



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

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aniba canelilla*  
(CASCA-PRECIOSA) E 1-NITRO-2-FENILETANO, SEU  
CONSTITUINTE PRINCIPAL, NA REVERSÃO DO DE  
APRENDIZADO DE ROEDORES**

Daniele Luz de Moraes

BELÉM – PA

2021



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

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aniba canelilla*  
(CASCA-PRECIOSA) E DO 1-NITRO-2-FENILETANO,  
SEU CONSTITUINTE PRINCIPAL, EM TESTES DE  
MEMÓRIA E APRENDIZADO DE ROEDORES**

Autora: Daniele Luz de Moraes

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Soares  
Maia

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane do  
Socorro Ferraz Maia

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas. Área de concentração:  
Avaliação Biológica de Produtos Naturais e  
Sintéticos - Instituto de Ciências da Saúde -  
Universidade Federal do Pará.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

- M827a Moraes, Daniele.  
AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Aniba canelilla  
(CASCA-PRÉCIOSA) E DO 1-NITRO-2-FENILETANO, SEU  
CONSTITUINTE PRINCIPAL, EM TESTES DE MEMÓRIA E  
APRENDIZADO DE ROEDORES / Daniele Moraes. — 2021.  
46 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. José Guilherme Maia  
Coorientação: Profª. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz  
Maia  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2021.
1. Aniba canelilla. 2. Óleo essencial. 3.  
1-nitro2-feniletano. 4. Memória e aprendizado . 5.  
Modelo escopolamina . I. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniele Luz de Moraes

### **AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aniba canelilla* (CASCA-PRECIOSA) E DO 1-NITRO-2-FENILETANO, SEU CONSTITUINTE PRINCIPAL, EM TESTES DE MEMÓRIA E APRENDIZADO DE ROEDORES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos - Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Pará.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia, PPGCF/UFGA (Orientador)

---

Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Junior

---

Profa. Dra. Luanna de Melo Pereira Fernandes

Belém-PA

2021

## **AGRADECIMENTOS**

A **Deus** meu socorro bem presente.

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

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. **José Guilherme Soares Maia** e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Cristiane do Socorro Ferraz Maia** pela orientação, oportunidade, investimento em passar conhecimento e por contribuírem com minha formação acadêmica e profissional.

A minha **família** por todo amor, cuidado, investimento e sempre acreditar e me apoiar.

Ao meu **namorado** por ser meu grande incentivador e companheiro.

A toda equipe do **LEPRON** e **LAFICO** que somaram com o presente trabalho de forma única, sem os quais não seria possível chegar até aqui.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Eloísa Helena de Aguiar Andrade** pela colaboração em analisar o óleo e suas frações.

Aos colegas e amigos de laboratório **Letícia Yoshitome, Fábio Coelho, Felype Pereira, Carla Silva, Pablo Franco, Igor Gonçalves, Alessandro Maués, Sarah Viana, Natalia Harumi, Eloise Cardoso, Karen Kubota e Thales Silva** pelo companheirismo.

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aniba canelilla* (CASCA-PRECIOSA) E DO 1-NITRO-2-FENILETANO, SEU CONSTITUINTE PRINCIPAL, EM TESTES DE MEMÓRIA E APRENDIZADO DE ROEDORES**

A demência é uma doença que afeta as funções cognitivas, principalmente em indivíduos idosos. Pode ser de origem genética, ambiental, lesões cerebrais, estresse, inflamação e distúrbios neurológicos. A Doença de Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa, é a causa mais comum de demência, considerada um grande problema de saúde pública global. A patologia da DA é marcada por morte progressiva dos neurônios colinérgicos e distúrbios bioquímicos que acarretam declínio cognitivo. Os fármacos utilizados para tratar demência e DA são de curta duração e apresentam reações adversas, incluindo hepatotoxicidade, náusea, efeitos cardiovasculares e outros. Por este motivo a busca por alternativas farmacológicas com melhor tolerabilidade se faz necessário. Dentre a diversidade de plantas com potencial farmacológico para atuar sobre a memória destaca-se *Aniba canelilla* (HBK) Mez, nativa da Amazônia, pertencente à família Lauraceae, conhecida popularmente como casca preciosa e canela-cheirosa. Seu óleo essencial, que possui 1-nitro-2-feniletano (NFE) como componente majoritário, ambos inibem a enzima AchE, responsável pela degradação de acetilcolina (ACh), substância importante nos processos de aprendizagem e memória. Este trabalho teve como objetivo avaliar se o óleo essencial *Aniba canelilla* (OEAC) e NFE revertem o dano de memória e aprendizado causados pela escopolamina. Para tanto, utilizou-se ratos submetidos a protocolo de dano mnemônico por administração de escopolamina, seguido de tratamento com o óleo essencial de *Aniba canelilla* (OEAC) e NFE e análise comportamental da memória através do teste padrão ouro Labirinto Aquático de Morris. Os resultados demonstraram que o OEAC e o NFE conseguiram reverter os danos causados no aprendizado e memória, sugere-se que este efeito está associado à capacidade de inibirem a AChE.

**Palavras-chave:** *Aniba canelilla*, óleo essencial, 1-nitro-2-feniletano, memória e aprendizado de roedores, modelo-escopolamina, labirinto aquático de Morris.

## ABSTRACT

### **EFFECT OF ESSENTIAL OIL OF *Aniba canelilla* (PRECIOUS CASCADE) AND 1-NITRO-2-PHENYLETANE, ITS MAIN CONSTITUENT, IN THE MEMORY AND LEARNING OF RODENTS**

Dementia is a disease that affects cognitive functions, especially in elderly individuals. It can be genetic, environmental, brain damage, stress, inflammation and neurological disorders. Alzheimer's Disease (AD), a neurodegenerative disease, is the most common cause of dementia, considered a major global public health problem. AD pathology is marked by progressive death of cholinergic neurons and biochemical disturbances that lead to cognitive decline. The drugs used to treat dementia and AD are of short duration and have adverse reactions, including hepatotoxicity, nausea, cardiovascular effects and others. For this reason, the search for pharmacological alternatives with better tolerability is necessary. Among the diversity of plants with pharmacological potential to act on memory, *Aniba canelilla* (HBK) Mez stands out, native to the Amazon, belonging to the Lauraceae family, popularly known as precious bark and cinnamon-scented bark. Its essential oil, which has 1-nitro-2-phenylethane (NFE) as a major component, both inhibit the enzyme AchE, responsible for the degradation of acetylcholine (ACh), an important substance in the processes of learning and memory. This work aimed to evaluate whether the essential oil *Aniba canelilla* (OEAC) and NFE reverse the memory and learning damage caused by scopolamine. For this purpose, rats were submitted to a mnemonic damage protocol by administration of scopolamine, followed by treatment with *Aniba canelilla* essential oil (OEAC) and NFE and behavioral analysis of memory through the Morris Aquatic Maze gold standard test. The results showed that OEAC and NFE were able to reverse the damage caused to learning and memory, suggesting that this effect is associated with the ability to inhibit AChE.

**Keywords:** *Aniba canelilla*, essential oil, 1-nitro-2-phenylethane, memory and learning of rodents, model-scopolamine, Morris water maze

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 _ Sistema de memórias .....	12
Figura 2 _ Principais áreas envolvidas na memória de trabalho .....	14
Figura 3 _ Memórias declarativas e interferentes .....	15
Figura 4 _ Perda de tecido no cérebro.....	18
Figura 5 _ Mecanismo de ação dos inibidores da AChE .....	19
Figura 6 _ Mecanismo de ação da memantina.....	21
Figura 7 _ Principais substâncias presentes no óleo essencial de Aniba canelilla .....	24
Figura 8 _ Esquema de tratamento dos grupos .....	29
Figura 9 _ Cromatograma do Óleo essencial de <i>A. caneilla</i> .....	30
Figura 10 _ Cromatograma da fração 1.....	31
Figura 11 _ Latência de escape.....	32
Figura 12 _ Distância total percorrida .....	33
Figura 13 _ Tempo no quadrante-alvo.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 \_ composição química do óleo essencial de *A. canellila*..... 31

Tabela 2 \_ composição química da fração 1 ..... 31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de variância
BChE	Butirilcolinesterase
BDNF	Fator neutrófico derivado do cérebro
Ca <sup>2+</sup>	Íon Cálcio
CaMKI	Proteína Quinase Dependente de Cálcio / Calmodulina
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAT	Atividades das enzimas catalase
CG-DIC	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de chamas
CID	Classificação Internacional de Doenças
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP
D1	Receptores de dopamina
DA	Doença de Alzheimer
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
Glu	Glutamato
GPX	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
IACHe	Inibidores das colinesterases
LE	Latências de escape
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
	massas
MDA	Malondialdeído
ME	Metileugenol

Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
mTor	Alvo mecanicista da rapamicina
MWM	Morris Water Maze
Na <sup>+</sup>	Íon Sódio
NFE	1-nitro-2-feniletano
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogénio
OE	Óleo essencial
OEAC	Óleo essencial de <i>Aniba canelilla</i>
PKA	Quinase dependente do AMP cíclico
PKC	Proteínas quinases dependente de cálcio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
UFPA	Universidade Federal do Pará
βA	Beta amiloide

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Memória.....	13
1.2 Demência.....	18
1.3 Tratamento.....	20
1.4 Modelos de demência.....	23
1.5 Óleo essencial de <i>Aniba canelilla</i> .....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. METODOLOGIA.....	28
3.1 Processamento do material botânico e obtenção do óleo essencial.....	28
3.2 Identificação dos compostos majoritários.....	28
3.3 Isolamento do 1-nitro-2-feiletano.....	28
3.4 Animais.....	29
3.5 Análise comportamental.....	31
3.6 Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Principais constituintes do OEAC.....	33
4.2 Fracionamento e identificação do composto isolado.....	33
4.3 Teste do labirinto aquático de Morris.....	34
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Memória

A memória pode ser definida como a capacidade de aquisição, formação, conservação e evocação de informações. O conjunto de informações adquiridas ao longo da vida a partir de experiências diversas, mais a resultante entre as recordações e esquecimentos, geram memórias. O acervo de memória forma o indivíduo, a personalidade e modula o comportamento. A aquisição representa aprendizagem, entretanto, as memórias não são fixadas imediatamente logo após aquisição, são necessários redes complexas de neurônios e processos metabólicos que irão formar a memória. Este processo é denominado de consolidação. A evocação, por sua vez é a recuperação das memórias consolidadas. As memórias podem ser retidas brevemente ou por tempos mais longos dependendo do processo de consolidação (Figura 1; LENT, 2010; IZQUIERDO, 2018; PEREIRA *et al.* 2019).

**Figura 1** \_ Sistema de memórias.



*Legenda:* Esquema das etapas envolvidas na formação da memória. Fonte: Adaptado de Lent, 2010.

Durante o processo de consolidação, as memórias são vulneráveis podendo sofrer interferências por causas distintas como traumatismo craniano, outras memórias, estado de vigília, emoções, liberação de hormônios como cortisol e adrenalina, relacionados com o nível de estresse, e outras substâncias capazes de atuar sobre o sistema nervoso central (SNC) diretamente ou indiretamente (IZQUIERDO *et al.* 1999; MOYANO *et al.* 2019). Há vários tipos

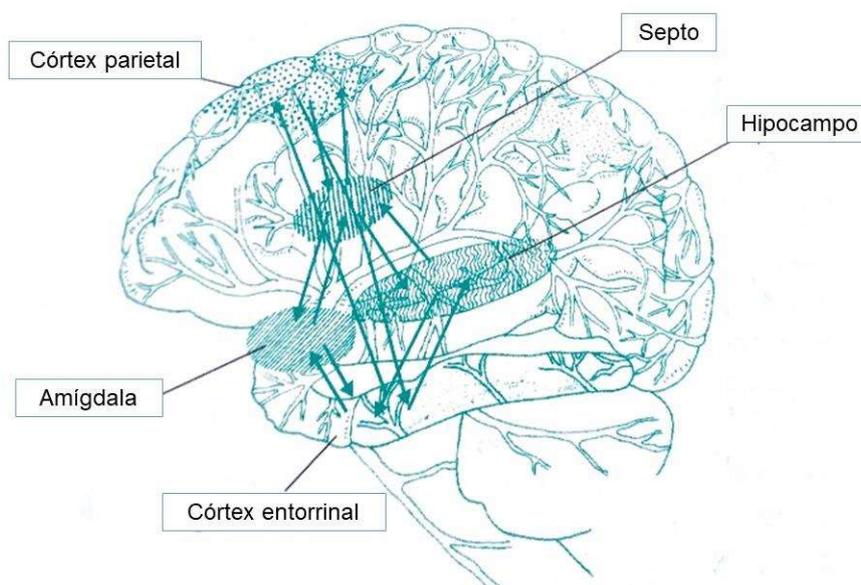
de memórias, algumas são adquiridas em segundos, outras em dias ou anos, além de visuais, olfativas, que dão prazer ou medo (WIRT e HYMAN 2019). Cada uma dessas envolve diferentes mecanismos nervosos. Segundo Izquierdo (2018) As memórias são classificadas de acordo com a função, conteúdo e duração.

### 1.1.1 Memória de Trabalho

Quanto a função, tem-se a memória de trabalho, também chamada de memória operacional. É uma memória de caráter fugaz que tem como finalidade gerenciar a realidade e a sequência das informações. Ela auxilia, por exemplo na percepção de lugar, do que se está fazendo ou o que se fez, e a partir desta percepção é possível dar continuidade nos atos (MILLER e COHEN, 2001). No momento em que se recebe uma informação a memória de trabalho “checa” nas memórias pré-existentes se a informação é nova ou não, se é útil ou prejudicial e assim auxilia na tomada de decisão (JONES e WILSON, 2005). Outro exemplo do papel gerenciador da memória de trabalho é no diálogo. Este, conserva por tempo suficiente uma informação no cérebro para que o indivíduo perceba a construção de sua fala, o que foi dito segundos atrás e então escolher o que dizer à frente (FUSTER e BRESSLER, 2012; IZQUIERDO, 2018).

A memória de trabalho é processada no córtex pré-frontal, antero-lateral e orbital-frontal, conecta com hipocampo e amígdala através do córtex entorrinal (Figura 2). O processamento depende da condução elétrica dos neurônios e não envolve alterações bioquímicas, o que confere a brevidade. Devido o córtex pré-frontal receber neurônios de áreas do cérebro que regulam estados de ânimo, níveis de consciência e emocionalidade, esses fatores modulam a memória de trabalho (JONES e WILSON, 2005; IZQUIERDO, 2018). De acordo com Izquierdo (2018) os principais neurotransmissores capazes de modular a memória de trabalho são acetilcolina, atuando sobre receptores muscarínicos e a dopamina sobre receptores do tipo D1. As memórias também podem ser classificadas ainda quanto ao conteúdo: memória declarativa e não declarativa.

**Figura 2** \_ Principais áreas envolvidas na memória de trabalho.



*Legenda:* Principais áreas envolvidas na memória de trabalho, todas as áreas estão conectadas entre si e com o hipocampo através do córtex entorrinal. Fonte: Adaptado de Izquierdo, 2018. Adaptado de Izquierdo, 2018.

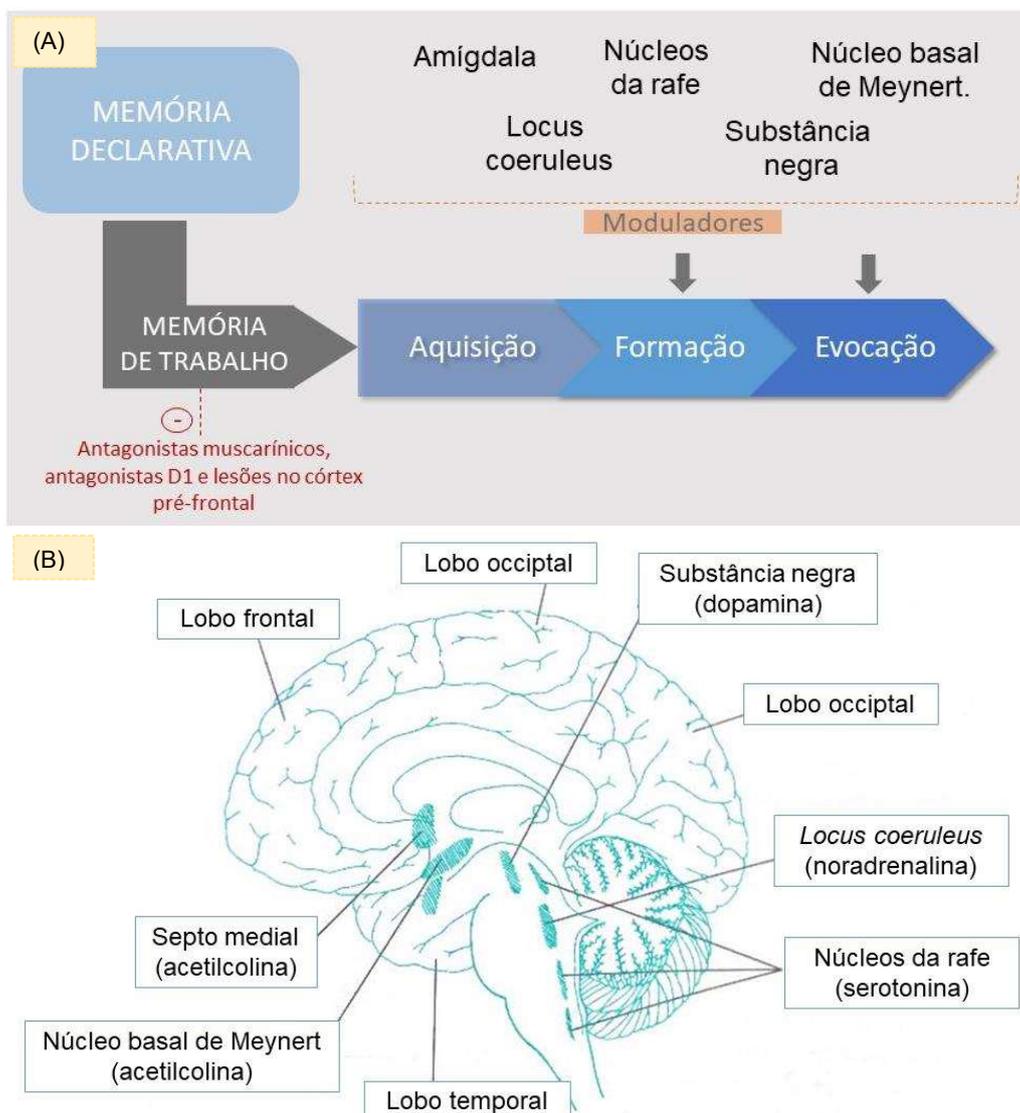
### 1.1.2 Memória declarativa

A memória declarativa recebe esse nome pois os humanos podem declará-la verbalmente. Essa memória é subdividida em episódicas ou autobiografia, que são eventos e fatos que o indivíduo assiste, ouve, participa ou lê; e memórias semânticas que são memórias de conhecimentos gerais como por exemplo português, química entre outras. As memórias semânticas quase sempre são adquiridas por meio das memórias episódicas. Ambas requerem um bom desempenho da memória de trabalho para aquisição, formação e evocação. Interferências na memória de trabalho podem afetar as memórias declarativas (Figura 3; IZQUIERDO, 2018; COUSINS e FERNÁNDEZ, 2019)

As principais regiões responsáveis pela memória declarativa são hipocampo e córtex entorrinal (Figura 2) associados entre si e com o córtex cingulado, córtex parietal e com os núcleos basal e lateral da amígdala (EICHENBAUM, 2001). A amígdala também armazena memórias, principalmente as de cunho emocional, e modula a formação de memórias declarativas juntamente com as regiões reguladoras do estado de ânimo, de alerta, da ansiedade e das emoções localizadas na substância negra, *locus*

*coeruleus*, núcleos da rafe e núcleo basal de Meynert. Os neurônios destas estruturas liberam para as áreas responsáveis pela memória declarativa neurotransmissores como dopamina, serotonina noradrenalina e acetilcolina respectivamente (Figura 3; IZQUIERDO, 2018). Outro grupo de memórias são as memórias não declarativas, seu conteúdo está relacionado as habilidades motoras ou sensoriais.

**Figura 3** \_ Estruturas responsáveis pelo processamento das memórias declarativas e Localização dos principais sistemas moduladores.



**Legenda:** **(A)** Estruturas responsáveis pelo processamento das memórias declarativas e interferentes. **(B)** Localização dos principais sistemas moduladores das memórias declarativas  
 Fonte: Adaptado de Izquierdo, 2018.

### 1.1.3 Memória não declarativa

Também conhecida como memória procedural, é comumente chamada de hábitos, e tem como exemplo tocar um instrumento musical, nadar ou dirigir. As memórias de procedimento são adquiridas de forma implícita e inconsciente. Nos distúrbios de memória em pacientes com lesões no hipocampo e estruturas associadas do lobo temporal medial, há grave comprometimento da memória explícita enquanto as memórias implícitas mostram-se preservadas. Assim, pode-se perceber que as memórias implícitas são de caráter neurobiológico distinto das memórias declarativas. As áreas responsáveis pelas memórias procedurais são núcleo caudado, que recebe neurônios da substância negra e o cerebelo, sofrem pouca modulação pelas emoções ou estado de ânimo. A principal modulação que ocorre é através da substância negra que tem importância nas funções motoras (IZQUIERDO, 2018; KALRA *et al.* 2019).

As memórias implícitas duram geralmente a vida inteira. Já as explícitas tem duração que varia em minutos, horas, dias, meses ou décadas. Sendo assim, as memórias podem ser classificadas também de acordo com seu tempo de duração.

### 1.1.4 Memória de curta duração e de longa duração

A memória de curta duração é a capacidade de reter uma certa quantidade de informação ativa na mente durante um curto período que varia entre 1 a 6 horas, o mesmo tempo que dura a consolidação das memórias de longa duração, estas duram meses ou anos, já as memórias que duram décadas também podem ser chamadas de remotas. Ambas as memórias envolvem as mesmas estruturas, mas processos paralelos entre si e independentes. O mecanismo de consolidação da memória de longa duração abrange processos eletrofisiológicos chamado potencial de longa duração (long-term potentiation, LTP) e depressão de longa duração (long-term depression, LTD; COOKE e BLISS, 2006; IZQUIERDO, 2018).

O LTP consiste em aumento da resposta pós-sináptica mediada por glutamato (Glu) em receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). Este resulta em síntese de proteínas

ribossomais, entre elas, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e quinase dependente do AMP cíclico (PKA), estas fosforilam fatores de transcrição como proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB), que regula a transcrição do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) responsável pela síntese proteica extrarribossomal nos dentritos pelo sistema mTor. A LTD por mecanismos semelhantes leva a ativação de proteínas quinases como cálcio/calmodulina-dependentes (CaMKII) e proteínas quinases cálcio dependentes (PKC), mas em menor grau e duração curta do efeito, os receptores de Glu fosforilados são levados para o interior das células, impossibilitados de serem ativados na membrana sináptica. Esses eventos contribuem com a consolidação das diferentes memórias de longa duração (IZQUIERDO, 2018).

## 1.2 Demência

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID), a demência é uma síndrome geralmente de natureza crônica ou progressiva derivada de doenças do cérebro em que há falhas nas sinapses responsáveis pelos processos cognitivos perturbando a memória, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento. Comumente acompanhados de distúrbios de emoção, motivação e do comportamento social. A demência está entre as principais causas de morbimortalidade em pessoas a partir de 60 anos, afetando aproximadamente 35,6 milhões em todo no mundo. (IZQUIERDO 2018; VON ARNIM *et al.* 2019)

A disfunção cognitiva é multifatorial, pode ser fisiológica através do processo de envelhecimento que naturalmente é acompanhado de declínio do número de neurônios; alteração genética que em geral necessitam de um fator desencadeante; ambiental devido exposição a agentes tóxicos, lesões cerebrais, estresse, inflamação e distúrbios neurológicos. A Doença de Alzheimer (DA), doença neurodegenerativa, é a causa mais comum de demência, responsável por cerca de 50 a 75% dos casos. O principal fator de risco é a idade com prevalência de 0,6% para indivíduos de 60 anos e mais de 17% na faixa etária acima dos 90, além disso, as comorbidades nesse grupo contribui com a gravidade da DA (HAIDER *et al.* 2016; LAVER *et al.* 2016; LI *et al.* 2018; MÜLLER *et al.* 2019).

A etiologia da DA é pouco esclarecida, há diferentes hipóteses, mas nenhuma linearidade dos processos desencadeantes foi confirmada até os dias atuais. Em 1980 lesões associadas a baixa atividade no núcleo basal de Meynert, importante estrutura colinérgica moduladora do cérebro, foram descobertas em paciente com DA. Esses achados levaram à hipótese colinérgica que destaca a acetilcolina (ACh) como principal neurotransmissor responsável pela memória e que a degeneração de seus neurônios fosse a causa da DA. Contudo, estudos posteriores mostraram que outras vias como dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica sofriam os mesmos danos, refutando esta hipótese, deportando-a como secundária a patogenia da DA, sem anular o importante papel modulador da ACh nos processos cognitivos (WHITEHOUSE *et al.* 1982; FRANCIS *et al.* 1999; IZQUIERDO 2018).

Atualmente, as características patológicas da DA envolvem morte progressiva de neurônios que levam a perda de tecidos em todo cérebro (figura 4), e distúrbios moleculares como depósitos beta amiloide ( $\beta$ A), este peptídeo forma agregados chamados placas senis e seus oligômeros são neurotóxicos capazes de interagir com neurônios e células da glia (células responsáveis por dirigir a destruição neuronal) levando a ativação de mecanismos inflamatórios, oxidativos e morte celular; acúmulo de proteína tau no interior das células levando a formação de emaranhados neurofibrilares capazes de perturbar o trânsito de proteínas pelo axônio acarretando morte celular (IZQUIERDO 2018; STELLA *et al.* 2015; VON ARNIM *et al.* 2019).

**Figura 4** \_ Perda de tecido cerebral na doença de Alzheimer.



**Legenda:** Perda de tecido em todo o cérebro causada por morte das células nervosas na doença de Alzheimer. Adaptado de ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2019. Fonte: Adaptado de ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2019.

As alterações estruturais e bioquímicas da DA iniciam no córtex entorrinal, seguindo para o hipocampo, posteriormente acometem córtices pré-frontal, parietal e occipital, áreas importantes para memória e aprendizado, podendo afetar também outras partes do cérebro (IZQUIERDO 2018; STELLA *et al.* 2015; VON ARNIM *et al.* 2019). Com a atual mudança demográfica apontando para crescimento da população idosa, estima-se um aumento no número de casos de demências, com valores de 74,7 milhões em 2030 e 131,5 milhões em 2050 de acordo com a Associação Internacional de Alzheimer (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL-ADI, acessado em junho de 2019), representando um problema de saúde pública em todo mundo cujo tratamento é desafiador.

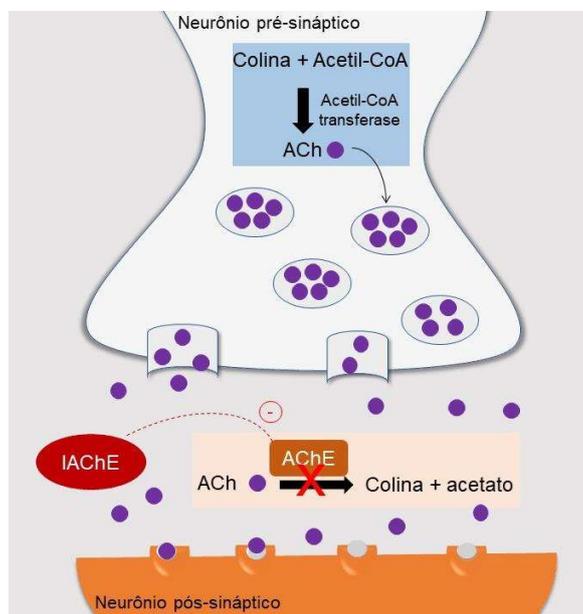
### 1.3 Tratamento

As terapias farmacológicas e não farmacológicas disponíveis limitam-se ao retardo da progressão da doença, o que confere melhora temporária, pois são incapazes de reverter a etiologia primária. O tratamento farmacológico atual inclui: donepezila rivastigmina, galantamina e memantina. Sendo os três primeiros inibidores das colinesterases (IAChE), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), enzimas responsáveis por degradar ACh, sendo que a BChE tem menor participação na degradação e está mais presente na periferia. O uso destes fármacos tem como objetivo aumentar a disponibilidade sináptica de ACh, na tentativa de compensar perda de neurônios colinérgico (Figura 5; STELLA *et al.* 2015; FORLENZA 2015; KOUÉMOU *et al.* 2017).

O primeiro IAChE sintetizado foi a fisostigmina em 1935, mas seu curto tempo de meia vida levou a descontinuação dos estudos. A tacrina foi disponibilizada em 1993, e funciona como inibidor reversível da AChE, agindo também sobre BChE o que confere benefícios adicionais e mais efeitos colaterais periféricos. Devido à baixa tolerabilidade, dificuldades posológicas e elevado risco de hepatotoxicidade, caiu em desuso. Os demais inibidores reversíveis das colinesterases foram donepezil em 1997, rivastigmina em 1998 e galantamina em 2000, são chamados de segunda geração. A eficácia desses fármacos são comparáveis e dependentes da dose. A dose máxima recomendada é donepezil 10mg, rivastigmina 12mg ou 9,5mg para aplicação

transdérmica, galantamina 24mg (FORLENZA 2005; MÜLLER *et al.* 2019; VON ARNIM *et al.* 2019).

**Figura 5** \_ Mecanismo de ação dos inibidores da AChE (IACHe).



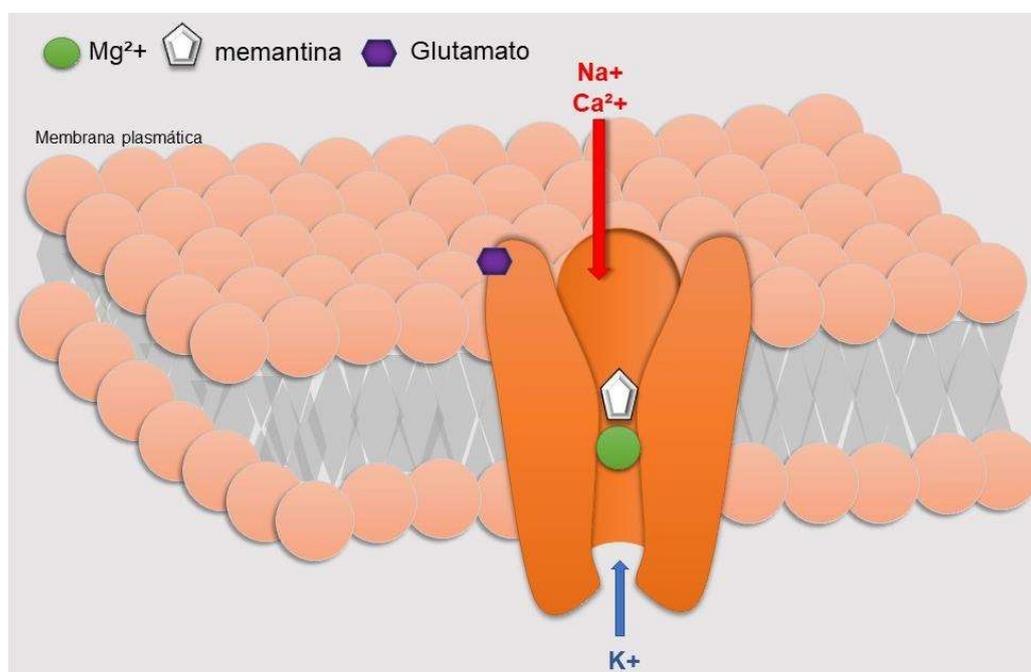
*Legenda:* Os inibidores da AChE (IACHe) na sinapse colinérgica.

O uso de IACHe é recomendado em diretrizes internacionais, a resposta farmacológica geralmente surge após 12 a 18 semanas e variam de acordo com os estágios da doença, sendo notados benefícios discretos no estágio leve a moderado, e com poucos ou nenhuns benefícios nos estágios avançados. O perfil de efeitos colaterais desses medicamentos é similar e deriva da potencialização das vias colinérgicas, incluindo desordens gastrointestinais como náuseas, vômitos, diarreia, perda de apetite, aumento da acidez gástrica; cardiovasculares com variação na pressão arterial, arritmia, bradicardia; e outras manifestações como tonturas, desmaio, cefaleia, suor excessivo, perturbação no sono, confusão e câimbras. Deve-se sempre avaliar a relação custo-benefício, quando há indiferença na progressão do dano é recomendado descontinuar o tratamento (MÜLLER *et al.* 2019; VON ARNIM *et al.* 2019).

A memantina, outra opção terapêutica, indicado para Alzheimer moderado a grave, é antagonista não competitivo do receptor NMDA de Glu, com objetivo de reequilibrar a neurotransmissão glutamatérgica. Em repouso o canal de NMDA é obstruído com o magnésio, quando há ativação este é deslocado. De

forma similar é o mecanismo de ação da memantina, obstrui o canal (Figura 6) e permanece bloqueando quando há hiperestimulação (condição patológica), promovendo ação neuroprotetora frente a excitotoxicidade glutamatérgica sem afetar a neurotransmissão fisiológicas. dose diária de 20 a 30 mg. O pico plasmático é obtido entre 3 e 8 horas após absorção pelo trato gastrointestinal, sendo necessário 2 administrações por dia. Não sofre metabolização hepática o que minimiza interações farmacocinéticas. Os efeitos colaterais mais frequentes são insônia, cefaleia, inquietação, vertigens, cansaço e diarreia tontura, confusão, aumento da pressão arterial, constipação, em alguns casos convulsões (WINBLAD *et al.* 2010; FORLENZA 2015; MÜLLER *et al.* 2019)

**Figura 6** \_ Mecanismo de ação da memantina



*Legenda:* Memantina atuando bloqueando o canal do receptor NMDA.

Em geral os fármacos anti-demência atuais apresentam curto tempo de meia vida e reações adversas que minimizam sua adesão, além disso seus efeitos clínicos são considerados fracos com mudanças moderadas pronunciadas na melhoria das habilidades cognitivas e cotidianas em 25% dos pacientes (MANGIALASCHE *et al.* 2012; CUMMINGS *et al.* 2017). Por este motivo a busca por novas opções farmacológicas com melhor tolerabilidade se faz necessário. As plantas representam uma fonte de produtos potencialmente bioativos com propriedades físico-químicas variadas amplamente empregadas na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades (FOGLIO *et al.* 2016) sendo,

portanto, necessário explorar atividade biológica de drogas vegetais sobre o sistema nervoso central. Existem diversos modelos experimentais em roedores disponíveis para compreender os distúrbios de memória e testar novas drogas.

#### **1.4 Modelos de demência**

Os modelos de demência podem ser divididos em: fisiológicos causado por envelhecimento natural, pois ratos idosos apresentam comprometimento cognitivo (WANG *et al.* 2015); ambientais através de neurotoxicidade induzida por metais como o alumínio, este altera o sistema colinérgico, produz inflamação e espécies reativas de oxigênio; modelos farmacológicos como glicocorticoides, que leva a atrofia dendrítica crônica e prejuízos no hipocampo, e escopolamina (WOODSON *et al.* 2003; HAIDER *et al.* 2016). Dentre esses, o modelo induzido por escopolamina é o mais utilizado. De acordo com Haider *et al.* (2016) o dano causado pela escopolamina é o que mais se aproxima dos estados de demência, levando a déficits mais pronunciados nos testes comportamentais, indução de estresse oxidativo e prejuízos neuroquímicos (GOVERDHAN *et al.* 2012; LEE *et al.* 2014).

Segundo a hipótese colinérgica da doença de Alzheimer a perda de memória ocorre pelo declínio de neurônios colinérgicos e consequente diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) no cérebro. A escopolamina por ser um antagonista muscarínico bloqueia os receptores mimetizando esses distúrbios. Além disso há aumento na atividade da AChE incrementando no déficit. O dano também é marcado por outras alterações não colinérgicas similar ao Alzheimer como declínio nos níveis de monoaminas cerebrais noradrenalina, dopamina e serotonina, e alterações no balanço oxidativo cerebral. Haider *et al.* (2016) investigou a peroxidação lipídica (MDA), atividade de enzimas antioxidantes (CAT, GPX e SOD), níveis de compostos antioxidantes (GSH) no cérebro e observou que a escopolamina (ESCOP) promove aumento significativo nos níveis de MDA e diminuição da a atividade de CAT, GPx, GSH (GOVERDHAN *et al.* 2012; RAHIMZADEGAN e SOODI, 2018).

Outro fator que aproxima o modelo de ESCOP a demência é a redução da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de

transcrição CREB. Há uma estreita relação entre CREB e BDNF, pois o CREB através de sucessivas fosforilações regula a expressão de BDNF. O BDNF por sua vez é responsável pela sobrevivência das células nervosas e plasticidade sináptica, sendo, portanto, essenciais para os processos de memória (HAFEZ *et al.* 2017). Os mecanismos supracitados compelem a déficits na memória e aprendizado de roedores que alteram o desempenho de testes comportamentais mnemônicos como labirinto aquático de Morris (Morris Water Maze – MWM) sem que haja comprometimento da capacidade locomotora, viabilizando sua aplicação na pesquisa de atividade farmacológica de novas drogas anti-demência (COZZOLINO *et al.* 1994; HAIDER *et al.* 2016).

Dentre a diversidade de plantas com potencial farmacológico sobre o SNC destacam-se as espécies ricas em óleo essencial (OE), estes apresentam como principais constituintes os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Essas substâncias são responsáveis pelas características organolépticas e atividades biológicas.

### **1.5 Óleo essencial de *Aniba canelilla***

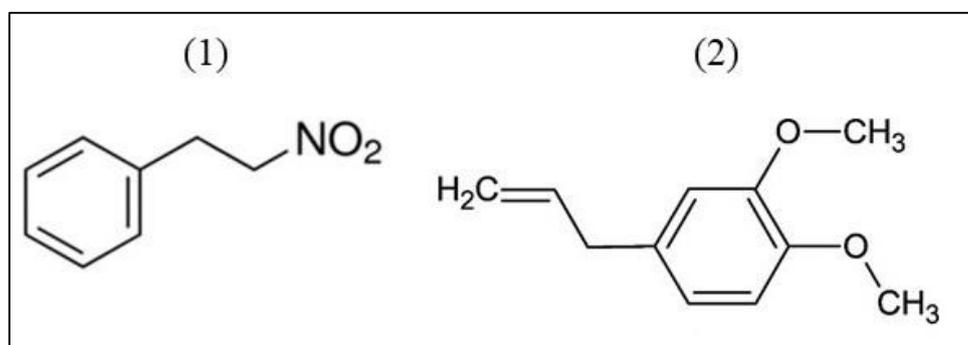
Entre as espécies aromáticas tem-se a *Aniba canelilla* (HBK) Mez, nativa da Amazônia, pertencente à família Lauraceae, conhecida popularmente como casca preciosa e canela-cheirosa. Distribui-se amplamente pela região amazônica, com predomínio nas regiões do leste da Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia até a Amazônia peruana, raramente encontrada na América Central (MANHÃES *et al.* 2012) O óleo essencial de *Aniba canelilla* (OEAC) é extraído da madeira, galhos, folhas, pedúnculo, caule fino e casca por destilação a vapor ou hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger, seu rendimento varia de 0,2% a 1,3%. Fatores como período chuvoso, maior aporte de luz e estágio inicial de desenvolvimento dos órgãos vegetais favorecem seu rendimento (TAVEIRA *et al.*, 2003; GIONGO *et al.*, 2017).

Tanto os extratos quanto o OE da espécie são utilizados na medicina tradicional como anti-inflamatória, antiespasmódica, no combate da anemia, anti-disentérica, tratamento de resfriados, tosse, dor de cabeça, náusea, acne, dermatite, febre, infecções variadas, lesões e estimulante do sistema nervoso central antidepressivos e calmantes (MAIA *et al.*, 2001; RODRIGUES E

CARLINI, 2006; SOUSA *et al.* 2009). O principal constituinte do OEAC é o 1-nitro-2-feniletano (NFE), derivado nitroso raro em plantas superiores, responsável pelo odor marcante semelhante ao da canela. Foi o primeiro composto nitro isolado de plantas, está presente também nas espécies *Ocotea odorifera* (Lauraceae) e *Dennettia tripetala* G. Baker (Annonaceae).

A estrutura química do NFE possui dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) disposto em uma cadeia alifática ligada a um anel aromático com propriedades de ressonância (Figura 7), a biogênese deriva do aminoácido fenilalanina, através da produção de fenilacetaldoxima, dependente de enzimas do citocromo P450. Outro componente importante do OEAC é o metileugenol (ME; Figura 7), a porcentagem destas substâncias varia de acordo com o clima, no período chuvoso os valores de NFE atingem 95% e ME 18% e no período seco 40% e 45% respectivamente. (GOTTLIEB, 1972; MATSUO *et al.* 1972; TAVEIRA, *et al.* 2003; MANHÃES *et al.* 2012

**Figura 7** \_ Principais substâncias presentes no óleo essencial de *Aniba canelilla*.



*Legenda:* 1-nitro-2-feniletano (1), metileugenol (2). Fonte: Adaptado de Sugimoto *et al.* (2017), Sipe *et al.* (2014).

*Aniba canelilla* apresenta potencial farmacológico promissor, OE e seu constituinte principal possuem comprovadamente atividade antioxidante, antinociceptiva, hipotensão, bradicardia, anti-inflamatório, vaso-relaxante, tripanomicida e inibidor da enzima acetilcolinesterase. Além destas a substância isolada também apresentou ação fungistática, hipnótica, anticonvulsivante e ansiolítica. Tanto o OE quanto NFE apresentaram boa estabilidade físico-química e organolépticas em diferentes formulações e quando administrados pelas vias intravenosa, oral, dérmica e efetividade quando administrados por via oral (OGER *et al.*, 1994; LAHLOU *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2007;

INTERAMINENSE *et al.*, 2011; INTERAMINENSE *et al.*, 2013 OYEMITAN *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2013).

Neste estudo, destaca-se a capacidade de o OEAC e seu composto principal atuarem sobre a demência. Com base nos resultados inibitórios do óleo essencial e seu composto principal sobre a enzima AChE *in vitro* de Silva *et al.* 2014, somado aos efeitos hipnótico, anticonvulsivante e ansiolítico de NFE no estudo de Oyemitan *et al.* (2013), observa-se que a substância atravessa a barreira hematoencefálica sugerindo, portanto, que ambos possam atuar na deficiência de aprendizado e memória através da via colinérgica, pois a ACh no SNC tem papel importante nos processos cognitivos (CHEN *et al.* 2008). Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos OEAC e NFE na reversão dos danos causados à memória e aprendizado induzidos pela escopolamina, sendo é o primeiro a investigar tais efeitos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do óleo essencial de *Aniba canelilla* e 1-nitro-2-feniletano na reversão dos danos causados à memória e aprendizado induzidos pela escopolamina.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter o óleo essencial de *Aniba canelilla* através da técnica de hidrodestilação;
- Identificar os componentes majoritários do óleo essencial de *Aniba canelilla*;
- Isolar o composto majoritário do óleo essencial de *Aniba canelilla*;
- Investigar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do óleo essencial de *Aniba canelilla* e seu composto majoritário na reversão dos danos causado à memória e aprendizado de ratos adultos, previamente induzidos pela escopolamina, através dos testes de labirinto aquático de Morris.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Processamento do material botânico e obtenção do óleo essencial**

O material vegetal foi coletado em Ulinópolis, Pará, e identificado por comparação com exsicata autêntica (MG 174904) registrada no herbário João Murça Pires, do Museu Emílio Goeldi, em Belém (PA). Todo processamento realizado com o material vegetal para obtenção de seu OE e do constituinte principal foi realizado Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Maia e colaboração da Técnica Rafaela Oliveira Pinheiro.

A parte vegetal utilizada foi madeira do tronco, esse material foi seco e posteriormente cortado em filete com facão. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em processo contínuo, com duração de 3h, utilizando aparelho de Clevenger modificado acoplado a um sistema de refrigeração com temperatura de 15°C. OEAC foi centrifugado e seco com sulfato de sódio anidro e refrigerado a 5-10°C.

#### **3.2 Identificação dos compostos majoritários**

Para quantificação dos constituintes, foi realizada análise do OEAC por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC) equipado com coluna capilar DB-5 (30m x 0,25 mm x 0,25µm), nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,2 mL/min), injeção splitless (split flow 20:1) temperaturas do injetor e detector 250°C e aquecimento da coluna de 60 a 240°C (variação de 3°C/min). A análise qualitativa foi realizada nas mesmas condições, usando cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), gás de arraste: Hélio, fonte de íons: 70 eV (impacto eletrônico), temperatura da fonte de íons e da linha de transferência de 200°C. A análise foi realizada no Museu Emilio Goeldi com a colaboração da Prof Dr<sup>a</sup> Eloisa Helena de Aguiar Andrade.

#### **3.3 Isolamento do 1-nitro-2-feiletano**

Para isolamento do composto majoritário, o OEAC (1,0 g) foi fracionado em coluna em gel de sílica 60 (70 – 230 mesh). A coluna foi eluída

com misturas de hexano/acetato de etila em ordem crescente de polaridade variando de 0 a 15% de acetato de etila. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas por cromatografia em camada delgada e CG-DIC.

### **3.4 Animais**

O projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Animais da Universidade Federal do Pará (UFPA), de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais. Foram utilizados Ratos Wistar, machos (n = 50), jovens adultos, 60 dias, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos em condições padronizadas de temperatura (22°+ 2°C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida ad libitum. Os animais foram separados em caixas medindo 41x34x17 cm, em grupos de 5 animais para evitar estresse por isolamento. Os experimentos foram realizados em salas com lâmpadas fluorescentes para iluminação (12lux) no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento da Faculdade de Farmácia da UFPA.

### **3.3 Grupos experimentais e tratamento**

O estudo consistiu em investigar se o OEAC e NFE revertem o dano de memória e aprendizado induzido por escopolamina em ratos machos. Para avaliar tal efeito, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos com n= 10 animais por grupo:

- I. CONTROLE;
- II. ESCOP;
- III. ESCOP + OEAC;
- IV. ESCOP + DNPZ
- V. ESCOP + NFE.

O experimento foi dividido em duas fases:

#### 3.4.1 Fase do dano:

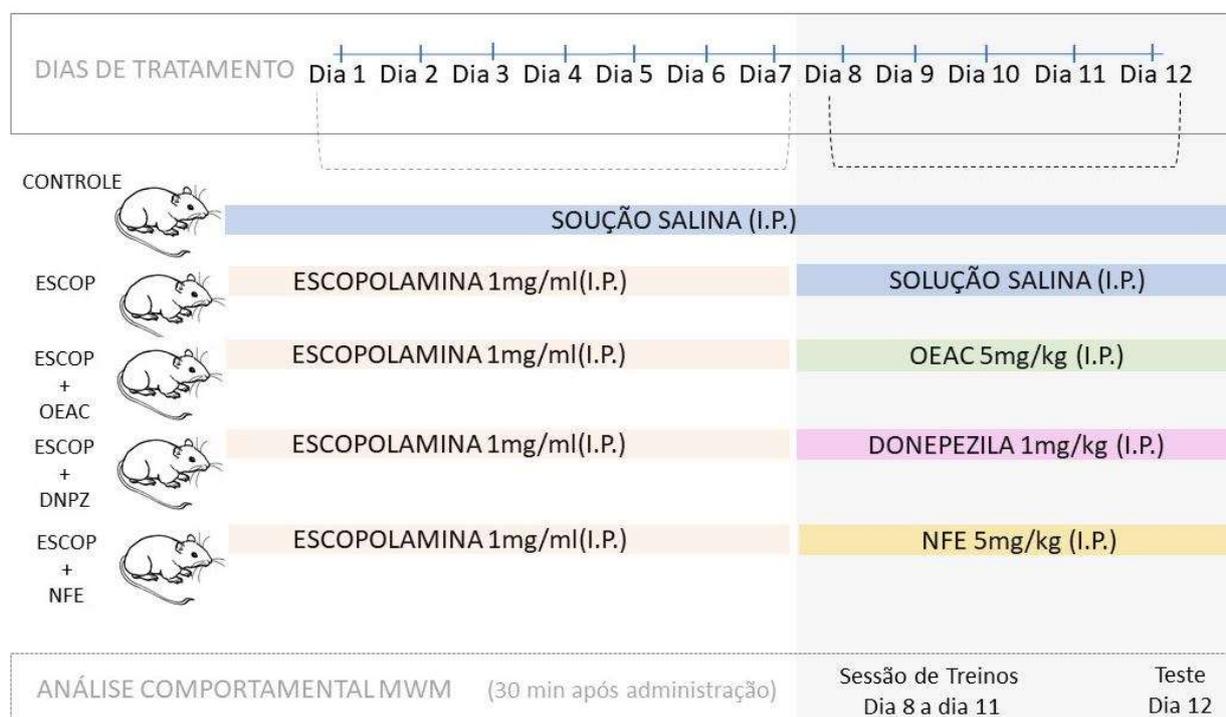
Essa fase consistiu em causar danos à memória e aprendizado dos roedores. Foi administrada via i.p. 1 mg/kg de ESCOP por 7 dias consecutivos (1° ao 7° dia) nos grupos II, III, IV e V. O grupo I, que corresponde ao controle basal recebeu somente o veículo (solução salina). Este protocolo e a dose da escopolamina foram baseados nos estudos de Haider *et al.* (2016) e Rahimzadegan *et al.* (2018).

#### 3.4.2 Fase reversão do dano:

A segunda fase consistiu em avaliar o efeito do óleo essencial na reversão do dano causado pela escopolamina (8° ao 12° dia). Cada grupo recebeu o seguinte tratamento:

- I. CONTROLE: Solução salina (i.p.);
- II. ESCOP: Solução salina (i.p.);
- III. ESCOP + OEAC: dose que correspondesse a 5mg/ kg de 1-nitro-2-feniletano no óleo essencial de *A. canelilla* (i.p.);
- IV. ESCOP + DNPZ: 1 mg/kg de donepezila (oral).
- V. ESCOP + NFE: 5mg/ kg de 1-nitro-2-feniletano (i.p.);

A dose do OEAC foi baseada no estudo de Oyemitan *et al.* (2013), no qual se observou que 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte do OEAC, possui efeito hipnótico em doses de 100 mg/kg e efeito ansiolítico em 5 mg/kg. Para evitar hipnose foi utilizada dose do óleo essencial inferiores a 100 mg/kg de 1-nitro-2-feniletano, mas em quantidade que mostrou efeito sobre o sistema nervoso central. Sendo assim, foi escolhida uma dose do óleo equivalente a 5 mg/kg de 1-nitro-2-feniletano, calculada com base na % de 1-nitro-2-feniletano. Como controle positivo foi utilizado donepezila (DNPZ) 1 mg/kg (Qu et al. 2017). Após 30 minutos das administrações, os animais foram submetidos as análises comportamentais (Figura 8).

**Figura 8 \_** Esquema de tratamento dos grupos.

*Legenda:* Esquema de tratamento dos grupos. Fase do dano: dia 1 ao dia 7; Fase da reversão do dano: Dia 8 ao dia 14.

### 3.5 Análise comportamental

#### 3.5.1 Teste de labirinto aquático de Morris (Morris Water Maze, MWM)

O teste de Morris Water Maze (MWM) consiste em um labirinto de água composto por um tanque circular (183 cm de diâmetro e 58 cm de altura) com uma plataforma oculta (Figura 9). O tanque foi preenchido com água e corante preto, não tóxico solúvel e temperatura ajustada para  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , dividido em quatro quadrantes iguais. Uma plataforma transparente (4 cm de diâmetro e 18 cm de altura) foi colocada no centro de um dos quatro quadrantes da piscina e submersa 2 cm abaixo da superfície da água, de modo que fique invisível na superfície. A posição da plataforma para escape permaneceu inalterada ao longo do experimento.

Do 8º dia ao 11º dia os ratos foram submetidos a uma sessão de treinamento consistindo em quatro tentativas, cada uma partindo de um quadrante diferente e com tempo máximo de 60 segundos. O animal que não conseguiu localizar a plataforma dentro de um tempo máximo de 60 s, foi colocado suavemente na plataforma e permaneceu nela por 15 s. As latências

de escape (LE) foram registradas e a média calculada para cada animal. Após os 4 dias consecutivos de treinamento foi aplicado o teste (no 12º dia), no qual a plataforma de escape foi removida do tanque e permitido o animal explorar por um tempo de 60 s. O tempo gasto no quadrante-alvo (que anteriormente continha a plataforma oculta) e trajetória de nado foi monitorada usando um sistema de rastreamento de vídeo (ANY-maze). O protocolo experimental foi baseado em Morris (1982) e Malik *et al.* (2017).

### **3.6 Análise estatística**

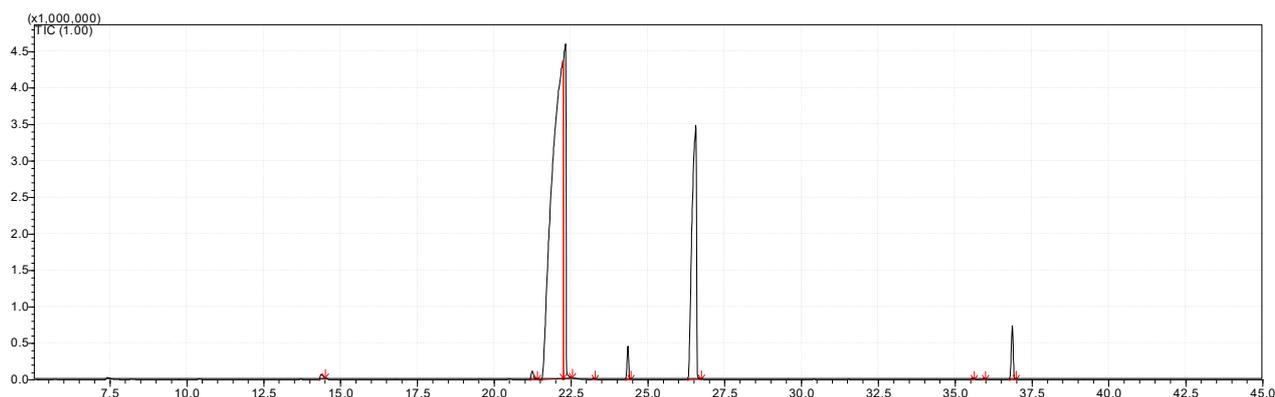
Os resultados do estudo comportamental do teste de MWM foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão e analisados no teste estatístico de normalidade Shapiro-Wilk e comparados usando ANOVA de uma via com medidas repetidas para os dados do treino, e ANOVA de uma via sem medidas repetidas para os dados do teste, seguidos pelo post hoc de Bonferroni e de Tukey quando necessário. Nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Principais constituintes do OEAC

A partir da análise química do OEAC realizada por CG-EM, identificou-se como constituintes majoritários dois fenilpropanóides: NFE (76.2%) e metileugenol (19.62%).

**Figura 9** \_ Cromatograma do Óleo essencial de *A. canella*.

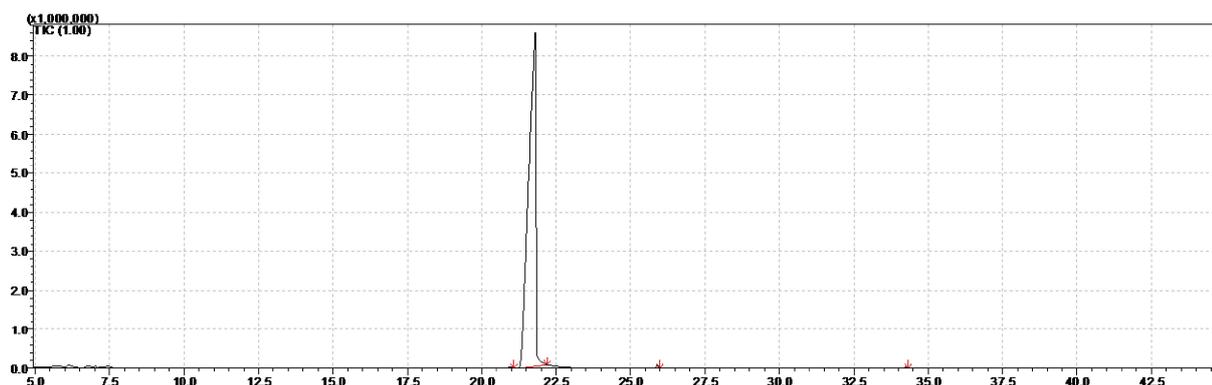


**Tabela 1** \_ composição química do óleo essencial de *A. canellila*

IR		%
1138	Benzeneacetonitrile	0.25
1290	Safrole	0.39
1311	Phenyl ethane<1-nitro-2->	76.57
1334	Phenyl-4-methyl pentan-3-one<1->	0.04
1359	Eugenol	1.0
1410	Methyl eugenol	19.8
1628	Dill apiole	0.06
1638	Eudesmol<gamma->	0.04
1661	Pogostol	1.85

### 4.2 Fracionamento e identificação do composto isolado

No fracionamento do OEAC e monitoramento por CCD foram obtidas 3 frações. Estas foram enviadas para o Museu Emilio Goeldi para identificação por comparação de seu espectro de massa e índice de retenção com o obtido na identificação do óleo essencial de origem, usando CG-EM. O 1-nitro-2-feniletano (99,43%) foi obtido na fração 1.

**Figura 10** \_ Cromatograma da fração 1.**Tabela 2** \_ composição química da fração 1.

IR		%
1283	safrole	0.19
1302	Phenyl ethane<1-nitro-2->	99.43
1394	Tetradecane	0.26
1595	Hexadecane	0.12

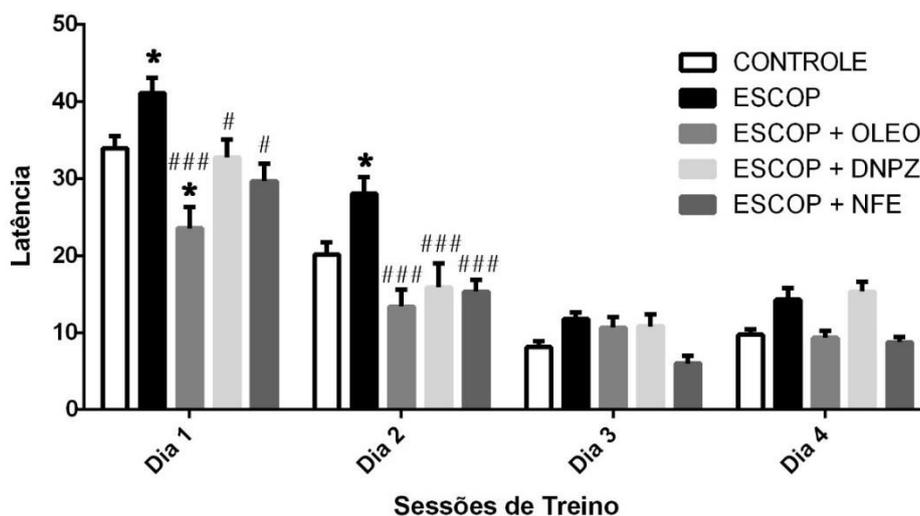
### 4.3 Teste do labirinto aquático de Morris

Na avaliação de aprendizado e melhoria de memória do OEAC e NFE foram registrados a LE para cada grupo durante os quatro dias da sessão de treinos de MWM (8º, 9º, 10º e 11º dia) como mostra a Figura 11. O grupo basal apresentou redução significativa na LE no primeiro dia de treino em relação ao segundo, terceiro e quarto dia. Efeito semelhante foi observado no grupo tratado com ESCOP. O grupo tratado com OEAC apresentou diferença significativa na LE no primeiro dia de treino em relação ao terceiro e quarto dia, semelhantemente foi observado no grupo que recebeu DNPZ. Os animais tratados com NFE apresentaram diferença significativa na LE no dia primeiro em relação ao segundo, terceiro e quarto dia. É possível observar um efeito significativo no desempenho dos animais ao longo das sessões de treino com diminuição gradual e significativa na LE em todos os grupos durante os 4 dias. Esse resultado demonstra que houve aprendizado ao longo da sessão de treinos por todos os grupos avaliados

O grupo tratado com ESCOP levou mais tempo para encontrar a plataforma em relação aos demais grupos no dia 1 e dia 2, com diferença significativa de  $p < 0,05$ . No dia 1 observou-se também diferença entre o grupo

OEAC e controle. No dia 3 e 4 não houve diferença significativa entre os grupos. Nota-se que os animais do grupo controle do dano (SCOP) tiveram prejuízo na aprendizagem apresentando retardo em relação ao grupo basal e aos demais, além disso verifica-se que os grupos OEAC e NFE apresentaram bom desempenho semelhante ao grupo basal.

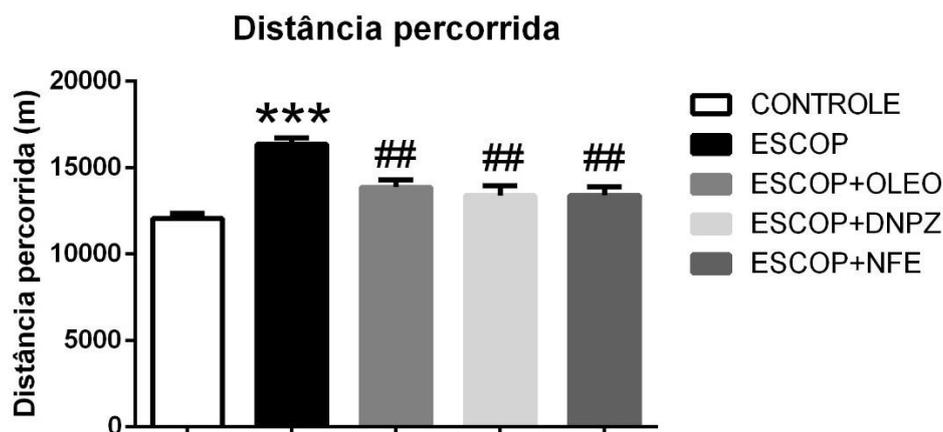
**Figura 11** \_ Efeito do OEAC e NFE sobre a latência de escape (LE).



*Legenda:* As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. da latência, em segundos, gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação com o grupo controle; #  $p < 0,05$  e ###  $p < 0,001$  em comparação com o grupo escopolamina.

Para o teste de sonda, os parâmetros analisados foram distância total percorrida e tempo no quadrante-alvo. Em relação a distância total percorrida (Figura 12), o grupo CONTROLE, OEAC, DNPZ e NFE apresentaram o mesmo desempenho, ou seja, não houve diferença significativa entre eles. O grupo ESCOP percorreu uma distância maior em relação aos demais ( $p < 0,05$ ). Esses resultados apontam para um prejuízo da recuperação da memória construída ao longo dos treinos pelo grupo ESCOP, demonstram também melhoria de memória promovida pelo grupo OEAC, DNPZ e NFE ao apresentar desempenho semelhante ao basal.

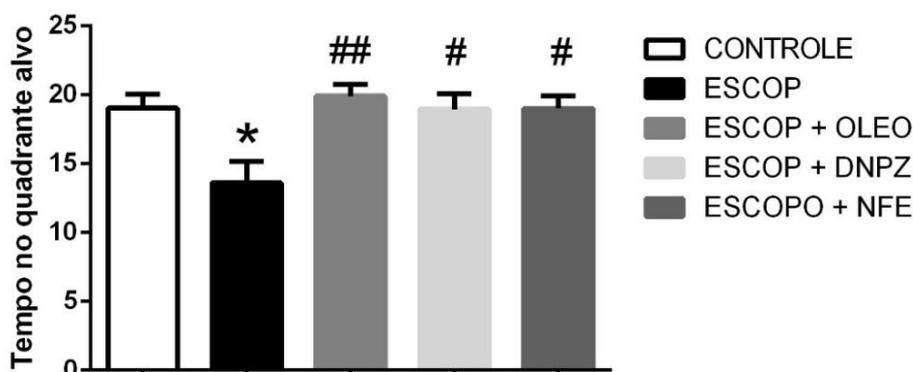
**Figura 12 \_ Distância total percorrida no teste MWM**



*Legenda:* As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. da distância total percorrida pelos animais durante o teste de sonda. \*\*\* $p < 0.001$  em comparação ao grupo de controle; ##  $p < 0,01$  em comparação ao grupo escopolamina.

Quanto ao tempo no quadrante-alvo (Figura 13), o grupo CONTROLE, OEAC, DNPZ e NFE apresentaram o mesmo comportamento, gastando mais tempo no quadrante que durante a sessão de treinos continha a plataforma. Já o grupo ESCOP foi o que passou menos tempo no quadrante-alvo com diferença estatística de  $p < 0,05$ . Esses resultados, semelhante ao parâmetro da distância total percorrida, demonstram que apesar da ESCOP prejudicar a evocação de memória, O OEAC, DNPZ e NFE puderam reverter tal prejuízo, igualando tais grupos a comportamento e desempenho semelhante ao dos animais do grupo controle basal.

**Figura 13 \_ Tempo no quadrante alvo no teste MWM.**



*Legenda:* As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo, em segundos, que os animais permaneceram no quadrante-alvo, o qual durante a fase de treinos continha a plataforma. \* $p < 0.05$  em comparação com o grupo de controle; #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  em comparação com o grupo escopolamina.

## 5. Discussão

A *Aniba canelilla* é uma planta amazônica amplamente utilizada na medicina tradicional para distúrbios digestivos, respiratórios, inflamatórios, dolorosos e do sistema nervoso central. Esta espécie é produtora de OE constituído principalmente por fenilpropanóides, em destaque o NFE (76.2%) e ME (19.62%). O OEAC pode ser extraído a partir de diferentes partes da planta como madeira do tronco, galhos, folhas, caules finos e cascas, resultando em variação quanto ao rendimento e percentual dos seus constituintes principais (SOUZA-JUNIOR et al., 2020). De acordo com Manhães et al. (2012) a composição fitoquímica e rendimento do OEAC também variam de acordo com o clima, incidência solar, umidade e o tipo de solo. Durante período chuvoso, há maior concentração de NFE com porcentagem de 95%, enquanto o metileugenol fica em torno de 18%. No período seco há desfavorecimento na concentração de NFE (aproximadamente 40%) e aumento na concentração de ME que pode atingir 45%.

Os resultados da análise fitoquímica deste estudo, corroboram com os dados na literatura, sendo identificados os dois componentes majoritários (O NFE com 99,43% e ME 18,8%), observa-se que a parte da planta utilizada, madeira do tronco, favoreceu a obtenção de uma alta concentração de NFE e um bom rendimento do OEAC. O NFE como constituinte majoritário confere ao óleo um gama de atividades biológicas já comprovadas como antinociceptiva, antiinflamatória, cardio-moduladora, hipotensora por mecanismos vasorrelaxantes, hipnótica, ansiolítica, anticolinesterásica e antibiótica. (MAIA et al., 2001; DE FILIPPS et al., 2004; SOUSA et al., 2009; MANHÃES et al., 2012; SILVA et al., 2014; SOUZA-JUNIOR et al. 2020).

Com base na atividade inibitória sobre a enzima AChE do OEAC e NFE, o presente trabalho destaca o potencial de atuarem nas vias colinérgicas centrais relacionadas a atividade cognitiva, através do modelo de dano de memória causado pela escopolamina. A escopolamina causa déficits cognitivos, sendo amplamente usada como modelo experimental de DA em estudos pré-clínicos e clínicos envolvendo voluntários jovens saudáveis e roedores. Admite-se que o principal mecanismo induzido pela escopolamina é o bloqueio dos receptores muscarínicos, mas também é observado efeitos residuais após um período de

administração. Acredita-se que esses efeitos resultem do aumento da atividade AchE, indução de estresse oxidativo, apoptose, respostas inflamatórias no tecido cerebral e diminuição de BDNF persistente (LENZ *et al.* 2012; SILVA *et al.*, 2014; HAIDER *et al.* 2016 e RAHIMZADEGAN *et al.* 2018).

A escopolamina foi administrada por sete dias consecutivos (RAHIMZADEGAN *et al.* 2018) para causar um dano de memória e posteriormente verificar se o OEAC e NFE revertem o dano cognitivo. Para tanto, aplicou-se o teste MWM (MORRIS 1984), considerado uma boa ferramenta para analisar aprendizagem espacial, memória dependente do hipocampo e detectar sistemas colinérgicos centrais. Entre os parâmetros utilizados para análise mnemônica tem-se LE, tempo que os animais levam para encontrarem a plataforma submersa no quadrante-alvo, com este parâmetro é possível observar a aprendizagem e memória, pois ao longo das sessões de treinos os animais tendem a apresentar redução na LE, ou seja, levam menos tempo para encontrar a plataforma, isto representa aquisição e evocação da memória (HAIDER *et al.* 2016 e RAHIMZADEGAN *et al.* 2018).

No presente estudo observa-se que houve aprendizado e conseqüentemente aquisição de memória pelos animais durante as sessões de treino, pois estes tiveram redução na LE. Entretanto, é possível notar que a escopolamina afeta de forma significativa a aquisição de memória, no dia 1 e 2 o grupo ESCOP teve maior LE em relação ao grupo controle basal e aos grupos OEAC, DNPZ e NFE. Nos dias 3 e 4 não houve diferença significativa entre os grupos. Esses resultados demonstram dano causado pela escopolamina e que este não impede totalmente o aprendizado, mas causa prejuízo que pôde ser superado pela quantidade de treinos que cada grupo recebeu. Avaliando a LE dos grupos OEAC, DNPZ e NFE pode-se notar que estes revertem o dano no aprendizado causado pela escopolamina, pois obtiveram desempenho igual ou superior ao grupo controle.

Após 24h do último dia de treino, realizou-se o teste de sonda, no qual verificou-se também o aprendizado e principalmente a memória de longa duração a partir dos parâmetros: distância total percorrida e tempo que cada animal ficou no quadrante-alvo. Os resultados mostram que o antagonista dos receptores muscarínicos, ESCOP, prejudicou aprendizagem espacial e a

memória de longa duração, pois os animais deste grupo apresentaram uma trajetória de nado maior e tempo no quadrante alvo reduzido em relação ao grupo tratado com solução salina. Os grupos OEAC, DNPZ e NFE mostraram um claro efeito benéfico sobre o déficit ocasionado previamente pela ESCOP, pois apresentaram menor trajeto de nado e maior tempo no quadrante alvo (MORRIS, 1982; KIM *et al.* 2017 e 2018).

Estudos farmacológicos revelam que os receptores colinérgicos muscarínicos participam maciçamente dos processos cognitivos, ao passo que as drogas que estimulam a transmissão de ACh apresentam melhora da cognição. De acordo com Silva *et al.* (2014) o OEAC e o NFE são fortes inibidores da AChE, enquanto o ME, segundo maior componente do OEAC, não inibe tal enzima. Sendo assim, estes resultados juntamente com a literatura disponível evidenciam que o OEAC e NFE atuam sobre memória promovendo melhoramento cognitivo por meio da inibição de AchE e consequente aumento de ACh na fenda sináptica, favorecendo vias colinérgicas no neocórtex e no hipocampo (FRANCIS *et al.* 1993; CHEN *et al.* 2008; JAMALI-RAEUFY *et al.* 2011; KIM *et al.* 2018). Mesmo com equivalência nos resultados obtidos em relação ao OEAC e a substância pura, vale ressaltar a importância do isolamento do NFE pois, o ME é considerado cancerígeno e genotóxico (GROH *et al.* 2016), dessa forma o uso do NFE puro garante maior controle toxicológico e evita exposição ao ME.

## **6. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados comportamentais do presente estudo, é possível concluir que o OEAC e seu constituinte principal NFE atuam sobre a memória revertendo dano cognitivo causado pelo antagonista muscarínico ESCOP, administrada por 7 dias consecutivos. Conclui-se tal efeito benéfico observado no OEAC esta intrinsecamente relacionado ao NFE, sendo o responsável por atuar inibindo a enzima AChE, favorecendo o aumento de ACh no SNC reforçando as vias colinérgicas relacionadas da memória. Este trabalho abre possibilidade para investigar outros mecanismos adjacentes bem como explorar o potencial antioxidante e anti-inflamatório da espécie a nível de SNC.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Chicago, c2019. Disponível em: <<https://www.alz.org/>>. Acesso em: 11 jun 2019.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. Londres. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/>>. Acesso em: 11 jun 2019.
- BRITO, T. S., LIMA, F. J. B., ARAGÃO, K. S., DE SIQUEIRA, R. J. B., SOUSA, P. J. C., MAIA, J. G. S., MAGALHÃES, P. J. C. (2013). The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. *Biochemical Pharmacology*, 85(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.012>
- CHEN, J., LONG, Y., HAN, M., WANG, T., CHEN, Q., & WANG, R. (2008). Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(3), 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.03.029>
- COOKE, S. F., & BLISS, T. V. P. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129(7), 1659–1673. <https://doi.org/10.1093/brain/awl082>
- COUSINS, J. N., & FERNÁNDEZ, G. (2019). The impact of sleep deprivation on declarative memory. *Progress in Brain Research*, 246, 27–53. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.01.007>
- COZZOLINO, R., GUARALDI, D., GIULIANI, A., GHIRARDI, O., RAMACCI, M. T., & ANGELUCCI, L. (1994). Effects of concomitant nicotinic and muscarinic blockade on spatial memory disturbance in rats are purely additive: Evidence from the morris water task. *Physiology and Behavior*, 56(1), 111–114. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90267-4)
- CUMMINGS, J., LEE, G., MORTSDORF, T., RITTER, A., & ZHONG, K. (2017). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 3(3), 367–384. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.05.002>
- DA SILVA, J. K. R., SOUSA, P. J. C., ANDRADE, E. H. A., & MAIA, J. G. S. (2007). Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of Aniba canelilla (H.B.K.) Mez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9422–9426. <https://doi.org/10.1021/jf071928e>
- EICHENBAUM, H. (2001). The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural Brain Research*, 127(1–2), 199–207. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432801003655>
- FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., DE OLIVEIRA SOUSA, M., ALEXANDRE, R., & RODRIGUES, F. (2006). Plantas Mediciniais como Fonte de

Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Multiciência*, 17(1), 1–8.

FORLENZA, O. V. (2005). Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, 32(3), 137–148.  
<https://doi.org/10.1590/S0101-60832005000300006>

FRANCIS, P. T., PALMER, A. M., SNAPE, M., & WILCOCK, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 67(4), 558–558.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp.67.4.558>

FUSTER, J. M., & BRESSLER, S. L. (2012). Cognit activation: A mechanism enabling temporal integration in working memory. *Trends in Cognitive Sciences*, 16(4), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.03.005>

GIONGO, J. L., VAUCHER, R. A., DA SILVA, A. S., OLIVEIRA, C. B., DE MATTOS, C. B., BALDISSERA, M. D., DA VEIGA JUNIOR, V. F. (2017). Trypanocidal activity of the compounds present in Aniba canelilla oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes. *Microbial Pathogenesis*, 103(2017), 13–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.006>

GOTTLIEB, O. R. (1972). Chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry*, 11(5), 1537–1570. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(72\)85001-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(72)85001-5)

GOVERDHAN, P., SRAVANTHI, A., & MAMATHA, T. (2012). Neuroprotective Effects of Meloxicam and Selegiline in Scopolamine-Induced Cognitive Impairment and Oxidative Stress. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/974013>

GROH, I.A., RUDAKOVSKI, O., GRÜNDKEN, M., SCHROETER, A., MARKO, D. Esselen M. Methyleugenol and oxidative metabolites induce DNA damage and interact with human topoisomerases. *Arch Toxicol*. 2016 Nov;90(11):2809-2823. doi: 10.1007/s00204-015-1625-3. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26542539.

HAFEZ, H. S., GHAREEB, D. A., SALEH, S. R., ABADY, M. M., EL DEMELLAWY, M. A., HUSSIEN, H., & ABDEL-MONEM, N. (2017). Neuroprotective effect of ipriflavone against scopolamine-induced memory impairment in rats. *Psychopharmacology*, 234(20), 3037–3053.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-017-4690-x>

HAIDER, S., TABASSUM, S., & PERVEEN, T. (2016). Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study. *Brain Research Bulletin*, 127, 234–247.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.10.002>

- INTERAMINENSE LDE F, DE SIQUEIRA RJ, XAVIER FE, DUARTE GP, MAGALHÃES PJ, DA SILVA JK, MAIA JG, SOUSA PJ, LEAL-CARDOSO JH, L. S. (2011). Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, in spontaneously hypertensive rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 25(6), 661–669. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2010.00891.x>
- INTERAMINENSE, L. D. F. L., RAMOS-ALVES, F. E. DOS, DE SIQUEIRA, R. J. B., XAVIER, F. E., DUARTE, G. P., MAGALHÃES, P. J. C., LAHLOU, S. (2013). Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4–5), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.033>
- IZQUIERDO, I. Memória. 3ª Edição. São Paulo. Artmed, 2018
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., VIANNA, M. R. M., IZQUIERDO, L. A., & BARROS, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00036-4)
- JAMALI-RAEUFY, N., NASEHI, M., EBRAHIMI-GHIRI, M., & ZARRINDAST, M. R. (2011). Cross state-dependency of learning between WIN55, 212-2 and scopolamine in rat dorsal hippocampus. *Neuroscience Letters*, 491(3), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.01.056>
- JONES M.W., WILSON M.A. (2005) Theta Rhythms Coordenar Interações Hippocampal – Pré-Frontal em uma Tarefa de Memória Espacial. *PLoS Biol* 3 (12): e402. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030402>
- KALRA, P. B., GABRIELI, J. D. E., & FINN, A. S. (2019). Evidence of stable individual differences in implicit learning. *Cognition*, 190(July 2018), 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2019.05.007>
- KIM, H. B., LEE, S., HWANG, E. S., MAENG, S., & PARK, J. H. (2017). p-Coumaric acid enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(3), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.068>
- KIM, M.-S., LEE, D. Y., KIM, H. W., SUNG, S. H., LEE, J., HAN, J.-S., & JEON, W. K. (2018). Terminalia Chebula Extract Prevents Against Scopolamine-Induced Amnesia Via Cholinergic Modulation and Anti-Oxidative Effect in Mice. *Alzheimer's & Dementia*, 13(7), P273. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.06.157>
- KOUÉMOU, N. E., TAIWE, G. S., MOTO, F. C. O., PALE, S., NGOUPAYE, G. T., NJAPDOUNKE, J. S. K., BUM, E. N. (2017). Nootropic and neuroprotective effects of Dichrocephala integrifolia on scopolamine mouse

model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 8(NOV), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00847>

LAVIER, K., DYER, S., WHITEHEAD, C., CLEMSON, L., & CROTTY, M. (2016). Interventions to delay functional decline in people with dementia: A systematic review of systematic reviews. *BMJ Open*, 6(4).  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010767>

LAHLOU, S., MAGALHÃES, P. J. C., DE SIQUEIRA, R. J. B., FIGUEIREDO, A. F., INTERAMINENSE, L. D. F. L., MAIA, J. G. S., & SOUSA, P. J. D. C. (2005). Cardiovascular Effects of the Essential Oil of Aniba canelilla Bark in Normotensive Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46(4), 412–421. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000175876.25296.f4>

LEE, B., SUR, B., SHIM, I., LEE, H., & HAHM, D.-H. (2014). Effect of acupuncture stimulation on scopolamine-induced impairment of spatial working memory via activation of cholinergic system and regulation of BDNF and CREB expressions in rats. *Integrative Medicine Research*, 4(1), 66. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2015.04.074>

LENT, R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos e fundamentos de neurociência. 2ª Edição. Rio de Janeiro. Atheneu, 2010

LI, S. P., WANG, Y. W., QI, S. L., ZHANG, Y. P., DENG, G., DING, W. Z., WANG, C. H. (2018). Analogous  $\beta$ -carboline alkaloids harmaline and harmine ameliorate scopolamine-induced cognition dysfunction by attenuating acetylcholinesterase activity, oxidative stress, and inflammation in mice. *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR), 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00346>

MAIA, J.G., ZOGHBI, M.G., ANDRADE, E.H. (2001). Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém: Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeldi

MALIK, J., KAUR, J., & CHOUDHARY, S. (2017). Standardized extract of *Lactuca sativa* Linn. and its fractions abrogates scopolamine-induced amnesia in mice: A possible cholinergic and antioxidant mechanism. *Nutritional Neuroscience*, 21(5), 361–372.  
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1291166>

MANHÃES, A. P., VEIGA-JÚNIOR, V. F., WIEDEMANN, L. S. M., FERNANDES, K. S., & SAMPAIO, P. DE T. B. (2012). Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of Aniba canelilla (H.B.K.) (Lauraceae) in the Central Amazon. *Acta Amazonica*, 42(3), 355–362. <https://doi.org/10.1590/s0044-59672012000300007>

MATSUO, M., KIRKLAND, D. F., & UNDERHILL, E. W. (1972). 1-Nitro-2-phenylethane, a possible intermediate in the biosynthesis of

benzylglucosinolate. *Phytochemistry*, 11(2), 697–701.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(72\)80034-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(72)80034-7)

MANGIALASCHE, F., KIVIPELTO, M., SOLOMON A., FRATIGLIONI, L.,  
(2012). Dementia prevention: Current epidemiological evidence and future  
perspective. *Alzheimer's Research and Therapy*, 4(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.1186/alzrt104>

MILLER, E. K., & COHEN, J. D. (2001). An integrate theory of PFC function.  
*Annual Review of Neuroscience*, 24, 167–202.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>

MOYANO, M. D., DIEKELMANN, S., PEDREIRA, M. E., & FORCATO, C.  
(2019). Sleep accelerates re-stabilization of human declarative memories.  
*Neurobiology of Learning and Memory*, 162, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.04.012>

MORRIS, R.G.M., GARRUD P., RAWLINS, J.N.P., OKEEFE, J. (1982). *Place  
navigation impaired in rats with hippocampal lesions*. *Nature*.

MÜLLER, P., FENDT, M., & MÜLLER, N. G. (2019). Pharmakologische  
Therapie der Alzheimer-Demenz. *Der Internist*.  
<https://doi.org/10.1007/s00108-019-0625-4>

OGER, J. M., RICHOMME, P., GUINAUDEAU, H., BOUCHARA, J. P., &  
FOURNET, A. (1994). Aniba canelilla (H.B.k.) mez essential oil: Analysis of  
chemical constituents, fungistatic properties. *Journal of Essential Oil  
Research*, 6(5), 493–497. <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9698432>

OYEMITAN, I. A., ELUSIYAN, C. A., AKANMU, M. A., & OLUGBADE, T. A.  
(2013). Hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic effects of 1-nitro-2-  
phenylethane isolated from the essential oil of *Dennettia tripetala* in mice.  
*Phytomedicine*, 20(14), 1315–1322.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.07.005>

PEREIRA, L. M., DE CASTRO, C. M., GUERRA, L. T. L., QUEIROZ, T. M.,  
MARQUES, J. T., & PEREIRA, G. S. (2019). Hippocampus and Prefrontal  
Cortex Modulation of Contextual Fear Memory Is Dissociated by Inhibiting  
De Novo Transcription During Late Consolidation. *Molecular Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1463-4>

QU, Z., ZHANG, J., YANG, H., GAO, J., CHEN, H., LIU, C., & GAO, W. (2017).  
*Prunella vulgaris* L., an edible and medicinal plant, attenuates  
scopolamine-induced memory impairment in rats. *Journal of Agricultural  
and Food Chemistry*, 65(2), 291–300.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04597>

RAHIMZADEGAN, M., & SOODI, M. (2017). Comparison of memory  
impairment and oxidative stress following single or repeated doses

administration of scopolamine in rat hippocampus. *Basic and Clinical Neuroscience*, 9(1), 5–14.

- RODRIGUES, E., & CARLINI, E. A. (2006). Plants with possible psychoactive effects used by the Krahô Indians, Brazil. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 28(4), 277–282. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242806>
- SILVA, N. N. S., SILVA, J. R. A., ALVES, C. N., ANDRADE, E. H. A., DA SILVA, J. K. R., & MAIA, J. G. S. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of Aniba canelilla essential oil. *Chemical Biology and Drug Design*, 84(2), 192–198. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12304>
- SIPE, H.J. JR., LARDINOIS, O.M., MASON, R.P. (2014). Free Radical Metabolism of Methyleugenol and Related Compounds. *Chem Res Toxicol.* 27:4, 483-9.
- SOUZA-JUNIOR, FJC, LUZ-MORAES, D., PEREIRA, FS, BARROS, MA, FERNANDES, LMP, QUEIROZ, LY, MAIA, CF, MAIA, JGS, FONTES-JUNIOR, EA (2020). Aniba canelilla (Kunth) Mez (Lauraceae): Uma revisão das propriedades etnobotânicas, fitoquímicas, antioxidantes, antiinflamatórias, cardiovasculares e neurológicas. *Frontiers in Pharmacology*, 11. doi: 10.3389 / fphar.2020.00699
- SOUSA, P. J. C., ARAUJO, J. S., PEREIRA, L. L. S., MODRO, M. N. R., MAIA, J. G. S., ARAUJO, M. T. F., PERAZZO, F. F. (2009). Phytochemical and toxicological evaluations of the essential oil from the bark of aniba canelilla (h.B.K.) Mez. *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 381–384. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700197>
- STELLA, F., RADANOVIC, M., CANINEU, P. R., DE PAULA, V. J. R., & FORLENZA, O. V. (2015). Anti-dementia medications: Current prescriptions in clinical practice and new agents in progress. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 6(4), 151–165. <https://doi.org/10.1177/2042098615592116>
- SUGIMOTO, M.A., DE JESUS AMAZONAS DA SILVA, M., FROEDE BRITO, L., DOS SANTOS BORGES, R., AMARAL, F.A., DE ARAUJO BOLETI, A.P., ORDOÑEZ, M.E., CARLOS TAVARES, J., PIRES SOUSA, L., LIMA, E.S. (2017). Anti-Inflammatory Potential of 1-Nitro-2-Phenylethylene. *Molecules*. 22: 11, 1977.
- WANG, Y. (2015). Effects of Long-term Exercise on Spatial Learning, Memory Ability, and Cortical Capillaries in Aged Rats. *Medical Science Monitor*, 21, 945–954. <https://doi.org/10.12659/msm.893935>
- TAVEIRA, F. S. N., DE LIMA, W. N., ANDRADE, E. H. A., & MAIA, J. G. S. (2003). Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla. *Biochemical*

*Systematics and Ecology*, 31(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00088-1)

VON ARNIM, C.A.F., BARTSCH, T., JACOBS, A. H. ET AL. Z. G. G. (2019). Diagnosis and treatment of mild cognitive impairment. *Clinical Geriatrics*, 18(4), 30–36. <https://doi.org/10.1007/s00391-019-01560-0>.

WINBLAD, B., GAUTHIER, S., ÅSTRÖM, D., & STENDER, K. (2010). Memantine benefits functional abilities in moderate to severe Alzheimer's disease. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 14(9), 770–774. <https://doi.org/10.1007/s12603-010-0122-x>

WIRT, R. A., & HYMAN, J. M. (2019). ACC Theta Improves Hippocampal Contextual Processing during Remote Recall. *Cell Reports*, 27(8), 2313-2327.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.080>

WOODSON, J. C., MACINTOSH, D., FLESHNER, M., & DIAMOND, D. M. (2003). Emotion-induced amnesia rats: Working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learning and Memory*, 10(5), 326–336. <https://doi.org/10.1101/lm.62903>

WHITEHOUSE, P. J., DONALD L. P., ROBERT, G. S., ARTHUR, W. C., JOSEPH, T. C., MAHLON, R. D. (1982). Alzheimer's Disease and Senile Dementia: Loss of Neurons in the Basal Forebrain. *Science*.