

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

THAÍS MOTA GOMES

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DO NIM INDIANO
(*Azadirachta indica A. Juss*) COMO ANTICOLINESTERÁSICO E NA AQUISIÇÃO
DE MEMÓRIA E APRENDIZAGEM DE RATOS**

São Luís
2018

THAÍS MOTA GOMES

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DO NIM INDIANO
(Azadirachta indica A. Juss) **COMO ANTICOLINESTERÁSICO E NA AQUISIÇÃO**
DE MEMÓRIA E APRENDIZAGEM DE RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão, para
obtenção do grau de Bacharel em
Medicina.

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Leandro
Camara

São Luís
2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Mota Gomes, Thaís.

Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas do nim indiano *azadirachta indica* a. Juss como anticolinesterásico e na aquisição de memória e aprendizagem de ratos / Thaís Mota Gomes. - 2018.
56 f.

Orientador(a): Adriana Leandro Camara.
Monografia (Graduação) - Curso de Medicina,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Anticolinesterásico. 2. *Azadirachta indica* A. Juss. 3. Doença de Alzheimer. I. Leandro Camara, Adriana. II. Título.

THAÍS MOTA GOMES

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DO NIM INDIANO
(Azadirachta indica A. Juss) **COMO ANTICOLINESTERÁSICO E NA AQUISIÇÃO**
DE MEMÓRIA E APRENDIZAGEM DE RATOS

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Leandro Camara (Orientadora)

Doutora em Ciências
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Maria Célia Pires Costa

Doutora em Química
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. Fabio de Souza Monteiro

Doutor em Farmacologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Jacira do Nascimento Serra

Doutor em Políticas Públicas
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida, pela força para enfrentar cada uma das batalhas acadêmicas, e por me possibilitar, por meio da fé, a buscar continuamente o melhor de mim como ser humano, pesquisadora e médica.

À minha orientadora, **Adriana Leandro Camara**, pela oportunidade de fazer parte da pesquisa, por ser exemplo, e contribuir sempre com o seu conhecimento e paciência. Agradeço em especial por estar comigo não só durante os dias de laboratório, mas também por abrir as portas de sua casa e se tornar minha amiga.

À minha mãe, **Antonildes Medeiros Mota Gomes**, por ser meu exemplo de mulher guerreira, forte, determinada e amorosa. A ela devo muito do que sou como pessoa, da minha vontade de crescer, do meu acreditar que sempre posso ir além. Obrigada por seu amor incondicional e por ser a mulher mais incrível de todas!

Ao meu pai, **Melvin Jones Neiva Gomes**, de quem herdei minha organização e humor. Obrigada por ser meu companheiro, por ser o pai carinhoso e cuidadoso que é. Eu nada seria sem que estivesse ao meu lado.

Aos meus irmãos, **Pedro, Giovana e Júlio Gomes**, motivo maior do meu esforço, pra quem quero sempre ser exemplo.

Ao meu namorado, **Luís Felipe Lira de Sousa**, por ser meu companheiro e suporte em meio às dificuldades, sempre disposto a me ajudar e me acalmar quando nem tudo corria como o planejado. Obrigada por sempre cuidar de mim, acreditar e incentivar.

Aos **meus avós**, bases da minha família. Agradeço principalmente a **Amauriza Medeiros Mota**, presença constante na minha vida, mulher corajosa, forte e amorosa que nunca mediu esforços para zelar por mim.

Aos **meus tios**, especialmente **Tertuliana Medeiros Mota dos Reis**, que é como uma segunda mãe para mim, uma médica excepcional e uma das maiores incentivadoras da minha jornada acadêmica.

Aos meus primos, **Ana Luiza Reis, Gabriella Mota e Iann Gabriel Mota**, por serem como irmãos e por me apoiarem, mesmo com todos os momentos em que estive ausente.

Aos meus amigos de faculdade e vida, em especial **Bruna Rocha, Gelson Arcos Jr., Igor Suzuki e Nordman Wall** por enfrentarem comigo todos esses anos de faculdade, por me apoiarem durante a pesquisa e por todos os momentos de

descontração e também de foco. Orgulho-me imensamente de vocês e sei que cada um é responsável pelas vitórias do outro.

Aos **membros do Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio)**, por todos os seminários, experimentos e eventos científicos, mas também pelas conversas e confraternizações. Serei eternamente grata por cada um que me acolheu e me ensinou. Agradeço especialmente a **Antônio Marcus de Andrade Paes** por prezar uma ciência de qualidade, por ser exigente e ser exemplo; e a **Bruno Araújo Serra Pinto** por sua disposição e parceria essencial na conclusão do trabalho.

Aos meus parceiros diretos de pesquisa, **Ana Catharinny Oliveira, Thaiane Santos, e Michael Ferreira**, que estiveram comigo em todos os momentos experimentais, com os quais pude conviver como amiga e pesquisadora. Obrigada pela amizade e pelo apoio experimental. Esse trabalho não seria possível sem vocês.

A todos os **membros da Liga Acadêmica de Oftalmologia do Maranhão (LAOF)**, pois minha jornada nesta liga me fez crescer em responsabilidade e compromisso. Agradeço por compartilhar essa paixão com pessoas tão especiais.

À orientadora da LAOF e minha orientadora pessoal, **Elaine de Paula Fiod Costa**, que por meio de outros projetos se fez crucial na minha formação. Professora, obrigada por sua dedicação, disponibilidade, perspicácia, e por ser essa inspiração como docente e oftalmologista.

À **FAPEMA**, que forneceu não só apoio financeiro para a realização do estudo, mas foi incentivadora constante dos projetos de que fiz parte através de eventos científicos, estágios e exposições.

À **Universidade Federal do Maranhão** e a todos os **funcionários e professores** que possibilitaram a realização de cada passo dessa pesquisa e da minha graduação.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.
A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

(Hipócrates)

RESUMO

Introdução: O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) é uma árvore originária da Índia, porém bastante comum no Brasil e especialmente no Maranhão. Esta árvore possui propriedades químicas e biológicas especiais, dentre elas, notório efeito inseticida. Vários trabalhos têm demonstrado que a maioria dos inseticidas possuem ação primária como anticolinesterásicos (anti-AChE), e podem ser capazes de interagir diretamente com um ou mais sítios no receptor colinérgico nicotínico (RCn). Atualmente os anti-AChE são os medicamentos mais utilizados para tratar a doença de Alzheimer (DA), a principal causa de demência no mundo e importante problema de saúde pública. **Objetivo:** Avaliar a atividade anticolinesterásica do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim indiano (EHFN) e os efeitos do tratamento com o EHFN no processo de aquisição de memória espacial em ratos. **Métodos:** Folhas do Nim coletadas na UEMA no município de São Luís-MA foram utilizadas para a preparação do EHFN, seguindo o protocolo de MATOS, 1997. A toxicidade oral do EHFN foi avaliada em ratos utilizando os parâmetros propostos por MALONE (1977). A atividade anticolinesterásica (anti-AChE e anti-BuChE) do EHFN foi mensurada em diferentes concentrações através do método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961). O Labirinto aquático de Morris (LAM) foi utilizado como método de avaliação do Processo de Aprendizagem-Memória. Para este teste 35 ratos Wistar foram divididos em três grupos: um tratado com salina (Controle, n = 11), e outros dois que receberam, respectivamente, 100mg/kg/dia (Nim 100, n = 12) e 300mg/kg/dia (Nim 300, n = 12) de EHFN por via oral durante o tratamento agudo e crônico (por 21 dias). **Resultados:** O EHFN não mostrou efeitos tóxicos nos ratos. O EHFN mostrou atividade inibitória sobre AChE ($IC_{50} = 3,25 \pm 1,04\text{mg/ml}$) e BuChE ($IC_{50} = 3,09 \pm 1,09\text{mg/ml}$). No teste LAM (comportamental), todos os grupos tiveram desempenho significativo no aprendizado quando tratados agudamente com o EHFN ou não. Porém, este desempenho foi melhorado significativamente somente nos animais tratados cronicamente com o EHFN (Nim 100 e Nim 300). No entanto, não foi demonstrada diferença significativa no tempo de permanência no quadrante alvo durante o teste do LAM. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que o EHFN possui atividade anticolinesterásica, sendo esta semelhante entre Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase e que o tratamento crônico do EHFN produz melhora de aprendizado uma vez que foi reduzido significativamente a latência de escape nestes animais, porém este tratamento não revelou nenhum efeito sobre a consolidação da aprendizagem.

Palavras Chaves: *Azadirachta indica* A. Juss. Anticolinesterásico. Doença de Alzheimer.

ABSTRACT

Introduction: Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) is a tree native to India, but very common in Brazil, notably in Maranhão. This tree has special chemical and biological properties, among them, a notorious insecticidal effect. Several studies have shown that most insecticides have primary action as anticholinesterases (anti-AChE), and may be able to interact directly with one or more sites in the nicotinic cholinergic receptor (CRn). Currently, anti-AChE are the drugs most commonly used to treat Alzheimer's disease (AD), the leading cause of dementia in the world and an important public health problem. **Objective:** To evaluate the anticholinesterase activity of the Indian Nim leaf hydroalcoholic extract (EHFN) and the effects of the treatment with EHFN in the process of spatial memory acquisition in rats. **Methods:** Leaves collected at UEMA in the city of São Luís-MA were used for the preparation of EHFN, following the protocol by MATOS, 1997. The oral toxicity of EHFN was evaluated in rats using the parameters proposed by MALONE (1977). The anticholinesterase (anti-AChE and anti-BuChE) activity of the EHFN was measured at different concentrations using the colorimetric method of Ellman *et al.* (1961). The Morris Aquatic Labyrinth (LAM) was used as an evaluation method of the Learning-Memory Process. For this test 35 Wistar rats were divided into three groups: one treated with saline (Control, n = 11), and another two receiving respectively 100mg/kg/day (Nim 100, n = 12) and 300mg/kg/day (Nim 300, n = 12) oral EHFN during acute and chronic treatment (for 21 days). Results: EHFN showed no toxic effects in rats. EHFN showed inhibitory activity on AChE (IC 50 = 3.25 ± 1.04mg/ml) and BuChE (IC 50 = 3.09 ± 1.09mg/ml). In the LAM (behavioral) test, all groups had significant learning performance when treated acutely with EHFN or not. However, this performance was significantly improved only in the animals chronically treated with the EHFN (Nim 100 and Nim 300). However, no significant difference in the time on target quadrant was demonstrated during the LAM test. **Conclusion:** This study showed that EHFN has anticholinesterase activity, being similar between Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and that the chronic treatment of EHFN produces learning improvement since the escape latency was significantly reduced in these animals, but this treatment did not show any effect on the consolidation of learning.

Keywords: *Azadirachta indica* A. Juss. Anticholinesterase. Alzheimer's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Azadirachta indica</i>	17
Figura 2	Inibição da Atividade de Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase pelo EHFN (0,3-10mg/ml).....	35
Figura 3	Efeito do Tratamento Agudo do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre a Latência de Escape (tempo para encontrar a plataforma).....	36
Figura 4	Efeito do Tratamento Agudo do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre o Tempo de Permanência no quadrante alvo no dia do Teste do Labirinto Aquático de Morris.....	37
Figura 5	Efeito do Tratamento Crônico do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre a Latência de Escape (tempo para encontrar a plataforma).....	38
Figura 6	Efeito do Tratamento Crônico do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre o Tempo de Permanência no quadrante alvo no dia do Teste do Labirinto Aquático de Morris.....	38
Figura 7	Efeito do Tratamento Agudo e Crônico do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre a Latência de Escape (tempo para encontrar a plataforma) nos dois dias de treino no Teste do Labirinto Aquático de Morris.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Partes do Nim com efeitos medicinais.....	21
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADI	Associação Internacional da Doença de Alzheimer
Anti-AChE	Anticolinesterásicos
AZA	Azadiractina
βA	β-Amilóide
BTCh	Butirilticolina
BuChE	Butirilcolinesterase
CA1	<i>Corno de Amon</i>
ChEs	Colinesterases
COX	Ciclo-oxigenase
DA	Doença de Alzheimer
DCL	Demência do Corpo de Lewy
DFT	Demência Frontotemporal
DV	Demência Vascular
EHFN	Extrato Hidroalcoólico das Folhas do Nim Indiano (<i>Azadiractha Indica</i> A. Juss)
GD	Giro Denteado
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
IC50	Concentração Inibitória Média
LAM	Labirinto Aquático de Morris
LOX	Lipo-oxigenase
LPO	Peroxidação Lipídica
NF-kB	Factor Nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
RCn	Receptor Colinérgico Nicotínico
SDAT	Demência Senil do Tipo Alzheimer
US-FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
TNF	Fatores de Necrose Tumoral
V_{máx}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	17
2.1.1	Classificação Taxonômica	17
2.1.2	Distribuição Geográfica	18
2.1.3	Propriedades químicas e utilização industrial	18
2.1.4	Propriedade medicinal	19
2.1.5	Ação inseticida e efeito anticolinesterásico	21
2.2	Demência	22
2.2.1	Doença de Alzheimer: Definição, histórico e epidemiologia	22
2.2.2	Fisiopatologia da Doença de Alzheimer	24
2.2.3	Terapia da Doença de Alzheimer	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	MATERIAIS	30
4.1	Material Botânico	30
4.2	Animais	30
4.3	Reagentes	30
4.4	Enzimas	31
4.5	Vidrarias e Equipamentos	31
5	MÉTODOS	31
5.1	Preparação do Extrato Hidalcólico das Folhas de Nim Indiano (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss) - EHFN	31
5.2	Avaliação Toxicológica do EHFN	31
5.3	Determinação da atividade anticolinesterásica do EHFN	32
5.4	Método para avaliar o processo de aprendizagem-memória: Labirinto Aquático de Morris	33
5.5	Análise estatística	34
6	RESULTADOS	35
6.1	O EHFN não apresenta ação tóxica em ratos	35

6.2	O EHFN apresenta atividade anticolinesterásica	35
6.3	O tratamento com EHFN promove melhorias de aprendizado em ratos avaliados pelo Labirinto Aquático de Morris.....	36
7	DISCUSSÃO	40
8	CONCLUSÃO	45
	REFERENCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) pertence à família Meliaceae e é originária do continente asiático (SAXENA, 1999). Atualmente, esta espécie está distribuída também nas áreas tropicais e subtropicais da África, Austrália e Américas (SCHMUTTERER, 1990). Trata-se de uma espécie bastante comum no Brasil, em especial no Estado do Maranhão. A enorme abrangência de territórios ocupados pelo Nim se deve à eficiência dos produtos dele extraído e da baixa toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente. Fato que levou o homem a disseminá-la para cultivo e pesquisa.

Praticamente todas as partes da planta são usadas: sementes, folhas, raízes e a madeira possuem usos conhecidos. Esta árvore possui propriedades químicas especiais, utilizada há mais de quatro mil anos no controle de insetos, pragas, nematóides, bactérias, fungos, piolhos, carrapatos, na medicina humana e animal, reflorestamento, fabricação de creme dental, sabonetes, sabões, cosméticos, adubação e no paisagismo, além de outras finalidades, na condição de uma planta de múltiplo uso (SUBAPRIYA, 2005; THAKURTA, 2007).

A utilização de substâncias de origem vegetal para o controle de insetos e até mesmo parasitas, tem sido amplamente estudada (CABRAL *et al.*, 1996) e um dos compostos naturais mais promissores é o Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Baseado nisso, um grupo de pesquisadores da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA desenvolveu um projeto de pesquisa intitulado: “Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de Nim Indiano (*Azadirachta Indica*) no Controle do *Aedes Aegypti* L., mosquito transmissor da Dengue” a partir do qual obtiveram um produto ovicida e larvicida viável, de fácil manipulação e sem efeito tóxico (MARINHO *et al.*, 2011). Este trabalho deu origem a Patente de Invenção intitulado: “Processo de Preparo do Extrato Hidroalcoólico das Folhas do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) com Ação Ovicida e Larvicida sobre o *Aedes aegypti*.” Cujo número é PI1003892-2 de 29 de outubro de 2010, Concedida em 06 de fevereiro de 2018.

Vários trabalhos têm demonstrado que a maioria dos inseticidas, possuem ação primária como anticolinesterásicos (anti-AChE), e além desta ação podem ainda ser capazes de interagir também diretamente com um ou mais sítios no receptor colinérgico nicotínico (RCn) (KUBA *et al.*, 1974; ARACAVA *et al.*, 1987; KAWABUCHI *et al.*, 1989; SWIERCZ *et al.*, 2013).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima éster hidrolase, sendo altamente efetiva para acetilcolina (ACh). A função da enzima acetilcolinesterase é catalisar rápida e eficientemente a hidrólise da acetilcolina. A rápida destruição da acetilcolina desativa o neurotransmissor após sua ligação ao receptor, de modo a impedir seu acúmulo nas sinapses e evitar a produção de estímulos contínuos por interações repetitivas. Como resultado, a despolarização produzida por ligação da acetilcolina ao receptor é finalizada com o objetivo de restabelecer a estabilidade da membrana pós-sináptica. Tal via é explorada por fazer parte da fisiopatologia de distúrbios demenciais como a Doença de Alzheimer (DA).

A DA é multifatorial, envolve múltiplos genes de risco e fatores ambientais, resultando em lesões de estruturas cerebrais, especialmente hipocampo e córtex (MADEO *et al.*, 2013). Os processos fisiopatológicos descritos para DA que são responsáveis pela degeneração de neurônios e sinapses (HENSTRIDGE C. M., PICKETT E., SPIRES-JONES T. L., 2016) são o acúmulo da proteína β -amilóide (β A), emaranhados neurofibrilares, dano mitocondrial, angiopatia cerebral, neuroinflamação, excitotoxicidade e estresse oxidativo (SANTOS, 2016). Em nível celular, a DA está associada à redução das taxas de acetilcolina no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica central, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão (VIEGAS JR *et al.*, 2004). Isso posto, é possível entender a importância de se estudar os inibidores da acetilcolinesterase em processos demenciais tais como a DA.

A prevalência estimada desta doença em 2015 foi de 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo e estima-se que este número quase dobre a cada 20 anos, atingindo 74,7 milhões em 2030 e 131,5 milhões em 2050 (PRINCE M.J., 2015). No Brasil, os estudos apresentam prevalência e incidência próximas aos estudos estrangeiros (LOPES E BOTTINO, 2002; NITRINI *et al.*, 2004).

Atualmente os inibidores da acetilcolinesterase como a Tacrina (Cognex®), Donepezila (Aricept®), Rivastigmina (RIV, Exelon®) e Galantamina (GAL, Reminyl®) são os medicamentos mais utilizados para tratar a doença de DA, estes inibem a enzima que degrada a ACh resultando no aumento da ACh da fenda sináptica, proporcionando assim sua ação sobre os poucos receptores existentes. Dentre os medicamentos citados acima, apenas a galantamina possui efeito de inibidor da

acetilcolinesterase e potencializador da resposta colinérgica nicotínica e é o único de origem natural.

Uma vez que o extrato hidroalcoólico das folhas do Nim mostrou atividade inseticida, e como a maioria dos inseticidas apresentam atividade anticolinesterásica, sendo esta útil no tratamento da Doença de Alzheimer, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade anticolinesterásica e potencial efeito nos processos de memória aprendizagem do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim Indiano (*Azadiractha indica* A. Juss) (EHFN) a fim de se chegar a um produto natural com ação anticolinesterásica útil no tratamento da DA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nim (*Azadirachta indica* A. Juss)

Azadirachta indica, também conhecida como Nim – “a árvore da vida”, possui um amplo espectro de atividades biológicas (GUPTA *et al.*, 2017). Somado a isso, as propriedades químicas provenientes das diversas partes da planta demonstraram grande utilidade na agropecuária e renderam a ela, em 1992, a alcunha de “a árvore que resolveria os problemas globais” em relatório da Academia Nacional de Ciências (US) (VIETMEYER, 1992).

O Nim é capaz de crescer até 15 metros mesmo em ambientes com poucas chuvas (Figura 1). Seu aparelho radicular é formado por uma raiz pivotante e raízes laterais, as quais promovem à planta sustentação e proporcionam a captura de água e nutrientes. Sua semente é marrom e seu fruto é macio e amargo (MARTINEZ, 2002; MOSSINI S.A.G., KEMMELMEIER C., 2005).



A



B

Figura 1. *Azadirachta indica*. **A:** Àrvore; **B:** folhas e frutos.

Fonte: http://web500.com.br/Nim-Site-P/Nim_Nemm_Especie.html.

2.1.1 Classificação Taxonômica

Sua classificação taxonômica deu-se em 1830 por De Jussieu (De Jussieu, 1830) apud Biswas *et al.* (2002). Pertence à ordem *Rutales*; Subordem *Rutinae*; Família *Meliaceae*, Subfamília *Melioideae*, Tribo *Melieae*, Gênero *Azadirachta* e Espécie *indica*.

2.1.2 Distribuição Geográfica

A origem da espécie Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) é incerta. Enquanto alguns atribuem a sua origem à Índia, outros acreditam que seja originário de Burma, um país do sudeste asiático. Trabalhos citam ainda Paquistão, Sri Lanka, Malásia, Indonésia e Tailândia (SAXENA, 1999).

O Nim pode ser encontrado atualmente em cerca de 72 países em todo o mundo, incluindo o Brasil, onde foi introduzido em 1984 (SURI R.K., MEHROTRA A., 1994). Possui uma variedade de sinônimos a depender do País, podendo ser chamada de Lilá indiana, Azadirakhta, Margosa, Tamar, Kohomba, Pokok semambu, Dogon yaro, Beyu, dentre outros (SUBAPRIYA R., BHUVANESWARI V., NAGINI S., 2005; BISWAS *et al.*, 2002).

A introdução do Nim no Brasil se deu por meio de sementes originárias das Filipinas trazidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, com o objetivo de pesquisar a ação inseticida desta planta. Mais tarde, em 1989 e 1990, este mesmo Instituto obteve sementes provenientes da Índia, Nicarágua e República Dominicana, sendo plantado, respectivamente, em Londrina, Paranaíba (PR), Jaboticabal (SP) e Brasília (DF) para avaliação de desenvolvimento (SOUZA MARTINEZ, 2002). Pela facilidade de desenvolvimento nos diversos climas e solos e pelo aproveitamento de praticamente todas as partes da planta, se tornou bastante comum no Brasil, motivo pelo qual a planta pode ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país (NEVES, 1996).

2.1.3 Propriedades químicas e utilização industrial

A nimbina foi o primeiro composto isolado a partir do óleo das folhas de Nim e desde então, partindo do interesse de estudar um efeito inseticida, muitos grupos começaram estudos químicos da planta, encontrando uma panaceia de atividades biológicas (ALZOHAIY, 2016).

Mais de 300 compostos já foram isolados e podem ser divididos em duas classes principais como isoprenóides e não-isoprenóides. Os **isoprenóides** incluem diterpenóides e triterpenóides contendo protomeliacos, limonóides, azadirona e seus derivados, gedunina e seus derivados, compostos de tipo vilasinina e C-secomeliacinas como nimbina, salanina e azadiractina. Os **não-isoprenóides**

incluem proteínas (aminoácidos) e hidratos de carbono (polissacarídeos), compostos sulfurosos, polifênicos tais como flavonóides e seus glicosídeos, dihidrocalcona, cumarina e taninos, compostos alifáticos, etc (DEV-KUMAR C., SUKHDEV, 1996; KUMAR *et al.*, 2010).

Praticamente todas as partes da planta são usadas. As sementes, folhas, raízes e a madeira possuem usos conhecidos (BITTENCOURT *et al.*, 2009). Os produtos derivados do Nim são cada vez mais utilizados na agricultura, pecuária, medicina e na fabricação de cosméticos, uma vez que se mostram seletivos, não mutagênicos, rapidamente biodegradáveis, com baixa toxicidade para organismos não alvo e benéficos, com mínimo distúrbio ao ecossistema (FORIM, 2006). Portanto, atendendo às demandas do mercado (MARTINEZ, 2002).

2.1.4 Propriedade medicinal

Partes da planta são utilizadas há séculos na medicina Ayurveda, Unani, Homeopatia, e, mais recentemente, na medicina moderna (ALZOHAIRY, 2016). Na Ayurvédica, são utilizadas há mais de 4000 anos (HASHMAT I.; AZAD H.; AHMED A., 2012).

A atividade antimicrobiana é maciçamente descrita. Recentemente, estudo de PU *et al.* (2010) comprovaram atividade do éster 9-octadecanoic acid-hexadecanoic acid tetrahydrofuran-3,4-diyl presente no óleo de Nim. Outra pesquisa avaliou a atividade antibacteriana dos extratos de casca, folhas, sementes e frutos de *Azadirachta indica* (Nim) em bactérias isoladas da boca adulta e os resultados revelaram que os extratos de casca e folhas mostraram atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas (YERIMA *et al.*, 2012). O Nim mostrou inativar e interferir no ciclo de replicação do vírus B-4 do coxsackievirus, além de apresentar atividade antiviral direta em *Herpes simplex* tipo 1 e poliovírus (BADAM *et al.*, 1999; TIWAR *et al.*, 2010).

Diversos estudos demonstraram atividade antifúngica e antiparasitárias dos componentes do Nim (NATARAJAN V., VENUGOPAL P. V., MENON T., 2003; LLOYD *et al.*, 2005; AMADIOHA A. C., OBI V. I., 1998).

Alzohairy (2016) cita três possíveis vias de atuação de componentes do Nim como (1) papel antioxidante pelos compostos nimbolide, azadiractina e ascorbato; (2) regulação das vias de sinalização celular, modulando genes supressores de

tumores e (3) papel antiinflamatório através da regulação da COX (Ciclo-oxigenase) e LOX (Lipo-oxigenase).

Os estudos envolvendo potencial antioxidante destacam os altos teores de polifenóis e flavonoides de *Azadirachta indica* (VAIBHAV *et al.*, 2013). Resultados indicam que extrato das folhas do Nim são benéficos na proteção de estresse oxidativo induzido pela Peroxidação Lipídica (LPO) em humano (SITHISARN P., SUPABPHOL R., GRITSANAPAN W., 2005). Experimentos mostraram também que extratos de Nim elevam os níveis de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase em um processo carcinogênico (MANAL *et al.*, 2007).

Extratos a base de Nim revelaram potencial de inibir a sobrevivência, a proliferação, a invasão, a angiogênese e a metástase das células cancerígenas (HAO *et al.*, 2014). Por conseguinte, apresentaram efeitos em estudos *in vitro* e *in vivo* com diversos tipos de câncer como os de origem mamária, gastrointestinal, ginecológica, hematológica, próstata, pele e tecido conjuntivo (PATEL *et al.*, 2016).

Embora ainda incipiente, a literatura avança no estudo da interferência do Nim a nível de SNC. Em modelos de Doença de Alzheimer, o extrato aquoso das folhas mostrou significativa atenuação de déficits cognitivos e diminuição do estresse oxidativo (RAGHAVENDRA *et al.*, 2013).

Ademais, uma diversidade trabalhos comprovam as atividade gastroprotetoras, antifúngicas e cardioprotetoras da *Azadirachta indica* (MOSSINI S.A.G., KEMMELMEIER C., 2005). A Tabela 1 sumarizada alguns dos usos do Nim de acordo com os componentes da planta.

Tabela 1. Partes do Nim com efeitos medicinais.

Partes da árvore de Nim	Uso
Folhas	Tratamento de catapora, infecções de pele, cosméticos, repelentes de pragas, controle de hanseníase, infecções intestinais, distúrbios respiratórios e constipação
Sementes	Hanseníase e Infecções do trato gastrointestinal
Flores	Infecções do trato gastrointestinal
Óleo	Cosméticos, repelentes de pragas, controle de hanseníase, infecções intestinais, distúrbios respiratórios, constipação, pastas de dentes e ceras
Casca	Dor, malária, cosméticos, repelentes de pragas, controle de hanseníase, infecções intestinais, distúrbios respiratórios, constipação, dor de estômago
Galhos	Febre, aumento do apetite e limpeza dos dentes
Goma	Cura de feridas, sarna, úlcera, tônico e estimulante
Seiva	Tônico estomacal
Árvore inteira	Febre, dor de cabeça, reumatismo, feridas sifilíticas crônicas, úlcera, desordens da pele

Adaptado de: Saleem et al., 2018.

2.1.5 Ação inseticida e efeito anticolinesterásico

Diversos estudos demonstram que os derivados do Nim Indiano tem capacidade inseticida (BISWAS *et al*, 2002). Suas propriedades inseticidas, repelentes e anorexígenas sobre os insetos são conhecidas há décadas (SCHMUTTERER, 1990). Embora o componente azadiractina (AZA) seja o principal ingrediente ativo na maioria das formulações, há vários ingredientes ativos potencialmente inseticidas no extrato de Nim (SUNDARAM, 1996; NATHAN *et al.*, 2005). Além dos anteriormente citados, alguns dos mecanismos de ação mais descritos são: regulação do crescimento, supressão e esterilização da fecundidade, repelência da oviposição ou atratividade e mudanças na aptidão biológica com bloqueio no desenvolvimento de agentes patogênicos transmitidos por vetores (SU, M.; MULLA, M. S., 1999). Nathan *et al.* (2008) demonstraram inibição da atividade de acetilcolinesterase no artrópode *Nilaparvata lugens* quando exposto à AZA. Dado este que chama atenção por se tratar de mecanismo pouco explorado e potencialmente útil na busca de novas drogas para o controle das patologias colinérgicas.

Os inseticidas organofosforados, como o diazinon, cujo alvo é a AChE, inibem irreversivelmente a enzima através da fosforilação de um grupo serina hidroxilo

dentro do sítio enzimático ativo (RUSSELL, 1980; BABU *et al.*, 1989; FOURNIER D., MUTERO A., 1994; BRETAUD *et al.*, 2000). A acetilcolinesterase é uma enzima éster hidrolase geral, sendo altamente efetiva para acetilcolina. Deste modo, é mais específica do que outras esterases, tais como a butirilcolinesterase (BuChE) (GRINGAUZ, 1997). A inibição de AChE pelos organofosforados causa acumulação de ATCh nas sinapses, de modo que a membrana pós-sináptica esteja em estado de estimulação permanente, o que resulta em paralisia, ataxia, falta geral de coordenação no sistema neuromuscular e eventual morte (SINGH K., SINGH D.K., 2000; AYGUN *et al.*, 2002).

Rahman *et al.* (1999) demonstraram que a atividade de ATCh é significativamente inibida no cérebro de rato quando tratada por via oral com 80, 160 e 320mg/kg de Vepacide, um ingrediente ativo do óleo de semente de Nim.

2.2 Demência

A demência é uma síndrome de declínio cognitivo e funcional, comumente ocorrendo com o envelhecimento como resultado de processos neurodegenerativos e cerebrovasculares que começam mais cedo no curso de vida (WHALLEY, 2006; WHALLEY, 2015). Dentre os principais tipos de demência, destaca-se a demência do Corpo de Lewy (DCL), Demência Frontotemporal (DFT), Demência Vascolar (DV) e Doença de Alzheimer (Caramelli & Barbosa, 2002; NETO J. G., TAMELINI M. G., FORLENZA O. V., 2005). A DA figura como a mais importante causa de demência em todo o mundo, representando até 75% de todos os casos de demência (TAKIZAWA *et al.*, 2015; SCHELTENS *et al.*, 2016; FIEST *et al.*, 2016).

2.2.1 Doença de Alzheimer: Histórico, definição, e epidemiologia

Em novembro de 1906, Alois Alzheimer apresentou uma palestra "*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*" (Sobre uma doença peculiar do córtex cerebral), na qual descreveu pela primeira vez, a patologia do cérebro da paciente Auguste Deter, que desde então foi considerado a primeira paciente com essa forma especial de demência. Mais tarde, Emil Kraepelin sugeriu nomear esta forma de demência "demência senil do tipo Alzheimer (SDAT)". Hoje, "Alzheimer" e "Demência" são freqüentemente usados como sinônimos pelo público leigo,

destacando a importância da descoberta, mesmo mais de 100 anos depois (Vollmar & Thyrian, 2017).

O processo da doença é caracterizado por transtorno neurodegenerativo progressivo, que se manifesta clinicamente por comprometimento cognitivo e de memória, declínio progressivo das atividades diárias e uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos e distúrbios comportamentais, afetando principalmente indivíduos idosos (ESFANDIARY *et al.*, 2014).

A maioria das pessoas com DA (mais de 95%) possui DA esporádica ou de início tardio, uma doença multifatorial em que fatores ambientais e predisposição genética contribuem para a patologia. A outra forma de DA, familiar ou de início precoce, corresponde a menos de 5% da população com DA e é devido a mutações de genes (BEKRIS *et al.*, 2010). A classificação de DA é baseada em critérios clínicos, incluindo história médica, exame físico, exames laboratoriais, neuroimagem e avaliação neuropsicológica (MENDIOLA-PRECOMA *et al.*, 2016).

À medida que o envelhecimento da população se tornou um fenômeno mundial, prevê-se que a DA represente grandes desafios para a saúde pública e os sistemas de cuidados de idosos em todos os países com custos diretos e indiretos (TAKIZAWA *et al.*, 2015). Estima-se que 5% da população com mais de 65 anos seja afetada pela DA (ESFANDIARY *et al.*, 2014). Segundo a Associação Internacional da Doença de Alzheimer (ADI), em 2010, 35,6 milhões de pessoas conviviam com o Alzheimer em todo o mundo, e a estimativa é de que este número praticamente dobre a cada 20 anos. Nos Estados Unidos em 2014, DA foi listado como a sexta causa de morte, em 2017, mais de 5 milhões de pessoas sofrem com DA, custando cerca de 236 bilhões de dólares (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017; HICKMAN *et al.*, 2016).

Quando estudada a prevalência de demência em países latino-americanos, observa-se que é superior a de países desenvolvidos (RODRIGUEZ *et al.*, 2008; NITRINI *et al.*, 2009; WHO, 2012). Alguns estudos atribuem esse dado a existência de fatores potencialmente modificáveis: diabetes, hipertensão da meia idade e obesidade, tabagismo, depressão, inatividade cognitiva e baixa escolaridade (MAESTRE *et al.*, 2002; MOLERO *et al.*, 2007). Em 2015, aproximadamente 70,9 milhões de latino-americanos eram mais velhos do que 60 anos. Em 2030, esse número irá exceder 121 milhões (United Nations DoEaSA, 2015). Dessa forma, por se tratar de doenças relacionadas ao envelhecimento, há um número crescente de

indivíduos em risco (MAESTRE *et al.*, 2018). No Brasil não existem estudos atualizados com as estimativas de prevalência, porém com base nas estatísticas populacionais brasileiras do último censo (BRASIL, 2000), estima-se a prevalência da doença de Alzheimer em 1,2 milhão de pacientes, com a incidência de 100 mil novos casos por ano.

Devido ao impacto social e aos custos gerados pela patologia, a pesquisa de Alzheimer está progredindo rapidamente. Desde 2013, o G8, grupo dos 8 países mais ricos e influentes do mundo, declarou que a demência deveria ser uma prioridade global, ambicionando que uma cura ou uma terapia modificadora da doença deveria estar disponível em 2025 (SCHELTENS *et al.*, 2016). Para tanto, os estudos recebem apoio de uma série de iniciativas ligadas à pesquisa; aumentando o financiamento, promovendo a participação em ensaios e colaboração para compartilhamento de informações e dados (PRINCE *et al.*, 2015).

2.2.2 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

A DA é multifatorial, envolve múltiplos genes de risco e fatores ambientais, resultando em lesões de estruturas cerebrais (MADEO *et al.*, 2013). Histopatologicamente, ocorre maciça perda sináptica e morte neuronal em regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral (SELKOE, 2001). O alvo inicial são as células piramidais da lâmina II do córtex entorrinal e suas conexões com a região do *Corno de Amon* (CA1) do hipocampo. Tais modificações levam a disfunção em conexões importantes relacionadas à cognição, como o prosencéfalo basal, incluindo núcleo basal de Meynert e os núcleos septais, componentes importantes na rede límbica da memória (GÓMEZ-ISLA *et al.*, 1996).

Em 1907, Alois Alzheimer descreveu duas alterações patológicas no cérebro de um paciente que sofria de demência. Tais alterações representam traços patognomônicos da doença e até hoje são utilizadas no diagnóstico pós-mortem de DA, são elas: acúmulo da proteína β A e emaranhados neurofibrilares (CHOPRA K., MISRA S., KUHAD A., 2011).

A hipótese de cascata amilóide sugere que o metabolismo da proteína precursora β -amilóide, β APP, é o evento inicial na patogênese da AD, levando à agregação de proteína β -amilóide, especificamente β A42, que formam depósitos

extracelulares em regiões cerebrais como hipocampo e córtex. A lesão neuronal progressiva gerada por esse processo leva à deficiência ou desequilíbrio entre vários neurotransmissores como acetilcolina, dopamina e serotonina, gerando as alterações cognitivas observadas na AD (VAN MARUM, 2008). Corroboram com essa teoria estudos em que foram avaliados grupo portadores de alterações genéticas que propiciaram o acúmulo cerebral de β -amilóide, através dos quais foi possível evidenciar o desenvolvimento precoce ou grave da DA (LEE, 2006; CITRON, 2004).

Os emaranhados neurofibrilares, encontrados no meio intracelular neuronal são gerados a partir da hiperfosforilação da proteína Tau. Este evento é deletério para o sistema nervoso, uma vez que a proteína Tau confere estabilidade aos microtúbulos. A formação dos emaranhados potencialmente resulta na ruptura da rede microtubular e apoptose celular.

A justificativa para ocorrência dos eventos antes descritos ainda é pouco elucidada, porém se relacionam fortemente a fatores genéticos, dano mitocondrial, angiopatia cerebral, neuroinflamação, excitotoxicidade e estresse oxidativo observados nos cérebros de pacientes ou modelos experimentais de DA. Entretanto, nem sempre é possível prever a cronologia de cada um desses eventos. Por conseguinte, diversas linhas de pesquisa se propõem a intervir nestes diferentes processos.

Fato é que a evolução da doença acarreta interferências nos caminhos da neurotransmissão, prejudicando as sinapses cerebrais e potencializando a apoptose neuronal. O resultado é a distorção anatômica cerebral: atrofia, alargamento dos sulcos e dilatação dos ventrículos.

Entre as vias neuronais afetadas ou destruídas, a disfunção colinérgica é a mais estudada e está intimamente relacionada com o declínio cognitivo inicial na DA. Na década de 1970 foram observadas que os neurônios colinérgicos são perdidos no início do processo da doença, o que deu origem a Hipótese colinérgica da patogênese de Alzheimer e serviu de base para a descoberta de inibidores de AChE (HENSTRIDGE C.M., PICKETT E., SPIRES-JONES T.L., 2016; FRANCIS, P. T., PARSONS, C. G.; JONES, R. W, 2012).

O comprometimento de núcleos colinérgicos leva precocemente a uma disfunção colinérgica nas áreas de projeção frontais, parietais e temporais. Observa-se também excesso de atividade de glutamato no córtex cerebral, comprometimento

do mecanismo de controle do cálcio neuronal, o que provoca uma cascata patogênica que leva a célula à apoptose. Essas alterações de neurotransmissores constituem a base da atual terapêutica sintomática da doença, com anticolinesterásicos e com antagonista de receptores glutamatergicos N-metil-D-aspartato (NMDA) (HAAS, 2012; HUANG Y., MUCKE L., 2012).

AChE é uma enzima chave que catalisa a hidrólise do neurotransmissor, acetilcolina, no sistema nervoso em vários organismos. A inibição da AChE aumenta os níveis de acetilcolina no cérebro, melhorando assim as funções colinérgicas em pacientes com DA.

Atualmente, a ciência sabe que a perda de células colinérgicas é uma consequência secundária da doença, mas os medicamentos mais promissores utilizados no tratamento dos casos de Alzheimer e o reparo da perda de memória e declínio cognitivo são os fármacos anticolinérgicos. Drogas anticolinesterásicas aumentam a transmissão colinérgica e demonstram melhorias modestas, porém estatisticamente significativas, na cognição e no funcionamento global em DA leve a moderada (LIBRO *et al*, 2016). Portanto, embora o consenso geral conclua que os inibidores de AChE nem retardam, nem revertam o progresso da doença, eles podem aliviar os sintomas de DA (SCHELTENS *et al*, 2016).

Tacrina (Cognex®) e Donepezila (Aricept®), ambos de origem sintética, foram os primeiros medicamentos aprovados para o tratamento da perda cognitiva em pacientes com DA pela *U.S. Food and Drug Administration* (US-FDA) em 1993 e 1996, respectivamente. Rivastigmina (RIV, Exelon®) e Galantamine (GAL, Reminyl®) são o mais recente Anti-AChE lançado pela US-FDA em 2000 e 2001. Estes alcalóides são naturais, derivados de plantas e demonstram resultados satisfatórios como Huperzine A, encontrados em *Huperzia spp.*, comercializados como suplemento dietético para suporte de memória e usado para tratar os sintomas de DA na China (MURRAY *et al*, 2013).

Por conseguinte, embora a literatura demonstre ser rica no estudo sobre Anti-AChE obtido das plantas, esta questão continua sendo por seus produtos promissores na melhoria dos sintomas cognitivos e comportamentais e na facilidade no teste de potenciais anti-AChE. Além disso, o estudo de fitoterápicos permite a descoberta de drogas com propriedades que interferem em outras vias que envolvem a patogênese da doença, principalmente a neuroinflamação e o estresse oxidativo (ELLMAN *et al*, 1961; CHOPRA K., MISRA S., KUHAD A., 2011).

2.2.3 Terapia da Doença de Alzheimer

A base do tratamento para a doença de Alzheimer é o cuidado de apoio da família e outros cuidadores (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017). Adicionado a isso, avanços na ciência básica e diagnóstico molecular forneceram possibilidades sem precedentes para o desenvolvimento de medicamentos para tratamento sintomático e tratamento baseado em etiologia (MENDIOLA-PRECOMA, 2016).

Para pacientes sintomáticos é sabido que a acetilcolina desempenha papel sacramental na mediação da aprendizagem e da memória. Tacrina, Rivastigmina, Donepezila e Galantamina são os medicamentos aprovados que promovem níveis mais altos de AChE e melhoram a função colinérgica do cérebro inibindo a enzima acetilcolinesterase que degrada o neurotransmissor (ANAND P., SINGH B, 2013; ANDRIEU *et al.*, 2015). Isolado ou em combinação com um inibidor de acetilcolinesterase, o antagonista do receptor de glutamato NMDA, Memantina, evita a sobrecarga de cálcio e a disfunção mitocondrial causada pelo aumento da geração de óxido nítrico, formação de oxidantes e, por fim, apoptose neuronal. Além desses quatro inibidores de acetilcolinesterase e Memantina (Namenda®), desde 2003, nenhum fármaco recente foi aprovado para uso no tratamento DA (GODYŃ *et al.*, 2016).

O tratamento baseado em etiologia inclui agentes potencialmente eficazes e visa intervir, entre outros, em enzimas, aglutinantes amilóides e terapias Tau (GODYŃ *et al.*, 2016). Os tratamentos não-farmacológicos têm um importante papel preventivo e adjuvante, que inclui exercícios físicos, apoio social, reabilitação cognitiva, assistência com atividades da vida diária, programas multidisciplinares e apoio aos cuidadores (GROOT *et al.*, 2016; MENDIOLA-PRECOMA *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2014).

Diante da importância terapêutica dos inibidores da AChE, estão sendo feitos esforços em busca de novas moléculas com atividade anti-AChE, como as drogas atuais de terapia (Galantamina e Rivastigmina) obtidas total ou parcialmente a partir de plantas (MURRAY *et al.*, 2013). Os produtos naturais e seus derivados são pistas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento futuro da DA, e as classes mais promissoras são alcalóides, coumarinas, flavonóides e estilbenos (LING H., TAO S., XINGSHU L., 2013). A potencialidade no uso de

plantas também consiste nas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e imunomoduladoras e seus princípios ativos (RAGHAVENDRA M. *et al*, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anticolinesterásica do Extrato Hidroalcoólico das Folhas do Nim indiano (*Azadiractha indica* A. Juss) (EHFN) e investigar os efeitos do tratamento com o EHFN no processo de aquisição de memória espacial em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade do EHFN administrado por via oral em ratos;
- Determinar a potência inibitória do EHFN sobre a atividade das colinesterases (Acelicolinesterase e Butirilcolinesterase);
- Avaliar os efeitos do tratamento agudo e crônico do EHFN sobre o processo de aprendizagem e memória em ratos.

4 MATERIAIS

4.1 Material Botânico

As folhas do Nim, *Azadirachta indica* A. Juss, foram coletadas na Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão – Brasil. Uma exsicata do material foi preparada e encontra-se registrada no Livro de registro do Herbário da UEMA com número de registro 1690.

4.2 Animais

Foram utilizados 35 ratos da espécie *Rattus norvegicus*, var. Wistar (machos, 90 dias, 300-500g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os mesmos foram divididos em três grupos: Controle (N=11), Nim 100 (N=12) e Nim 300 (N=12). O grupo controle recebeu salina por via oral, enquanto que os grupos Nim 100 e Nim 300 receberam por via oral, EHFN 100 e 300mg/kg, respectivamente. Para o tratamento agudo foi administrado uma única dose por via oral de salina ou Nim 100 ou 300mg/kg de acordo com cada grupo no dia do teste. E para o tratamento crônico os animais receberam salina, Nim 100mg/kg ou 300mg/kg durante 21 dias. O Labirinto Aquático de Morris (LAM) foi realizado com todos os animais. Os protocolos animais previstos no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEMA, segundo o parecer nº 033/2014 em 02/07 de 2014.

4.3 Reagentes

Água destilada (H_2O); Álcool etílico (C_2H_6O) P.A; 5,5 ácido ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) Sigma D-8130 (PM 396,3); Iodeto de Acetilcolina (ATCh) Sigma A-5751 (PM 289,2); Iodeto de Butirilcolina (BTCh) Sigma B-3253 (PM 317,2); Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$); Fosfato de Sódio Monobásico Monoidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) 0,2M (27,6g/l); Fosfato de Sódio Dibásico Heptaidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 0,2M (53,65g/l); Cloreto de Sódio (NaCl); Sulfato de Sódio Anidro ($Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$) P.A.

4.4 Enzimas

Acetilcolinesterase do peixe *Electrophorus electricus* (Sigma C-2888);
Butirilcolinesterase de soro de eqüino (Sigma C-4290).

4.5 Vidrarias e Equipamentos

Tubo de ensaio; Béquer; Bastão de vidro; Pipeta; Proveta; Espectrofotômetro (SpectraMAX 250, Molecular Devices, USA); CG-MS QP5000 Shimadzu, Rotaevaporador (Heidolph®); Balança digital (Celtac®); Estufa; Cuba de vidro; Papel manteiga; Tesoura; Gazes; Balança analítica.

5 MÉTODOS

5.1 Preparação do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) – EHFN

As folhas de Nim foram coletadas na Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) no município de São Luís – MA, no período de março ou outubro de 2014. Em seguida, o material foi submetido ao processo de secagem, sendo exposto sobre bancada, em local seco e arejado. Depois foi secado em estufa a 45°C. Após completa secagem o material foi triturado e pesado. Ao pó obtido adiciona-se álcool a 70% (EtOH:H₂O) na proporção (1:3): uma parte da planta para três de álcool. Foram feitas várias extrações a cada 72 horas, para obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim (MATOS, 1997) e no final rotaevaporado para eliminação do solvente. Uma vez que se obteve um extrato pastoso, o mesmo foi ressuspendido em água destilada para ser administrado aos animais.

5.2 Avaliação Toxicológica do EHFN

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Biofísica da UFMA, usando ratos da espécie *Rattus norvegicus*, var. Wistar (machos, 90 dias, 300-500g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão.

O extrato hidralcólico das folhas do Nim foi administrado por via oral em dose única de 4g/kg a 1 grupo com 5 animais.

Todos os animais após o tratamento foram examinados durante 0, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas e 4 e 7 dias para observação dos efeitos estimulantes e depressores, produzidos pelo extrato hidralcólico das folhas do Nim e comparar com os observados no grupo controle.

Os parâmetros estimulantes que foram observados foram: motilidade, frequência respiratória, piloereção, movimentos estereotipados, convulsão (clônica ou tônica), tremores (finos ou grosseiros), sialorreia, fasciculação, midríase, ereção de cauda, tremor de cauda, diâmetro pupilar, lamber pata, coçar focinho e morder cauda.

Os parâmetros depressores que foram avaliados foram: motilidade, frequência respiratória, sedação, catatonía, ptose palpebral, analgesia, anestesia, perda de reflexo, diâmetro pupilar, ataxia, dispneia, passividade, tônus dorsal, perda da preensão da pata, paralisia trem posterior.

Com o resultado das observações foram preenchidas tabelas adaptadas conforme estudos (MALONE, 1977) e a análise destes foi comparada com a literatura disponível.

5.3 Determinação da atividade anticolinesterásica do EHFN

Para estudar a capacidade do extrato hidroalcoólico das folhas do Nim de inibir as colinesterases, foi feito os experimentos de cinética enzimática, utilizando-se o método de Ellman *et al.*, (1961) e adaptado ao leitor de microplacas por Viegas Jr *et al.*, (2005).

A metodologia empregada tem como princípio o registro da velocidade de produção da tiocolina, à medida que o substrato – iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina – é hidrolisado. Com este objetivo é utilizado o reagente de Ellman, ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB – Sigma D-8130), que, em contato com tióis advindo da degradação da acetilcolina, produz um ânion de cor amarela (ELLMAN *et al.*, 1961).

O EHFN foi testado em alíquotas de 0,3mg/mL, 1mg/mL, 3mg/mL e 10mg/mL. A cada 100µL de alíquota do extrato foi adicionado 5µL com concentração molar de

0,01 de DTNB, 20 μ L de Acetilcolinesterase (*E. electricus*)/Butirilcolinesterase 0,5U/mL, 55 μ L de Tampão PO₄ e 20 μ L de substrato de acetiltiocolina/butiriltiocolina.

A leitura foi feita em microplaca de 96 poços, sob temperatura ambiente (22-25 °C), a um comprimento de onda de 412 nm, a intervalo de aproximadamente 12s, por 5 minutos, em pH 7,4. Atividade enzimática da colinesterase (ChE) foi estimada pela medida da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de hidrólise do substrato (ATCh e BChTh) e observou-se a capacidade do EHFN em inibir esta atividade das enzimas, através da diminuição desta resposta. A densidade óptica foi medida pelo espectrofotômetro (SpectraMAX 250, Molecular Devices, USA) e os dados foram apresentados e armazenados no software SOFTmax PRO 5.4. A concentração inibitória média (IC_{50}) foi baseada no modelo de sítio único e determinada em curvas concentração-resposta por regressão não linear.

5.4 Método para avaliar o processo de aprendizagem-memória: Labirinto Aquático de Morris

Para avaliação o processo de aprendizagem e memória foi realizado o teste do labirinto aquático de Morris. Neste os animais foram individualmente inseridos em um tanque circular de fibra de vidro, com 134cm de diâmetro e 40cm de altura, com uma plataforma retangular de vidro com 15cm de largura e 30cm de comprimento e altura de 28,5cm, localizada no centro da sala de 12m². Referencias visuais foram colocadas na sala para orientação dos animais. Para realização dos testes, foi adicionada água no tanque até que o nível ultrapasse em 2cm a altura da plataforma.

Na fase de treinamento que corresponde a dois dias, os ratos tiveram cinco ensaios diários, com tempo máximo de 60 segundos para cada ensaio. Para cada teste o animal foi solto de frente para a parede do tanque, saindo de pontos pseudoaleatórios (norte, sul, leste, oeste e noroeste) que não daquele onde estava a plataforma. Nos casos em que os animais não conseguiram atingir a plataforma no referido tempo, o treinador o conduziu até a mesma e lá o animal foi deixado por 10 segundos. Ao término de cada ensaio, os animais eram retirados, secados e após 10 minutos colocados em nova posição. A aquisição da memória espacial foi avaliada a partir dos treinos e o teste foi feito no terceiro dia do experimento para estimativa da retenção de memória. Para o teste, a plataforma foi retirada. Os

animais foram novamente colocados no tanque em um dos pontos pseudoaleatórios do treinamento (norte) e deixados por 60 segundos. Dessa forma, o tempo gasto no quadrante anteriormente ocupado pela plataforma (quadrante alvo) pôde ser mensurado.

Para o tratamento agudo os animais realizaram dois treinos e no dia do teste foram administrados por via oral salina e EHFN de acordo com cada grupo. Para o tratamento crônico os animais receberam salina e EHFN de acordo com cada grupo por 21 dias, sendo que nos dias 19 e 20 foram repetidos os treinos e no dia 21 foi feito o teste. Após os testes os animais foram sacrificados.

5.5 Análise estatística

As análises gráficas foram feitas nos softwares Microsoft Excel (Microsoft Corporation), GraphPad Prism 7 (GraphPad Software), e os resultados expressos como média \pm erro-padrão da média. Os parâmetros das curvas de inibição e de análise cinética contaram ainda com os dados gerados a partir do SOFTmax PRO 5.4. Nos testes comportamentais, os tempos de latência dos treinos e permanência no quadrante alvo foram estimados pelo software MouseGlob versão 1.6.5.

6 RESULTADOS

6.1 O EHFN não apresenta ação tóxica em ratos

O EHFN apresentou coloração verde escura, peso seco de 0,3454g/ml e rendimento de 34,54 %. E quando administrado por via oral em ratos uma dose de 4g/kg o EHFN não apresentou ação tóxica, pois nenhuma alteração significativa foi observada nestes animais analisados com base nos parâmetros citados na Tabela de Malone (1977) até 72h da administração, não havendo nenhuma morte de animal no período observado.

6.2 O EHFN apresenta atividade anticolinesterásica

O EHFN inibiu de forma dose-dependente as colinesterases, Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase, apresentando uma atividade anticolinesterásica com $IC_{50} = 3,25 \pm 1,04\text{mg/ml}$ para AChE e $IC_{50} = 3,09 \pm 1,09\text{mg/ml}$ para a BuChE (Figura 2).

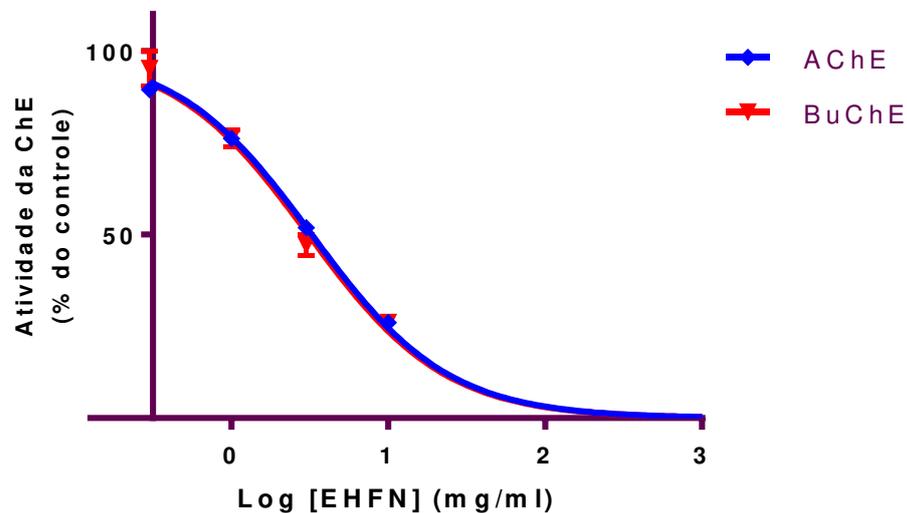


Figura 2. Inibição da Atividade de Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase pelo EHFN (0,3 - 10mg/ml). Cada ponto representa a média de dois experimento feito em triplicata. (o) AChE e (Δ) BuChE).

6.3 O tratamento com EHFN promove melhorias de aprendizado em ratos avaliados pelo Labirinto Aquático de Morris

Na fase aguda do tratamento com o EHFN o tempo médio para alcançar a plataforma (Latência de Escape) no primeiro dia de treino no Labirinto Aquático de Morris do grupo controle foi $25,4 \pm 6,1$ s, do Nim 100 foi de $26,4 \pm 13,1$ s e do Nim 300 foi de $25,0 \pm 5,7$ s. Já no segundo dia de treino, os tempos dos grupos controle, Nim 100 e Nim 300 foram, respectivamente, $14,4 \pm 1,5$ s; $12,1 \pm 1,9$ s; e $13,3 \pm 2,6$ s. Estes resultados evidenciam que houve uma melhora no processo de aprendizados em todos os grupos, confirmado pela diferença significativa observada entre os treinos (do Dia 1 e Dia 2) em todos os grupos. No entanto, não foi observado uma diferença significativa entre os grupos tratados com o EHFN e o grupo controle no mesmo dia do treino (figura 3).

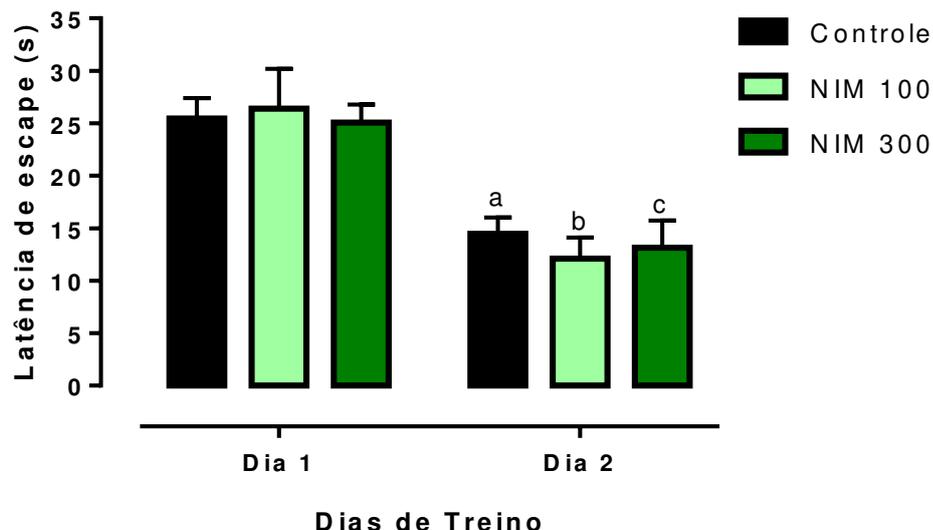


Figura 3. Efeito do Tratamento Agudo do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre a Latência de Escape (tempo para encontrar a plataforma). Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão do tempo para encontra a plataforma ($n= 10 - 12$ animais por grupo). As letras indicam uma diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao primeiro dia de treino de **a.** Controle; **b.** Nim 100; **c.** Nim 300 analisados por análise de variância (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey's).

No dia do teste, o tempo de permanência no quadrante alvo foi de $14,2 \pm 1,8$ s para o grupo controle; $15,5 \pm 2,1$ s para o grupo tratado com o EHFN 100mg/kg (Nim 100); e $12,4 \pm 1,2$ s para o grupo tratado com o EHFN 300mg/kg (Nim 300). Nenhuma diferença significativa foi evidenciada entre os grupos ($p>0,05$) (figura 4).

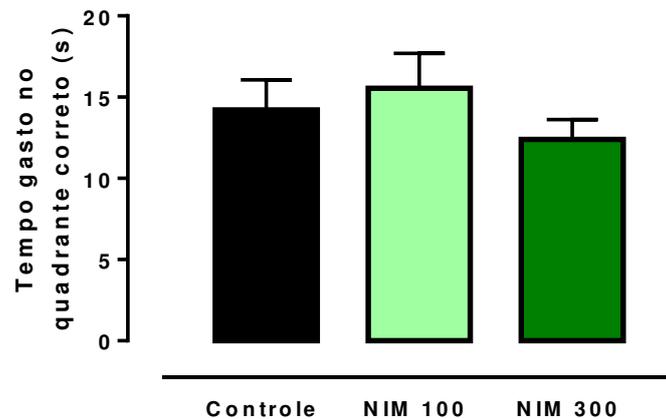


Figura 4. Efeito do Tratamento Agudo do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre o Tempo de Permanência no quadrante alvo no dia do Teste do Labirinto Aquático de Morris. As barras expressam a média \pm erro-padrão do tempo de permanência no quadrante correto ($n = 10 - 12$ animais por grupo). Não foram evidenciadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Análise de variância (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey's).

Durante a fase crônica, os tempos médios para alcançar a plataforma no primeiro dia de treino dos grupos controle, Nim 100 e Nim 300 foram, respectivamente, de $9,7 \pm 1s$; $13,8 \pm 1,8s$; e $12,4 \pm 1,5s$, enquanto que, no segundo dia de treino os tempos foram de $7,64 \pm 1,07s$; $8,8 \pm 1,28s$; e $7,45 \pm 0,89s$. Estes resultados, mostram que o tratamento crônico do EHFN (100 e 300mg/kg) produz uma melhora no processo de aprendizado nos grupos de animais que receberam o EHFN. Uma vez que os tempos para alcança a plataforma no segundo dia de treino foram reduzidos em 36,23% e 39,91% nos grupos Nim 100 e Nim 300 respectivamente, em relação ao mesmo grupo no dia anterior (figura 5).

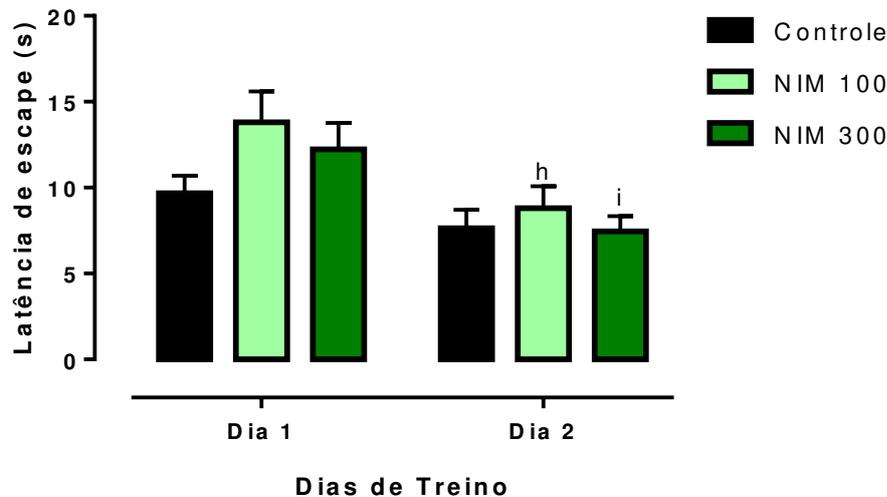


Figura 5. Efeito do Tratamento Crônico do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre a Latência de Escape (tempo para encontrar a plataforma). Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão do tempo para encontra a plataforma ($n= 10 - 12$ animais por grupo). As letras indicam uma diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao primeiro dia de treino de **h**. Nim 10; **i**. Nim 300 analisados por análise de variância (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey's).

O tratamento crônico com o EHFN não alterou de forma significativa o tempo de permanência no quadrante alvo no dia do teste, uma vez que, o grupo controle, Nim 100 e Nim 300 permaneceram $19,3 \pm 1,6s$; $18,4 \pm 1,1s$; e $17,6 \pm 2,0s$ respectivamente no quadrante alvo (figura 6).

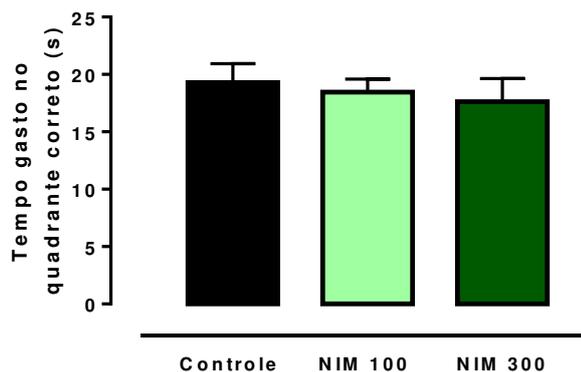


Figura 6. Efeito do Tratamento Crônico do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre o Tempo de Permanência no quadrante alvo no dia do Teste do Labirinto Aquático de Morris. As barras expressam a média \pm erro-padrão do tempo de permanência no quadrante correto ($n = 10 - 12$ animais por grupo). Não foram evidenciadas diferenças significativas ($p>0,05$). Análise de variância (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey's).

O tempo para encontrar a plataforma no LAM foi reduzido pela metade nos três grupos estudados (controle, Nim 100 e Nim 300) do dia 1 para o dia 2 do treino.

Já os animais com o tratamento crônico com o EHFN (Nim 100 e Nim 300) ou não mantiveram seus tempos para encontrar a plataforma quando comparados o dia 2 do agudo com o Dia 1 do crônico, no entanto no segundo dia de treino do crônico os animais que apresentaram uma melhora no desempenho foram os do grupo tratados com o EHFN (figura 7).

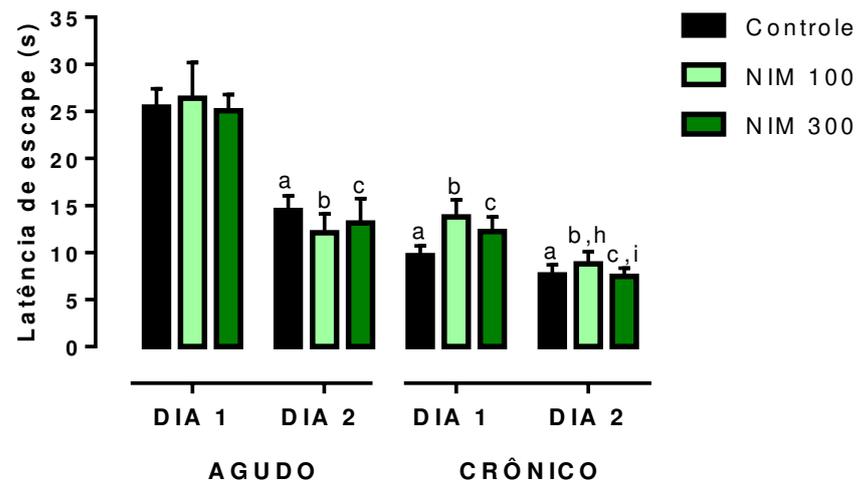


Figura 7. Efeito do Tratamento Agudo e Crônico do EHFN (100 e 300mg/kg) sobre a Latência de Escape (tempo para encontrar a plataforma) nos dois dias de treino no Teste do Labirinto Aquático de Morris. As barras expressam a média \pm erro-padrão do tempo para encontra a plataforma ($n = 10 - 12$ animais por grupo). As letras representam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao **a**. Controle no Dia 1 de Treino Agudo; **b**. Nim 100 no Dia 1 de Treino Agudo; **c**. Nim 300 no Dia 1 de Treino Agudo; **h**. Nim 100 no Dia 1 de Treino crônico; **i**. Nim 300 no Dia 1 de Treino Crônico analisados por análise de variância (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey's).

7 DISCUSSÃO

A indústria farmacêutica de fitoterápicos se intensificou nos anos 90 e desde então está em constante crescimento. De 1999 para 2000, as vendas de fitoterápicos aumentaram 15%, enquanto que, os medicamentos sintéticos apenas 4% (DE CASTRO, R. A.; ALBIERO, A. L. M., 2016). Com vistas para esse mercado, a avaliação do rendimento dos extratos naturais visa a verificação de viabilidade com fins de produção em larga escala. O EHFN no presente estudo mostrou rendimento semelhante ao de Emerenciano (2015), que obteve 36,7% em sua pesquisa. Estes valores são superiores ao apresentado por Farias (2008) que apresentou 10,5% de rendimento em seus extratos hidroalcoolicos de *A. indica*.

A mensuração das toxicidades de compostos naturais é crucial antes da sua aplicação na gestão da saúde. A primeira evidência de segurança do Nim é seu uso extensivo na Índia, pelo menos nos últimos quatro mil anos, por seres humanos e animais (CONRICK, 2001). Além disso, vários estudos com base em modelo animal e ensaios clínicos confirmaram que o Nim é seguro. A exemplo, Mossini & Kimmelmeier (2005) mostrou em seus estudos que mamíferos utilizando produtos à base de Nim não apresentaram efeito toxicológico ou aumento da mortalidade mesmo em altas doses por via oral, dermal ou inalatória.

Quanto à hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, Kale *et al.* (2003) evidenciaram atividade hepatoprotetora do extrato aquoso da folha de Nim ao diminuir significativamente as alterações nos níveis séricos de bilirrubina, proteína, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina e impedir significativamente as alterações histológicas induzidas por drogas antituberculose, amplamente utilizadas em países como Brasil. Resultados dos experimentos de Abdel *et al.* (2014) confirmaram que o extrato efetivamente resgata o rim do dano oxidativo mediado por cisplatina, um importante quimioterápico.

Em contrapartida alguns alertaram sobre seus efeitos tóxicos / adversos, pois apesar de efeitos biológicos de amplo espectro, algumas pessoas podem apresentar coceira, inchaço da boca e gargante e às vezes dificuldades respiratórias com o uso de produtos à base desta espécie (PAUL R., PRASAD M., SAH N. K., 2011). Estudos mostram que o óleo de Nim também pode estar associado a convulsões refratárias, acidose metabólica, insuficiência renal, encefalopatia, distúrbios

auditivos, visuais e ataxia (DHONGADE R. K., KAVADE S. G., DAMLE R. S., 2008; LAI S. M., LIM K. W., CHENG H. K., 1990; MEERAN M. *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo corroboram com os dados positivos do Nim, uma vez que não foram identificadas em nossas análises alterações importantes nos parâmetros estimuladores e depressoires propostos por Malone (1977).

Atualmente, apenas quatro drogas inibidoras da colinesterase são clinicamente aprovadas: donepezil, tacrina, galantamina e rivastigmina. Uma vez que inibem a enzima que degrada a ACh, aumentam a oferta do neurotransmissor na fenda sináptica, proporcionando assim sua ação sobre os poucos receptores existentes (ANAND & SINGH, 2013).

Dentre esses fármacos, destaca-se a Galantamina, que é um alcalóide extraído de plantas da família Amaryllidaceae; este composto é considerado mais eficaz ($IC_{50} = 0,37 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$) no tratamento da DA por ter uma ação prolongada e reversível sobre AChE, em relação à fisostigmina e a tacrina (WILCOCK *et al.*, 2000). Com isso muitas plantas têm sido relatadas como fontes de compostos com potencial inibitório (GUPTA & GUPTA, 1997; TREVISAN *et al.*, 2003; MUKHERJEE *et al.*, 2007).

Segundo Feitosa *et al.* (2011), plantas brasileiras das espécies: *Jatropha gossypifolia* e *Senna alata*, apresentaram respectivamente os seguintes IC_{50} : 0,5mg/ml e 0,08mg/ml para AchE, utilizando o modelo de Ellman (1977) como método avaliativo. No presente estudo, o EHFN apresentou inibição da AChE (IC_{50} de 3,25mg/ml) e, embora tenha se mostrado inferior na inibição colinesterásica quando comparado com outras espécies, tendo em vista os diversos mecanismo etiopatogênicos da doença, a espécie Nim é de potencialmente interesse para o uso clínico na doença de Alzheimer por seus efeitos favoráveis em relação a distúrbios cognitivos, incluindo atividades antiinflamatórias e antioxidantes.

Ao contrário do encontrado em estudos envolvendo drogas anticolinesterásicas, O EHFN não mostrou seletividade por nenhuma das colinesterases testadas, apresentando IC_{50} semelhantes para AChE e BuChE, inibindo cerca de 70% das enzimas com a maior dose testada (10mg/ml).

A butirilcolinesterase, também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase não neuronal, é extensamente distribuída em diferentes tecidos do corpo humano, tais como fígado, pulmão, coração, além de estar presente no plasma, nas células sanguíneas e nas sinapses colinérgicas do sistema

nervoso central (POHANKA, 2011). Porém, apesar da ampla distribuição, a literatura é falha em delimitar sua função fisiológica, uma vez que indivíduos deficientes em BuChE são geralmente saudáveis sem sinais manifestos de doença (WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J., 2008.). Apesar de compartilharem 65% de homologia na sequência de aminoácidos, algumas diferenças moleculares determinam que a ATCh seja preferencialmente hidrolisada pela AChE em detrimento da BuChE. Contudo, estudos sugerem que a BuChE aumente em 40-90% nas áreas cerebrais mais afetadas pela DA, como o córtex temporal e hipocampo, enquanto que ocorre declínio da atividade da AChE presente no cérebro. Esse fato sugere que a BuChE desempenhe um papel adicional importante na transmissão colinérgica e exerça influência na expressão da AChE (KALMAN *et al.*, 2004). Dessa forma, os dados apresentados com o EHFN sinalizam possíveis benefícios clínicos no tratamento dos sintomas neurodegenerativos e de demência, como ocorre na doença de Alzheimer (KATALINIC *et al.*, 2010).

Os possíveis efeitos do Nim a nível de SNC ainda vão além, pois há relatos do uso da planta na cessação do tabagismo a partir da mastigação de suas folhas. Em um dos casos, o paciente referiu diminuição acentuada do desejo de mastigar tabaco quando passou a mastigar, regularmente, cerca de 5 gramas de folhas de Nim por dia durante cerca de um mês (DWIVEDI, S.; CHOPRA, 2015). Estudos anteriores já demonstraram que a Nimbidina, um dos componentes do Nim, exibiu atividade antinicotínica tanto em teste *in vitro*, quanto *in vivo*, sugestivo de efeito de bloqueio ganglionar (PILLAI *et al.*, 1984).

A memória envolve codificação, armazenamento, persistência e evocação das informações. Segundo sua duração, a memória pode ser classificada em memórias de curto ou longo prazo. Esta última, exige síntese proteica em áreas cerebrais como a formação hipocampal que inclui o hipocampo propriamente dito (Corno de Amon - CA), Giro Denteado (GD), o subículo e o córtex entorrinal (NILS, 2015).

Danos nessas áreas, acidente vascular cerebral e o envelhecimento fisiológico normal causam deficiência de aprendizado no LAM similar ao prejuízo causado por drogas anticolinérgicas (GREEN *et al.*, 1992). Diversos autores já validaram o LAM com instrumento de identificação de memória operacional que é entendida como a manutenção temporária ativa de informações recém adquiridas ou reativadas da memória de longa duração (WOLLMANN *et al.*, 2011).

O processo de aprendizagem e memória espacial é explorado pelo LAM em dois momentos principais: a) fase de aquisição (treinos) e b) fase de evocação (teste). Os principais parâmetros analisados em cada fase são, respectivamente, o tempo para encontrar a plataforma (latência) e o tempo de permanência no quadrante anteriormente ocupado pela plataforma.

No presente estudo, a primeira fase de aquisição ocorreu antes da administração da primeira dose do extrato. Os resultados encontrados foram compatíveis com diminuição significativa do tempo gasto para alcançar a plataforma no segundo dia de treino em comparação ao primeiro, demonstrando a eficiência do método em avaliar a aprendizagem espacial dos animais. Além disso, a homogeneidade entre os grupos pôde ser comprovada, pois nenhum grupo se mostrou superior ao outro. Já na segunda fase de aquisição que iniciou no 20º dia da administração do extrato, os animais dos grupos experimentais (100mg/kg e 300mg/kg) tiveram desempenho superior ao controle, pois reduziram significativamente o tempo para alcançar a plataforma no segundo dia em comparação ao primeiro. A análise comparativa entre as fases de treinamento aguda e crônica, foi útil ainda em demonstrar que ocorreu retenção de memória do aprendido na fase aguda, visto que o tempo médio para alcançar a plataforma no primeiro dia de treino da fase crônica foi metade do que a média do primeiro dia da fase aguda.

A capacidade do EHFN em melhorar o parâmetro de aprendizado espacial avaliado no LAM pode estar associado à diversidade de compostos presentes em seu extrato. Os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos produtos à base de Nim podem auxiliar na terapêutica de quadros demenciais.

Gupta *et al.* (2010) foram os primeiros a demonstrar que o Nimbolide possui potencial para inibir o fator de transcrição pró-inflamatório, a via de sinalização do fator nuclear (NF- κ B) e induzir apoptose nas células cancerosas. O estudo de Kaur *et al.* (2004) e Alam *et al.* (2012) mostraram a atividade anti-inflamatória do Nimbidin e epoxyzadiradione, respectivamente, contra fator de migração de macrófagos.

Compostos como azadiractina, ácido gálico e polissacarídeos derivados da planta tiveram seus potenciais anti-inflamatórios destacados (THOH, 2011; BHOWMIK, 2010). Atividade imunomoduladora e efeito anti-inflamatório foram demonstrados em estudos que utilizaram a casca e sementes do Nim (ARORA N., KOUL A., BANSAL M. P., 2011; BISWAS, 2002).

Na fase de aquisição, não foi encontrada diferença significativa no tempo de permanência no quadrante alvo entre os grupos nem no tratamento agudo nem no tratamento crônico do EHFN. De forma semelhante, também não foi encontrada significância estatística na avaliação de um mesmo grupo entre as fases.

Era esperado que o processo de memória-aprendizagem se mostrasse melhor nos grupos tratados com o EHFN em comparação com o controle, e que aqueles cronicamente estimulados fossem melhores do que os agudos. Porém, é possível que a ausência de atividade significativa se justifique por se tratar de um grupo de animais sem alterações demenciais a serem corrigidas, uma vez que, Raghavendra *et al.* (2015) em seus estudos com o Nim, exibiram melhorias significativas com a dose de 300mg/kg/dia em modelo farmacológico de indução da DA em ratos. A partir de um modelo de isquemia-reperusão, Yanpallewar *et al.* (2005) demonstraram a potencialidade neuroprotetora da *A. indica*, uma vez que a administração oral pré-isquemia (500mg/kg/dia por 7 dias) reduziu significativamente parâmetros laboratoriais e histológicos de lesão, além de demonstrar melhor desempenho dos animais tratados nas tarefas de ansiedade (campo aberto) e distúrbios de aprendizagem / memória (Labirinto Aquático de Morris). Entretanto, de forma análoga ao presente estudo, não foi observada melhora significativa no grupo tratado com Nim sem lesão, deixando questionável a capacidade de melhorar cognição / memória naqueles sem nenhum dano neurológico.

O ambiente pró-inflamatório é especialmente indutor da apoptose em populações neuronais sensíveis através de mediadores extrínsecos como TNF e NOS, porém, constituintes do Nim revelam efeitos protetores nos vasos cerebrais e consequente diminuição da gravidade da neuroinflamação (VAIBHAV *et al.*, 2012). Kandhare *et al.* (2017) sugeriram que *Azadirachta indica* foi capaz de gerar efeito neuroprotetor em modelo animal de dor neuropática através de suas funções antioxidantes, anti-inflamatórias e antiapoptóticas.

Cabe salientar ainda que apesar de não ter apresentado efeito substancial no teste do presente estudo, não foi percebido danos no SNC dos animais tratados com o EHFN. A ausência de dano somada às interferências indiretas de compostos bioflavonoides, esteróis e limonóides derivados do Nim em distúrbios como hipertensão, diabetes mellitus, aterosclerose, tromboembolismo e estresse oxidativo, que são fatores de risco para acidente vascular cerebral e demência, fazem dos extratos de Nim potenciais alternativas terapêuticas (BIRD T.D., 2001).

8 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o EHFN possui atividade anticolinesterásica, sendo esta semelhante entre Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase e que o tratamento crônico do EHFN produz melhora de aprendizado uma vez que foi reduzido significativamente a latência de escape nestes animais, porém este tratamento não revelou nenhum efeito sobre a consolidação da aprendizagem. Assim, o presente estudo sinaliza a importância de se desenvolver mais testes e avaliação de parâmetros bioquímicos em animais tratados com o EHFN, pois o potencial anticolinesterásico do EHFN e seus possíveis efeitos nos receptores colinérgicos nicotínicos merecem ser explorados.

REFERÊNCIAS

A espécie Nim Indiano - Neem. Disponível em: http://web500.com.br/Nim-Site-P/Nim_Nemm_Especie.html. Acessado em: 25/06/2018

ABDEL MONEIM, Ahmed E.; OTHMAN, Mohamed S.; AREF, Ahmed M. Azadirachta indica attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

ALAM, Athar et al. Novel anti-inflammatory activity of epoxyazadiradione against macrophage migration inhibitory factor inhibition of tautomerase and proinflammatory activities of macrophage migration inhibitory factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 29, p. 24844-24861, 2012.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2017 Alzheimer's disease facts and figures, 13, 2017. 325-373.

ALZOHAIRY, Mohammad A. Therapeutics role of Azadirachta indica (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. **Evidence-Based complementary and alternative medicine**, v. 2016, 2016.

AMADIOHA, A. C.; OBI, V. I. Fungitoxic Activity of Extracts from Azadirachta indica and Xylopiya aethiopyca on Colletotrichum lindemuthianum in Cowpea. **Journal of herbs, spices & medicinal plants**, v. 6, n. 2, p. 33-40, 1998.

ANAND, Preet; SINGH, Baldev. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 4, p. 375-399, 2013.

ANDRIEU S, COLEY N, LOVESTONE S, AISEN PS, VELLAS B. Prevention of sporadic Alzheimer's disease: lessons learned from clinical trials and future directions. *Lancet Neurol.*, v. 14, n. 9, p. 926-44, Sep 2015.

ARACAVA, Y. et al. The molecular basis of anticholinesterase actions on nicotinic and glutamatergic synapses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 505, n. 1, p. 226-255, 1987.

ARORA, N.; KOUL, A.; BANSAL, M. P. Chemopreventive activity of Azadirachta indica on two-stage skin carcinogenesis in murine model. **Phytotherapy research**, v. 25, n. 3, p. 408-416, 2011.

AYGUN, Dursun et al. Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 903-910, 2002.

BABU, P. R. Aravinda et al. Recovery of benthocarb-inhibited AChE in fish brain: an in vitro study. **Ecotoxicology and environmental safety**, p. 317-322, 1989.

BADAM, L.; JOSHI, S. P.; BEDEKAR, S. S. 'In vitro'antiviral activity of neem (Azadirachta indica. A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses. **The Journal of communicable diseases**, v. 31, n. 2, p. 79-90, 1999.

BEKRIS, Lynn M. et al. Genetics of Alzheimer disease. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 23, n. 4, p. 213-227, 2010.

BHOWMIK, Debjit et al. Herbal remedies of Azadirachta indica and its medicinal application. **J Chem Pharm Res**, v. 2, n. 1, p. 62-72, 2010.

BIRD, T.D., 2001. Memory loss and dementia. In: BRAUNWALD, E., HAUSER, S.L., FAUCCI, A.S., KASPER, D.L., LONGO, D.L., JAMESON, J.L. (Eds.), Harrison's principles of Internal Medicine, vol 1. McGraw-Hill, New York, pp. 148-155.

BISWAS, Kausik et al. Biological activities and medicinal properties of neem (Azadirachta indica). **CURRENT SCIENCE-BANGALORE**, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002.

BITTENCOURT, Alexandre Muzy et al. O cultivo do nim indiano (Azadirachta indica A. Juss.): uma visão econômica. **Floresta**, v. 39, n. 3, 2009.
BRASIL. IBGE. **Censo Demográfico**, 2000.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.-P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (Carassius auratus). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n. 2, p. 117-124, 2000.

CABRAL, Marise MO et al. Anti-moulting activity in Brazilian Melia azedarach. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 117-118, 1996.

CARAMELLIA, Paulo; BARBOSAB, Maira Tonidandel. Como diagnosticar as quatro causas mais freqüentes de demência? How to diagnose the four most frequent causes of dementia?. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 24, n. Supl I, p. 7-10, 2002.

CHOPRA, Kanwaljit; MISRA, Shubham; KUHAD, Anurag. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 12, n. 3, p. 335-350, 2011.

CITRON, Martin. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 9, p. 677, 2004.

CONRICK, John. **Neem: the ultimate herb**. Lotus Press, 2001.

DE CASTRO, Rafaela Arns; ALBIERO, Adriana Lenita Meyer. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 59-72, 2016.

DE JUSSIEU, A. Mémoire sur le groupe des meliaceés. **Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle**, Paris, v. 19, p153-304, 1830.

DEV-KUMAR, C.; SUKHDEV (1993) Chemistry, In: N.S. Randhawa and B.S. Parmar (Eds.), Neem Research and Development, Society of Pesticide Science, India, pp. 63-97.

DHONGADE, Ramchandra K.; KAVADE, Sandeep G.; DAMLE, Rushikesh S. Neem oil poisoning. **Indian pediatrics**, v. 45, n. 1, 2008.

DWIVEDI, Shridhar; CHOPRA, Deepti. Neem (*Azadirachta indica*) as an Alternative Therapy for Tobacco Cessation. 2015.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V JR, FEATHER-STONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, 7, Jul 1961. 88-95. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518>>.

EMERENCIANO, Denise Porfirio et al. Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de *Azadirachta Indica* A. Juss. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 8, n. 2, p. 147-156, 2015.

ESFANDIARY, Ebrahim et al. Novel effects of *Rosa damascena* extract on memory and neurogenesis in a rat model of Alzheimer's disease. **Journal of neuroscience research**, v. 92, n. 4, p. 517-530, 2014.

FARIAS, Maria Rita de Kássia Costa et al. Investigação das propriedades farmacológicas de *Azadirachta indica* A. Juss. 2008.

FEITOSA, C. M. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. **Braz. J. Biol.**, 2011, vol. 71, n. 3, p. 783-789

FIEST, Kirsten M. et al. The prevalence and incidence of dementia due to Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 43, n. S1, p. S51-S82, 2016.

FORIM, M. R. Estudo Fitoquímico do Exerto de *Azadirachta indica* sobre a *Melia azadirach*: Quantificação de substâncias Inseticidas. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química. (2006). Tese de Doutorado.

FOURNIER, D.; MUTERO, A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 108, n. 1, p. 19-31, 1994.

FRANCIS, Paul T.; PARSONS, Chris G.; JONES, Roy W. Rationale for combining glutamatergic and cholinergic approaches in the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 12, n. 11, p. 1351-1365, 2012.

GODYŃ J, JOŃCZYK J, PANEK D, MALAWSKA B. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. **Pharmacol Rep.**, v. 68, n. 1, p. 127-38, Feb 2016.

GÓMEZ-ISLA, Teresa et al. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 14, p. 4491-4500, 1996.

GREEN, E. J. et al. Protective effects of brain hypothermia on behavior and histopathology following global cerebral ischemia in rats. **Brain research**, v. 580, n. 1-2, p. 197-204, 1992.

GRINGAUZ, Alex; MULLER, G. Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why. 1997.

GROOT C, HOOGHIEMSTRA AM, RAIJMAKERS PG, VAN BERCKEL BN, SCHELTENS P, SCHERDER E, ET AL. The effect of physical activity on cognitive function in patients with dementia: A meta-analysis of randomized control trials. **Ageing Res Rev.**, v. 25, p. 13-23, Jan 2016.

GUPTA, Ashu; GUPTA, Rajendra. A survey of plants for presence of cholinesterase activity. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 827-831, 1997.

GUPTA, Subash Chandra et al. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. **Phytomedicine**, v. 34, p. 14-20, 2017.

HAAS, Christopher. Strategies, development, and pitfalls of therapeutic options for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 28, n. 2, p. 241-281, 2012.

HAO, Fang et al. Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 1, p. 247-257, 2014.

HASHMAT, Imam; AZAD, Hussain; AHMED, Ajj. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)- A nature's drugstore: an overview. **Int Res J Biol Sci**, v. 1, n. 6, p. 76-79, 2012.

HENSTRIDGE, Christopher M.; PICKETT, Eleanor; SPIRES-JONES, Tara L. Synaptic pathology: a shared mechanism in neurological disease. **Ageing research reviews**, v. 28, p. 72-84, 2016.

HICKMAN, Richard A.; FAUSTIN, Arline; WISNIEWSKI, Thomas. Alzheimer disease and its growing epidemic: risk factors, biomarkers, and the urgent need for therapeutics. **Neurologic clinics**, v. 34, n. 4, p. 941-953, 2016.

HUANG, Yadong; MUCKE, Lennart. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1204-1222, 2012.

KALE, B. P. et al. Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 177-180, 2003.

KÁLMÁN, János et al. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life sciences**, v. 75, n. 10, p. 1195-1204, 2004.

KANDHARE, Amit D.; MUKHERJEE, Anwesha A.; BODHANKAR, Subhash L. Neuroprotective effect of *Azadirachta indica* standardized extract in partial sciatic nerve injury in rats: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic studies. **EXCLI journal**, v. 16, p. 546, 2017.

KATALINIĆ, Maja et al. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 1, p. 186-192, 2010.

KAUR, Gurpreet; SARWAR ALAM, M.; ATHAR, M. Nimbidin suppresses functions of macrophages and neutrophils: relevance to its antiinflammatory mechanisms. **Phytotherapy research**, v. 18, n. 5, p. 419-424, 2004.

KAWABUCHI, M. et al. The reversible carbamate,(-) physostigmine, reduces the size of synaptic end plate lesions induced by sarin, an irreversible organophosphate. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 97, n. 1, p. 98-106, 1989.

KUBA, K. et al. A study of the irreversible cholinesterase inhibitor, diisopropylfluorophosphate, on time course of end-plate currents in frog sartorius muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 189, n. 2, p. 499-512, 1974.

KUMAR, P. Sudhir et al. Biological action and medicinal properties of various constituent of *Azadirachta indica* (Meliaceae): an overview. **Annals of Biological research**, v. 1, n. 3, p. 24-34, 2010.

LAI, S. M.; LIM, K. W.; CHENG, H. K. Margosa oil poisoning as a cause of toxic encephalopathy. **Singapore medical journal**, v. 31, n. 5, p. 463-465, 1990.

LEE, Hyoung-gon et al. Amyloid beta: the alternate hypothesis. **Current Alzheimer Research**, v. 3, n. 1, p. 75-80, 2006.

LIBRO, Rosaliana et al. Natural phytochemicals in the treatment and prevention of dementia: An overview. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 518, 2016.

LING HUANG, TAO SU, XINGSHU LI. Natural Products as Sources of New Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Curr Top Med Chem.**, v. 13, n. 15, 2013.

LLOYD, AC Charmaine et al. Anticandidal activity of *Azadirachta indica*. **Indian journal of Pharmacology**, v. 37, n. 6, p. 386, 2005.

LOPES, Marcos A.; BOTTINO, Cássio. Prevalence of dementia in several regions of the world: analysis of epidemiologic studies from 1994 to 2000. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 60, n. 1, p. 61-69, 2002.

MADEO, Jennifer et al. The role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis Parkinsonism**, v. 3, n. 2, p. 116-21, 2013.

MAESTRE, Gladys E. et al. Incidence of dementia in elderly Latin Americans: Results of the Maracaibo Aging Study. **Alzheimer's & Dementia**, 2017.

MAESTRE, Gladys E. et al. The Maracaibo Aging Study: population and methodological issues. **Neuroepidemiology**, v. 21, n. 4, p. 194-201, 2002.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Wagner, H.; Wolf, P, editors. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. Berlin: Springer Verlag; 1977. p. 23-53.

MANAL, M. E. T. et al. The effect of neem (*Azadirachta indica*) leaves extract on alpha-fetoprotein serum concentration, glutathione s-transferase and glutathione peroxidase activity in hepatocarcinogenesis induced rats. **Int Cancer Res**, v. 3, n. 2, p. 111-118, 2007.

MARINHO, P.E.S.; SILVA, K.P.; BARROSO, W.A.; CAMARA, L.L.; COSTA, C.M.P.; SILVA, M.C. FREIRE, S.M.F.; CAMARA, A.L. Effect of Hydroalcoholic Extract of Neem (*Azadirachta indica*) in the control of *Aedes aegypti*. Fesbe, 2011. Rio de Janeiro.

MARTINEZ, S. S. O Nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção / Instituto Agronômico do Paraná. Londrina: IAPAR, 2002.

MEERAN, Mohammed et al. "Herbal remedy is natural and safe"—truth or myth?. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 61, p. 75, 2013.

MENDIOLA-PRECOMA J, BERUMEN LC, PADILLA K, GARCIA-ALCOCER G. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. **Biomed Res Int**, v. 2016, Jul 2016.

MOLERO, Aldrin E.; PINO-RAMÍREZ, Gloria; MAESTRE, Gladys E. High prevalence of dementia in a Caribbean population. **Neuroepidemiology**, v. 29, n. 1-2, p. 107-112, 2007.

MORRIS, R. G. M. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, n. 5868, p. 681, 1982.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A.Juss): Múltiplos usos. **Acta Farm**. 2005.

MUKHERJEE, Pulok K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 14, n. 4, p. 289-300, 2007.

MURRAY AP, FARAONI MB, CASTRO MJ, ALZA NP, CAVALLARO V. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. **Curr Neuropharmacol**, v. 11, n. 4, p. 388-413, Jul 2013.

NATARAJAN, V.; VENUGOPAL, P. V.; MENON, T. Effect of *Azadirachta indica* (neem) on the growth pattern of dermatophytes. **Indian journal of medical microbiology**, v. 21, n. 2, p. 98, 2003.

NATHAN, S. Senthil et al. The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaffolder. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, n. 2, p. 113-122, 2005.

NATHAN, Sengottayan Senthil et al. Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 244-250, 2008.

NETO, José Gallucci; TAMELINI, Melissa Garcia; FORLENZA, Orestes Vicente. Diagnóstico diferencial das demências. **Rev Psiq Clín**, v. 32, n. 3, p. 119-30, 2005.

NEVES, BP. Circular Técnica nº28 Cultivo do Nim Indiano *Azadirachta indica* A. Juss. Goiânia: Embrapa – CNPAF – APA, 1996.

NILS, Aline Vilar Machado. **Treinamento em memória operacional espacial em ratos idosos: efeitos na ansiedade, habituação e densidade de células no hipocampo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015.

NITRINI, Ricardo et al. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. **International Psychogeriatrics**, v. 21, n. 4, p. 622-630, 2009.

PATEL, Shradha M. et al. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2016. p. 100-115.

PAUL, Rajkumar; PRASAD, Murari; SAH, Nand K. Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): a mini review. **Cancer biology & therapy**, v. 12, n. 6, p. 467-476, 2011.

PILLAI, N. R.; SANTHAKUMARI, G.; LAPING, Johannes. SOME PHARMACOLOGICAL ACTIONS OF 'NIMBIDIN'-A BITTER PRINCIPLE OF *AZADIRACHTA INDICA*-A JUSS (NEEM). **Ancient science of life**, v. 4, n. 2, p. 88, 1984.

POHANKA, Miroslav. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc**, v. 155, n. 3, 2011.

PRINCE, Martin James. **World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends**. Alzheimer's Disease International, 2015.

PU, Zhong-Hui et al. Antibacterial activity of 9-octadecanoic acid-hexadecanoic acid-tetrahydrofuran-3, 4-diyl ester from neem oil. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 8, p. 1236-1240, 2010.

RAGHAVENDRA, M. et al. Role of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 3, n. 1, p. 37, 2013.

- RAHMAN, M. F.; SIDDIQUI, M. K. J.; JAMIL, Kaiser. Sub-chronic effect of neem based pesticide (Vepacide) on acetylcholinesterase and ATPases in rat. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 34, n. 5, p. 873-884, 1999.
- RODRIGUEZ, Juan J. Llibre et al. Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. **The Lancet**, v. 372, n. 9637, p. 464-474, 2008.
- RUSSELL, A., 1980. Cholinesterase inhibitors. In: Odgson, E., Guthrie, E.F. (Eds.), *Introduction to Biochemical Toxicology*. Blackwell, Oxford, pp. 193–223.
- SALEEM, Sumaira et al. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. **Phytotherapy Research**, 2018.
- SANTOS, M. Â. C. D. FITOTERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER. UNIVERSIDADE DO ALGARVE. [S.l.]. 2016.
- SAXENA, R. C. The neem tree: its geographical distribution, plantation characteristics, growth and yield and associated pests and diseases. In: **Training Workshop on “How to Grow and Use Neem”**, ICIPE, Mbita, Kenya. 1999. p. 14-23.
- SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER MM, DE STROOPER B, FRISONI GB, SALLOWAY S, VAN DER FLIER WM. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 388, n. 10043, Jul 2016.
- SCHMUTTERER, Heinrich. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual review of entomology**, v. 35, n. 1, p. 271-297, 1990.
- SELKOE, Dennis J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.
- SHULTZ, E. B. NEEM: a tree for solving global problems: report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development, National Research Council. 1992.
- SINGH, Kiran; SINGH, D. K. Toxicity to the snail *Limnaea acuminata* of plant-derived molluscicides in combination with synergists. **Pest management science**, v. 56, n. 10, p. 889-898, 2000.
- SITHISARN, Pongtip; SUPABPHOL, Roongtawan; GRITSANAPAN, Wandee. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 109-112, 2005.
- SOUZA MARTINEZ, S. **O nim (*Azadirachta indica*) natureza, usos múltiplos, produção**. Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), 2002.

SU, MIRSMENN; MULLA, M. S. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 2, p. 133-152, 1999.

SUBAPRIYA, R.; BHUVANESWARI, V.; NAGINI, S. Ethanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract induces apoptosis in the hamster buccal pouch carcinogenesis model by modulation of Bcl-2, Bim, caspase 8 and caspase 3. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 6, n. 4, p. 515, 2005.

SUNDARAM, Kanth MS. Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 31, n. 4, p. 913-948, 1996.

SURI, R. K.; MEHROTRA, A. **Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) A Wonder Tree**. Society of Forest & Environmental Managers, 1994.

ŚWIERCZ, Radosław et al. Partial protection from organophosphate-induced cholinesterase inhibition by metyrapone treatment. **International journal of occupational medicine and environmental health**, v. 26, n. 4, p. 636-646, 2013.

TAKIZAWA, Claire et al. Epidemiological and economic burden of Alzheimer's disease: a systematic literature review of data across Europe and the United States of America. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 43, n. 4, p. 1271-1284, 2015.

TAN, Chen-Chen et al. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 41, n. 2, p. 615-631, 2014.

THAKURTA, Prarthana et al. Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 607-612, 2007.

THOH, Maikho et al. Azadirachtin interacts with retinoic acid receptors and inhibits retinoic acid-mediated biological responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 6, p. 4690-4702, 2011.

TIWARI, Vaibhav et al. In vitro antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* L.) bark extract against herpes simplex virus type-1 infection. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 8, p. 1132-1140, 2010.

TREVISAN, Maria Teresa Salles et al. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

UCHEGBU, M. C. et al. The Growing Importance of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in Agriculture, Industry, Medicine and Environment: A Review. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n. 3, p. 230-245, 2011.

United Nations DoEaSA, Population Division. World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A390). 2015.

VAIBHAV, Kumar et al. Azadirachta indica mitigates behavioral impairments, oxidative damage, histological alterations and apoptosis in focal cerebral ischemia–reperfusion model of rats. **Neurological Sciences**, v. 34, n. 8, p. 1321-1330, 2013.

VAN MARUM, Robert J. Current and future therapy in Alzheimer's disease. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 265-274, 2008.

VIEGAS JR, Cláudio et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, p. 655-660, 2004.

VIEGAS, J. C.; BOLZANI, V.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. New antiAlzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. *Med. Chem.* 5: 915-926, 2005.

VOLLMAR, Horst Christian; THYRIAN, René. 110 years after Auguste Deter. 2017.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 8, p. 1558-1571, 2008.

WHALLEY, Lawrence J. **Understanding Brain Aging and Dementia: a life course approach**. Columbia University Press, 2015.

WHALLEY, Lawrence J.; DICK, Finlay D.; MCNEILL, Geraldine. A life-course approach to the aetiology of late-onset dementias. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 1, p. 87-96, 2006.

WHO. Dementia: A Public Health Priority. London: World Health Organization; 2012.

WILCOCK, Gordon K.; LILIENFELD, Sean; GAENS, Els. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. **Bmj**, v. 321, n. 7274, p. 1445, 2000.

WOLLMANN, Camila Tochetto et al. Efeitos da agmatina nos prejuízos de aprendizagem e memória induzidos pela escopolamina e envelhecimento em ratos. 2011.

YANPALLEWAR, Sudhirkumar et al. Neuroprotective effect of Azadirachta indica on cerebral post-ischemic reperfusion and hypoperfusion in rats. **Life sciences**, v. 76, n. 12, p. 1325-1338, 2005.

YERIMA, M. B. et al. Effect of neem extracts (Azadirachta indica) on bacteria isolated from adult mouth. **Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 20, n. 1, p. 64-67, 2012.