta para o extrato RQ-S foi realizada para avaliar o efeito no desempenho da tarefa de reconhecimento de objetos e para definir a dose para os experimentos subsequentes. Os camundongos foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos que receberam extrato RQ-S (30, 100 e 300 mg/kg) ou salina (10 mL/kg) por gavagem oral, uma vez ao dia durante 7 dias. Uma hora após a última administração, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos (dias 7, 8 e 9). A dose de 100mg/kg de RQ-S foi selecionado com base no estudo para mensuração da atividade antioxidante e dos CFT e no teor de FT *in vitro*.

Experimento 2: Efeito do extrato RQ-S sobre o déficit de memória e indicadores de estresse oxidativo induzidos pela administração de SCP

Uma vez determinado que o extrato de RQ-S na dose de 100 mg/kg não alterou a memória, testamos se essa dose de extrato poderia evitar os déficits de memória induzidos pela administração de SCP. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos que receberam extrato de RQ-S (100 mg/kg) ou solução salina (NaCl a 0,9%, 10 mL / kg) por cavagem oral, uma vez ao dia durante 7 dias. Uma hora após a última administração, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto (dias 7, 8 e 9). No dia 8, cada grupo foi novamente aleatoriamente dividido em dois grupos que receberam SCP (1 mg/kg) ou solução salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg) por administração intraperitoneal, 30 minutos antes da sessão de treino. Após o teste comportamental, o hipocampo e o córtex cerebral foram removidos para a determinação da atividade da AChE e indicadores de estresse oxidativo (SOD, CAT e TBARS). A faixa de dose e o tempo de administração foram selecionados com base em estudos anteriores que mostram

que a administração de SCP (1 mg/kg) causa déficit de memória (SINGH et al., 2016).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa GraphPad Prism 7 foi utilizado para a análise estatística e para a plotagem dos gráficos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, seguida de análise *post hoc* de Bonferroni's, dependendo do experimento. O valor de p, foi usado para mostrar a correlação e sua significância. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados expressos são as médias das triplicatas e desvio padrão ou erro padrão.

5 RESULTADOS

5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - *IN VITRO*

A Tabela 3 mostra o conteúdo de TPC (mg GAE.g⁻¹), TF (mg QE.g⁻¹) e atividade antioxidante de DPPH e ABTS (μmol Trolox.g⁻¹) de extratos etanólicos de quinoa. A análise estatística (ANOVA de uma via) mostrou diferença significativa no teor de TPC entre os extratos etanólicos de quinoa avaliados [F (3,8) = 280,7; p <0,05]. Comparações *post hoc* demonstraram que: o extrato RQ-S apresentou o maior teor de TPC quando comparado aos demais extratos (26,07 ± 0,70). O WQ-SRT apresentou o menor teor de TPC quando comparado aos demais extratos (8,10 ± 0,96) e não houve diferença significativa no conteúdo de TPC para os extratos WQ-S e RQ-SRT (21,20 ± 0,11 e 22,29 ± 1,09, respectivamente).

A análise estatística (ANOVA de uma via) mostrou diferença significativa no conteúdo de TF entre os extratos etanólicos de quinoa avaliados [F (3,8) = 273,4; p <0,05]. Comparações *post hoc* demonstraram que: os extratos WQ-S, RQ-S e RQ-SRT não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si (89,10 ± 6,09, 93,80 ± 0,43 e 85,72 ± 5,25 respectivamente) e o extrato WQ-SRT apresentou o menor teor de TF quando comparado aos demais extratos (12,43 ± 0,87).

Entre os extratos etanólicos de quinoa avaliados pelo DPPH [F (3,8) = 657; p <0,05] a análise estatística (ANOVA de uma via) mostrou diferença significativa. Comparações *post hoc* demonstraram que: houve diferença significativa para a atividade antioxidante entre todos os extratos analisados. O RQ-S apresentou a maior atividade antioxidante quando comparado aos demais extratos (18,49 ± 0,80) e o WQ-SRT apresentou a menor atividade antioxidante quando comparado aos demais extratos (4,60 ± 0,11).

Não houve diferença significativa, conforme análise estatística (ANOVA de uma via) entre os extratos etanólicos de quinoa avaliados pelo ABTS. Embora a atividade antioxidante variou de 102,81 ± 9,38 a 134,79 ± 18,55, para WQ-SRT e RQ-S, respectivamente.

Tabela 3: Compostos fenólicos, teor de flavonóides e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) de extratos etanólicos de quinoa.

Extrato de Quinoa	TPC mg GAE.g ⁻¹	TF mg QE.g ⁻¹	DPPH μmol Trolox.g ⁻¹	ABTS μmol Trolox.g ⁻¹
WQ-S	21.20 ± 0.11 ^a	89.10 ± 6.09 ^a	14.58 ± 0.11 ^a	115.27 ± 11.12 ^a
RQ-S	26.07 ± 0.70 ^b	93.80 ± 0.43 ^a	18.49 ± 0.80 ^b	134.79 ± 18.55 ^a
WQ-SRT	8.10 ± 0.96 ^c	122.43 ± 0.87 ^b	4.60 ± 0.11 ^c	102.81 ± 9.38 ^a
RQ-SRT	22.29 ± 1.09 ^a	85.72 ± 5.25 ^a	8.00 ± 0.23 ^d	123.48 ± 11.11 ^a

Os dados são as médias ± SEM. Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p <0,05). Compostos fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TF), atividade antioxidante pelo DPPH e ABTS.

Fonte: Autoria própria (2017)

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC

A análise HPLC-DAD-MS do extrato RQ-S foi realizada para confirmar os resultados obtidos por métodos colorimétricos e para identificar os compostos fenólicos no extrato. A análise por HPLC detectou e confirmou a presença de oito compostos fenólicos que correspondiam a ácidos fenólicos e flavonóides (Tabela 4).

Tabela 4: Metabólitos identificados no extrato de quinoa etanólico por HPCL-DAD-MS.

Amostra	RQ-S
Tempo de retenção (minutos)	Metabólitos
2.5 - 3.4	Lactulose
4.6 - 5.6	Ácido gentísico
4.9 - 6.0	Ácido L-Alpha-hidroxi isovalérico
8.0 - 8.9	Ácido 3-Hidroxibenzóico
10.2 - 11.2	Ácido p-Coumárico
11.2 - 12.4	Metil-b-D-galactopiranósido
14.4 - 15.4	Ácido 3-(3,4-Dihidroxifenil)propiónico
19.3 - 20.5	Hesperidina

Fonte: Autoria própria (2018)

5.3 DESENHO EXPERIMENTAL 1

A Figura 11B mostra o efeito da administração oral do extrato RQ-S (30, 100 e 300 mg/kg) por 7 dias, no índice de discriminação na sessão de teste da tarefa de reconhecimento de objetos. A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que o

extrato RQ-S, na dose de 300 mg/kg, aumentou significativamente o índice de discriminação [$F(3,28) = 3,73$; $p < 0,05$], revelando que a administração de extração de RQ-S melhorou a memória na tarefa de reconhecimento de objetos. Não houve diferença significativa entre os grupos para o tempo gasto explorando os dois objetos na sessão de treinamento, indicando, assim, nenhuma exploração tendenciosa de objetos (dados não mostrados).

Tabela 5: Efeito da administração do extrato RQ-S (30, 100, 300 mg/kg) por 7 dias no teste de comportamento exploratório de animais (*crossing* e *rearing* respostas) durante a sessão de habituação da tarefa de reconhecimento de objeto.

Grupo	<i>Crossing</i>	<i>Rearing</i>	N
Salina	51.0 ± 5.21	11.5 ± 1.21	8
RQ-S 30 mg/kg	43.5 ± 3.07	11.5 ± 1.82	8
RQ-S 100 mg/kg	47.5 ± 7.15	10.5 ± 0.92	8
RQ-S 300 mg/kg	39.0 ± 7.32	11.0 ± 2.01	8
Análise estatística	$F_{(3,28)} = 0.057, p > 0.981$	$F_{(3,28)} = 0.474, p > 0.702$	

Dados são as médias ± SEM; N, número de animais em cada grupo.

Fonte: Autoria própria (2018)

A Tabela 5 mostra o efeito do extrato RQ-S no comportamento exploratório de camundongos, durante a sessão de habituação na tarefa de reconhecimento de objetos. A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que o extrato RQ-S não alterou o número de respostas cruzadas ou de criação (valores F mostrados na Tabela 5), sugerindo que sua administração não causou incapacidade motora durante as sessões de treinamento e testes. A dose de extracto de RQ-S utilizada nas experiências subsequentes (100 mg/kg) foi selecionada com base na ausência de efeito na memória mostrada nesta experiência.

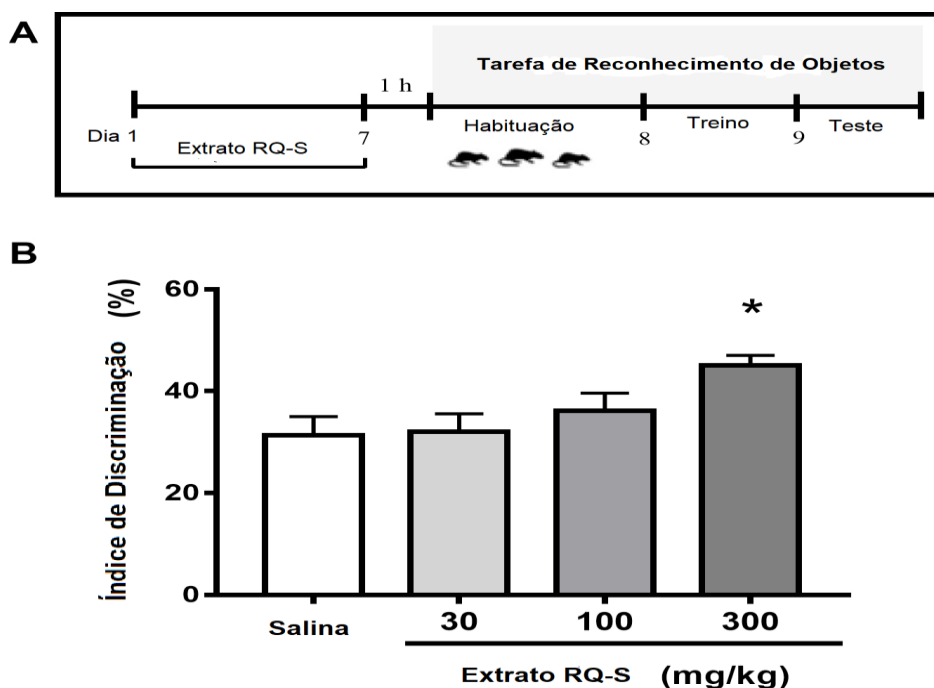


Figura 11- A) Representação esquemática do protocolo experimental para curva dose-resposta do extrato RQ-S. B) Administração do extrato RQ-S (30, 100 e 300 mg/kg) por 7 dias no índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objetos. Os dados são as médias \pm EPM, para $n = 8$ animais em cada grupo. *Indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).

Fonte: Autoria própria (2018)

5.4 DESENHO EXPERIMENTAL 2

As Figuras 12B, 13 e 14 mostram o efeito da administração oral de extrato de RQ-S (100 mg/kg), SCP (1 mg/kg), e a coadministração de extrato de SCP e RQ-S no índice de discriminação na sessão de teste da tarefa de reconhecimento de objetos, indicadores de estresse oxidativo (SOD, CAT e TBARS) e atividade de AChE no hipocampo e no córtex cerebral. A análise estatística (ANOVA de duas vias) revelou efeito significativo para o extrato RQ-S ou solução salina versus interação SCP ou salina [$F(1,28) = 6,32$; $p < 0,05$] no índice de discriminação. Comparações *post hoc* demonstraram que a co-administração do extrato RQ-S evitou o déficit de indução de SCP na tarefa de reconhecimento de objetos (Fig. 12B).

Não houve diferença significativa entre os grupos para o tempo gasto explorando os dois objetos na sessão de treinamento, indicando que não há exploração tendenciosa de objetos (dados não mostrados). A análise estatística também revelou efeito significativo para o extrato RQ-S ou solução salina versus

interação SCP ou salina nos indicadores de estresse oxidativo: SOD [F (1,16) = 13,75; $p < 0,05$], CAT [F (1,16) = 7,01; $p < 0,05$] e TBARS [F (1,16) = 5,24; $p < 0,05$] no hipocampo e SOD [F (1,16) = 8,72; $p < 0,05$], no córtex cerebral. Comparações *post hoc* demonstraram que a co-administração de extrato de RQ-S preveniu a alteração dos indicadores de estresse oxidativo induzidos por SCP no hipocampo (SOD, CAT e TBARS; Fig. 13A-C) e parcialmente no córtex cerebral (SOD; Fig. 13D).

O extrato de RQ-S não preveniu a alteração de CAT e TBARS induzida por SCP no córtex cerebral (Fig. 13 E e F). A ANOVA de duas vias mostra o efeito significativo para o extrato RQ-S ou solução salina versus interação SCP ou salina na atividade da AChE no hipocampo [F (1,16) = 9,04; $p < 0,05$] e córtex cerebral [F (1,16) = 21,04; $p < 0,05$]. Comparações *post hoc* demonstraram que a co-administração do extrato RQ-S preveniu o aumento da atividade da AChE induzida por SCP no hipocampo (Fig. 14A) e no córtex cerebral (Fig. 14B).

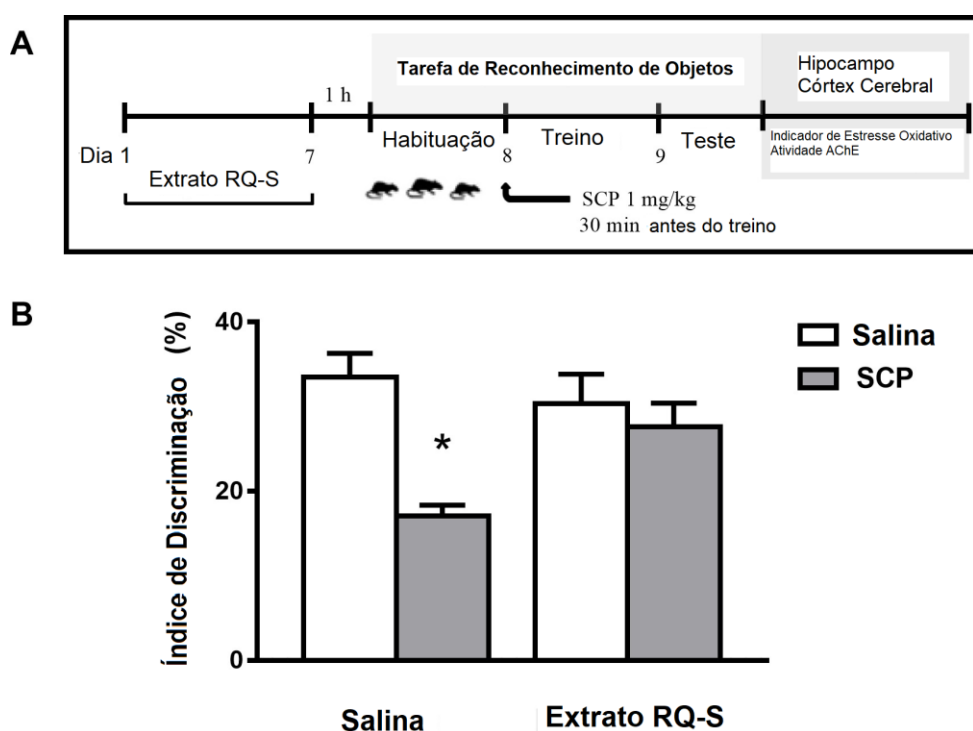


Figura 12- A) Representação esquemática do protocolo experimental para administração do extrato RQ-S e escopolamina (SCP). B) Administração de extrato RQ-S (100 mg/kg), PCS (1 mg/kg) e a coadministração de extrato de SCP e RQ-S no índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objetos. Os dados são as médias \pm SEM, com $n = 8$ animais em cada grupo. * Indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).

Fonte: Autoria própria (2018)

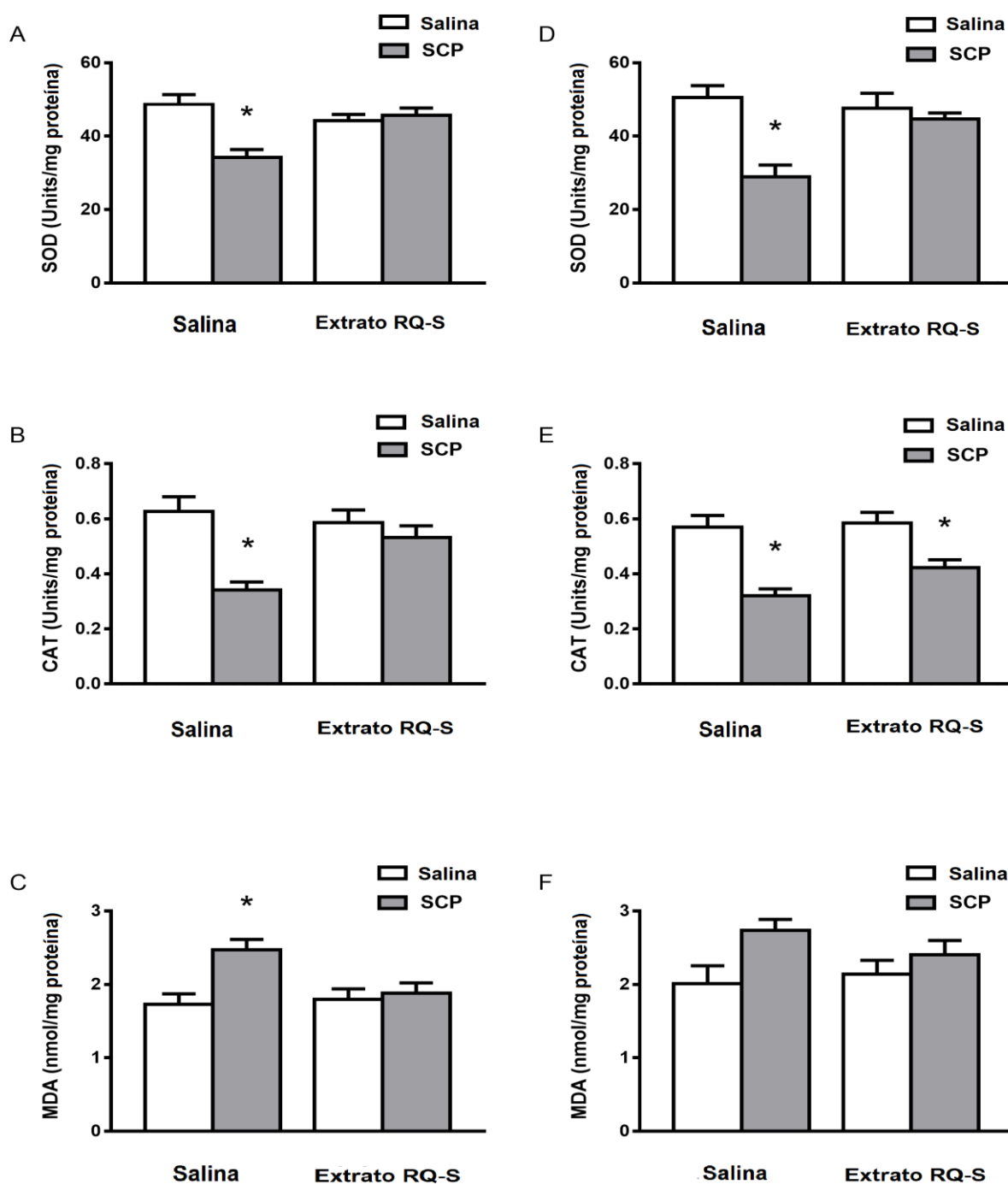


Figura 13- Administração de extrato RQ-S (100 mg/kg), escopolamina (SCP - 1 mg/kg) e a co-administração de extrato de SCP e RQ-S em indicadores de estresse oxidativo A) Superóxido Dismutase, B) Catalase e C) Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico no hipocampo e D) Superóxido Dismutase, E) Catalase e F) Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico no córtex cerebral de camundongos. Os dados são as médias \pm EPM, para $n = 5$ animais em cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).

Fonte: Autoria própria (2018)

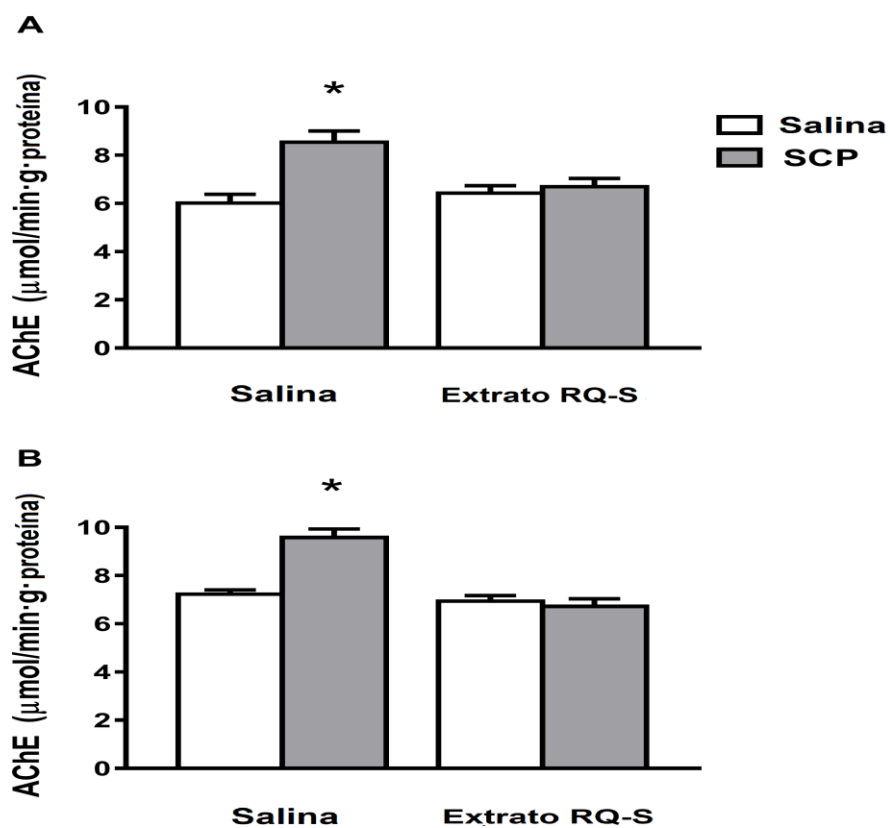


Figura 14- Administração de extrato RQ-S (100 mg/kg), escopolamina (SCP - 1 mg/kg) e a coadministração de extrato de SCP e RQ-S na atividade da AChE no hipocampo A) hipocampo B) córtex cerebral de camundongos. Os dados são as médias \pm EPM, para $n = 5$ animais em cada grupo. *Indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (solução salina/solução salina).

Fonte: Autoria própria (2018)

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, os modelos de triagem *in vitro* foram realizados para avaliar o teor de TFC e TF e a atividade antioxidante de quatro extratos etanólicos de quinoa com coloração branca e vermelha, obtidos por dois diferentes métodos de extração. Alguns estudos mostraram a influência do método de extração e do tipo de semente de quinoa no conteúdo de TFC e TF e na atividade antioxidante (NSIMBA; KIKUZAKI; KONISHI, 2008; PALOMBINI, et al., 2013; CARCIOCHI; MANRIQUE, 2015; TANG et al., 2015; ABDERRAHIM et al., 2015).

O extrato de quinoa vermelha obtido pelo método soxhlet (RQ-S) apresentou os maiores teores de TFC e TF e atividade antioxidante do que os outros extratos de quinoa (Tabela 3) e foi testado quanto ao potencial neuroprotetor em um modelo *in vivo*. O extrato RQ-S mostrou melhorar a memória (Fig. 11), mas especificamente este extrato impediu o déficit de memória induzido por SCP na tarefa de reconhecimento de objetos (Fig. 12). Além disso, os resultados mostraram que a administração de SCP altera a atividade da AChE e indicadores de estresse oxidativo, como SOD, CAT e TBARS no hipocampo e no córtex cerebral e essas alterações foram restauradas pelo tratamento oral do extrato RQ-S (100 mg/kg durante 7 dias - Fig. 13 e 14).

Evidências mostraram que a disfunção colinérgica e o estresse oxidativo estão intimamente associados ao comprometimento cognitivo que ocorre nos distúrbios relacionados à idade, como as doenças neurodegenerativas (AULD et al., 2015; SUGANTHY; MALAR; DEVI, 2016).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor diretamente envolvido no processo de aprendizagem e memória (DRACHMAN; LEAVITT, 1974). Na fenda sináptica, a ACh é rapidamente hidrolisada para ação pela enzima AChE, levando à terminação da neurotransmissão colinérgica (FRANCIS et al., 1999). A disfunção do sistema colinérgico reduz os níveis de ACh no hipocampo e no córtex, levando a déficits de memória (GU et al., 2016). Nesse sentido, a administração aguda de SCP, um antagonista colinérgico, tem sido amplamente utilizada para induzir déficits de memória considerados característicos da disfunção colinérgica na doença neurodegenerativa (DEIANA et al., 2009; TOTA et al., 2012). A atividade da AChE no hipocampo e no córtex cerebral é aumentada pela administração intraperitoneal

de SCP e tem sido usada como modelo experimental e testes para encontrar tratamento de doenças neurodegenerativas (AIGNER; WALKER; MISHKIN, 1991; KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010). O aumento do nível de ACh pela inibição da AChE é uma estratégia de tratamento para a doença de Alzheimer (KAMKWALALA; NEWHOUSE, 2017).

Além disso, foi relatado que os déficits de memória induzidos por SCP estão associados ao aumento do estresse oxidativo (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010; GOVERDHAN; SRAVANTHI; MAMATHA, 2012; HAIDER; TABASSUM; PERVEEN, 2016). Em estudo, Tung e colaboradores (2017), demonstraram um aumento significativo do estresse oxidativo evidenciado por diminuições nas atividades de SOD e GPx, bem como melhora o conteúdo de MDA. Portanto, extrato rico em compostos bioativos com atividade inibitória e antioxidante da AChE tem sido uma estratégia para prevenir déficits de memória causados por danos neurodegenerativos.

Os resultados revelados em nosso estudo não apenas mostram relatos prévios de que a SCP causou déficits de memória na tarefa de reconhecimento de objetos (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010), mas mostram que a administração de extrato com maior potencial antioxidante *in vitro* (RQ-S) preveniu déficits de memória induzidos pela SCP, indicando que o extrato de quinoa avaliado possui efeito anti-amnésico. Além disso, demonstramos que a administração de SCP aumentou a atividade da AChE e os níveis de TBARS, bem como diminuiu as atividades antioxidantes das enzimas SOD e CAT no hipocampo e córtex cerebral, sugerindo disfunção colinérgica e desequilíbrio antioxidante, que pode ser responsável pelo comprometimento da memória.

Curiosamente, a co-administração com extrato RQ-S foi capaz de restaurar as atividades de AChE, SOD e CAT e os níveis de TBARS no hipocampo e a atividade da SOD no córtex cerebral. No entanto, não teve efeito sobre a redução da atividade da CAT e aumento dos níveis de TBARS no córtex cerebral. É importante enfatizar que a maioria dos efeitos do extrato de RQ-S ocorreu no hipocampo, uma região do cérebro com alto grau de plasticidade e criticamente envolvida nas funções da memória (EICHENBAUM, 2000; GAO et al., 2016).

Nesse sentido, estudos relataram melhora da memória através do combate ao estresse oxidativo no hipocampo (EDUVIERE et al., 2015; ZHAO et al., 2015). As descobertas do presente estudo sugerem que o sistema dopaminérgico e a

restauração de defesas antioxidantes alcançadas pelo tratamento com extrato RQ-S podem mediar a melhora da memória e esse efeito envolve principalmente o hipocampo.

A análise de HPCL-DAD-MS do extrato RQ-S mostrou a presença de ácidos fenólicos e flavonóides como a hesperidina e o ácido p-cumárico (Tabela 4). Podemos, assim, sugerir que o efeito do extrato RQ-S sobre os indicadores de estresse oxidativo, atividade da AChE e memória pode ser devido à presença desses compostos bioativos. Estudos anteriores indicam que compostos bioativos como hesperidina e ácido p-cumárico têm ações antioxidantes potentes, forte efeito inibitório da AChE e melhoram significativamente os déficits de memória (ANTUNES et al., 2016; NATARAJ et al., 2016).

7 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

As análises *in vitro* reforçam que o extrato etanólico da quinoa vermelha possuem quantidades significantes de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e estes podem ser responsáveis pelo seu efeito antioxidante observado pelo método de DPPH.

O extrato RQ-S contém ácidos fenólicos e flavonoides, como hesperidina e o ácido p-cumárico, confirmado por análise de CLAE, e podem ser atribuídos a eles o possível efeito antioxidante sobre os indicadores de estresse oxidativo, atividade da AChE e memória.

A administração de SCP (1mg/kg) aumentou a atividade da AChE e os níveis de TBARS, bem como diminuiu as atividades das enzimas SOD e CAT no hipocampo e no córtex cerebral, sugerindo disfunção colinérgica e desequilíbrio antioxidante, que pode ser responsável pelo comprometimento da memória.

A administração de RQ-S (100 mg/kg) preveniu a alteração dos indicadores de estresse oxidativo induzido por SCP no hipocampo (SOD, CAT e TBARS) e, no córtex cerebral, preveniu parcialmente (SOD), não prevenindo a alteração de CAT e TBARS. O extrato RQ-S impediu também o aumento da atividade da AChE induzida por SCP no hipocampo e no córtex cerebral, conforme representado na Figura 15.

Assim, baseado nos resultados obtidos, o RQ-S pode ser considerado como alvo para o desenvolvimento de drogas capazes de prevenir déficits de memória, permitindo a identificação de estratégias farmacológicas eficazes para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

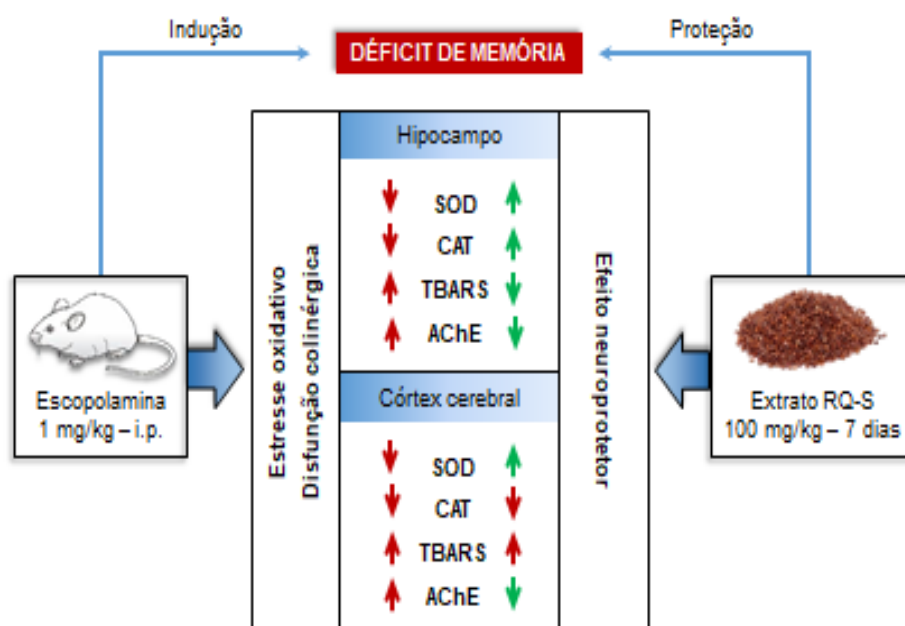


Figura 15- Esquema da indução ao déficit de memória por escopolamina e efeito do extrato etanólico de quinoa vermelha em camundongos
 Fonte: Autoria própria (2018)

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M. E. et al. Bougainvillea spectabilis flowers extract protects against the rotenone-induced toxicity. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 10 (5), 478–490. 2017.

ABDERRAHIM, F. et al. Effect of germination on total phenolic compounds , total antioxidant capacity , Maillard reaction products and oxidative stress markers in canihua (*Chenopodium pallidicaule*). **Journal of Cereal Science**. 56 (2), 410–417. 2012.

ABDERRAHIM, F. et al. Physical features, phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian Altiplano. **Food Chemistry**. 183, 83–90. 2015.

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**. 11 (2), 180–187. 2001.

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**. 105 (1947), 121–126. 1984.

AIGNER, T. G.; WALKER, D. L.; MISHKIN, M. Comparison of the effects of scopolamine administered before and after acquisition in a test of visual recognition memory in monkeys. **Behavioral and Neural Biology**. 55 (1), 61–67. 1991.

ALECCI, U. et al. Efficacy and Safety of a Natural Remedy for the Treatment of Gastroesophageal Reflux: A Double-Blinded Randomized-Controlled Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2016.

ALVAREZ-JUBETE, L. et al. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**. 119 (2), 770–778. 2010.

AMAYA-FARFAN, J. ; MARCÍLIO, R. ; SPEHAR, C. R. Deveria o Brasil investir em novos grãos para a sua alimentação? A proposta do amaranto (*Amaranthus sp.*). Segurança alimentar e nutricional. **Ensaio E Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias E Da Saúde**. 12 (1), 47–56. 2005.

AMEEN-ALI, K. E.; EASTON, A.; EACOTT, M. J. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 53, 37–51. 2015.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 90 (17), 7915–7922. 1993.

ANEKONDA, T. S.; REDDY, P. H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**. 50 (2), 361–376. 2005.

ARAUJO, S. M. et al. Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **NeuroToxicology**. 51, 96–105. 2015.

ATAIE, A.; SHADIFAR, M.; ATAEE, R. Review paper: Polyphenolic antioxidants and neuronal regeneration. **Basic and Clinical Neuroscience**. 7 (2), 81–90. 2016.

AULD, D. S et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system : relations to B-amyloid peptides , cognition , and treatment strategies. **Progress Neurobiolpgy**. 68, 209–45. 2002.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. 117 (4), 426–436. 2013.

BADDELEY, A.; HITCH, G. Working memory. **Psychology of Learning and Motivation**. 8, 47–89. 1974.

BAKHTIARI, M. et al. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 93, 218–229. 2017. h

BARTUS, R. T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Experimental Neurology**. 163 (2), 495–529. 2000.

BAUR, J. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**. 444 (7117), 337–342. 2016.

BELL, M. A.; CUEVAS, K. Using EEG to study cognitive development: Issues and practices. **Journal of Cognition and Development**. 13 (3), 281–294. 2012.

BERNHOF, A. Highlights through the history of plant medicine. Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals. **The Norwegian Academy of Science and Letters**. (Vol. 50, 2010).

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. **Behavioural Pharmacology**. 15 (1), 45–54. 2004.

BHARGAVA, A.; SHUKLA, S.; OHRI, D. Chenopodium quinoa - An Indian perspective. **Industrial Crops and Products**. 23 (1), 73–87. 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248–254. 1976.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**. v. 28, p. 2530, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**. 56 (11), 317–333. 1998.

BURESOVÁ, O.; BOLHUIS, J. J.; BURES, J. Differential Effects of Cholinergic Blockade on Performance of Rats in the Water Tank Navigation Task and in a Radial Water Maze. **Behavioral Neuroscience**. 100 (4), 476–482. 1986.

CAMINA, E.; GÜELL, F. The neuroanatomical, neurophysiological and psychological basis of memory: Current models and their origins. **Frontiers in Pharmacology**. 8(JUN), 1–16. 2017.

CARCIOCHI, R. A.; MANRIQUE, G. D. Optimization of antioxidant phenolic compounds extraction from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. **Journal Food Science Technology**. 52 (July), 4396–4404. 2015.

CARRATÙ, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di

origine vegetale. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**. 41 (1), 7–16. 2005.

CHASSOT, J. M. et al. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 137 (3), 1143–1148. 2011.

CHEN, J. et al. Meta-analysis: Overweight, obesity, and Parkinson's disease. **International Journal of Endocrinology**. 2014.

CIFONE, M. G. et al. Role of nitric oxide in cell-mediated cytotoxicity tumor. **Advances in Neuroimmunology**. 5, 113–461. 1995.

CORKIN, S. Lasting Consequences of Bilateral Medial Temporal Lobectomy: Clinical Course and Experimental Findings in H.M. **Seminars in Neurology**. 1984.

DAL-PAN, A. et al. Cognitive-enhancing effects of a polyphenols-rich extract from fruits without changes in neuropathology in an animal model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. 55 (1), 115–135. 2016.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

DATLA, K. P. et al. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. **Neuro Report**. 12 (17), 3871–3875. 2001.

DE-MELLO, N.; CAROBREZ, A. P. Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. **Behavioural Pharmacology**. 13 (2), 139–148. 2002.

DEIANA, S.; PLATT, B.; RIEDEL, G. The cholinergic system and spatial learning. **Behavioural Brain Research**. 221 (2), 389–411. 2011.

DEIANA S. et al. Methylthioninium chloride reverses cognitive deficits induced by scopolamine: Comparison with rivastigmine. **Psychopharmacology (Berl)**. 202, 53–65. 2009.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; SOUZA, M. A.. The pharmacology, neuroanatomy and

neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 31 (5), 673–704. 2007.

DEY, A. et al. Enhanced gene expression rather than natural polymorphism in coding sequence of the OsbZIP23 determines drought tolerance and. **PloS One**, 11 (3), 1–26. 2016.

DRACHMAN, D. A.; LEAVITT J. Human Memory and the Cholinergic System: A Relationship to Aging? **Archives of Neurology**. 30, 113–21. 1974.

DURLING, L. J. K., SVENSSON, K., & ABRAMSSON-ZETTERBERG, L. Furan is not genotoxic in the micronucleus assay in vivo or in vitro. **Toxicology Letters**. 169 (1), 43–50. 2007.

EBERT, U. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of scopolamine after subcutaneous administration. **Journal of Clinical Pharmacology**. 38 (8), 720–726. 1998.

EDUVIERE, A. T. et al. Methyl jasmonate enhances memory performance through inhibition of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in mice. **Life Science**. 132, 20–6. 2015.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**. (March), 1379–1391. 2016.

EICHENBAUM, H. A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 1, 41–50. 2000.

EICHENBAUM, H.; YONELINAS, A. P.; RANGANATH, C. The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. **Annual Review of Neuroscience**. 30 (1), 123–152. 2007.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. 7 (2), 88–95. 1961.

EMBRAPA, Mercado de cultivares e sementes. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13737898/adquira-sementesde>

quinoa-e-amaranto-diretamente-da-embrapa>. Acesso em: ago. 2017.

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**. 68, 2986–3008. 2007.

FAO, The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>>. Acesso em: 11 ago., 2017.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. Alzheimer s Disease: Targeting the Cholinergic System. **Current Neuropharmacology**. 101–115. 2016.

FINKELSTEIN, Y.; VARDI, J. Progressive parkinsonism in a young experimental physicist following long-term exposure to methanol. **NeuroToxicology**. 23 (4–5), 521–525. 2002.

FRANCIS, P. T. et al. The cholinergic hypothesis of Alzheimer ' s disease : a review of progress. **Journal of Neurolpgy Neurosurgery Psychiatry**. 66, 137–147. 1999.

GAO, J. et al. International Journal of Developmental Neuroscience Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model. **International Journal Developmental Neuroscience**. 49, 67–78. 2016

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et al. Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa Samples (*Chenopodium quinoa* Willd.) Grown under Di ff erent Saline and Nonsaline Irrigation Regimens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60, 4620-4627, 2012.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et al. Influence of pearling process on phenolic and saponin content in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Food Chemistry**. 157, 174–178. 2014.

GORINSTEIN, S. et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. **European Food Research and Technology**. 321–328. 2007.

GOVERDHAN, P.; SRAVANTHI, A.; MAMATHA, T. Neuroprotective effects of Meloxicam and Selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative

stress. **International Journal of Alzheimer's Disease**. 2012.

GRAF, B. L. et al. Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties. **Food Chemistry**. 163, 178–185. 2014.

GRAF, B. L. et al. Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Comprehensive Reviews Food Science Food Safety**, 14 (4), 431–445. 2015.

GRANATO, D.; NUNES, D. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas: Uma Abordagem Teórico-Prática**. Rio de Janeiro/Brasil: Elsevier Editora. 2017.

GUO, C. et al. Neuroprotective effects of polygalacic acid on scopolamine-induced memory deficits in mice. **Phytomedicine**. 23, 149–55. 2016.

HAIDER, S.; TABASSUM, S.; PERVEEN, T. Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study. **Brain Research Bulletin**. 127, 234–47. 2016.

HALLIWELLI, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. fourth ed. Oxford University Press, Oxford; New York. 2007.

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. **International Journal of Molecular Sciences**, 8 (9), 950–988. 2007.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, 11 (3), 298–300. 1956.

HARVEY, J. A.; GORMEZANO, I. Effects of Scopolamine and Methyloscopolamine on Classical Conditioning of the Rabbit Nictitating Membrane Response¹ of the tone stimulus control. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 225, 42–49. 1983.

HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop - The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**. 92 (2–3), 147–162. 2004.

HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. **Trends in Cell Biology**. 21 (10), 569–576. 2011.

HENSON, R. N.; GAGNEPAIN, P. Predictive, interactive multiple memory systems. **Hippocampus**. 20 (11), 1315–1326. 2010.

HIROSE, Y. et al. Antioxidative properties and flavonoid composition of Chenopodium quinoa seeds cultivated in Japan. **Food Chemistry**. 119 (4), 1300–1306. 2010.

HODNICK, W. F. et al. Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**. 37 (13), 2607–2611. 1988.

HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Cell**. 148 (6), 1204–1222. 2013.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **International Journal of ChemTech Research**. 3 (3), 1033–1036. 2011.

INGLETT, G. E.; CHEN, D.; LIU, S. X. Antioxidant Activities of Selective Gluten Free Ancient Grains. **Food and Nutrition Sciences**. 612–621. 2015.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**. 29 (9), 496–505. 2006.

KAMKWALALA, A.; NEWHOUSE, P. Beyond Acetylcholinesterase Inhibitors: Novel Cholinergic Treatments for Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**. 14, 1–14. 2017.

KELSEY, N. A.; WILKINS, H. M.; LINSEMAN, D. Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. **Nutraceutical**. 15 (11), 7792–7814. 2015.

KITTS, D. Bioactive substances in food : identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 72 (72), 423–434. 1994.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 34 (8), 1307–1350. 2010.

KONDAKÇI, E. et al. Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. **Talanta**. 115, 583–589. 2013.

KRIS-ETHERTON, P. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**. 113 Suppl (1), 71S–88S. 2002.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**. 46 (5), 244–282. 2007.

LAMBETH, D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox Enzymatic Activity and Expression. **Free Radical Biology and Medicine**. 14 (4), 319–331. 2007.

LANGEMANN; KABIERSCHE, N. Measurement of Low-Molecular-Weight Antioxidants, Uric Acid, Tyrosine and Tryptophan in Plaques and White Matter from Patients with Multiple Sclerosis. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 53 (9), 1689–1699. 1991.

LEE, G. Y. et al. Amelioration of Scopolamine-Induced Learning and Memory Impairment by α -Pinene in C57BL/6 Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2017.

LI, G.; WANG, S.; ZHU, F. Physicochemical properties of quinoa starch. **Carbohydrate Polymers**. 137, 328–338. 2016.

LIBRO, R. et al. Natural phytochemicals in the treatment and prevention of dementia: An overview. **Molecules**. 21 (4). 2016.

LIM, K. S. et al. Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1042, 210–220. 2005.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic

compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**. 93, 47–56. 2005.

MANACH, C. et al. Polyphenols - Food Sources and Bioavailability. The **American Journal of Clinical Nutrition**. 79 (5), 727–47. 2004.

MANNA, C. et al. The Role of Iron Toxicity in Oxidative Stress-induced Cellular Degeneration in Down Syndrome: Protective Effects of Phenolic Antioxidants. **Current Nutrition & Food Science**. 8 (3), 206–212. 2012.

MARSHALL, S.; VAN DER MEIJ, B. Fish and omega-3 intake and health in older people. **Maturitas**. 1–2. 2018.

MCKEOWN, N. M. et al. Whole Grains and Health: from Theory to Practice — Highlights of the Grains for Health Foundation 's Whole Grains Summit 2012 1 , 2. **The Journal of Nutrition**. 744–758. 2013.

MIRANDA, M. et al. Antimicrobial Potential and Phytochemical Content of Six Diverse Sources of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). **Scientific Research, Agricultural Sciences**. 11 (5), 1015–1024. 2014.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**. 247 (5), 3170–3175. 1972.

MOHAPEL, P. et al. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. **Neurobiology of Aging**. 26 (6), 939–946. 2005.

MORAIS, E. C. et al. Compostos bioativos e características físico-químicas de polpa de araticum in natura e pasteurizada. **Brazilian Journal of Food Technology**. 20. 2017.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FIHLO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Plants and Bioactive Compounds for the Treatment of Parkinson's Disease. **Research Gate**. 2002.

MORIN, M. P.; GRENIER, D. Regulation of matrix metalloproteinase secretion by green tea catechins in a three-dimensional co-culture model of macrophages and gingival fibroblasts. **Archives of Oral Biology**. 75, 89–99. 2016.

MUÑOZ-SORIANO, V.; PARICIO, N. *Drosophila* Models of Parkinson's Disease: Discovering Relevant Pathways and Novel Therapeutic Strategies. **Parkinson's Disease**. 1–14. 2011.

NATARAJ, J. et al. Lutein protects dopaminergic neurons against MPTP-induced apoptotic death and motor dysfunction by ameliorating mitochondrial disruption and oxidative stress. **Nutritional Neuroscience**. 19, 237–46. 2016.

NESPOLO, M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fifth Edition. by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. Oxford University Press. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology. 73, 384–385. 2017.

NSIMBA, R. Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Food Chemistry Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp . seeds. **Food Chemistry**. 106, 760–766. 2008.

OGUNGBENLE, H. N. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. 54 (2), 153–158. 2003.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. 95, 351–358. 1979.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2 (5), 270–278. 2009.

PARK, S.-I. et al. Therapeutic Effects of Blue Honeysuckle on Lesions of Hyperthyroidism in Rats. **The American Journal of Chinese Medicine**. 44 (7), 1441–1456. 2016.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54 (13), 4557–4567. 2006.

PEIGNEUX, P. et al. Are spatial memories strengthened in the human hippocampus during slow wave sleep? **Neuron**. 44 (3), 535–545. 2004.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, J. et al. A Potential Alternative against Neurodegenerative Diseases. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**. 2016.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**. 18 (12), 1995–2018. 1998.

POTTER, P. E.; MEEK, J. L.; NEFF, N. H. Acetylcholine and Choline in Neuronal Tissue Measured by HPLC with Electrochemical Detection. **Journal of Neurochemistry**. 41 (1), 188–194. 1983.

PREGO, I.; MALDONADO, S.; OTEGUI, M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**. 82 (4), 481–488. 1998.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**. 24 (5), 981–990. 2012.

REIN, M. J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**. 75 (3), 588–602. 2013.

REPO-CARRASCO-VALENCIA, R. et al. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). **Food Chemistry**. 120 (1), 128–133. 2010.

REPO-CARRASCO-VALENCIA, R.; SERNA, L. A. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. **Food Chemistry**. (4229), 225–230. 2011.

RICE-EVANS, C. Flavonoids and isoflavones: Absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology and Medicine**. 36 (7), 827–828. 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**. 20 (7), 933–956. 1996.

RISPAIL, N.; MORRIS, P.; WEBB, K. Phenolic Compounds: extraction and analysis. **Lotus Japonicus Handbook**. 349–354. 2005.

ROBERTSON, L. Memory and the brain. **Journal of Dental Education**. 66 (1), 30. 2002.

RUALES, J. et al. The nutritional quality of an infant food from quinoa and its effect on the plasma level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in undernourished children. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. 53 (2), 143–154. 2002.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 273 (3), 442–455. 2013.

SCHNEIDER, C. D.; REISCHAK DE OLIVEIRA, A. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**. 10, 314–318. 2009.

SEIDMAN, S. et al. Synaptic and epidermal accumulations of human acetylcholinesterase are encoded by alternative 3'-terminal exons. **Molecular and Cellular Biology**. 15 (6), 2993–3002. 1995.

SEN, C. K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. **Molecular Aspects of Medicine**. 28 (5–6), 692–728. 2007.

SERRA, D., ALMEIDA, L. M.; DINIS, T. C. P. Anti-inflammatory protection afforded by cyanidin-3-glucoside and resveratrol in human intestinal cells via Nrf2 and PPAR- γ : Comparison with 5-aminosalicylic acid. **Chemico-Biological Interactions**. 260, 102–109. 2016.

SIES, H. **Biochemistry of Oxidative Stress**. Angewandte Chemie International Edition in English, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SIMONE, F. D. E. et al. **Two flavonol glycosides from chenopodium quinoa**. 29 (11), 3690–3692. 1990.

SINGH, V. et al. Evaluation of anti-amnesic effect of extracts of selected *Ocimum* species using in-vitro and in-vivo models. **Journal of Ethnopharmacology**. 193(May), 490–499. 2016.

SOARES, J. J. et al. Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 95 (July), 245–251. 2017.

SOHAL, R.; ORR, W. The Redox Stress Hypothesis of Aging. **Free Radical Biology and Medicine**. 14 (4), 539–555. 2012.

SOUSA, C. M. D. M.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. 30 (2), 351–355. 2007.

SOUZA-SARTORI, J. A. et al. Parameters of influence on extraction of phenolic compounds from sugarcane tops with total antioxidant activity | Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. **Bioscience Journal**. 29 (2), 297–307. 2013.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**. 82 (3), 171–177. 2004.

SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S. M. Memory: brain systems and behavior. **Trends in Neurosciences**. 11, 170–175. 1988.

SUGANTHY, N.; MALAR, D. S.; DEVI, K. P. *Rhizophora mucronata* attenuates beta-amyloid induced cognitive dysfunction, oxidative stress and cholinergic deficit in Alzheimer's disease animal model. **Metabolic Brain Disease**. 31, 937–49. 2016.

SUN, T.; HO, C. T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**. 90 (4), 743–749. 2005.

TAKASHIMA, A. GSK-3 β and memory formation. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. 5 (April), 1–5. 2012.

TANG, Y. et al. Characterisation of phenolics , betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd . genotypes. **Food Chemistry**. 166, 380–388. 2015.

TENG, E.; SQUIRE, L. R. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. **Nature**. 400 (6745), 675–677. 1999.

TONG, L., BI-XIAN, P., & FENGLIAN, B. The structure and C-NMR of an indolenium squaraine dye. **Dyes and Pigments**. 43, 67–71. 1999.

TOTA, S. K. et al. Role of central angiotensin receptors in scopolamine-induced impairment in memory, cerebral blood flow, and cholinergic function. **Psychopharmacology (Berl)**. 222, 185–202. 2012.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 51 (3), 443–452. 2007.

TUNG, B. T. et al. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities in vitro of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice. **Journal Ethnopharmacology**. 198, 24–32. 2017.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 39 (1), 44–84. 2007.

VAN DER KAMP, J. W., POUTANEN, K., SEAL, C. J., & RICHARDSON, D. P. The healthgrain definition of “whole grain.” **Food and Nutrition Research**. 58 (10), 1–8. 2014.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. 30 (5), 1323–1338. 2007.

VAUGHAN, J. G.; GEISSLER, C.; NICHOLSON, B. **The new Oxford book of food plants**. 249. 2009.

VEGA-GÁLVEZ, A. et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*), an ancient Andean grain: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 90 (15), 2541–2547. 2010.

VESELIS, R. A. Memory formation during anaesthesia: plausibility of a neurophysiological basis. **British Journal of Anaesthesia**. 1–7. 2015.

VIEIRA, R. F. et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**. 29 (3), 287–304. 2001.

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**. 285, 131–139. 2015.

WHISHAW, I. Q. Dissociating performance and learning deficits on spatial navigation tasks in rats subjected to cholinergic muscarinic blockade. **Brain Research Bulletin**. 23 (4–5), 347–358. 1989.

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**. 26 (S1), 1–58. 2011.

WU, L. et al. Neuroprotective effects of total flavonoid fraction of the *Epimedium koreanum* Nakai extract on dopaminergic neurons: In vivo and in vitro. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 91, 656–663. 2017.

YAMADA, M. et al. Nasal Colivelin treatment ameliorates memory impairment related to Alzheimer's disease. **Neuropsychopharmacology**. 33 (8), 2020–2032. 2008.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**. 176–186. 2001.

ZHAO, J. et al. Advanced development in phytochemicals analysis of medicine and food dual purposes plants used in China (2011-2014). **Journal of Chromatography A**. 1428, 39–54. 2016.

ZHAO, R. et al. Effects of alpha-lipoic acid on spatial learning and memory, oxidative stress, and central cholinergic system in a rat model of vascular dementia. **Neuroscience Letters**. 587, 113–9. 2015.

ZHENG, L. et al. Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. **Molecular Cell**. v. 32, p. 325-336, 2009.