

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

DÂMARIS COSTA MIRANDA PIRES

A suplementação alimentar de longo prazo com folhas de manjeriço  
(*Ocimum basilicum*) induz alterações comportamentais e previne o declínio  
cognitivo associado à idade em camundongos

Uberlândia

2022

DÂMARIS COSTA MIRANDA PIRES

A suplementação alimentar de longo prazo com folhas de manjeriço  
(*Ocimum basilicum*) induz alterações comportamentais e previne o declínio  
cognitivo associado à idade em camundongos

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas,  
do Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade Federal de Uberlândia  
como requisito parcial para obtenção do  
título de mestre em Biologia Celular.  
Orientador: Prof. Dr. Alberto da S. Moraes

Uberlândia

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P667d  
2022

Pires, Dâmaris Costa Miranda, 1998-

A ingestão de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) induz alterações comportamentais e previne o declínio cognitivo associado à idade em camundongos [recurso eletrônico] / Dâmaris Costa Miranda Pires. - 2022.

Orientador: Alberto da Silva Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.6007>

Inclui bibliografia.

I. Biologia celular. I. Moraes, Alberto da Silva, 1978-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU :576.3

---



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 05/2022, do PPGBC				
Data:	18/07/2022	Hora de início:	[08:00]	Hora de encerramento:	[12:20]
Matrícula do Discente:	11922BCE002				
Nome do Discente:	Dâmaris Costa Miranda Pires				
Título do Trabalho:	A suplementação alimentar de longo prazo com folhas de manjeriço ( <i>Ocimum basilicum</i> ) induz alterações comportamentais e previne o declínio cognitivo associado à idade em camundongos				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	-				

Reuniu-se, de forma Virtual, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, assim composta: Professores Doutores: **Professores Doutores: Gessynger Moraes Silva - UNESP; Foued Salmen Espindola - UFU; e Alberto da Silva Moraes - UFU**, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. **Alberto da Silva Moraes**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provadoa.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Alberto da Silva Moraes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/07/2022, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espindola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/07/2022, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gessynger Moraes Silva, Usuário Externo**, em 18/07/2022, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3735240** e o código CRC **CABD4D4F**.

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, primeiramente, que me capacita a cada dia e me concedeu o privilégio de realizar este trabalho.*

*Ao meu esposo, que sempre me apoiou e se empenhou para que eu pudesse fazer o mestrado.*

*Ao meu pai e minha mãe que muitas vezes, mesmo de longe, também me concederam apoio. À Nanci, que nos últimos meses foi uma grande ajuda para mim nos afazeres domésticos.*

*Ao professor Alberto, que aceitou me orientar no mestrado e que sempre esteve disponível para tirar dúvidas, instruir. Com certeza tive aprendizados valiosos para a minha vida profissional e pessoal.*

*À toda equipe da Rede de Biotérios da UFU (REBIR) que também sempre se colocou a disposição para esclarecer dúvidas e nos concedeu o espaço para o alojamento dos animais. À Sandra, que na época estava como estagiária na REBIR, por muitas vezes precisei de sua ajuda e fui atendida.*

*À Andrea Tatiana Durán, uma companheira de mestrado, com quem aprendi bastante sobre a cultura colombiana e fui ajudada quando precisei.*

*À Natália Ferreira Silva e à Paulla Vieira, que me auxiliaram com dicas e materiais de estudo para que eu pudesse ingressar no mestrado.*

*Ao simpático casal de idosos que me concedeu o manjericão utilizado no trabalho.*

*À CAPES, pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, pela estrutura e professores. À Esther, técnica do laboratório de Histologia pelas pacientes orientações.*

*Agradeço também aos membros da banca de qualificação e banca de defesa (prof. dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo, dr. Gessynger Morais Silva, prof. dra. Yara Cristina*

*de Paiva Maia, prof. dr. Foued Salmen Espíndola) pelas valorosas contribuições ao meu trabalho.*

*E à todos que somaram nessa jornada. Que Deus abençoe muito mais a cada um destes.*

*“Eu sou a videira; vocês os ramos. Se alguém permanecer em Mim e eu nele, esse dará muito fruto; pois sem Mim vocês não podem fazer coisa alguma.”*

Bíblia Sagrada, João 15:5

## RESUMO

O avanço da idade traz consigo alguns desafios, incluindo mudanças que ocorrem de forma fisiológica, como o declínio cognitivo, afetando a memória, o aprendizado e a atenção. Sabe-se que a nutrição pode influenciar o funcionamento do sistema nervoso central e suas funções cognitivas. O manjeriço comum (*Ocimum basilicum* L.) é conhecido pelos vários benefícios para a saúde associados ao seu consumo, incluindo o seu efeito antioxidante e anti-inflamatório. Portanto, no presente estudo, o objetivo foi analisar e comparar o potencial efeito benéfico da ingestão de manjeriço nas funções cognitivas em camundongos idosos, quando ocorre declínio cognitivo leve e em animais mais jovens, quando ainda não existem alterações funcionais deletérias detectáveis. Para isso, o manjeriço foi utilizado como suplemento alimentar para camundongos fêmeas C57BL/6 adultos maduros e adultos idosos. Os animais dos grupos tratados receberam, de quatro a sete meses, um preparado contendo uma mistura de ração extrusada padrão triturada (5 g) e um homogenato aquoso de folhas frescas de manjeriço (1,2 mg in 10 mL), o qual era repetetizado e seco em estufa. Posteriormente, os camundongos foram testados cognitivamente na tarefa de reconhecimento de objetos (TRO), labirinto em cruz elevado (LCE) e labirinto aquático de Morris (LAM). O declínio cognitivo associado à idade, a memória e o aprendizado foram avaliados e os resultados, além de comprovarem alterações cognitivas deletérias e dependentes da idade em camundongos, somadas a um possível efeito ansiolítico do envelhecimento, demonstraram efeitos benéficos da ingestão de manjeriço em camundongos idosos, especialmente. Neste estudo, também foi evidenciado um possível efeito estimulante e/ou ansiogênico do manjeriço nos animais suplementados, evidente principalmente em animais adultos maduros. Assim, a ingestão diária com manjeriço a longo prazo, graças, possivelmente, às suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, pode modular aspectos cognitivos e comportamentais, por exemplo, diminuindo a perda de memória associada à idade, ou funcionando como um agente estimulante/ansiogênico.

**Palavras-chave:** Cognição. Envelhecimento. Memória. *Ocimum basilicum*. Suplementação alimentar.

## ABSTRACT

Advancing age brings with it some challenges, including changes that occur physiologically, such as cognitive decline, affecting memory, learning and attention. It is known that nutrition can influence the functioning of the central nervous system and its cognitive functions. Common basil (*Ocimum basilicum L.*) is known for the various health benefits associated with its consumption, including its antioxidant and anti-inflammatory effect. Therefore, in the present study, the aim was to analyze and compare the potential beneficial effect of dietary basil ingestion on cognitive functions in aged mice, when mild cognitive decline occurs and in younger animals, when there are still no detectable deleterious functional changes. For this, basil was used as a food supplement for mature adult and elderly adult C57BL/6 female mice. The animals from treated groups received, between four to seven months, a preparation containing a mix of grounded rodent extruded chow (5 g) and an aqueous homogenate of fresh basil leaves (1.2 mg in 10 mL), which was repelleted and oven dried. Later, the mice were cognitively tested in the novel object recognition (NOR), elevated plus maze (EPM) and Morris water maze (MWM). Age-associated cognitive decline, as well as memory and learning were evaluated, and the results, in addition to proving deleterious age-dependent cognitive changes in mice, added to a possible anxiolytic effect of aging, demonstrated beneficial effects of basil ingestion, especially in mature adults. In this study, a possible anxiogenic effect of basil in supplemented animals was also evidenced, evident mainly in mature adult animals. Thus, long-term daily ingestion of basil, possibly thanks to its antioxidant and anti-inflammatory activities, can modulate aspects cognitive and behavioral effects, for example, decreasing age-related memory loss, or functioning as a stimulant/anxiogenic agent.

**Keywords:** Aging. Cognition. Food supplementation. Memory. *Ocimum basilicum*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre EROs, inflamação e envelhecimento.....	20
Figura 2 – Espécime de <i>Ocimum basilicum</i> .....	27
Figura 3 – Diversidade de espécies do gênero <i>Ocimum</i> .....	29
Figura 4 – Diferenças morfológicas de folhas de três espécies comuns de manjeriço..	30
Figura 5 – Estrutura química do linalol.....	33
Figura 6 – Estrutura química do 1,8-cineol.....	34
Figura 7 – Estrutura química do eugenol.....	35
Figura 8 – Folhas de manjeriço ( <i>Ocimum basilicum</i> ) utilizadas no presente estudo....	40
Figura 9 – Exemplo de área de trabalho para análise dos vídeos dos testes.....	43
Figura 10 – Material e métodos TRO.....	45
Figura 11 – Material e métodos LCE.....	47
Figura 12 – Material e métodos LAM.....	49
Figura 13 – Resultado avaliação de massa corporal.....	54
Figura 14 – Resultado TRO.....	56
Figura 15 – Resultado LCE.....	58
Figura 16 – Resultado LAM.....	59
Figura 17 – Avaliação de ansiedade nos testes LCE e TRO.....	62
Figura 18 – Resultado condições dos animais após os testes cognitivos.....	66

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Composição das dietas.....	42
Tabela 2 – Impacto dos problemas de saúde detectados sobre os resultados dos testes cognitivos.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ml – Mililitro;

kg – Quilograma;

min – Minuto/s;

s – Segundo/s;

h – Hora/s;

fig – Figura;

col – Colaboradores;

e1 – Índice de exploração durante treino;

e2 – Índice de exploração durante o desafio;

d1 – Índice de discriminação absoluta;

d2 – Índice de discriminação;

d3 – Índice de preferência;

TRO – Tarefa de reconhecimento de objetos;

LCE – Labirinto em cruz elevado;

LAM – Labirinto aquático de Morris;

SNC – Sistema nervoso central;

EROs – Espécies reativas de oxigênio;

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1;

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais;

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

REBIR-UFU – Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia;

MouBeAT – *Mouse Behavioral Analysis Toolbox*;

LT1 – Latência de transferência dia do treino;

LT2 – Latência de transferência dia do desafio;

DF – *degree of freedom*;

NF-kB – Fator nuclear kappa-B;

GR – Glutathione redutase;

SOD – Superóxido dismutase;

IL-6 – Interleucina-6;

TNF-a – Fator de necrose tumoral alfa;

IL-1B – Interleucina 1 beta;  
BHE – Barreira hematoencefálica;  
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;  
NO – Óxido nítrico;  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio;  
GSH – Glutathiona;  
GPx – Glutathiona peroxidase;  
GST – Glutathiona S-transferase;  
GR – Glutathiona redutase;  
CAT – Catalase;  
PGE2 – Prostaglandina E2;  
IL-4 – Interleucina 4;  
LDL – Lipoproteína de baixa intensidade;  
-OH – Hidroxila;  
O<sub>2</sub> – Superóxido;  
NO – Óxido nítrico;  
COX-2 – Ciclooxygenase-2;  
LOX – Lipo-oxigenase;  
IL-10 – Interleucina 10;  
NMDA – N-metil-d-aspartato;  
Nrf2 – Fator nuclear eritróide-2 relacionado ao fator 2;  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato;  
NQO1 – Quinona oxirredutase 1;  
GSTA – Glutathiona S-transferase A;  
AChE – Acetilcolinesterase;  
ACh - Acetilcolina;  
COX – Ciclo-oxigenase;  
PGs – Prostaglandinas;  
DPPH – difenil-1-picrilhidrazil;  
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
	2.1 FATORES ASSOCIADOS COM O ENVELHECIMENTO CELULAR NO SNC E DEMAIS SISTEMAS.....	17
	2.2 COGNIÇÃO E ENVELHECIMENTO.....	21
	2.3 NEURODEGENERAÇÃO E NEUROPROTEÇÃO.....	24
	2.4 ASPECTOS NUTRICIONAIS E ENVELHECIMENTO.....	25
	2.5 PLANTAS MEDICINAIS.....	26
	2.6 MANJERICÃO ( <i>OCIMUM SP.</i> ).....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
	4.1 ANIMAIS.....	38
	4.2 SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR.....	40
	4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	43
	4.3.1 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	44
	4.3.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	46
	4.3.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	48
	4.4 AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE.....	50
	4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
	5.1 AVALIAÇÃO DE MASSA CORPORAL.....	54
	5.2 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	55
	5.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	56
	5.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	58
	5.5 AVALIAÇÃO DE ANSIEDADE.....	59
	5.6 CONDIÇÕES DOS ANIMAIS APÓS OS TESTES COGNITIVOS.....	62
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços médicos e melhoras no sistema público de saúde contribuíram na redução da mortalidade por doenças infecciosas, bem como na redução de doenças não comunicáveis na população idosa, auxiliando no aumento da expectativa de vida, devido a melhoria dos cuidados médicos, vacinação e higiene. No entanto, a expectativa de saúde não aumentou na mesma proporção (WILMOTH, J. R., 2000; EGGLESTON, K. N.; FUCHS, V. R., 2012).

O envelhecimento é caracterizado pelo declínio progressivo e inevitável da função dos órgãos, culminando com a morte do organismo. Com o avançar da idade, as doenças cardíacas e o câncer tornam-se mais frequentes, assim como a doença de Alzheimer, que é uma doença neurodegenerativa. Portanto, idosos que sobrevivem com boa saúde até o fim da vida são casos raros (DONG, X.; MILHOLLAND, B.; VIJG, J., 2016).

Em idosos, o envelhecimento, no que diz respeito ao sistema nervoso central (SNC), é caracterizado por declínio cognitivo, o qual ocorre como consequência de mudanças estruturais no cérebro, associadas à diminuição da plasticidade sináptica. A neurogênese é afetada e as alterações na plasticidade, assim como a perda sináptica, tornam os idosos mais propensos a desenvolver doenças do SNC (AUNAN, J. R. et al., 2016).

Atualmente, o ser humano tem uma expectativa de vida maior, o que torna ainda mais importante entender os mecanismos envolvidos no envelhecimento fisiológico para retardar alguns de seus efeitos secundários. Conforme demonstrado em diferentes espécies, o dano ao material genético leva ao envelhecimento que, no SNC, pode ser evidenciado como uma redução extrema do córtex cerebral e do hipocampo, associada a um grande aumento ventricular (LOERCH, P. M. et al., 2008; MATHERS, C. D. et al., 2015).

O declínio cognitivo não ocorre apenas como consequência de doenças neurodegenerativas, mas também no envelhecimento fisiológico. Com o envelhecimento, as regiões cerebrais responsáveis pela consolidação da memória declarativa, a aprendizagem espacial, a memória de trabalho e atenção tornam-se prejudicadas (KAUSLER, D. H., 1994; BETTIO, L. E. B.; RAJENDRAN, L.; GIL-MOHAPPEL, J., 2017).

Sabe-se, por exemplo, que a única forma efetivamente testada em mamíferos de aumentar a expectativa de vida é por meio da restrição calórica, seja aguda ou crônica. Porém, há muito se sabe que a nutrição pode influenciar no envelhecimento de vários tecidos, bem como no funcionamento do SNC e em suas funções cognitivas (GRANTHAM-MCGREGOR, S., 1984; MARTI-NICOLOVIUS, M.; AREVALO-GARCIA, R., 2018).

O manjericão (*Ocimum basilicum*), erva pertencente à família *Lamiaceae*, é utilizado como medicamento potencial na medicina tradicional e em rituais religiosos, sendo também utilizado na culinária internacional e como condimento de alimentos e bebidas (HUNI, 2021). É a principal planta consumida pelas populações europeias, sendo seu consumo *in natura* associado principalmente à dieta mediterrânea, a qual se baseia no amplo consumo de grãos inteiros, frutas, vegetais, legumes, laticínios e carne branca (SIMOPOULOS, A. P., 2001). Essa dieta está relacionada a uma baixa incidência de doenças neurodegenerativas, além da redução do risco para o desenvolvimento de câncer e de doenças cardiovasculares (VISIOLI, F. et al., 2004).

Consumido naturalmente ou processado, o manjericão é apreciado também pelo seu óleo essencial. Na medicina alternativa, partes do manjericão são usadas para fazer chás. Já na culinária popular, o manjericão é utilizado como tempero para ser consumido em guisados de carnes e peixes, saladas, sopas e licores (FAVORITO, P. A. et al., 2011), além de ser comumente utilizado em molhos para massas e pratos à base de tomate (BOWER, A.; MARQUEZ, S.; MEJIA, E. G., 2016).

Na medicina popular, o manjericão é usado como analgésico abdominal, anti-inflamatório e no tratamento de distúrbios neurológicos, como ansiedade, enxaqueca e dores de cabeça. Na medicina Ayurveda, uma antiga terapia indiana, o consumo de alimentos frescos é promovido. O manjericão é conhecido na Ayurveda como “a rainha das ervas” devido às suas propriedades medicinais, sendo útil para o corpo e a mente. Acredita-se que o consumo diário de manjericão previne doenças, promove saúde, bem-estar e longevidade, além de ajudar a reduzir o estresse (MAHAJAN, N. et al., 2013; OPARA, E. I.; CHOCHAN, M., 2014).

É amplamente aceito que várias partes da planta possuem ação antialérgica, antioxidante, radioprotetora e anticarcinogênica. Isso se deve à rica composição do manjericão que contém linalol, eugenol, geraniol, 1,8-cineol, alfa-pineno, dentre outros, que o torna útil para fins fitoterápicos na indústria farmacêutica e cosmética

(PRAKASH, J.; GUPTA, S., 2000; ADHVARYU, M. R. et al., 2008; RAMESH, B.; SATAKOPAN, V. N., 2010; KADIAN, R.; PARLE, M., 2012).

Em um estudo realizado por Sarahroodi e col. (SARAHROODI, S. et al., 2012), usando modelo animal, foi demonstrado que a administração de diferentes doses de *Ocimum basilicum* aumentou a retenção e recuperação da memória. Em outro estudo, realizado em 2018, Singh e colaboradores (SINGH, V.; KRISHAN, P.; SHRI, R., 2018) utilizaram extrato alcoólico de folhas de manjeriço e descobriram que, quando administrado após a indução de danos cerebrais em camundongos, houve melhora da memória e diminuição do déficit neurológico, indicando efeito neuroprotetor do manjeriço.

Alguns estudos anteriores avaliaram o potencial do manjeriço na melhora cognitiva, porém tais estudos utilizaram animais que não são considerados idosos (até 9 meses de idade) (KUSINDARTA, D. L.; WIHADMADYATAMI, H.; HARYANTO, A., 2018) e, na grande maioria, houve a indução de algum dano cognitivo antes do tratamento, não avaliando, portanto, o declínio cognitivo leve fisiológico dependente da idade (RAGHAVENDRA, M. et al., 2009).

Além disso, a maior parte dos estudos foi realizada com a administração de extratos etanólicos de manjeriço (MALVE, H. O. et al., 2014). Solventes -como o etanol- utilizados para aumentar a eficiência de extração e reduzir o tempo de extração, são tóxicos, sendo, portanto, fluidos de extração não seguros para ervas, plantas e afins (CHENG, Y. et al., 2021). Ainda, as folhas integrais contêm todos os nutrientes e compostos, ao contrário dos extratos e óleos em que são extraídos determinados tipos de compostos, mas não todos.

No presente estudo, foram usados animais que envelheceram naturalmente, os quais receberam folhas de manjeriço misturadas a ração para roedores, com o intuito de avaliar os possíveis benefícios cognitivos e comportamentais da ingestão dessa erva durante o declínio cognitivo leve associado à idade, dado o extenso uso dessa planta na alimentação humana, e dos relatados benefícios do uso de seus óleos essenciais e suplementos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fatores associados com o envelhecimento celular no SNC

Os distúrbios degenerativos dependentes da idade levam a uma deterioração progressiva da função e estrutura dos tecidos. Esse fenômeno acontece como consequência do envelhecimento, que se caracteriza por alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, ocorrendo desde uma célula e se expandindo para todo o organismo. No final da década de 50, propôs-se a teoria dos radicais livres, segundo a qual o estresse oxidativo seria a causa para o envelhecimento, sendo o metabolismo oxidativo mitocondrial a fonte do excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), cujos níveis, com o avançar da idade, aumentam, sendo estes diretamente responsáveis por danos cumulativos ao DNA, proteínas e lipídios (HARMAN, D., 1956).

Além de serem fruto do metabolismo oxidativo normal, os radicais livres podem advir de outras fontes como tabagismo, radiação, dentre outros. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade das defesas antioxidantes em eliminá-los, consequência do aumento da produção de EROs, associado ou não ao baixo consumo alimentar de antioxidantes, ou à diminuição da expressão de enzimas e entidades antioxidantes do próprio organismo (HALLIWELL, B., 1997; MCCORD, J. M., 2000).

A produção de EROs, associada ao dano oxidativo às macromoléculas celulares, fornece um ambiente propício para que haja o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento (LINDSAY, D. G.; ASTLEY, S. B., 2002; LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B., 2006). O estresse oxidativo, portanto, pode se relacionar ao envelhecimento pelas variações na geração ou eliminação de EROs (BENZI, G.; MORETTI, A., 1995). Ocorrendo de maneira persistente, pode causar dano celular e apoptose, conduzindo à perda da homeostase biológica e ao comprometimento da função dos órgãos (ROMÁ-MATEO, C. et al., 2018).

O processo de envelhecimento celular se difere da senescência celular. O envelhecimento celular se inicia desde o nascimento e se estende até que ocorra a morte, estando associado a processos de danos e alterações celulares relacionadas ao tempo e ao uso. Assim, o processo de envelhecimento afeta qualquer tipo celular, independentemente de sua capacidade proliferativa. A senescência, por sua vez, compreende um conjunto de mudanças relacionadas à parada da atividade mitótica da

célula e os resultados são efeitos deletérios no organismo, tornando-o mais suscetível a doenças crônicas (BALCOMBE, N.; SINCLAIR, A., 2001; GAVA, A. A.; ZANONI, J. N., 2005).

A senescência celular pode ser induzida por estresse, por exemplo em resposta a eventos moleculares danosos, ou replicativa, resultante de perda telomérica (PARTRIDGE, L.; GEMS, D., 2002). No primeiro caso, a resposta está associada a mudanças fenotípicas, como resultado da ativação de programas de expressão gênica em resposta a diferentes agentes estressores, limitando a expectativa de vida proliferativa da célula (FRANCICA, P.; AEBERSOLD, D. M.; MEDOVÁ, M., 2017). Descrita pela primeira vez na década de 60 (HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S., 1961), a senescência replicativa decorre da perda de DNA telomérico que ocorre a cada divisão celular, sendo considerada um dos marcadores de envelhecimento, e está relacionada a morbidade e comorbidade da maioria das doenças associadas à idade (LÓPEZ-OTIN et al., 2013).

O processo de senescência celular pode ser causado, portanto, pelo atrito dos telômeros, estresse oxidativo, radiação, outros agentes de dano ao DNA, dentre outros mecanismos (COPPÉ, J.-P. et al., 2010; CAMPISI, J., 2013), levando a mudanças morfológicas e bioquímicas (MCHUGH, D.; GIL, J., 2018). As células senescentes, além de hiporeplicativas, são metabolicamente alteradas e adquirem um fenótipo secretório de fatores pró-inflamatórios (HERNANDEZ-SEGURA, A. et al., 2017). Dessa forma, ao mesmo tempo em que a senescência atua como um mecanismo antitumoral por limitar a replicação de células pré-neoplásicas, seu acúmulo também impulsiona o envelhecimento do organismo através da diminuição da capacidade replicativa celular (COLLADO, M.; SERRANO, M., 2010; VAN DEURSEN, J. M., 2014), com consequências negativas, inclusive, à manutenção dos nichos de células progenitoras adultas (RODIER, F.; CAMPISI, J., 2011).

O envelhecimento cerebral se diferencia do de todos os outros órgãos uma vez que é composto, dentre outros tipos celulares, pelos neurônios, que são células pós-mitóticas diferenciadas nas quais os telômeros supostamente não encurtam com o passar do tempo (ISAEV, N. K. et al., 2013). No SNC, o envelhecimento se caracteriza por uma deterioração progressiva das funções cognitivas, além da perda de massa tecidual e probabilidade aumentada de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

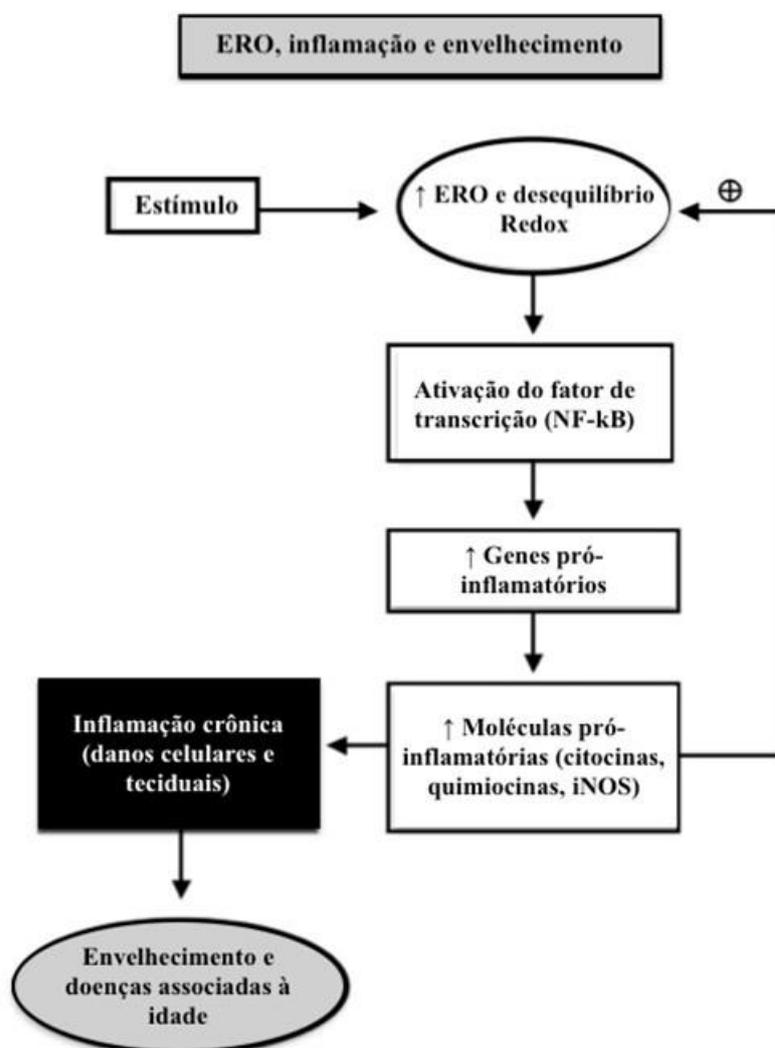
Ao longo do envelhecimento normal, os neurônios pós-mitóticos do SNC apresentam danos ao DNA, aumento da variante de histonas associada à heterocromatina, macroH2A, e aumento da produção de IL-6 (MALLETTE, F. A. et al., 2007; COPPÉ, J.-P. et al., 2008; KREILING, J. A. et al., 2011), sendo este um dos eventos que conduz à neurodegeneração (KIECOLT-GLASER, J. K. et al., 2003; ACOSTA, J. C. et al., 2013).

Além disso, ocorre a perda do número, diâmetro e comprimento dos dendritos nos neurônios (PAGE, T. L. et al., 2002). Sugere-se que os principais causadores do envelhecimento sejam o acúmulo de EROs e alterações nos programas moleculares genéticos e epigenéticos (YANKNER, B. A.; LU, T.; LOERCH, P., 2008).

A maior parte do oxigênio utilizado pelo cérebro é consumido pelas mitocôndrias. A produção de radicais livres nesse processo é alta. Em um cérebro saudável, ocorre o equilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade das defesas antioxidantes os eliminarem. Já em um cérebro envelhecido, enzimas antioxidantes como glutatona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) tendem a estar menos ativas, em associação com uma maior produção de EROs (LEUTNER, S.; ECKERT, A.; MÜLLER, W. E., 2001). Com isso, ocorre acúmulo de radicais livres e consequente estresse oxidativo. O estresse oxidativo, por sua vez, danifica, dentre outras macromoléculas, o DNA nuclear e mitocondrial, colaborando para o aumento da disfunção mitocondrial e para a diminuição na atividade das células cerebrais. Esse processo prejudica o desempenho do indivíduo nas atividades relacionadas à aprendizagem, memória e cognição (GRIMM, A.; ECKERT, A., 2017).

Adicionalmente, com o avançar da idade, ocorrem danos às estruturas neurovasculares, incluindo redução da membrana basal e perda de pericitos. Tais eventos contribuem para o comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE) e, conseqüentemente, vazamento vascular (SOTO, I. et al., 2015). Como observado em camundongos e humanos, esse evento estaria relacionado ao declínio cognitivo dependente do hipocampo e que ocorre no envelhecimento fisiológico (MONTAGNE, A. et al., 2015). O vazamento vascular que ocorre com o dano na BHE permite que proteínas neurotóxicas adentrem o SNC, resultando em neuroinflamação, morte celular e estresse oxidativo (ENCIU, A. M.; GHERGHICEANU, M.; POPESCU, B. O. et al., 2013).

No envelhecimento fisiológico, ocorrem transformações orgânicas, morfológicas e funcionais, dentre elas a desregulação do sistema imunológico caracterizada pela imunossenescência, levando à inflamação crônica conhecida como *inflammaging*, um fenômeno de baixa intensidade, controlado, sistêmico e assintomático no curto prazo (GIUNTA, S., 2006). A teoria inflamatória molecular do envelhecimento defende que o estresse oxidativo relacionado à idade ativa fatores transcricionais redox-sensíveis, causando a regulação positiva da expressão gênica pró-inflamatória (Fig. 1). Conseqüentemente, ocorre a produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, levando a inflamação em diversos tecidos. Esse processo inflamatório se torna crônico, contribuindo para o envelhecimento e para o desenvolvimento de doenças crônicas (CHUNG, H. Y. et al., 2000; CHUNG, H. Y. et al., 2006).



**Figura 1.** Relação entre EROs, inflamação e envelhecimento. **Fonte:** KREGEL, K. C.; ZHANG, H. J. (2007), adaptado.

Nesse processo inflamatório crônico, ocorre o aumento sérico de citocinas interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), levando a danos e degeneração tecidual a longo prazo (BRUUNSGAARD, H. et al., 1999; MICHAUD, M. et al., 2013). Esse processo chega até o SNC por vias como o nervo vago, pelos órgãos circunventriculares e plexo coroide (TRACEY, K. J., 2002; CZURA, C. J.; TRACEY, K. J., 2005; JANIG, W.; GREEN, P. G., 2014).

A sinalização inflamatória elevada decorrente da idade, que envolve, além dos neurônios, a micróglia ativada, astrócitos e células endoteliais, causa a neuroinflamação, cuja continuidade contamina as células vizinhas as tornando senescentes também. A produção elevada de radicais livres nesse processo conduz a déficits cognitivos, comprometendo neurônios do hipocampo e levando à perda de memória. Há, portanto, um ciclo vicioso, no qual o estresse oxidativo causa inflamação, a qual, causa mais estresse oxidativo (MATTSON, M. P.; MAGNUS, T., 2006, LÓPEZ-VALDÉS, H. E.; MARTÍNEZ-CORIA, H., 2016).

## **2.2 Cognição e envelhecimento**

Devido ao aumento da população idosa, compreender o envelhecimento a nível molecular e celular se torna necessário. O cérebro humano executa funções cognitivas a partir de quase 100 bilhões de neurônios e células gliais. Além disso, esse órgão recebe 15% do débito cardíaco, possuindo alta demanda energética (SOKOLOFF, L. et al., 1977). O envelhecimento pode ser notado a partir de déficits cognitivos e motores que aumentam progressivamente em idosos (CURRERI, C. et al., 2018). Velocidade de caminhada mais lenta, passos mais curtos e diminuição do comprimento da passada são inerentes às alterações de mobilidade observadas com o avançar da idade (HERSSENS, N. et al.; 2018). Além disso, a recuperação de informações, a velocidade de processamento e a inibição de resposta também são afetadas (HARADA, C. N.; NATELSON LOVE, M. C.; TRIEBEL, K. L., 2013).

A cognição é uma função cerebral que compreende a atenção, a memória, a linguagem e as habilidades visuo-espaciais, por exemplo. À medida que a idade aumenta, ocorrem mudanças notáveis referentes à cognição, afetando a qualidade de vida (TUCKER-DROB, E. M., 2019). O aprendizado e a evocação de memórias são os domínios cognitivos mais afetados no envelhecimento normal, ao passo que a fala, a

linguagem e a memória processual são menos afetadas (HARADA, C. N.; NATELSON LOVE, M. C.; TRIEBELD, K., 2013).

A performance em tarefas que exijam memória de trabalho, velocidade de processamento e plasticidade cognitiva, declina, após a meia-idade, de maneira constante, devido à perda de potencial biológico (SALTHOUSE, T. A., 2009), por exemplo, com prejuízos nos sistemas sensoriais, como visão, audição e equilíbrio (WILLIAMS, K. N.; KEMPER, S., 2010). A maioria dos indivíduos apresenta perda cognitiva significativa aos 60 anos de idade, com declínio generalizado aos 75 anos, sendo que a velocidade de percepção é principalmente afetada (SCHAIE, K. W.; WILLIS, S. L.; CASKIE, G. I., 2004).

O declínio cognitivo pode ser governado por diversos fatores como dieta, estilo de vida e danos oxidativos, os quais atuam na integridade cerebral comprometendo a plasticidade neural, a atividade da rede neural, os sistemas anti-inflamatório e antioxidante, dessa forma afetando as funções cognitivas e cerebrais (BAGHEL, M. et al., 2017). Com isso, ocorre a redução do volume das substâncias cerebrais branca e cinzenta, encolhimento da glia e dos neurônios e degeneração sináptica (SALVADORES, N. et al., 2017).

O declínio cognitivo associado à idade está relacionado a perdas sinápticas, podendo estas serem o resultado de acúmulo de peptídeo beta-amiloide responsável por causar estresse oxidativo, inflamação e comprometimento vascular (QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M., 2010). Como relatado no tópico anterior, por possuir um elevado consumo de oxigênio, o cérebro está sujeito a sofrer estresse oxidativo, que se caracteriza pelo desequilíbrio entre as defesas antioxidantes celulares e a produção de EROs (KRINSKY, N. I., 1992). A desregulação do metabolismo celular que ocorre com o avançar da idade contribui para o aumento da concentração de EROs, que, por sua vez, colabora com o processo de envelhecimento, por meio de modificações oxidativas de lipídeos e proteínas (SASTRE, J. et al., 2000). Além desses danos estruturais, as EROs também ativam a via de sinalização do fator nuclear kappa-B (NF-kB) que, conseqüentemente, ativa genes associados ao envelhecimento celular, cuja atividade provoca imunossenescência e inflamação (SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K., 2009).

O declínio cognitivo associado à idade pode ser fisiológico ou patológico. O envelhecimento fisiológico ocorre como resultado de maturação, levando a mudanças

nas funções cognitivas. Durante o envelhecimento fisiológico, ocorrem modificações morfológicas e funcionais no cérebro, que afetam sinapses e árvores dendríticas, neurotransmissores, circulação, metabolismo do cérebro, aprendizagem, memória, sistema motor e sensorial, dentre outras (WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S., 2003). O envelhecimento patológico, por sua vez, se relaciona a doenças e traumas cerebrais, sendo essa uma consequência do estilo de vida e variação genética (REESE, C. M.; CHERRY, K. E.; COPELAND, A. L., 2000).

Os impactos nas funções cerebrais envolvem alterações na formação e evocação de memórias, por exemplo, com diminuição das memórias de reconhecimento e de curto prazo, além da velocidade de processamento (PARK, D. C. et al., 2002; JAMES, L. E.; FOGLER, K. A.; TAUBER, S. K., 2008; GILCHRIST, A. L.; COWAN, N.; NAVEH-BENJAMIN, M., 2008). Já a memória episódica, apesar de geralmente apresentar declínio detectável cerca de 3 a 8 anos antes da morte do indivíduo, pode ter seu declínio iniciado já a partir dos 35 anos, com estabilidade até os 60 anos (RABBIT, P., 2005).

O envelhecimento saudável está relacionado com a composição genética e fatores ambientais (FINKEL, D.; PEDERSEN, N. L., 2004, KILMOVA, B.; VALIS, M.; KUCA, K., 2017). O desempenho cognitivo no idoso saudável melhora após treinamento ou prática cognitiva (HERTZOG, C. et al.; 2008), ao mesmo tempo em que indivíduos que possuem maior escolaridade apresentam melhor desempenho cognitivo quando idosos, possivelmente devido a maior possibilidade de emprego, maior renda e apoio social. Ter um estilo de vida em que haja estímulos intelectuais causa maior manutenção da cognição e melhor funcionamento no dia a dia, podendo ser desde atividades de lazer até atividades complexas (GROSS, A. L. et al.; 2011), enquanto os exercícios físicos, por exemplo, atuam como neuroprotetores no envelhecimento humano, concomitantemente ao aumento de volume do hipocampo, sendo que idosos que praticam atividade física possuem um risco 38% menor de declínio cognitivo (LIU-AMBROSE, T.; BEST, J. R., 2017). Já a suplementação nutricional tem se mostrado eficaz na melhora do comprometimento cognitivo durante o envelhecimento (VLACHOS, G. S.; SCARMEAS, N., 2019).

Em camundongos, os déficits relacionados à idade começam a aparecer entre 6 e 12 meses de idade, afetando a visão, a audição, o tato, entre outros (RADULESCO, C. I. et al., 2021). O declínio cognitivo de comportamento e sensorial, relacionado ao

envelhecimento, não está associado à perda de neurônios em sua maioria, mas devido a hiperexcitabilidade neuronal e a mudanças na plasticidade dos contatos sinápticos nos neurônios, com perda de sinapses excitatórias e alterações na interação com as células da glia (FISCHER, C. et al.; 2020; SALAS, L. H.; BURGADO, J.; ALLEN, N. J., 2020). Há também alterações na sensibilidade dos receptores de neurotransmissores, incluindo o sistema dopaminérgico, muscarínico, opioide e adrenérgico (JOSEPH, J. A. et al., 1978; EGASHIRA, T.; TAKAYAMA, F.; YAMANAKA, Y., 1996). Tais alterações parecem ocorrer principalmente o hipocampo (FAN, X.; WHEATLEY, E. G.; VILLEDA, S. A., 2017).

### **2.3 Neurodegeneração e neuroproteção**

A neurodegeneração é um processo que leva a um dano neuronal irreversível seguido de morte celular, o qual está associado ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas. O cérebro utiliza 1/5 do oxigênio disponível a partir da respiração, além de produzir altos níveis de radicais livres, se tornando propenso ao estresse oxidativo e ao envelhecimento rápido (PRASAD, et al., 1999; FLOYD, R. A., 1999). O envelhecimento é o fator de risco de maior impacto para a ocorrência de neurodegeneração (HOU, Y. et al., 2019).

O envelhecimento cognitivo é governado pela dieta, estilo de vida, danos oxidativos e outros. Tais fatores alteram o cérebro em níveis estrutural, neuroquímico e de expressão gênica, levando ao comprometimento dos sistemas antioxidante e anti-inflamatório, plasticidade neural e processos cognitivos (BAGHEL, M. et al., 2017).

A neuroproteção se baseia em estratégias para defender o SNC contra lesão neuronal causada devido a distúrbios neurodegenerativos. A nutrição e as intervenções na dieta durante o envelhecimento trazem implicações para o declínio cognitivo e demência (DAUNCEY, M. J., 2014). Sendo assim, o consumo de plantas medicinais está relacionado à neuroproteção, pois atua na prevenção de doenças do SNC (ADAMS, M.; GMÜNDER, F.; HAMBURGER, M., 2007; HO, Y. S.; SO, K. F.; CHANG, R. C. C., 2010).

A capacidade cognitiva, bem como a integridade funcional e estrutural do cérebro se tornam comprometidas devido ao desequilíbrio nutricional. Vitaminas, minerais, ácidos graxos e micronutrientes com funções anti-inflamatórias e antioxidantes têm sido eficazes no combate ao envelhecimento cognitivo

(MCGRATTAN, A. M. et al., 2019). Além do mecanismo natural dos organismos de manter os níveis de EROs abaixo do limiar citotóxico (conhecido como defesa antioxidante, que atua neutralizando o desequilíbrio da homeostase redox das células), os antioxidantes provenientes do consumo de ervas funcionam como eliminadores não enzimáticos induzidos por dieta (CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L., 1997).

Os nutracêuticos, que podem ser suplementos alimentares, padrão alimentar, fitoquímicos, alimentos funcionais ou medicinais fisiologicamente benéficos contra doenças, são responsáveis por mitigar os déficits cognitivos em idosos, além de proteger contra distúrbios cognitivos associados à idade (NEALE, C. et al., 2013).

Os polifenóis, por exemplo, são um tipo de nutracêutico presentes em plantas medicinais, que atuam na neuroproteção, melhorando o comprometimento cognitivo (CARRILLO, A. J. ZAFRILLA, M. P.; MARHUENDA, J., 2019). Os flavonoides são um tipo de polifenol, que atuam, por exemplo, inibindo as atividades de beta- e alfa-secretase, além de aumentar os níveis de proteínas neuromoduladoras. Em outra classe de flavonoides, ocorre a melhora da cognição devido ao mecanismo semelhante ao do efeito neuroprotetor do estrogênio (LEE, Y. B. et al., 2004; SOKOLOV, A. N. et al., 2013).

A dieta mediterrânea é um padrão alimentar conhecido por estar associado ao envelhecimento cognitivo mais lento (LOURIDA, I. et al., 2013), que consiste em priorizar o consumo de alimentos vegetais, azeite e peixes e evitar o consumo de produtos derivados do leite, álcool, carne e ovos. Comprovadamente, o efeito neuroprotetor da dieta mediterrânea foi evidenciado na melhora da memória episódica, memória tardia e memória de trabalho em idosos (VALLS-PEDRET, C. et al., 2015; LOUGHREY, D. G. et al., 2017; SOLFRIZZI, V. et al., 2017). Tais efeitos positivos estão relacionados com a composição nutricional da dieta mediterrânea, como ácidos graxos, antioxidantes e vitaminas, que atuam mitigando disfunções cognitivas, além de preservar a integridade estrutural do cérebro, diminuir o dano oxidativo e neuroinflamação (GU, Y. et al., 2010; HUHN, S. et al., 2015; ARIDI, Y. S.; WALKER, J. L.; WRIGHT, O. R. L., 2017).

#### **2.4 Aspectos nutricionais e envelhecimento**

À medida que a expectativa de vida aumenta, os casos de demência e distúrbios cerebrais associados a idade aumentam também. Na antiguidade, a humanidade contava

com o auxílio de remédios naturais para distúrbios do SNC. Na atualidade, o interesse por tratamentos naturais tem ressurgido, por serem considerados tratamentos mais “leves” (ADAMS, M.; GMÜNDER, F.; HAMBURGER, M., 2007).

Os regimes alimentares, também conhecidos como intervenções nutricionais, atuam melhorando a saúde e longevidade, e retardando o processo de envelhecimento (DE CABO, R. et al., 2014). Estudos demonstram que a suplementação alimentar aumenta os níveis de antioxidantes no cérebro e tecidos. A restrição calórica, por sua vez, é definida como redução na ingestão de calorias sem haver desnutrição. Em seres humanos, a restrição de 15% do valor diário de calorias pode ter benefícios contra a mortalidade no envelhecimento (WILLCOX, B. J.; WILLCOX, D. C, 2013). Isso ocorre devido à redução na liberação do hormônio do crescimento, insulina e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1), que aceleram o envelhecimento (FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D., 2010). Em roedores, uma dieta restrita em proteínas diminuiu os níveis séricos de IGF1, trazendo benefícios cognitivos (LONGO, V. D.; MATTSON, M. P., 2014).

## **2.5 Plantas medicinais**

Uma planta ou especiaria se caracteriza pela folha, raiz, semente, estigma ou casca de uma planta que é utilizada para fim de cozimento, com o objetivo de agregar sabor aos alimentos, substituindo o sal (TAPSELL, L. C. et al., 2006).

As plantas são conhecidas por seus benefícios medicinais, dentre eles a proteção contra doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, câncer e diabetes *mellitus*, por exemplo (KAEFER, C. M.; MILNER, J. A., 2008; IRITI, M. et al., 2010). Os fitoterápicos são medicamentos originados a partir de plantas medicinais. Seu uso teve início quando a humanidade se atentou para as mudanças nas funções corporais que algumas plantas causavam, sendo usadas desde os povos antigos, em diferentes regiões geográficas (SCHNEIDER, R. H. et al., 2002), primeiramente com os chineses em 4000-5000 a.C., sendo o seu uso posteriormente difundido na Índia (AMRANI, S. et al., 2006).

Algumas plantas são conhecidas por suas propriedades “antienvelhecimento”, já que fornecem nutrientes importantes, auxiliam no tratamento de doenças e aliviam seus sintomas, favorecendo o bom funcionamento de diversos órgãos e a saúde do

organismo. A composição química dos fitoterápicos pode incluir ácidos graxos, flavonoides, esteróis, alcaloides, glicosídeos, terpenos e taninos (ODY, P., 2017).

A maior fonte de antioxidantes na dieta humana é proveniente do consumo de ervas, sendo que a concentração de antioxidantes aumenta com o processo de desidratação da erva (CARLSEN, M. H. et al., 2010). Os antioxidantes atuam agindo em locais-chave na rede de sinalização funcional da célula, por meio de proteínas quinases, fosfatases e outras (LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G., 2010).

### 2.6 Manjericão (*Ocimum sp.*)

Há diferenças de opiniões se a origem do manjericão é africana ou asiática, uma vez que se trata de uma planta cultivada há séculos (RYDING, O., 1994). As migrações geográficas distantes introduziram variações de manjericão a partir de cruzamentos naturais (GUPTA, R., 1994).

No Brasil, a espécie *Ocimum basilicum* L. (Fig. 2) é conhecida como manjericão, basilicão, alfavaca cheirosa, entre outros (Fig. 2). Na Índia, é conhecida como tulsi, já nos Estados Unidos é conhecida como *sweet basil* (JUCÁ, E., 2000).



**Figura 2.** Espécime de *Ocimum basilicum* L. **Fonte:** JANNUZZI, H. *et al.*, 2019.

O manjericão foi escolhido pelos indianos para ser utilizado nos tribunais em casos de juramento (SANTOS, E. F., 2007). É também usado no comércio como planta ornamental. Para os italianos, o manjericão já foi considerado como um símbolo de amor e é utilizado ainda hoje como decoração em Portugal (GARDÉ, A.; GARDÉ, N., 1977; PRENIS, J.; DUDLEY, E. C.; CARTER, A. J., 1990).

O manjericão também é utilizado como condimento em países meridionais compondo pratos de carne, saladas e guisados. Também é usado na confeitaria (manjericão doce) e compõe molhos, ketchups, coberturas, vinagre etc. (SANTOS, E. F., 2007). É usado com fins medicinais para combater diarreias, infertilidade, vômitos e cólicas intestinais. Melhora o funcionamento renal (é diurético), alivia a tosse e bronquite. É também antisséptico e auxilia na redução de espasmos musculares (PANIZZA, S., 1997; RUDDER, E. A. M. C., 2002).

A diversidade de espécies do gênero *Ocimum* (Fig. 3) ocorre devido à polinização cruzada, levando a um exacerbado número de subespécies, formas e variedades (SIMON, J. E. et al., 1999). Aproximadamente 50 a 150 espécies estão incluídas no gênero *Ocimum*. Nesse gênero, são encontrados, por exemplo, *Ocimum americanum*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum minimum*, *Ocimum tenuiflorum*, dentre outras espécies (ALBUQUERQUE, U. P.; HOLANDA, C. A. L. 1998).



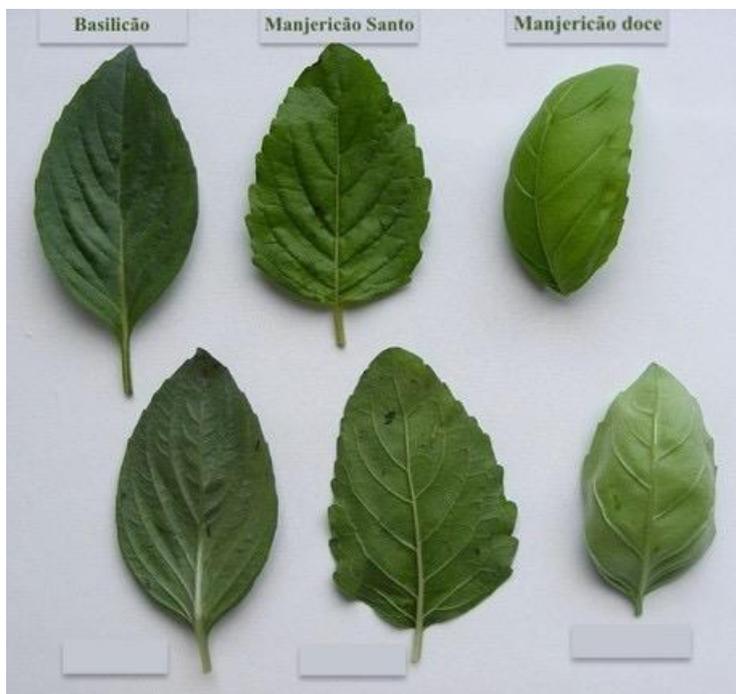
**Figura 3.** Diversidade de espécies do gênero *Ocimum*. a: Alfavaca basilicão; b: Alfavaca verde; c: *Dark Opal*; d: folha de alface; e: Folha fina; f: *Grecco a Palla*; g: Local Hortaliça; h: Manjeriçã Citral; i: Manjeriçã roxo; j: Manjeriçã vermelho; k: Manjeriçã vermelho rubi; l: Ornamental; m: *Minette* Anão. **Fonte:** ISHIKAWA, F. Y., 2017.

Dentre os tipos de manjeriçã, são encontrados manjeriçãs de folhas pequenas (anões), manjeriçãs com “folha de alface”, manjeriçãs verdadeiros (*genovese* e manjeriçã doce) e manjeriçãs roxos (*dark opal*, *rubin*, *purple tuffles*) (CAROVIC-STANKO, K. et al., 2011).

A espécie *Ocimum basilicum* L. possui a maior diversidade, uma vez que possui o maior número de tipos entre todas as espécies, sendo comumente encontradas seis variedades (*var. basilicum* cv. *Genovese*, *var. basilicum* cv. *Sweet Basil*, *var. difforme* Benth., *var. purpurascens* Benth., cv. *Dark Opal*, e *var. thrysiflorum* L.). As variedades de plantas da espécie *Ocimum basilicum* resultam em plantas com aromas diversos, sendo eles aroma doce, de canela, limão, cravo, cânfora e anis (ALBUQUERQUE, U. P.; HOLANDA, C. A. L., 1998; VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E., 2000).

Para determinar o tipo de manjeriçã, normalmente são feitas análises químicas do óleo essencial produzido pela planta (SIMON, J. E. et al., 1999). Além das diferenças químicas, é possível observar diferenças morfológicas, por exemplo características do caule, coloração, forma das folhas (Fig. 4) e frutos, ou até mesmo o aroma (BLANK. A. F. et al., 2004, FAVORITO, P. A. et al., 2011). O manjeriçã é

uma erva comumente encontrada em feiras e apresenta variações de acordo com a cidade, região e estabelecimento de procedência da planta. Devido a essa variedade, os cultivares variam em tamanho, cor e aromas distintos, dentre eles o aroma de limão, rosa, cânfora, madeira, fruta e licor (SANSON, A. D., 2009).



**Figura 4.** Diferenças morfológicas de folhas de três espécies comuns de manjeriçao. Basilicão: *Ocimum basilicum* L.; Manjeriçao santo: *Ocimum sanctum*; Manjeriçao doce: *Ocimum basilicum*.  
**Fonte:** Quora (com modificações).

O manjeriçao comum (*Ocimum basilicum* L.) é uma das diversas espécies de manjeriçao encontradas ao redor do mundo, que, além de seu uso culinário difundido, está incluída na categoria de plantas medicinais, sendo, portanto, também conhecida por suas várias propriedades terapêuticas. Possui sabor doce e apresenta segurança para o consumo (SINGH, V.; AMDEKAR, S.; VERMA, O., 2010). É uma planta de baixo custo, sem contraindicações e pode ser encontrada no mundo todo (SINGH, V.; AMDEKAR, S.; VERMA, O., 2010). Possui folhas pequenas, crescimento colunar e ramos arroxeados. O manjeriçao, bem como as plantas medicinais, são uma fonte de metabólitos secundários e óleos terapêuticos.

De forma geral, a planta possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo utilizada no tratamento de distúrbios neurológicos. Nesse sentido, estudos indicam que o manjeriçao é capaz de reduzir marcadores de estresse oxidativo, como

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), cuja concentração celular é um marcador de peroxidação lipídica, óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ao mesmo tempo em que aumenta a atividade de defensores antioxidantes como glutatona (GSH), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e catalase (CAT), concomitantemente à inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, e aumento de citocinas anti-inflamatórias como prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina 4 (IL-4) (ABD EL-GHFFAR, E. A. et al., 2018). A inibição da oxidação de lipoproteína de baixa intensidade (LDL) e disfunção mitocondrial também podem contribuir com os efeitos benéficos do consumo dessa erva (GRAYER, R. J. et al., 1996). As propriedades antioxidantes de plantas como o manjeriço estão relacionadas à presença de grupos funcionais hidroxila (-OH) e de ligações duplas conjugadas em diversas de suas moléculas, por exemplo, nos flavonoides (AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S., 2004).

A composição química das plantas varia de acordo com a localização geográfica em que a planta foi cultivada, bem como a época da colheita, forma de cultivo, estação do ano e condições climáticas. O manjeriço é uma erva rica em polifenóis, estando presentes nessa classe os flavonoides, os taninos e os ácidos fenólicos. Os flavonoides são um grupo de compostos de baixo peso molecular de origem vegetal, cuja concentração em ervas da família *Lamiaceae* é de aproximadamente 0,2-0,4 g / kg (SHAN, B. et al., 2005). Atuam como antioxidantes e anti-inflamatórios, sendo que uma de suas principais ações antioxidantes se deve à eliminação de EROs, incluindo superóxido (O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) (HEIJNEN, C. G. et al., 2002), enquanto no espectro anti-inflamatório, têm como alvo enzimas de respostas anti-inflamatórias (TAPSELL, L. C. et al., 2006), atuando, por exemplo, através da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase (através de iNOS) e proteína C-reativa (PCR), além de diminuir a secreção de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ , ao mesmo tempo em que suprimem a síntese induzível de NO, inibem a lipo-oxigenase (LOX) e reduzem a secreção de IL-6 (RUBIÓ, L.; MOTILVA, M. J.; ROMERO, M. P., 2013).

A composição química do manjeriço também varia entre as espécies. No entanto, observa-se com frequência o linalol, metil-chavicol, metil-eugenol, eugenol, estragol, 1,8-cineol, geraniol, dentre outros. Para a espécie *Ocimum basilicum* L. há a presença de 53 integrantes químicos de acordo com Chalchat e outros (1999). Segundo

Jannuzzi e colaboradores (2019), na análise química de *Ocimum basilicum L.* cultivado no Distrito Federal, os principais componentes encontrados foram o linalol (66%), seguido de 1,8-cineol (10%) e eugenol (7%), aproximadamente.

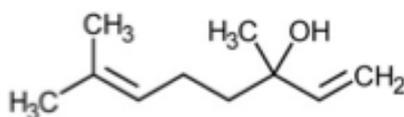
A seguir, seguem os principais constituintes do manjericão e suas características. O linalol (3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol) (Fig. 5) é prevalente em diversas espécies de plantas aromáticas, sendo utilizado na medicina tradicional para o alívio de sintomas e cura de doenças (CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G., 2000; PEANA, A. T. et al., 2006). Seu uso está associado a atividades biologicamente ativas, com propriedades antimicrobianas e anticancerígenas (KAMATOU, G., P., P.; VILJOEN, A., M., 2008).

Atua no SNC com funções sedativas, anticonvulsivantes e hipotérmicas (ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D. O., 1995), além de atuar como anti-inflamatório e antioxidante (CELIK, S.; OZKAYA, A., 2002), também sendo um atrativo para insetos polinizadores (CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G., 2000). O linalol possui efeito neuroprotetor, conforme demonstrado em casos de isquemia global induzida, onde sua administração oral levou a melhora dos comprometimentos neurológicos, motores e cognitivos (SABOGAL-GUÁQUETA, A. M. et al., 2018), ou em modelos de danos neuronais causados por estresse oxidativo induzido por acrilamida (MEHRI, S.; MESHKI, M. A.; HOSSEINZADEH, H., 2014). A neuroproteção associada à administração de linalol pode estar relacionada com inibição de estresse oxidativo por parte dessa molécula (PARK, H. et al., 2016).

As ações antioxidantes do linalol parecem ter um papel importante na melhora de memória e aprendizagem espaciais, quando estas são prejudicadas não apenas por estresse oxidativo, mas também quando estão associadas com eventos inflamatórios. Nesse sentido, parece que o linalol atua reduzindo as atividades da COX-2 e da IL-1 $\beta$  no hipocampo. Também foi demonstrado seu papel na redução da perda de memória em modelos de camundongos com Alzheimer (SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G. P., 2016) e naquela decorrente de condições neurodegenerativas associadas a disfunção mitocondrial e produção de EROs (SABOGAL-GUÁQUETA, A. M. et al., 2019), ou mesmo no déficit cognitivo induzido (XU, P. et al., 2017).

Interessantemente, há dados na literatura que mostram que o linalol pode apresentar efeito sedativo e hipnótico (ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.;

SOUZA, D. O., 1995; LINCK, V. M. et al., 2010), através da sua interação antagonista competitiva com receptores glutamatérgicos tipo N-metil-d-aspartato (NMDA) (ELISABETSKY, E.; BRUM, L., 2003; CAMMAROTA, M. et al., 2004) e, portanto, atuar de forma negativa na formação de memória (COELHO, V. R. et al., 2011).



**Figura 5.** Estrutura química do linalol. **Fonte:** DE GROOT, A. (2019).

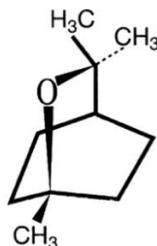
O 1,8-cineol (Fig. 6), também conhecido como eucaliptol, é considerado o principal monoterpene emitido pela vegetação na atmosfera (*National Center For Biotechnology Information*). Possui odor semelhante à cânfora, sendo emitido como atrativo para polinizadores, como abelhas e mariposas (MURRAY, M. J.; LINCOLN, D. E., 1970). É utilizado em alimentos, fragrâncias e cosméticos devido ao seu aroma. É útil no tratamento de reumatismo, tosse e asma. Devido a sua propriedade de melhorar a frequência dos batimentos ciliares da membrana mucosa das vias respiratórias, apresenta capacidades secretolíticas (KASPER, P. et al., 1994). Além disso, também exibe propriedades antissépticas e antimicrobianas (PATTNAIK, S. et al., 1997).

Em termos oxidativos, o 1,8-cineol é um monoterpene que atua inibindo a produção de EROs e citocinas a partir da regulação das vias do fator nuclear eritróide-2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e do NF-κB, respectivamente, possuindo, portanto, papel terapêutico na doença de Alzheimer, por exemplo. O 1,8-cineol aumenta a migração de Nrf2 do citoplasma para o núcleo celular, ativando a transcrição de enzimas antioxidantes (SOD e CAT). O Nrf2, por sua vez, se liga ao elemento de resposta antioxidante e ativa a transcrição de genes que codificam para antioxidantes, dentre eles nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), quinona oxirredutase 1 (NQO1), glutationa S-transferase A (GSTA), entre outras (JIANG, Z. et al., 2019).

O tratamento com 1,8-cineol na fase inicial da doença de Alzheimer atua inibindo a acetilcolinesterase (AChE), assim como atuam diversos medicamentos utilizados para o tratamento da doença. A AChE cliva a acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, sendo este um neurotransmissor de extrema importância na transdução de sinal no SNC. Uma vez inibindo a AChE, mais ACh estará disponível, melhorando

assim a função cognitiva (KAUFMANN, D.; DOGRA, A. K.; WINK, M., 2011). A atividade antioxidante do 1,8-cineol também foi evidenciada a partir de monócitos humanos isolados, nos quais este monoterpene foi capaz de reduzir a produção de EROs e  $H_2O_2$  (JUERGENS, U. R. et al., 2005). Estudos anteriores elucidaram que plantas contendo 1,8-cineol induzem enzimas desintoxicantes, prevenindo o dano oxidativo (MITIC-CULAFIC, D. et al., 2009).

Descobertas recentes tem sido feitas também com relação às propriedades anti-inflamatórias do 1,8-cineol (SANTOS, F. A. et al., 2001). Em um estudo realizado por Juergens em 2014, mostrou-se que a terapia com 1,8-cineol foi capaz de reduzir a produção de  $IL-1\beta$ , LOX e ciclo-oxigenase (COX) de monócitos humanos isolados, evidenciando seu potencial anti-inflamatório.



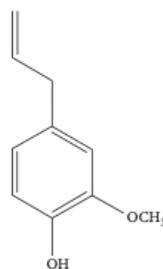
**Figura 6.** Estrutura química do 1,8-cineol. **Fonte:** JUERGENS, U. (2014).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (Fig. 7) é um fenilpropanóide encontrado em várias especiarias e ervas, possuindo propriedades hidrofóbicas que, uma vez ingerido via oral, chega até o cérebro, sendo, portanto, eficiente em diferentes distúrbios neurológicos (BAROT, J.; SAXENA, B., 2021). Estudos anteriores mostraram que o eugenol possui a capacidade de mitigar o estresse oxidativo, inflamação e morte neural (MA, L. et al., 2018).

É um dos principais componentes responsáveis pelo odor característico do manjeriço, inibe a COX e a síntese de prostaglandinas (PGs), conferindo efeito analgésico e anestésico, além de exibir propriedades anticarcinogênica, anticonvulsiva e anti-inflamatória (ESCOBAR, R. G., 2002; FATHY, M. et al., 2018). O eugenol também possui propriedades antioxidativas. Graças à sua estrutura, o eugenol fixa radicais fenoxi e recebe átomos de hidrogênio doados (GÜLÇIN, I., 2011), além de sequestrar radicais livres a partir do difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), dessa forma inibindo EROs e NO (BARBOZA, J. N. et al., 2018).

Conseqüentemente, esse composto atua eliminando radicais livres, reparando e reduzindo a incidência de danos induzidos pelo estresse oxidativo e assim prevenindo doenças inflamatórias crônicas (FUJISAWA, S.; MURAKAMI, Y., 2016), câncer (PAVITHRA, B., 2014), além de apresentar ação neuroprotetiva (DUBEY, K. et al., 2017), constituindo, assim, numa terapia alternativa para transtornos neurodegenerativos. O eugenol também é conhecido por induzir o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* - BDNF) no hipocampo, que tem a habilidade de aumentar o número de neurônios piramidais e suas ramificações dendríticas, além de preservar a sobrevivência e plasticidade neuronais (IRIE, Y., 2006).

Tais propriedades podem contribuir para as ações benéficas do eugenol administrado via gavagem, observadas anteriormente, ao diminuir a perda de memória espacial induzida por escopolamina em camundongos (GARABADU, D.; SHARMA, M., 2019), ou no aumento do aprendizado/memória espaciais e de reconhecimento em camundongos (AKBAR, L. et al., 2021). Nesse caso em especial, o melhor desempenho cognitivo foi associado com diversas ações teciduais decorrentes da administração de eugenol, por exemplo no estímulo à neurogênese, diminuição de morte celular neuronal e aumento da complexidade dendrítica, observados no hipocampo.



**Figura 7.** Estrutura química do eugenol. **Fonte:** BARBOZA, J. N. et al. (2018).

A administração desses componentes em associação, como é o caso do óleo essencial de manjeriço, tem sido associada ao tratamento da depressão (ALLI, S. S. et al., 2017; SENTARI, M. et al., 2019) e da migrânea (AHMADIFARD, M. et al., 2020), assim como com a melhora do déficit cognitivo induzido por brometo de etídio (GARABADU, D. & SINGH, D., 2020), confirmando, neste último caso, um possível efeito neuroprotetor, sendo, entretanto, seu uso voltado para o SNC bastante restrito, de acordo com os dados disponíveis na literatura.

Dessa forma, o entendimento dos benefícios do consumo de manjeriço no SNC ainda é bastante insipiente e merece maior investigação. Contudo, é de se esperar que as propriedades terapêuticas associadas com os diversos componentes químicos do manjeriço possam atenuar ou até mesmo prevenir os efeitos deletérios da idade avançada, no que diz respeito ao comportamento, cognição, aprendizado e memória.

### **3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão alimentar de folhas de manjeriço nas funções cognitivas em camundongos.

Mais especificamente, buscamos:

- Avaliar se há perda cognitiva leve em animais adultos idosos.
- Testar se a ingestão de manjeriço pode trazer ganhos cognitivos em animais adultos idosos.
- Investigar se a ingestão de manjeriço também poderia trazer alterações na cognição em adultos maduros, sendo estes animais onde não existem problemas cognitivos associados à idade.

A justificativa de testar a eficácia de alguma intervenção nutricional reside na necessidade prévia de se estabelecer quais os seus potenciais benefícios nas funções cognitivas. Contudo, sabemos que os resultados obtidos podem contribuir no futuro para intervenções nutricionais, também no sentido de amenizar os sintomas cognitivos e sistêmicos que costumam aparecer com o avanço da idade em seres humanos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) com o protocolo de registro CEUA/UFU 082/19 de acordo com o que dispõe a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e as normas expedidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizadas fêmeas C57BL/6, fornecidas e mantidas no Biotério Central da Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU), localizado no bloco 4U, no bairro Umuarama. A escolha por fêmeas se deu pelo fato de os machos normalmente atacarem seus companheiros de caixa em disputas por território, levando à ferimentos e mortes, havendo, portanto, a necessidade da manutenção de caixas individuais. Já as fêmeas convivem pacificamente na mesma caixa, sendo possível economizar espaço nas *hacks* ventiladas em que os animais são mantidos. No presente trabalho, os animais permaneceram mais tempo do que o habitual nas *hacks*, de forma a alcançarem a idade necessária para a realização dos testes.

A linhagem de camundongos C57BL/6 é utilizada em áreas de pesquisa envolvendo biologia do desenvolvimento, diabetes, obesidade, genética, entre outras. Além disso, é utilizada para apoiar pesquisas nas áreas de comportamento e aprendizagem, pesquisas envolvendo intervenção nutricional e neurobiologia. Em geral, camundongos dessa linhagem apresentam alta expectativa de vida e baixa suscetibilidade a tumores (*The Jackson Laboratory*), o que foi de extrema importância neste trabalho, uma vez que os testes também foram realizados em animais idosos.

Iniciaram os experimentos um total de quarenta e oito animais, sendo vinte e quatro animais adultos maduros (8 meses de vida), que já atingiram a maturidade reprodutiva e, portanto, seu desenvolvimento pleno, sendo equivalentes a humanos de 20 a 30 anos, e os demais vinte e quatro animais sendo adultos idosos (18 meses de vida) que, por sua vez, equivalem a humanos de 56 a 69 anos (FLURKEY, K.; CURRER, J. M.; HARRISON, D. E., 2007). A escolha das idades se baseou na necessidade de avaliar o envelhecimento fisiológico, sem interferência de eventos de desenvolvimento característicos de animais jovens. Os animais foram adquiridos após o

desmame, em períodos diferentes, de acordo com a capacidade da REBIR de fornecimento de animais, e mantidos até a idade de uso desejada.

Cálculos estatísticos para determinar o tamanho necessário da amostra a ser utilizada no estudo foram feitos (CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D., 2013) levando a um resultado muito exacerbado. Conseqüentemente, o tamanho da amostra foi determinado empiricamente, de acordo com o número de animais por grupo, rotineiramente utilizado em experimentos envolvendo testes cognitivos, e disponíveis na literatura. Dois animais do grupo adulto idoso morreram antes dos testes previstos e não puderam ser substituídos, dado o tempo necessário para envelhecimento. Entretanto, o número de animais solicitados à REBIR previu a necessidade de se ter pelo menos 10 animais por grupo para os testes previstos, o que foi possível conseguir. Dessa forma, essa perda não trouxe prejuízo para a presente análise.

Os animais adultos maduros foram separados aleatoriamente em dois grupos com 12 animais cada. Da mesma forma, os animais adultos idosos foram aleatoriamente separados em dois grupos com 11 animais cada (12 inicialmente, antes da perda de dois animais). Portanto, os grupos finais foram:

- Grupo 1, G1, (dieta controle) (n = 12), com camundongos adultos maduros;
- Grupo 2, G2 (dieta suplementada) (n = 12), com camundongos adultos maduros;
- Grupo 3, G3 (dieta controle) (n=11), com camundongos adultos idosos;
- Grupo 4, G4 (dieta suplementada) (n=11), com camundongos adultos idosos.

Os animais foram identificados de forma individual por letras do alfabeto, por exemplo, animais do grupo G2: G2A, G2B, G2C, G2D e assim por diante, e tiveram suas caudas periodicamente marcadas com caneta hidrográfica, criando-se um padrão de bandas e cores que permitisse a identificação individual dos animais ao longo de todos os experimentos.

Os animais foram mantidos em condições padrão, em no máximo 5 por caixa, sendo, estas, isoladores de polisulfona contendo maravalha, com ventilação mecânica, sob controle de ruído, umidade e temperatura, e com ciclo claro-escuro de 12 horas, ração e água *ad libitum*. Os isoladores e bebedouros eram trocados semanalmente, lavados e autoclavados para posterior uso.

## 4.2 Suplementação alimentar

Cada grupo experimental recebeu ração extrusada padrão (CR-1 NuviLab irradiada), fornecida pela REBIR, ou ração suplementada, de acordo com os protocolos informados a seguir.

A suplementação alimentar foi realizada por meio de folhas de manjeriço comum (*Ocimum basilicum* L.) (Fig. 8) adicionadas à ração extrusada padrão. Para cada 5 g de ração triturada com o auxílio de um liquidificador, foi adicionado um preparado contendo cerca de 1,2 mg de folhas recém-moídas de manjeriço em 10 ml de água. Em seguida, a ração foi repeletizada manualmente com o auxílio de uma seringa de 20 ml e posteriormente seca em estufa ventilada a 60 °C por 24 h.

O manjeriço utilizado no presente trabalho foi obtido a partir de uma horta familiar localizada na cidade de Uberlândia-MG. Os exemplares obtidos foram então cultivados em um vaso localizado internamente, utilizando terra proveniente da própria horta familiar, com regas diárias. A espécie de manjeriço foi identificada no Herbário Uberlandense (HUFU), e pelo Prof. Dr. Jean Kleber de Abreu Mattos, do Departamento de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), o qual possui experiência em trabalhar com manjeriço.



**Figura 8.** Folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) utilizadas no presente estudo. Fonte: autoria própria.

A quantidade de manjeriço adicionada à ração foi determinada de acordo com a ingestão média de especiarias comuns pela população europeia. As preferências de ervas frescas variam de país para país, mas, em geral, as principais variedades são manjeriço e cebolinha (*CBI Ministry Of Foreign Affairs*).

Considerando que o consumo de ervas e especiarias na Europa é de 0,5 g / pessoa / dia e 60-75% desse valor corresponde ao manjericão, o consumo diário de manjericão seria de 0,3 a 0,375 g / pessoa / dia. O peso médio de um europeu é de 70,8 kg (WALPOLE, S. C. et al., 2012), então o consumo médio de manjericão para a população europeia pode ser estimado entre 4,24 e 5,30 mg de manjericão / dia / kg.

Por fim, foi calculada a quantidade de manjericão a ser administrada aos camundongos, considerando as diferenças de demanda metabólica e de superfície corporal entre as duas espécies (camundongo e humano) (NAIR, A. B.; JACOB, S., 2016). Assim, a quantidade de manjericão consumida pelos humanos foi multiplicada por 12,3 para se obter a quantidade equivalente em camundongos, resultando em 52-65 mg de manjericão / kg de animal / dia. Os camundongos têm aproximadamente 20 g de peso (0,020 kg); assim, o consumo diário de manjericão deve ser de aproximadamente 1-1,3 mg / animal / dia, ou 1,2 mg em média. A quantidade média diária de ração consumida pelos camundongos nas instalações da REBIR é de 5 g por animal. Assim, misturou-se cerca 1,2 mg de folhas de manjericão a 5 g de ração, para consumo diário.

A ração CR-1 Nuvilab, de acordo com seu rótulo, é composta basicamente por milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato dicálcico e cloreto de sódio. A composição da ração controle e da ração suplementada com manjericão, em termos de vitaminas, minerais e aminoácidos, é mostrada na Tabela 1, onde é possível ver que a contribuição da ingestão de manjericão em termos de nutrientes e calorias é negligenciável, exceto pelo incremento com relação ao conteúdo de vitamina C.

A composição das dietas foi estimada com base em informações do fabricante da ração, presentes no rótulo. Como essa formulação não é completa, e nem todos os nutrientes são indicados, por questões comerciais, foi necessário calcular a proporção de farelo de milho integral, soja e trigo presentes na ração, utilizando o método de Pearson (*Pearson's Square Method*), e utilizando as tabelas de composição química dos alimentos disponíveis no website do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (Departamento de Informática em Saúde EPM-UNIFESP), as quais são baseadas no documento SR25, *National Nutrient Database for Standard Reference*, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, USDA (USDA, 2012). A composição nutricional das folhas de manjericão foi obtida nas mesmas fontes, e sua contribuição de seus nutrientes para a ração suplementada foi

calculada com base na proporção entre manjeriço e ração que foram misturados. Importante considerar que essa é uma estimativa da composição, uma vez que esta pode ter sofrido alteração razoável em virtude do processamento pelo qual passaram as folhas e a ração suplementada (vide informações acima).

**Tabela 1. Composição das dietas\***

Nutriente	Unidade	Controle	+manjeriço
Cálcio (máx)	mg	70,000	70,002
Lisina	mg	70,000	70,001
Metionina	mg	25,000	25,000
Magnésio	mg	20,028	20,029
Potássio	mg	73,929	73,933
Fósforo	mg	40,000	40,001
Ácido fólico	mg	30,000	30,000
Fosfolipídeos	mg	22,511	22,511
Sódio	mg	13,500	13,500
Colina	mg	12,000	12,000
Vitamina B5 (pantotenato)	mg	0,5600	0,5600
BHT	mg	0,5000	0,5000
Flúor (máx)	mg	0,4000	0,4000
Vitamina B3 (Niacina)	mg	0,3494	0,3494
Ferro	mg	0,3420	0,3420
Zinco	mg	0,3000	0,3000
Manganês	mg	0,2543	0,2543
Vitamina E	mg	0,2010	0,2010
Vitamina B1 (tiamina)	mg	0,0720	0,0720
Vitamina B6 (piridoxina)	mg	0,0600	0,0600
Vitamina B2 (riboflavina)	mg	0,0550	0,0550
Cobalto	mg	0,0075	0,0075
Vitamina C	mg	0,0000	0,0002
Cobre	µg	77,4525	77,4571
Iodo	µg	10,0000	10,0000
Vitamina A (retinol)	µg	3,750	3,750
Selênio	µg	1,711	1,711
Biotina	µg	1,300	1,300
Vitamina B12 (cobalamina)	µg	0,300	0,300
Vitamina K (filoquinona)	µg	0,063	0,067
Vitamina D	IU	10,500	10,500
Valor energético	kcal	16,896	16,896

\*Valores presentes em 5 g de ração.

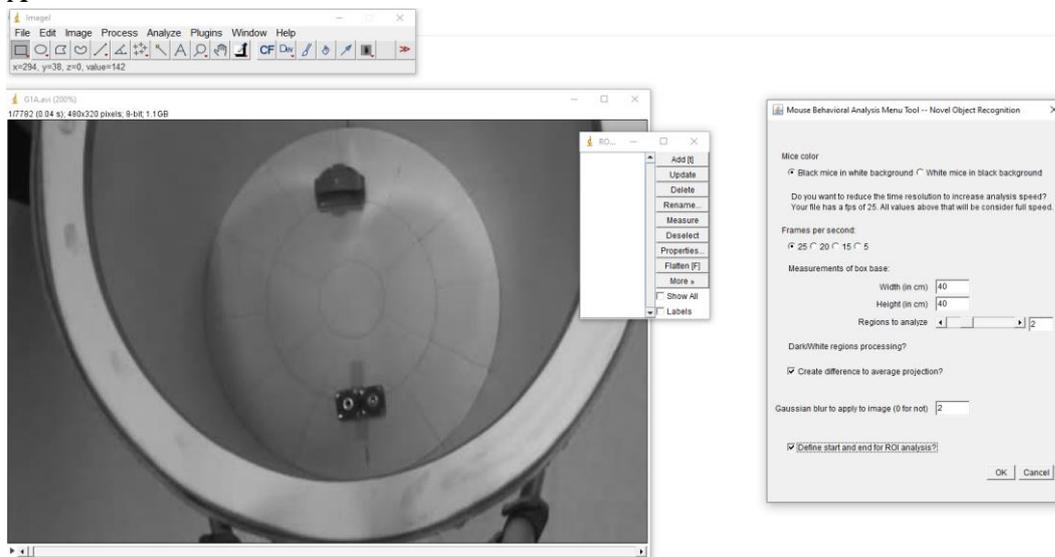
A ração suplementada foi fornecida aos animais por um período de, no mínimo, 4 meses para os animais adultos maduros e de 6 a 7 meses para os animais adultos idosos até a idade desejada para os testes cognitivos, sendo disponibilizada também durante estes, e até o momento da eutanásia. A quantidade de ração consumida pelos animais foi monitorada constantemente para avaliar qualquer influência da

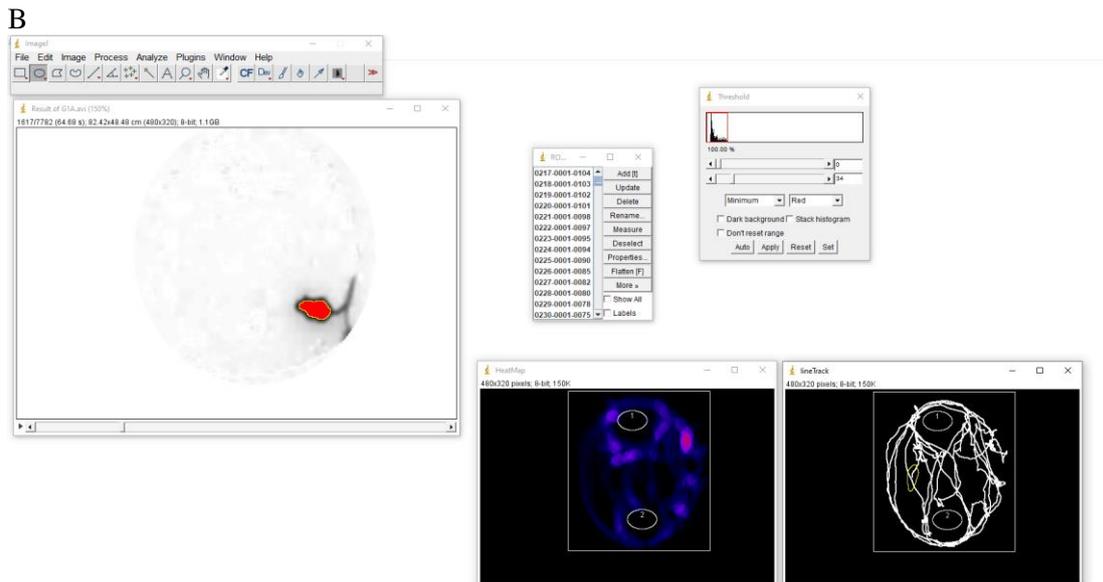
suplementação nos hábitos alimentares. O peso dos animais também foi monitorado para avaliar qualquer efeito da suplementação sobre este parâmetro.

### 4.3 Testes comportamentais

Depois que os animais alcançaram a idade pretendida para os testes, sendo 9 meses e 18 meses para os animais adultos maduros e adultos idosos, respectivamente, os mesmos foram submetidos a três testes comportamentais para avaliação cognitiva. Foram utilizados a tarefa de reconhecimento de objetos (TRO), o labirinto em cruz elevado (LCE) e o labirinto aquático de Morris (LAM). Todos os testes foram registrados em câmera de vídeo para posterior análise no *software ImageJ*, por meio do *plugin* de análise *Mouse Behavioral Analysis Toolbox (MouBeAT)*, um conjunto de ferramentas para analisar, de forma semiautomática, diferentes testes comportamentais em roedores (BELLO-ARROYO, E. et al., 2018) (Fig. 9). A análise visual/manual de vídeos de testes comportamentais é laboriosa e demorada. Contudo, a alternativa disponível de softwares de análise automatizada se torna, para a maioria dos pesquisadores da área, demasiado dispendiosa em termos financeiros. Dessa forma, esse *plugin* traz uma alternativa de custo zero para a análise de vídeos de ensaios comportamentais, sem a riqueza de parâmetros fornecidos por softwares como o AnyMaze<sup>®</sup>, por exemplo, mas com o fornecimento de parâmetros mínimos, na forma de planilhas Excel, os quais podem ser utilizados para cálculos adicionais e obtenção de outros parâmetros de interesse.

A





**Figura 9.** Exemplo de área de trabalho para análise dos vídeos dos testes comportamentais, utilizando o *plugin MouBeAT* para *ImageJ*. As opções do *plugin* variam de acordo com o teste cognitivo avaliado. A. determinação das configurações iniciais para o teste. B. alguns dos resultados obtidos após análise do vídeo. Fonte: autoria própria.

Para serem lidos no *ImageJ*, é necessário primeiramente converter todos os vídeos para AVI, utilizando o *software* *ffmpeg*, o qual converte os vídeos para um formato AVI que possa ser lido pelo *ImageJ*. *Softwares* disponíveis comercialmente para tal fim não produzem formatos AVI que sejam compatíveis. Uma vez convertidos, os vídeos são carregados no *ImageJ*, sendo automaticamente transformados em *stacks* dos *frames* que compõem o vídeo. Os vídeos devem ser carregados no *ImageJ* em escala de cinza. A análise do *MouBeAT*, portanto, é uma análise sequencial de imagens, onde cada *frame* do vídeo é analisado como uma imagem individual, e os dados são então compilados automaticamente em planilhas do *Microsoft Excel*. Em um teste com 3 min de duração, com vídeos a uma taxa de 25 *frames/s*, o *ImageJ* analisará e gerará dados referentes a 4.500 *frames*. Todo o processo de análise de um único vídeo dura cerca de 5 a 10 min, a depender do tamanho do vídeo.

#### 4.3.1 Tarefa de reconhecimento de objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos não causa estresse ao animal e explora a preferência inata dos roedores por novidades. O protocolo de Lueptow (2017) foi utilizado, exceto que um campo aberto circular de madeira, na cor branca, com 40 cm

de diâmetro foi usado em vez de uma caixa retangular, para evitar o comportamento do animal de escolher um canto da caixa para ficar (Fig. 10A).



A



B

**Figura 10.** Visão superior do campo aberto circular utilizado na tarefa de reconhecimento de objetos. A: dois objetos diferentes foram colocados em polos opostos do campo circular no dia do desafio. B: exemplo de objeto utilizado durante os testes. Fonte: autoria própria.

Esse teste teve duração de três dias, sendo o primeiro dia reservado para a habituação do animal no campo aberto. Cada animal foi individualmente colocado na arena vazia, podendo explorar livremente por um período de 5 min, após o qual era colocado em nova caixa reservada para animais já habituados. O treino foi realizado 24 h após a habituação, sendo cada animal colocado na arena vazia por 1 min para nova habituação, seguido da retirada do animal da arena e adição de dois objetos idênticos posicionados em polos opostos. Em seguida, o animal era reinsertado na arena para livre exploração, sendo o treinamento realizado por 5 min.

Depois de mais 24 h, os animais foram desafiados seguindo o mesmo protocolo do dia anterior (dia do treino), exceto que um dos objetos conhecidos foi trocado por um objeto novo, ou seja, ao qual os animais ainda não haviam sido expostos. Dois conjuntos de pares de objetos foram usados (Fig. 10B), com cada animal sendo alternadamente exposto a um par diferente de objetos idênticos durante o treinamento. A arena e os objetos foram limpos com álcool 70% com o auxílio de papel toalha antes de cada animal ser testado. A escolha dos objetos utilizados neste teste foi feita após avaliação prévia com outro grupo de animais da mesma linhagem. Objetos com os quais os animais não apresentassem um bom índice de interação eram descartados como opções a serem utilizadas posteriormente, assim como foram descartados do teste objetos pelos quais os animais demonstrassem alguma preferência mesmo ao serem apresentados a estes pela primeira vez.

As sessões de treinamento e desafio foram gravadas em vídeo utilizando uma videocâmara digital. Os vídeos foram posteriormente analisados no *ImageJ*. O MouBeAT fornece, a partir da análise dos vídeos, a distância total percorrida pelo animal, o tempo total onde a cabeça do animal está próxima a cada um dos objetos, o tempo total no qual o corpo do animal está próximo a cada um dos objetos, os instantes específicos nos quais o animal interagiu pela primeira vez com cada um dos objetos, além do número de vezes que o animal interagiu com cada um dos objetos. A partir dos dados obtidos foram calculados o índice de exploração  $e1$  ( $a1 + b1$ ), que é o tempo total de exploração dos objetos iguais  $a1$  e  $b1$  durante o treino e  $e2$  ( $a + b$ ), que é o tempo total de exploração dos objetos diferentes  $a$  e  $b$  durante o desafio. O índice de discriminação absoluta  $d1 = b-a$ , o índice de discriminação  $d2 = d1 / e2$  e o índice de preferência  $d3 = 100 * (b / e2)$  também foram calculados. Valores de  $d2$  maiores que 0,25 ou menores que -0,25 indicam preferência por algum dos objetos. Todos os animais com preferência por algum dos objetos idênticos no primeiro dia não foram considerados para análise estatística neste teste, uma vez que pelo fato dos objetos serem idênticos, o animal não deveria ter preferência por nenhum deles.

Esse teste avalia a memória explícita dos roedores (ENNACEUR, A.; DELACOUR, J., 1989), analisando sua tendência natural de exploração do ambiente e objetos novos. Com isso, a presença de um objeto novo junto a um objeto conhecido no campo aberto, deve induzir o animal a explorar por mais tempo o objeto novo em detrimento do objeto conhecido. Assim, quanto mais tempo o animal interage com o objeto novo, maior a evidência de que ele reconheceu o objeto visto no dia anterior, o que é um indício de memória.

#### **4.3.2 Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado avalia a interação entre aprendizagem/memória aversiva e ansiedade, bem como a tendência natural do animal de procurar um lugar onde se sinta mais seguro (FILE, S. E., 1993). A tarefa do animal de escolher entre um ambiente seguro como o dos braços fechados, e outro arriscado, como o dos braços abertos, é grandemente prejudicada quando existem lesões hipocâmpais. Para isso, foi utilizado um labirinto de madeira em forma de cruz, elevado do solo por suportes de PVC de 50 cm de altura, com quatro braços medindo 32,5 x 6 cm cada. Dois braços são abertos (sem paredes), contendo apenas 1 cm de alçado lateral em suas bordas, para

evitar que os animais caiam. Os outros dois braços são fechados com paredes de 15 cm de altura. Todos os quatro braços são conectados a um quadrado central com 6 cm de lado (Fig. 11).



**Figura 11.** Visão superior do labirinto em cruz elevado. Dois braços abertos sendo mostrados na horizontal e dois braços fechados sendo mostrados na vertical. Fonte: autoria própria.

Seguindo o protocolo descrito em Kouémou e colaboradores (2017), esse teste teve duração de dois dias.

No primeiro dia, considerado o dia do treino, cada animal foi colocado em uma das pontas do braço aberto com a cabeça voltada para fora do labirinto. O mesmo braço foi usado para todos os animais testados. A sessão foi gravada até que o animal entrasse em um dos braços fechados até um limite máximo de dois minutos. Uma entrada foi considerada sempre que o animal entrou no braço fechado com as quatro patas.

Em seguida, o animal era deixado por mais 2 min no labirinto para explorar livremente e então era retirado e colocado em uma caixa para roedores, separado dos demais. Os animais que não entraram em nenhum braço fechado em no máximo 2 min foram direcionados manualmente a um deles e monitorados por mais 2 min, para que aprendessem a localização dos braços fechados.

Após 24 h, foi realizado o desafio. Cada animal foi separadamente colocado na extremidade de um braço aberto, como no dia anterior, e monitorado até entrar em um braço fechado, tendo o animal um período máximo de 2 min para entrar no braço fechado. O labirinto foi limpo com álcool 70% entre os testes, com o auxílio de papel toalha.

As sessões também foram gravadas em vídeo, os quais foram analisados posteriormente no *ImageJ*. Com base nos dados obtidos, a latência de transferência (LT) no primeiro e no segundo dia foi calculada e comparada para cada grupo experimental. A latência de transferência se refere ao tempo que o animal leva para entrar pela primeira vez em qualquer um dos braços fechados.

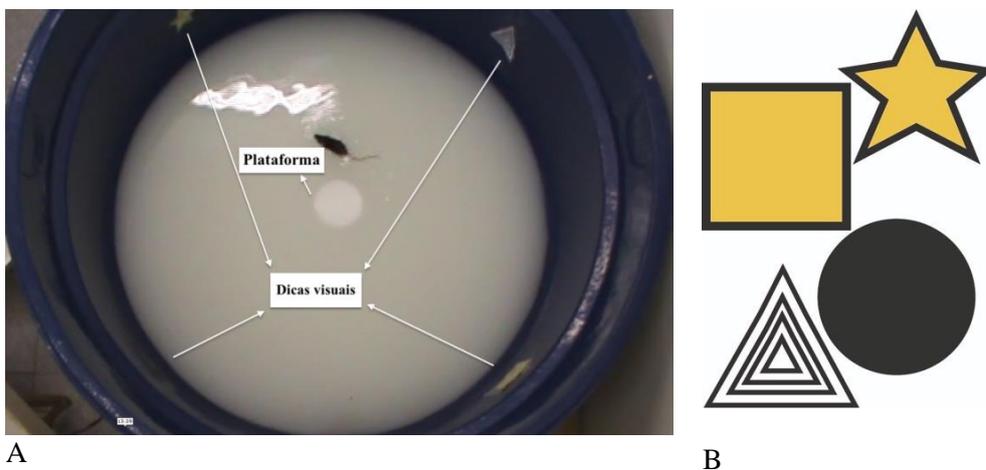
Classicamente, neste tipo de teste, os animais são deixados no centro do labirinto, e o tempo em que permanecem nos braços abertos e fechados é utilizado como um medidor de ansiedade. Entretanto, para determinação da latência de transferência de um braço aberto para um braço fechado, como um quantificador de memória, é necessário que o animal seja colocado em um braço aberto.

### **4.3.3 Labirinto aquático de Morris**

O labirinto aquático de Morris é utilizado para avaliação de memória espacial (GALLAGHER, M.; BURWELL, R.; BURCHINAL, M., 1993), classicamente associada às funções hipocâmpais. O protocolo utilizado foi o de um único dia, descrito por Nunez (2008). Uma caixa d'água de polietileno de 1.000 litros, com diâmetro de 1,16 m na base, foi utilizada como piscina (Fig. 12A). Quatro dicas visuais foram colocadas nas paredes da piscina, diametralmente opostas, com a finalidade de servir como pontos de referência para os animais. A piscina foi preenchida com água suficiente até uma altura aproximada de 15 cm da base.

O aquecimento da água foi feito com auxílio de um ebulidor elétrico, mantendo a temperatura em torno de 26 °C. A água foi tornada opaca com a adição de tinta guache branca atóxica, para impedir que os animais vissem a plataforma quando essa se encontrasse submersa. De acordo com o protocolo de referência, um recipiente cilíndrico de polietileno branco com 11,3 cm de diâmetro, o qual foi colocado no centro da piscina, foi usado como plataforma, não havendo, portanto, a divisão clássica da piscina em quadrantes. A altura da plataforma na água foi alterada por meio de uma placa de Petri de vidro embaixo dela. Quando a plataforma devesse estar visível, a placa

de Petri estava presente, já quando a plataforma devesse estar oculta, mas ainda presente, a placa de Petri era retirada.



**Figura 12.** Visão superior do tanque de água utilizado como labirinto aquático. A: esquema mostrando a localização da plataforma central e as dicas visuais distintas colocadas em cada um dos quatro quadrantes virtuais. B: imagens utilizadas como dicas visuais. Estas foram impressas em papel sulfite e plastificadas. Fonte: autoria própria.

O teste foi dividido em três etapas: pré-treinamento, treinamento e desafio. Nas etapas de pré-treinamento e treinamento, a plataforma foi posicionada no centro do tanque. Na fase de pré-treinamento, o topo da plataforma estava cerca de 0,5 cm acima do nível da água e visível aos animais, enquanto na fase de treinamento estava 0,5 cm abaixo do nível da água opaca e, portanto, não visível para os animais. Na sessão de desafio, a plataforma foi removida da piscina.

No pré-treinamento, cada animal foi colocado na plataforma por um período de 20 s, sendo colocado na água com o focinho voltado para uma das pistas visuais (Fig. 12B). Após encontrar a plataforma, o animal deveria permanecer nela por 10 s. Se transcorridos 60 s o animal não encontrasse a plataforma, este era gentilmente conduzido até ela e deixado permanecer por 10 s. Esse procedimento foi realizado mais duas vezes, sequencialmente, voltando o animal para outras duas pistas visuais diferentes, antes de passar para outro animal.

O treinamento foi realizado de forma semelhante ao pré-teste, mas com a plataforma submersa e, portanto, não visível aos animais, com monitoramento por 60 s e 10 s de tempo de plataforma. Cada animal foi submetido a esse procedimento quatro vezes. Para cada animal, cada sessão de treinamento foi realizada em triplicata, alternadamente entre os animais, sendo que a ordem das pistas visuais em que os

animais foram colocados na piscina foram diferentes para cada sessão. Assim, cada animal nadou até a plataforma por um total de 12 vezes.

Por fim, os animais foram desafiados na piscina sem plataforma, colocados de frente para uma das pistas visuais e monitorados por 30 s. Os vídeos gravados desta sessão de desafio foram então analisados no *ImageJ*. Além dos tempos necessários para os animais alcançarem a área da plataforma, foram avaliadas também as distâncias médias dos animais até a plataforma ao longo do teste, para evitar qualquer interferência nas velocidades de nado, também considerando que nem todos os animais conseguiram passar pela área da plataforma, mesmo nadando próximo a sua localização, na maioria das vezes. Apenas os animais que atingiram a área da plataforma foram considerados para avaliação, enquanto a análise dos vídeos foi restrita a um máximo de 30 s para evitar a extinção da memória que pode ocorrer após um período de busca, quando o animal não encontra a plataforma (Michela Gallagher, comunicação pessoal).

#### **4.4 Avaliação da ansiedade**

O desempenho cognitivo dos animais pode ser prejudicado pelo seu nível de estresse e ansiedade. Dessa forma, consideramos importante avaliar também se o envelhecimento e a ingestão de manjerição poderiam influenciar neste aspecto comportamental e, dessa forma, influenciar os resultados dos testes cognitivos observados no presente estudo. Utilizando uma análise alternativa de ansiedade, conforme descrita na metodologia em Shoji e col. (2016), foi avaliado o tempo total em que os animais permaneceram nos braços abertos com relação ao tempo em que permaneceram nos braços fechados, durante o treinamento no LCE, evitando-se, dessa forma, qualquer influência da lembrança do animal com relação à existência e localização de braços fechados, caso tal diferença fosse avaliada no dia do desafio.

O comportamento normal do animal, associado à sua ansiedade em permanecer em ambientes abertos e expostos, após ter sido colocado em um braço aberto pela primeira vez, é explorar o labirinto até que, uma vez que tenha encontrado os braços fechados, permanecerá no interior desses por muito mais tempo do que explorará os braços abertos. Animais tratados com ansiolíticos, por outro lado, tendem a permanecer nos braços abertos por tempo similar àquele durante o qual exploram os braços fechados.

Comportamentos associados à ansiedade também foram avaliados utilizando os dados obtidos durante a sessão de treinamento do teste TRO (LUEPTOW, L. M., 2017). Nesse teste, quanto maior o nível de ansiedade, menos tempo o animal interage com os objetos idênticos durante a sessão de treinamento. Nas caixas retangulares, o animal permanece boa parte do teste em algum dos cantos da caixa, opostos aos objetos. No presente trabalho, tentou-se diminuir essa tendência realizando o teste em um campo aberto circular, como descrito anteriormente. Não obstante, o tempo total de interação com ambos os objetos foi comparado, mesmo que o animal tenha apresentado preferência por algum dos objetos idênticos.

#### **4.5 Análise estatística**

Para um número amostral de no máximo 12 animais por grupo, optou-se por usar apenas estatística não paramétrica, uma vez que seria inapropriado fazer suposições sobre a distribuição dos dados e, considerando ainda que, para amostras menores do que 100, os testes de normalidade perdem poder estatístico (NCSS Statistical Software, Chapter 194).

A análise das massas corporais envolveu um teste de variâncias que resultou em heteroscedasticidade, seguido de comparação do formato das distribuições, as quais não diferiram, possibilitando comparação das medianas no teste de Mood. A amplitude do efeito foi determinada utilizando o índice de Grissom de probabilidade de superioridade (GRISSOM, R. J., 1994).

A avaliação da variância dos índices de discriminação entre os objetos conhecido e novo no TRO ( $d_2$ ) resultou em homoscedasticidade, possibilitando comparações múltiplas das distribuições via teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Conover-Iman para comparações múltiplas (CONOVER, W. J.; IMAN, R. L., 1979). A amplitude do efeito, com seu intervalo de confiança, foram estimados utilizando-se o índice  $g$  de Hedge. Ainda para o TRO, as comparações objeto conhecido x objeto novo para cada grupo experimental, das diferenças absolutas do número de interações com cada objeto no dia do treinamento e no dia do desafio foram avaliadas diretamente no teste de Mann-Whitney, uma vez que a análise de variâncias para dois grupos antes desse teste não é necessária. A amplitude do efeito também foi estimada utilizando-se o  $g$  de Hedge.

Diversas comparações, com respeito aos dados obtidos a partir do LCE, foram realizadas. Primeiramente foram comparados, para cada grupo e de forma pareada, as latências de transferência no treinamento (LT1) e no desafio (LT2). Essa análise envolveu o teste de Wilcoxon para amostras pareadas (mesmo animal em duas situações diferentes), seguida de determinação da amplitude do efeito, utilizando a probabilidade de superioridade para amostras dependentes,  $PS_{dep}$  e seu intervalo de confiança. As demais comparações foram realizadas separadamente para LT1 e LT2, considerando as comparações relevantes dentre todos os grupos. Para LT1, houve homoscedasticidade entre os grupos. Dessa forma corremos um Kruskal-Wallis seguido por Conover-Iman. Para LT2, como houve heteroscedasticidade, optou-se pelo teste de medianas de Mood, uma vez que o teste chi-2 para formato das distribuições não detectou diferenças entre os grupos experimentais. Para ambos, LT1 e LT2, a amplitude ou amplitude do efeito foi estimada utilizando-se o  $g$  de Hedge.

Os tempos gastos pelos animais para alcançarem a plataforma no LAM (somente parte dos animais), apresentaram heterogeneidade de variâncias e diferenças no formato das distribuições sendo, portanto, comparados com base no teste de medianas modificado por Randy Wilcox (WILCOX, R., 2017). A estimativa de amplitude de efeito utilizada foi a probabilidade de superioridade de Grissom. Já as distâncias médias entre os animais e a plataforma no dia do desafio apresentaram homogeneidade de variâncias e, dessa forma, os dados foram analisados utilizando Kruskal-Wallis seguido de Conover-Iman para comparações múltiplas, enquanto o  $g$  de Hedge foi utilizado para amplitude do efeito.

Finalmente, para a análise de ansiedade no LCE, foram comparados, para cada grupo, os tempos que os animais permaneceram nos braços abertos e nos braços fechados. Houve homogeneidade de variâncias e o teste de hipóteses escolhido foi, portanto, o Mann-Whitney, com amplitude do efeito medida através do  $g$  de Hedge. Já a avaliação de ansiedade no TRO, envolvendo o tempo total de interação com os objetos no treinamento foi comparado entre os grupos utilizando Kruskal-Wallis seguido de Conover-Iman, já que foi detectada homoscedasticidade. O  $g$  de Hedge foi o índice de escolha para determinação da amplitude do efeito.

Sempre que necessário, a homogeneidade de variâncias foi testada por meio de um teste de Conover dos quadrados dos ranqueamentos (CONOVER, W.; IMAN, R., 1981), sendo o resultado homoscedasticidade ou heteroscedasticidade para

homogeneidade ou heterogeneidade de variâncias, respectivamente. Esse teste foi implementado em planilha do Microsoft Excel pelo Prof. Dr. Alberto Moraes, com base nos cálculos do artigo original.

As formas de distribuição foram comparadas aos pares por meio de um teste chi-2, também implementado em uma planilha do Microsoft Excel pelo Prof. Dr. Alberto Moraes. A planilha calcula o grau de liberdade (*degree of freedom* – DF) e o valor de chi-2. Ambos os valores são analisados no software R utilizando o comando `pchisq` (valor chi2, valor DF) onde o p-valor do teste é obtido.

Os testes de hipóteses (Mood, Kruskal-Wallis+Conover-Iman, Wilcoxon, Mann-Whitney e Wilcox) foram todos executados em ambiente R. Para o teste de Mood, utilizou-se o pacote `RVAideMemoire` (MANGIAFICO, S. S., 2016). O teste de Kruskal-Wallis foi executado utilizando o pacote `conover.test` desenvolvido por Alexis Dinno. Para o teste de postos sinalizados de Wilcoxon ou o Mann-Whitney, foi utilizado o pacote `wilcox.test`. Finalmente, para a análise de medianas de Wilcox, foi utilizado o pacote `Rallfun-v38` desenvolvido com base em Wilcox (2017). Nos casos que envolveram comparações múltiplas, por exemplo, teste de medianas de Mood, ou Kruskal-Wallis seguido de Conover-Iman, nenhum método de correção foi aplicado, uma vez que apenas algumas comparações foram de interesse, e.g., animais com dieta controle x dieta suplementada, G1xG2 e G3xG4, e controles adultos maduros x adultos idosos, G3xG1. Para todos os testes, o nível de significância escolhido foi  $p < 0,05$ .

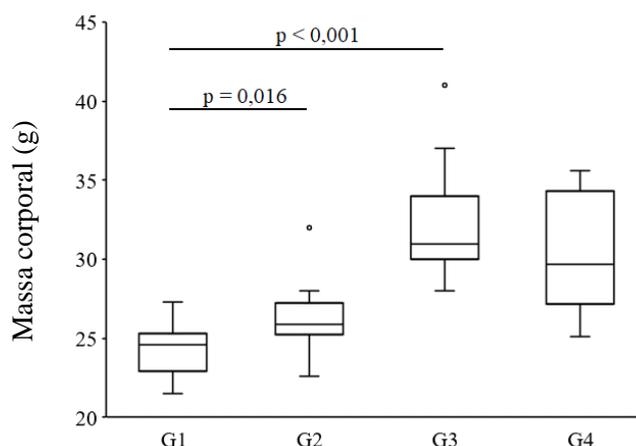
Os tamanhos ou amplitudes de efeito (*effect sizes*) foram estimados utilizando os índices ajustados de Hedge ( $g$ ) e a probabilidade de superioridade de Grissom ( $P_{a>b}$ ), para grupos independentes, ou a probabilidade de superioridade,  $PS_{dep}$ , para grupos pareados. O índice  $g$  de Hedge, assim como seu intervalo de confiança foram calculados utilizando uma planilha Microsoft Excel obtida no website do *Cambridge Centre for Evaluation & Monitoring* (Effect size calculator - CEM). A planilha foi modificada pelo Prof. Dr. Alberto Moraes adicionando uma correção para cálculo do  $g$  em amostras cujo  $n$  seja menor que 50. De acordo com Brydges (2019), valores de  $g$  menores que 0,15, maiores que 0,15 e menores de 0,40, entre 0,40 e 0,75 e acima de 0,75 foram considerados, respectivamente, insignificantes, pequenos, médios e altos. A probabilidade de superioridade de Grissom também foi calculada em planilha Excel implementada pelo Prof. Dr. Alberto Moraes, com base nos cálculos propostos em

Grissom (1994). A probabilidade de superioridade para amostras pareadas foi determinada utilizando o *package* para R, “orddom” (ROGMANN, J. J.; 2013).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação de massa corporal

Os animais submetidos aos testes tiveram sua massa corporal medida após o sacrifício. Como esperado, o envelhecimento está associado ao aumento de massa corpórea (Fig. 13) ( $P_{G3>G1} = 1,00$ , I.C.<sub>95</sub> 0,433 a 1,00).



**Figura 13.** Influência da idade e da dieta na massa corporal. Os grupos são adultos maduros com dieta controle (G1) e suplementada (G2) e adultos idosos com dieta controle (G3) e suplementada (G4). Valores acima das barras indicam a significância estatística no teste de medianas de Mood.

Nos animais adultos idosos, nenhum efeito da suplementação foi observado com relação a ganho ou perda de massa corpórea, sendo, entretanto, possível observar ganho de massa corpórea nos adultos maduros suplementados, com relação a seus controles não suplementados. Tal alteração, entretanto, apesar de ser observada na maioria dos animais do grupo G2, como mostra o teste de Grissom para a amplitude do efeito ( $P_{G1>G2}$  de Grissom = 0,236, I.C.<sub>95</sub> 0,028 a 0,816), em poucos casos está associada a aumentos expressivos, sendo que a diferença de massa corpórea entre os animais do grupo G2 e a média de massa corpórea do grupo G1 não ultrapassa 1 ou 2 gramas. Dessa forma, apesar da significância estatística, não vemos nos resultados evidência de alteração biológica relevante associada à ingestão de manjeriço nos adultos maduros,

no que diz respeito à massa corpórea. Interessantemente, dados da literatura mostram que a ingestão de manjeriço está associada com perda de peso em animais com dieta hipercalórica.

## 5.2 Tarefa de Reconhecimento de Objetos

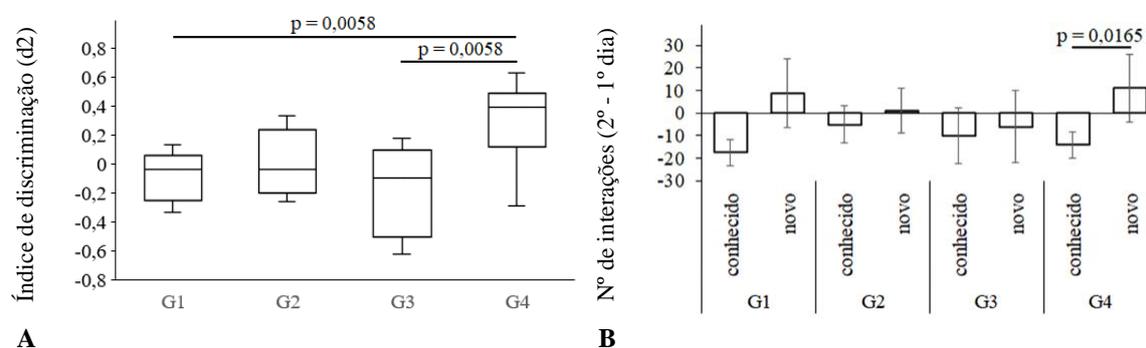
A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental que permite acessar memória declarativa em roedores. Tal memória, em roedores, tem sido associada com a atuação da acetilcolina no córtex pré-frontal pré-límbico. Fêmeas da linhagem C57BL/6 foram descritas como de performance ruim nesse teste, quando utilizados os descritores com base no tempo de interação, mas apresentam bom desempenho quando o número de interações com cada objeto é avaliado no dia do desafio (FRICK, K. M.; GRESACK, J. E., 2003).

Nesse sentido, a maioria dos animais apresentou pouca discriminação entre o objeto conhecido e o objeto novo no dia do desafio, com índice de discriminação,  $d_2$ , menor que 0,25, considerando as medianas dos grupos G1 a G3 (Fig. 14A). Somente o grupo G4, de idosos suplementados, apresentou mediana de  $d_2$  de aproximadamente 0,40, com diferença estatística na comparação com G1 ( $g$  de Hedge 1,24, I.C.<sub>.95</sub> 0,16 a 2,31) e G3 ( $g$  de Hedge 1,14, I.C.<sub>.95</sub> -0,099 a 2,36), indicando boa discriminação entre os objetos nesse grupo. A suplementação do grupo G2 causou alguma tendência de melhora do desempenho no teste, com pelo menos dois animais apresentando  $d_2 > 0,25$ , enquanto no grupo G1 não houve nenhum, mas sem amparo estatístico do achado ( $p = 0,1505$  no teste de Kruskal-Wallis seguido de Conover-Iman como pós-teste, e  $g$  de Hedge 0,53, I.C.<sub>.95</sub> -0,36 a 1,42). Dois em 5 animais do grupo G3 apresentaram uma forte interação com o objeto conhecido no dia do desafio, com os outros três não apresentando preferência alguma, sendo esse comportamento revertido pela suplementação no grupo G4, com 4 de 7 animais apresentando clara discriminação dos objetos. Foram avaliados 9, 11, 5 e 7 animais dos grupos G1 a G4, respectivamente. Esses resultados indicam forte melhora na performance cognitiva nos animais idosos suplementados, enquanto os efeitos da suplementação em animais adultos maduros, neste teste, foram bastante sutis.

Avaliou-se também para este teste comportamental o número de interações com os objetos, sendo este um bom preditor para fêmeas C57Bl/6, de acordo com Frick e Gresack (2003). O número absoluto de interações com cada objeto no dia do desafio

não variou entre os grupos, seja utilizando o total de animais, seja utilizando apenas os que não apresentaram preferência por um dos objetos idênticos durante o treinamento (dados não mostrados). Entretanto, pode-se também avaliar a diferença absoluta entre o número de interações para cada objeto no dia do treinamento e no dia do desafio, a menos a1 e b menos a2, sendo “a1” e “a2” objetos idênticos no treinamento, “a” e “b” objetos conhecido e novo, respectivamente, no dia do desafio. Neste caso, ao considerarmos todos os animais testados, somente o grupo suplementado G4 apresentou diferença estatisticamente significativa entre as diferenças calculadas para o objeto novo e para o objeto conhecido (Fig. 14B) ( $g$  de Hedge 0,88, I.C.<sub>.95</sub> 0,001 a 1,75), confirmando o efeito positivo da suplementação nos animais adultos idosos.

Adicionalmente, as medianas das diferenças para interação com o objeto conhecido, para todos os grupos, tendem a ser negativas, demonstrando diminuição da interação com o objeto conhecido no dia do desafio, ao passo que a mediana das diferenças para interação com o objeto novo é positiva para os grupos G1 e G4, nula para o grupo G2, e negativa para o grupo G3 de idosos controles. Dessa forma, há indício de que os animais dos grupos G1 e G2, adultos maduros com ração controle e suplementada, respectivamente, e G4, adultos idosos suplementados, interagiram mais com o objeto novo no dia do desafio, o que indica prejuízo cognitivo nos idosos controle, assim como preservação de memória declarativa nos animais mais jovens, independente da suplementação, e nos animais idosos que tenham sido suplementados.



**Figura 14.** Tarefa de reconhecimento de objetos. Os grupos são adultos maduros com dieta controle (G1) e suplementada (G2) e adultos idosos com dieta controle (G3) e suplementada (G4). Em A, os índices de discriminação ( $d_2$ ) para os animais considerados para o teste. Em B, as medianas para as diferenças no número de interações, a-a1 e b-a2, sendo “a1” e “a2” os objetos idênticos no treinamento e “a” e “b” objetos conhecido e novo, respectivamente, no dia do desafio. As barras de erro representam o erro padrão da mediana. Os p-valores acima das barras horizontais indicam diferença estatística no teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Conover-Iman, e Mann-Whitney, para A e B, respectivamente. Em A,  $n = 9, 11, 5, 7$  para os grupos G1 a G4, respectivamente. Em B,  $n = 12, 12, 11$  e  $11$ , para os grupos G1 a G4, respectivamente.

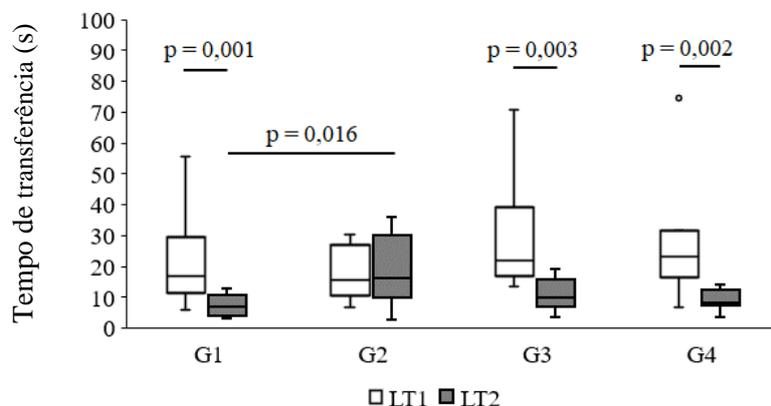
## 5.2 Labirinto em Cruz Elevado

O LCE foi utilizado como forma de testar a memória aversiva dos animais, muito associada à integridade do hipocampo. Foram calculadas as latências de transferência, que são os tempos que cada animal levou para entrar no braço fechado para o primeiro dia (treinamento = LT1) e para o segundo dia (desafio = LT2) (Fig. 15). Espera-se que as latências de transferência no segundo dia sejam menores do que no primeiro dia, o que é uma evidência de aprendizado e memória. Como previsto, a evidência de aquisição de memória e evocação foi observada em adultos maduros com ração controle, com LT2 sendo menor que LT1 em quase todos os animais (probabilidade de superioridade,  $PS_{dep}$  de 0,92 de LT1 sobre LT2, com I.C.<sub>95</sub> -0,976 a -0,181). Curiosamente, nenhuma diferença estatística entre LT1 e LT2 foi observada nesta faixa etária suplementada com manjeriço (G2) ( $p = 0,91$ ,  $PS_{dep} = 0,50$ , I.C.<sub>95</sub> -0,553 a 0,553), o que foi um resultado, à princípio, inesperado.

A comparação LT1xLT2 não forneceu indícios de prejuízo cognitivo associado ao envelhecimento, com ambos os grupos de animais idosos, G3 e G4, apresentando diferenças estatisticamente significantes para essa comparação (Fig. 15, p-valores), e altos índices de probabilidade de superioridade para LT1>LT2 ( $PS_{dep} = 0,91$  com I.C.<sub>95</sub> -0,975 a -0,119 para ambos os grupos, G3 e G4).

No entanto, enquanto as latências de transferência no primeiro dia (LT1), como esperado, não diferiram entre os grupos ( $p = 0,42$  em Kruskal-Wallis seguido por Conover-Iman), as latências de transferência para o dia do desafio (LT2) diferiram de forma estatisticamente significativa entre G1 e G2 ( $p = 0,0165$ ,  $g$  de Hedge 1,26 I.C.<sub>95</sub> 0,35 a 2,09), tendo, portanto, os adultos maduros suplementados com manjeriço levado mais tempo para entrar nos braços fechados na sessão de teste do que os não suplementados, o que pode indicar, de forma surpreendente, prejuízo de memória nos adultos maduros após a suplementação. A comparação intergrupos dos tempos de latência no dia do desafio (LT2) também não forneceu evidência de prejuízo cognitivo associado à idade (G1xG3  $p = 0,15$  no teste de Mood, e  $g$  de Hedge 0,81 com I.C.<sub>95</sub> -0,07 a 1,63), tampouco de melhoria de desempenho associada com a suplementação nesse grupo etário (G3xG4  $p = 0,21$  no teste de Mood, com  $g$  de Hedge -0,44 e I.C.<sub>95</sub> -1,26 a 0,43). Portanto, os dados obtidos no presente estudo não forneceram evidência de prejuízo cognitivo associado ao envelhecimento em camundongos, para o tipo de

memória avaliada no LCE, além de terem evidenciado piora na performance dos animais adultos de meia idade suplementados com manjerição.



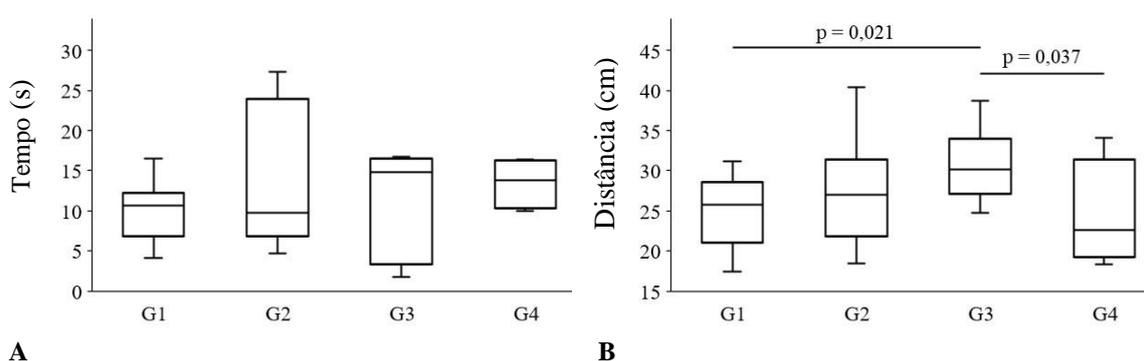
**Figura 15.** Latências de transferência para as sessões de treinamento (LT1) e desafio (LT2). Os grupos são adultos maduros com dieta controle (G1) (n = 12) e suplementada (G2) (n=12) e adultos idosos com dieta controle (G3) (n = 11) e suplementada (G4) (n = 11). Os p-valores sobre as barras indicam a significância estatística para as comparações LT1xLT2 no teste de Wilcoxon, ou para a comparação múltipla intergrupos para LT2 no teste de Mood.

#### 5.4 Labirinto Aquático de Morris

O LAM foi empregado para avaliação de aprendizado e memória visuo-espacial, sendo esta última um dos componentes da memória de trabalho. No presente caso, no dia do desafio, quando a plataforma foi retirada da piscina, foram avaliados o tempo necessário para os animais passarem pela área antes ocupada pela plataforma (Fig. 16A) e a distância média de cada animal até essa área ao longo de toda a sessão (Fig. 16B). Foram considerados somente os animais que efetivamente passaram pela região da plataforma ausente, totalizando 10 de 12, 9 de 12, 6 de 11, e 4 de 11 animais para os grupos G1 a G4, respectivamente. Neste caso, de forma surpreendente, a suplementação, independentemente da idade, pareceu estar associada com uma perceptível redução no número de animais considerados *performers* no teste, em comparação com os controles não suplementados. Na avaliação por tempo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos (Fig. 16A), sendo, entretanto, possível observar que as medianas para os grupos adultos idosos, independentemente da dieta, foram maiores que as medianas para os grupos de adultos maduros (“10,68”, “9,72”, “14,82” e “13,86” para os grupos G1 a G4, respectivamente). Os índices de Grissom,  $P_{b>a}$ , para as comparações G1xG2, G1xG3, G1xG4 e G3xG4,

respectivamente, 0,58, 0,60, 0,75 e 0,50, reforçam essa observação. Com um  $n$  reduzido de *performers*, principalmente nos grupos de animais adultos idosos, associado a grande variação dos dados, qualquer diferença biologicamente relevante para estes grupos, no sentido de identificação de prejuízo cognitivo decorrente do envelhecimento e do efeito da suplementação na memória espacial, se tornou extremamente prejudicada, quando a variável tempo foi avaliada.

Entretanto, foi possível demonstrar piora de desempenho no LAM associada ao envelhecimento, quando as distâncias médias foram analisadas (Fig. 16B). Quando comparados com os controles adultos maduros (G1), os animais do grupo adultos idosos controles (G3) permaneceram mais distantes da localização da plataforma ausente ( $p = 0,021$ ,  $g$  de Hedge = 1,12, I.C.<sub>95</sub> 0,04 a 2,20), apresentando, portanto, maior dificuldade em localizá-la. Enquanto a ingestão de manjerição do grupo adulto (G2) não trouxe melhora no desempenho, sendo este semelhante ao dos adultos maduros com ração controle ( $p = 0,21$ ,  $g$  de Hedge = 0,39, I.C.<sub>95</sub> -0,51 a 1,30). No grupo adulto idoso (G4), a suplementação foi associada a menores distâncias médias ( $p = 0,037$ ,  $g$  de Hedge = -0,88, I.C.<sub>95</sub> -2,20 a 0,45) e, portanto, a melhor desempenho com relação aos idosos não suplementados, indicando, dessa forma, reversão do prejuízo cognitivo no tocante à memória visuo-espacial nos animais adultos idosos suplementados com manjerição.



**Figura 16.** Labirinto aquático de Morris. A: tempo para encontrar a área da plataforma ausente. B: distâncias médias a partir da área da plataforma ausente (cm), no dia do desafio. Os grupos são adultos maduros com dieta controle (G1) e suplementada (G2) e adultos idosos com dieta controle (G3) e suplementada (G4). Os valores acima das barras horizontais indicam a significância estatística no teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Conover-Iman.

### 5.5 Avaliação de ansiedade

É de consenso que estresse e ansiedade podem prejudicar a formação e evocação de memórias. Os resultados de testes cognitivos em modelos animais precisam, portanto, ser avaliados à luz dos possíveis efeitos que a idade e a suplementação podem

apresentar no que diz respeito à ansiedade nos animais. Nesse sentido, utilizando os dados obtidos nos testes cognitivos realizados no presente estudo, buscou-se avaliar outros parâmetros para estimativa de comportamentos de ansiedade, seguindo recomendações presentes na literatura.

O LCE, por exemplo, foi desenvolvido originalmente para a avaliação de ansiedade em modelos animais, sendo um dos testes mais utilizados para esse fim, através da comparação do tempo em que o animal permanece nos braços abertos e fechados (SHOJI, H. et al., 2016). Utilizando os dados do dia de treinamento, no qual os animais tiveram a liberdade de explorar o labirinto por 2 min sem interrupção, mesmo que já tivessem encontrado um dos braços fechados, foi possível observar que, como esperado, os adultos maduros (G1) apresentaram os sinais de ansiedade típicos da espécie, permanecendo no interior dos braços fechados a maior parte do tempo (Fig. 17A, G1) ( $p = 0.0006$ ,  $g$  de Hedge 1,74, I.C.<sub>.95</sub> 0,80 a 2,68), enquanto adultos idosos do grupo controle (G3) não apresentaram qualquer indício de preferência ( $p = 0,3447$ ,  $g$  de Hedge 0,40, I.C.<sub>.95</sub> -0,49 a 1,28), indicando um possível efeito ansiolítico do envelhecimento nesses animais.

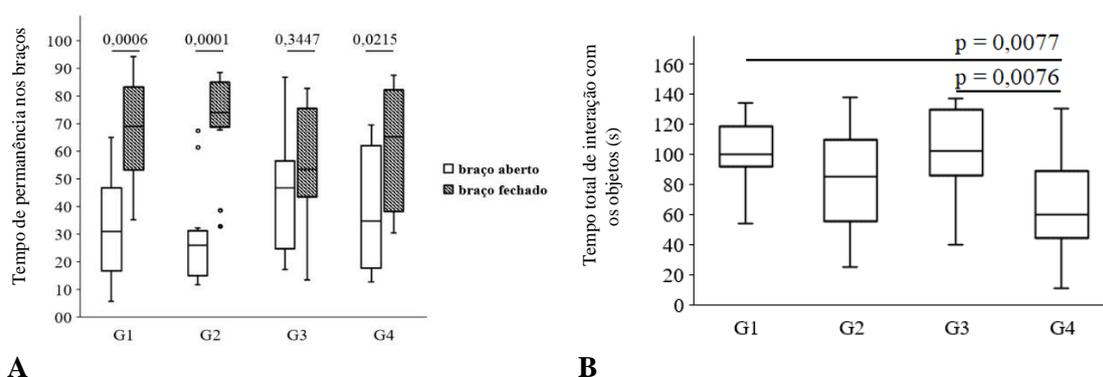
Surpreendentemente, a ingestão de manjeriço pareceu aumentar o nível de ansiedade dos animais, não apenas aumentando ainda mais a diferença entre o tempo no qual os animais normalmente permanecem nos braços fechados com relação aos braços abertos (Fig. 17A, G2) ( $p = 0,0001$ ,  $g$  de Hedge 2,01, I.C.<sub>.95</sub> 1,03 a 3,00), mas também restaurando nos adultos idosos suplementados (G4), pelo menos de forma mais discreta, o comportamento de permanecer mais tempo nos braços fechados (Fig. 17A, G4) ( $p = 0,0215$ ,  $g$  de Hedge 1,05, I.C.<sub>.95</sub> 0,16 a 1,95), o que indica aumento mais leve de ansiedade nesses animais. Apesar das latências de transferência para o dia do treinamento (LT1) não apresentarem diferença estatisticamente significativa nos animais adultos maduros com ou sem suplementação, (G2 e G1, respectivamente), tampouco a latência de transferência no dia do desafio foi menor para esta faixa etária após suplementação (Fig. 15, G2), de forma que maiores níveis de ansiedade podem ter prejudicado a formação de memórias nesses animais (G2). Concomitantemente, os animais adultos idosos não suplementados (G3), dado o efeito ansiolítico do envelhecimento fisiológico aqui evidenciado, tiveram um desempenho neste teste tão bom quanto os adultos maduros controles (Fig. 15), quando comparados LT1 e LT2 para cada grupo. No grupo G4, a combinação do efeito ansiolítico da idade, com o

possível efeito ansiogênico induzido pela suplementação, foi de tal forma equilibrada, a ponto de manter o bom desempenho desse grupo no LCE, com LT2 sendo menor do que LT1. Outro indício destas conclusões foi observado através da análise das distâncias percorridas pelos animais nos braços do labirinto. Animais dos grupos idosos tendem a se locomover menos no labirinto que seus controles mais jovens, independentemente da suplementação. Para G1xG3, o p-valor no Conover-Iman foi de 0,037, com  $g$  de Hedge -0,80 [I.C.<sub>.95</sub> -1,65 – 0,05], e para G1xG4, o p-valor no mesmo teste foi de 0,010, com  $g$  de Hedge -1,00 [I.C.<sub>.95</sub> -1,87 - -0,13]. Temos, portanto, para ambos os casos, forte influência da idade na diminuição da atividade de locomoção dos animais, o que corrobora com animais menos ansiosos. Simultaneamente, apesar da falta de diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2 ( $p = 0,154$ , Conover-Iman), o índice  $g = 0,44$  [I.C.<sub>.95</sub> -0,37 – 1,25], há indício de uma influência média da suplementação no aumento da atividade de locomoção desses animais no labirinto, o que corrobora com o efeito ansiogênico observado após suplementação desse grupo.

Esses resultados foram corroborados, adicionalmente, pelas análises complementares no teste TRO. Neste teste, a diminuição do tempo de interação dos animais com os objetos no campo aberto serve como um preditor quantitativo de aumento de ansiedade (LUEPTOW, L. M., 2017). Segundo os resultados do LCE, que mostram possível efeito ansiogênico da suplementação nos grupos G2 e G4, foi possível observar que os animais desses dois grupos apresentam diminuição no tempo de interação com os objetos, embora essa diminuição tenha sido estatisticamente significativa somente para o grupo G4, com relação aos grupos controle G1 e G3 (Fig. 17B, p-valores acima das barras). Contudo, os níveis de ansiedade induzidos pela suplementação não trouxeram prejuízo de performance no TRO, uma vez que, pelo menos para o grupo G4, os animais apresentaram um desempenho superior ao dos demais grupos, no que diz respeito ao reconhecimento do objeto do dia do treinamento (Fig. 14).

O protocolo normalmente utilizado no LAM foi identificado por si só como uma situação estressora, com os animais submetidos a este teste apresentando aumento de níveis de cortisol e piora na performance cognitiva comparativamente a outros testes de avaliação de memória espacial (HARRISON, F. E.; HOSSEINI, A. H.; MCDONALD, M. P., 2009). Entretanto, nenhuma evidência estatisticamente significativa de piora de desempenho neste teste, e que pudesse ser associada com efeitos ansiolítico da idade e

ansio gênico da suplementação, foi encontrada no presente trabalho (Fig. 16). Portanto, os sinais de ansiedade detectados nos outros dois testes não puderam ser confirmados no LAM, sendo, contudo, importante lembrar que nem todos os animais conseguem encontrar a plataforma ausente no desafio, sendo que cerca de 83%, 75%, 55% e 36% dos animais dos grupos G1 a G4, respectivamente, conseguem localizar a área da plataforma ausente. Dessa forma, além da queda no percentual de *performers* em G3 com relação a G1, e, portanto, associada ao envelhecimento, os grupos suplementados sempre apresentam menor percentual de *performers* com relação aos seus controles não suplementados, independentemente da idade. Considerando os dados de ansiedade e desempenho apresentados para os outros testes, é de se supor que esta conclusão não seja factual, e que o aumento de ansiedade aparentemente induzido pela suplementação tenha surtido impactos negativos no desempenho de boa parte dos animais dos grupos suplementados no LAM.



**Figura 17.** Avaliação de ansiedade no LCE (A), e no TRO (B). Os grupos são adultos maduros com dieta controle (G1) e suplementada (G2) e adultos idosos com dieta controle (G3) e suplementada (G4). Os p-valores acima das barras indicam significância estatística para o teste de Mann-Whitney, no caso do LCE, e de Kruskal-Wallis com pós-teste de Conover-Iman para o TRO.

## 5.6 Condições dos animais após os testes cognitivos

Após os testes cognitivos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido de decapitação, e abertos para dissecação de órgãos e tecidos para análises posteriores a serem realizadas em projetos futuros, por exemplo, para avaliação de marcadores de estresse oxidativo, isolamento de núcleos para análise morfológica nuclear após citoquímica e avaliação qualitativa e quantitativa de marcadores epigenéticos.

Também foi realizado processamento dos tecidos para inclusão em parafina e posterior análise histopatológica rotineira. Foram retirados dos animais encéfalos

inteiros, tentando preservar principalmente o cérebro e cerebelo. Estes foram divididos em dois hemisférios, sendo um processado para inclusão em parafina e o outro congelado a -20 °C para os demais ensaios. Foi retirado o coração, o qual foi cortado em duas metades, no sentido longitudinal atrioventricular, as quais foram processadas da mesma forma. Foram retirados dois fragmentos do fígado, provenientes do lobo maior, sendo um congelado e outro processado para análise histopatológica. O baço foi dividido e processado igualmente. Os ovários também foram retirados, junto com fragmentos da tuba uterina e de gordura abdominal. Os rins direito e esquerdo foram retirados, sendo cada um processado como descrito acima. Finalmente, os músculos reto femoral e vasto medial e lateral foram retirados em bloco de ambas as patas traseiras, sendo cada um processado como descrito.

Durante os testes cognitivos e após o sacrifício e dissecação, foram identificados problemas de saúde em alguns animais, os quais foram avaliados à luz de seu desempenho nos testes cognitivos, como forma de se identificar possíveis correlações. Os problemas encontrados foram descritos na Tabela 2, alguns dos quais são mostrados abaixo (Fig. 18).

**Tabela 2.** Impacto dos problemas de saúde detectados sobre os resultados dos testes cognitivos

Animais	Observação	TRO	LCE	LAM
G2D e G2K	Problema de visão (animais com manchas brancas em um ou ambos os olhos, podendo ser indicativo de catarata, glaucoma ou cegueira).	Estes animais pouco interagiram com os objetos no treinamento, considerando o tempo total durante o qual interagiram com os dois objetos. Ambos não apresentaram diferença com relação ao número de visitas aos objetos no treinamento e	Desempenho normal – $LT2 < LT1$ . Ambos levaram mais tempo que os demais animais para entrar pela primeira vez no braço fechado durante o treinamento, e percorreram as maiores distâncias durante os dois minutos de avaliação. Adicionalmente, permaneceram	Bom desempenho no aspecto distância média com relação à localização da plataforma no desafio. Entretanto, G2K levou mais tempo para alcançar essa área.

		desafio. G2D teve uma forte interação com o objeto conhecido no desafio, enquanto G2K foi excluído da análise por apresentar preferência por um dos objetos idênticos no treinamento.	muito mais tempo nos braços abertos que nos braços fechados, que é o contrário do padrão do grupo (eles são os dois <i>outliers</i> do G2 na Fig. 15A. O fato de possivelmente não enxergarem bem, pode ter diminuído a ansiedade por estarem em um ambiente aberto.	
G3D e G4B	Cegueira unilateral (animais que não tinham um dos olhos).	G3D foi excluído da análise por apresentar preferência por um dos objetos durante o treinamento, mas G4B (adulto idoso suplementado) teve bom desempenho no teste.	Ambos tiveram desempenho normal, com $LT2 < LT1$ . Mas G3D levou muito tempo, assim como alguns animais sem sinais de problemas de saúde, para entrar no braço fechado durante o treinamento. G3D andou bastante, assim como os animais sem problemas aparentes de saúde, mas, diferencialmente, com baixa velocidade de locomoção. Adicionalmente, permaneceu muito mais tempo nos braços abertos que nos fechados no treinamento.	Não passaram pela região da plataforma durante o desafio, ao mesmo tempo em que suas distâncias médias dessa área foram maiores que as medianas para seus respectivos grupos.
G3E	Prolapso retal.	Excluído da	Desempenho	Respondeu

		análise por apresentar preferência por um dos objetos idênticos no treinamento.	normal, com $LT2 < LT1$ .	bem ao teste no quesito distância média, apesar de ter levado tempo acima da mediana do grupo para passar pela área da plataforma ausente no desafio.
G4A	Esplenomegalia e cistos hepáticos indicativos de massa tumoral.	Excluído da análise por apresentar preferência por um dos objetos idênticos no treinamento.	Apesar de $LT2 < LT1$ , a diferença entre ambos foi pequena. LT1 foi baixa para o primeiro dia, comparado aos demais animais do grupo. Demonstrou-se com alto nível de ansiedade, permanecendo nos braços fechados a maior parte o tempo.	Não passou pela área da plataforma ausente durante o desafio, apesar da distância média com relação a esta área estar próxima da mediana do grupo.
G4C	Hepatomegalia e coloração hepática escura	Respondeu muito bem ao teste.	Desempenho normal, com $LT2 < LT1$ . Levou muito tempo, e andou bastante pelos braços abertos e área central, antes de entrar no braço fechado no treinamento. Com isso, o tempo de permanência nos braços abertos foi alto.	Não passou pela área da plataforma ausente durante o desafio, apesar da distância média com relação a esta área estar próxima da mediana do grupo.
G4D	Esplenomegalia com manchas brancas no baço	Excluído da análise por apresentar	Desempenho normal, com $LT2 < LT1$ . Sinais	Não passou pela área da plataforma

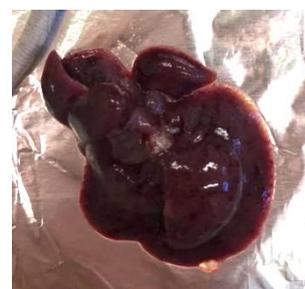
	e no fígado.	preferência por um dos objetos idênticos durante o treinamento.	de ansiedade, assim como a maior parte do grupo, permanecendo mais tempo nos braços fechados.	ausente durante o desafio, apesar da distância média com relação a esta área estar próxima da mediana do grupo.
G4H	Edema intestinal	Excluído da análise por apresentar preferência por um dos objetos idênticos no treinamento.	Desempenho muito bom. Rapidamente encontrou o caminho para os braços fechados, tanto no treinamento quanto no desafio.	Respondeu bem ao teste.



A



B



C



D



E

**Figura 18.** Alterações viscerais observadas em animais do grupo 4. A: G4A, baço aumentado com manchas mais claras; B: G4A, possível tumor hepático; C: G4C, fígado aumentado e de coloração muito escura; D: G4D, manchas claras no fígado; E: G4H, edema intestinal.

Percebe-se, por essa análise, que não há uma ligação evidente entre os problemas observados e o desempenho dos animais nos testes, uma vez que os animais com problemas tiveram desempenho ruim em algum, mas não em todos os testes. Adicionalmente, animais diagnosticados com problemas idênticos, mas de grupos experimentais diferentes, por exemplo, G3D e G4B, ambos com cegueira unilateral,

tiveram mal desempenho no LAM, mas responderam diferentemente no TRO e apresentaram bom desempenho no LCE. Chama atenção, entretanto, o fato de todos os animais que apresentaram as alterações viscerais mostradas na Figura 18 serem do grupo de adultos idosos suplementados (G4). Dessa forma, apesar de nenhum adulto maduro suplementado ter apresentado alterações viscerais visíveis, uma investigação dos possíveis efeitos adversos da dieta suplementada se torna imprescindível, principalmente nos idosos, uma vez que esse grupo pode ser mais suscetível a possíveis efeitos colaterais, em decorrência da idade dos animais, ou em virtude do maior tempo de suplementação ao qual esse grupo foi submetido (4 meses x 6 a 7 meses, respectivamente, para adultos maduros e adultos idosos).

## **6 DISCUSSÃO**

Devido a obstáculos sociais, econômicos e físicos, a população idosa é a mais propensa a ter deficiência de minerais em sua alimentação. Nesse sentido, há a importância de pesquisas científicas no intuito de promover intervenções nutricionais para um envelhecimento saudável (NORTON, S. et al., 2014). Os nutracêuticos, incluindo compostos fenólicos, ácidos graxos e vitaminas, devido a suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e de homeostase metabólica, possuem potencial para reverter alterações estruturais no cérebro, danos no DNA e promover a expectativa de vida, prevenindo o surgimento de declínio cognitivo leve e doenças neurodegenerativas associadas à idade (SINGH, P. et al., 2021).

Os terpenos estão presentes em plantas e especiarias (MASTELIC, J. et al., 2008). O linalol é um monoterpeneo que parece possuir efeito ansiolítico (SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G. P., 2016). Tais achados vão de encontro aos resultados do presente trabalho, onde há indícios de que a administração de manjerição na dieta trouxe efeitos estimulantes, ao invés de ansiolíticos, o que demonstra que muito há ainda em se entender o papel do manjerição no organismo.

A melhora da memória no modelo de envelhecimento fisiológico, observada no presente estudo, por meio da ingestão de manjerição pode, portanto, ter relação com a capacidade do manjerição em reduzir o estresse oxidativo, concomitantemente à inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Outras alterações comportamentais associadas ao envelhecimento envolvem diminuição da atividade motora, por exemplo, para explorar ambientes novos, assim como diminuição geral da função motora, além de diminuição das respostas a sons altos e repentinos, e do comportamento social. São observados também aparecimento de comportamento depressivo, aumento da inibição de pré-pulso e déficits nas memórias espacial e de medo condicionado, assim como diminuição de comportamento tipo ansiedade, a depender do teste empregado (SHOJI, H. et al., 2016). Este último corrobora a análise de ansiedade realizada no presente estudo.

Dessa forma, ocorrências de múltiplas alterações comportamentais podem mascarar os resultados dos testes utilizados, prejudicando sua análise e dificultando a identificação de alterações relacionadas à formação e evocação de diferentes tipos de memórias com a idade, além de como a ingestão de manjerição pode modular tais alterações. Contudo, ainda assim, foi possível observar evidência de que tais alterações

comportamentais, no presente caso a ansiedade, também podem ser influenciadas pela suplementação empregada. O que surpreende é que a ingestão de manjeriço apresentou efeito ansiogênico, de acordo com os presentes dados, contrariamente ao que foi reportado na literatura anteriormente, onde o tratamento com extrato hexânico de manjeriço inibe o efeito ansiogênico observado em modelos animais após administração de aspirina (ABD EL-GHFFAR, E. A. et al., 2018). Informações a esse respeito são bastante escassas, o que abre perspectivas para projetos futuros, visando melhor identificar a influência do manjeriço, também, no comportamento de ansiedade em modelos animais.

Dados os achados patológicos possivelmente associados à administração a longo prazo de manjeriço, especialmente nos animais idosos, é importante considerar possíveis efeitos adversos de sua administração no modelo biológico empregado. O óleo essencial de manjeriço, em concentrações de 3% a 4%, possui efeito extremamente tóxico sobre ácaros de poeira, sendo utilizado, portanto, como inseticida. Os componentes ativos desse óleo são principalmente citral, alfa-terpineol e linalol, sendo o citral, o mentol e o eugenol os componentes com maior toxicidade contra ácaros (PERUMALSAMY, H. et al., 2014). O estragol, o principal componente do óleo essencial de manjeriço, tem sido associado ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer hepático em roedores, através de sua genotoxicidade associada com indução de quebras no DNA (DING, W. et al., 2015). O que se divulga, em geral, é que nas quantidades normalmente consumidas na alimentação humana, efeitos colaterais não são observados após ingestão de manjeriço, e seu consumo é considerado seguro. Entretanto, em se tratando o presente trabalho de dados obtidos em outra espécie animal, não eliminamos a possibilidade do manjeriço, em doses supostamente alimentícias, estar associado com alta toxicidade em camundongos, concomitantes aos benefícios cognitivos observados aqui. Não seria surpresa. Diversos óleos essenciais utilizados em larga escala pela espécie humana têm sido relatados como extremamente tóxicos a outras espécies, a exemplo dos cães.

Dessa forma, pesquisas envolvendo os possíveis benefícios e efeitos colaterais do alto consumo de manjeriço ou de seus derivados, como extratos, concentrados e óleos essenciais, na espécie humana, são fundamentais para um completo entendimento das ações dessa planta no nosso organismo.

Há de se considerar, finalmente, que apesar da fonte de manjeriço utilizada neste trabalho ser de folhas frescas recém-colhidas, algum processamento foi necessário para que estas se misturassem completamente à ração. A homogeneização das folhas frescas picadas em 10 mL de água, seguida da mistura dessa suspensão com a ração triturada e pressurização da mistura em seringa para drenagem do excesso de água e repeletização pode, possivelmente, ter retirado das folhas uma quantidade considerável de componentes solúveis em água.

Posteriormente, a secagem da ração modificada em estufa a 60 °C certamente contribuiu para alterar ainda mais as propriedades da mistura. A composição do manjeriço em termos de macronutrientes, minerais e vitaminas, além dos componentes voláteis, como por exemplo os presentes no óleo essencial, sofre alteração considerável quando folhas frescas são desidratadas para melhor preservação. Secagens a meros 45 °C estão associadas com evaporação de vários componentes voláteis além da transformação desses em novos componentes (BOGGIA, R. et al., 2015). Dessa forma, os efeitos da ingestão de manjeriço observados no presente trabalho podem ter relação com os diversos componentes presentes nas folhas que foram descritos aqui, mas é difícil precisar, sem uma análise composicional, quais nutrientes e compostos, e em qual quantidade, ainda estão presentes na mistura após todo o processamento realizado.

## 7 CONCLUSÃO

Com os presentes resultados, foi possível concluir que:

- O envelhecimento em camundongos está associado com déficit cognitivo, no que diz respeito à memória de reconhecimento e memória espacial, mas não no caso de memória aversiva;

- A ingestão de manjeriço, nos adultos idosos, está associada com melhora na memória de reconhecimento e na memória espacial, que são afetadas no envelhecimento fisiológico;

- Nos adultos maduros, onde o déficit cognitivo *à priori* ainda não está presente, a ingestão de manjeriço trouxe fraco indício de melhora na memória de reconhecimento, aparente piora na memória aversiva, e nenhuma alteração na memória espacial, sendo, dessa forma, inefetivo em ganho cognitivo onde não exista alteração prévia;

- Há indicação de que o envelhecimento tenha, em camundongos, um efeito ansiolítico, contrabalanceado pela ingestão de manjeriço, a qual induz um efeito ansiogênico, efeito este evidenciado principalmente nos adultos maduros, onde os níveis de ansiedade são “normais” e, portanto, a indução de ansiedade é muito maior;

- Os resultados dos testes comportamentais podem ter sido influenciados fortemente pelo efeito ansiogênico associado à ingestão de manjeriço, prejudicando a performance nos testes, e dificultando a identificação dos efeitos benéficos da suplementação, principalmente nos adultos maduros;

- A melhora cognitiva observada nos animais idosos, após ingestão de manjeriço, pode, de acordo com dados da literatura, ser decorrente dos efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores dos principais componentes da planta, sendo eles flavonoides, terpenoides e eugenol;

- Existe a possibilidade da ingestão de manjeriço estar associada com o aparecimento de efeitos adversos sistêmicos nos animais idosos, o que requer investigação adicional.

## REFERÊNCIAS

ABD EL-GHFFAR, E. A.; AL-SAYED, E.; SHEHATA, S. M.; ELDAHSHAN, O. A.; EFFERTH, T. The protective role of *Ocimum basilicum* L. (Basil) against aspirin-induced gastric ulcer in mice: Impact on oxidative stress, inflammation, motor deficits and anxiety-like behavior. **Food & Function**. v. 9, n. 8, p. 4457-4468, August 2018. <https://doi.org/10.1039/C8FO00538A>

ACOSTA, J. C.; BANITO, A.; WUESTEFELD, T.; GEORGILIS, A.; JANICH, P.; MORTON, J. P.; ATHINEOS, D.; KANG, T. W.; LASITSCHKA, F.; ANDRULIS, M.; PASCUAL, G.; MORRIS, K. J.; KHAN, S.; JIN, H.; DHARMALINGAM, G.; SNIJDERS, A. P.; CARROLL, T.; CAPPER, D.; PRITCHARD, C.; INMAN, G. J.; LONGERICH, T.; SANSOM, O. J.; BENITAH, S. A.; ZENDER, L.; GIL, J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 978–990, August 2013. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>

ADAMS, M.; GMÜNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders-A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 363-381, September 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.016>

ADHVARYU, M. R.; SRIVASTAV, S. P.; VANIAWALA, S. N.; REDDY, M. N. A comparative study of radioprotection by four Indian medicinal herbs against genotoxicity induced by sub-lethal gamma irradiation in Swiss albino mice. **Iranian Journal of Radiation Research**, n.1, v. 6, p. 19-30, June 2008.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Suppression of the nuclear factor-kB activation pathway by spice-derived phytochemicals. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1030, n. 1, p. 434-441, December 2004. <https://doi.org/10.1196/annals.1329.054>

AHMADIFARD, M.; YARAHMADI, S.; ARDALAN, A.; EBRAHIMZADEH, F.; BAHRAMI, P.; SHEIKHI, E. The Efficacy of Topical Basil Essential Oil on Relieving Migraine Headaches: A Randomized Triple-Blind Study. **Complementary Medicine Research**, v. 27, n. 5, p. 310-318, 2020. <https://doi.org/10.1159/000506349>

AKBAR, L.; JULIANDI, B.; BOEDIONO, A.; BATUBARA, I.; SUBANGKIT, M. Effects of eugenol on memory performance, neurogenesis, and dendritic complexity of neurons in mice analyzed by behavioral tests and Golgi staining of brain tissue. **Journal Of Stem Cells & Regenerative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 35-41, March 2021. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1701005>

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Ethnobotany of the genus *Ocimum* L. (*Lamiaceae*) among the Afrobrazilian communities. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n. 1, p.107-117, 1998. <https://doi.org/10.3989/ajbm.1998.v56.i1.224>

ALBUQUERQUE, U. P.; HOLANDA C. A. L. The genus *Ocimum L. (Lamiaceae)* in North-East Brazil. **Anales Del Jardín Botánico De Madrid**, v. 56, n. 1, p. 43-64, June 1998. <https://doi.org/10.3989/ajbm.1998.v56.i1.219>

ALLI, S. S.; ABD EL WAHAB, M. G.; AYUOB, N. N.; SULIAMAN, M. The antidepressant-like effect of *Ocimum basilicum* in an animal model of depression. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 6, p. 390-401, August 2017. <https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1323276>

AMRANI, S.; HARNAFI, H.; BOUANANI, N. E. H.; AZIZ, M.; CAID, H. S.; MANFREDINI, S.; BESCO, E.; NAPOLITANO, M.; BRAVO, E. Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum Basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 12, 1040-1045, December 2006. <https://doi.org/10.1002/ptr.1961>

ARIDI, Y. S.; WALKER, J. L.; WRIGHT, O. R. L. The association between the Mediterranean dietary pattern and cognitive health: a systematic review. **Nutrients**, v. 9, n.7, p. 674, June 2017. <https://doi.org/10.3390/nu9070674>

AUNAN, J. R.; WATSON, M. M.; HAGLAND, H. R.; SOREIDE, K. Molecular and biological hallmarks of ageing. **British Journal of Surgery**, v. 103, n. 2, p. 29-46, January 2016. <https://doi.org/10.1002/bjs.10053>

BAGHEL, M.; SINGH, P.; SRIVAS, S.; THAKUR, M. K. Cognitive changes with aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. India Section B: Biological Sciences. v. 89, n. 3, p. 765-773, August 2017. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0906-4>

BALCOMBE, N. R.; SINCLAIR, A. Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, n. 6, p. 835-849, December 2001. <https://doi.org/10.1053/bega.2001.0244>

BARBOZA, J. N.; FILHO, C. S. M. B.; SILVA, R. O.; MEDEIROS, J. V. R.; SOUSA, D. P. An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-9, December 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3957262>

BAROT, J., & SAXENA, B. Therapeutic effects of eugenol in a rat model of traumatic brain injury: A behavioral, biochemical, and histological study. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 11, n. 4, p. 318-327, July 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.01.003>

BELLO-ARROYO, E.; ROQUE, H.; MARCOS, A.; ORIHUEL, J.; HIGUERA-MATAS, A.; DESCO, M.; CAIOLFA, V. R.; AMBROSIO, E.; LARA-PEZZI, E.;

GÓMEZ-GAVIRO, M. V. MouBeAT: A new and open toolbox for guided analysis of behavioral tests in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. 201, p. 1-12, September 2018. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00201>

BENZI, G.; MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiology of Aging**, v. 16, n. 4, p. 661-674, August 1995. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00066-N](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00066-N)

BETTIO, L. E. B.; RAJENDRAN, L.; GIL-MOHAPEL, J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. **Neuroscience & Biobehavioral**, v. 79, p. 66-86, August 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030>

BLANK, A. F.; FILHO, J. D. C.; NETO, A. D. S.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. D. C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 113-116. January 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000100024>

BOGGIA, R.; ZUNIN, P.; HYSENAJ, V.; BOTTINO, A.; COMITE, A. Dehydration of Basil Leaves and impact of processing composition. In: PREEDY, V. **Processing and Impact on Active Components in Food**. London: Academic Press, 2015. cap. 78, p. 645-653. ISBN 978-0-12-404699-3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00078-0>

BOWER, A.; MARQUEZ, S.; DE MEJIA, E. G. The health benefits of selected culinary herbs and spices found in the traditional mediterranean diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2728-2746, December 2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.805713>

BRUNSGAARD, H.; ANDERSEN-RANBERG, K.; JEUNE, B.; PEDERSEN, A. N.; SKINHOJ, P.; PEDERSEN, B. K. A high plasma concentration of tnf- is associated with dementia in centenarians. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 54, n. 7, p. 357-364, July 1999. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.7.M357>

BRYDGES, C. R. Effect Size Guidelines, Sample Size Calculations, and Statistical Power in Gerontology. **Innovation in aging**, v. 3, n. 4, p. 1-8, September 2019. <https://doi.org/10.1093/geroni/igz036>

CAMMAROTA, M.; BARROS, D. M.; VIANNA, M. R. M.; BEVILAQUA, L. R. M.; COITINHO, A.; SZAPIRO, G.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. The transition from memory retrieval to extinction. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 3, p. 573-82, September 2004. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652004000300011>

CAMPISI, J. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 685–705, February 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, June 1997. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)

CARLSEN, M. H.; HALVORSEN, B. L.; HOLTE, K.; BOHN, S. K.; DRAGLAND, S.; SAMPSON, L.; WILLEY, C.; SENOO, H.; UMEZONO, Y.; SANADA, C.; BARIKMO, I.; BERHE, N.; WILLET, W. C.; PHILLIPS, K. M.; JACOBS, D. R.; BLOMHOFF, R. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 3, p. 1-11, January 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>

CAROVIC-STANKO, K.; LIBER, Z.; POLITEO, O.; STRIKIĆ, F.; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Molecular and chemical characterization of the most widespread *Ocimum* species. **Plant Systematics and Evolution**, v. 294, n. 3-4, p. 253-262, July 2011. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0471-x>

CARRILLO, A. J. ZAFRILLA, M. P.; MARHUENDA, J. Cognitive function and consumption of fruit and vegetable polyphenols in a young population: is there a relationship? **Foods**, v. 8, n. 10, p. 507, October 2019. <https://doi.org/10.3390/foods8100507>

CELIK, S.; OZKAYA, A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research**, v. 35, n. 6, p. 547-552, November 2002. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2002.35.6.547>

CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; SIDIBE, L.; HARANA, M. Aromatic plants of Mali (I): chemical composition of essential oils of *Ocimum basilicum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 3, p. 375-380, February 1999. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701159>

CHAPTER 194 Normality Tests - NCSS Statistical Software. [2017]. Disponível em: <NCSS.com>. Acesso em: 20 abr. 2020.

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 303-306, October 2013. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>

CHENG, Y.; XUE, F.; YU, S.; DU, S.; YANG, Y. Subcritical water extraction of natural products. **Molecules**, v. 26, n. 13, June 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26134004>

CHUNG, H. Y.; KIM, H. J.; JUNG, K. J.; YOON, J. S.; YOO, M. A.; KIM, K. W.; YU, B. P. The inflammatory process in aging. **Reviews in Clinical Gerontology**, v. 10, n. 3, p. 207-222, March 2000. <https://doi.org/10.1017/S0959259800010327>

CHUNG, H. Y.; KIM, H. J.; KIM, J. W.; YU, B. P. The inflammation hypothesis of aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, n. 1, p. 327–335, April 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05662.x>

COELHO, V. R.; GIANESINI, J.; VON BOROWSKI, R.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; PICADA, J. N.; SANTOS, A. R. S.; BRUM, L. F. S.; PEREIRA, P. (–)-Linalool, a naturally occurring monoterpene compound, impairs memory acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 896-901, July 2011. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.02.010>

COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 51–57, January 2010. <https://doi.org/10.1038/nrc2772>

CONOVER, W. J.; IMAN, R. L. On multiple-comparisons procedures [Technical Report LA-7677-MS,]. **Los Alamos Scientific Laboratory**, February 1979. <https://doi.org/10.2172/6057803>

CONOVER, W. J.; IMAN, R. L. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. **The American Statistician**, v. 35, n. 3, p. 124–129, August 1981. <https://doi.org/10.1080/00031305.1981.10479327>

COPPÉ, J.-P.; PATIL, C. K.; RODIER, F.; KRTOLICA, A.; BEAUSÉJOUR, C. M.; PARRINELLO, S.; HODGSON, J. G.; CHIN, K.; DESPREZ, P. Y.; CAMPISI, J. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. **Plos One**, v. 5, n. 2, p. e9188, February 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009188>

COPPÉ, J.-P.; PATIL, C. K.; RODIER, F.; SUN, Y.; MUÑOZ, D. P.; GOLDSTEIN, J.; NELSON, P. S.; DESPREZ, P. Y.; CAMPISI, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic ras and the p53 tumor suppressor. **Plos Biology**, v. 6, n. 12, p. 2853-2868, December 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. Rock Ville, p. 1250-1318, 2000.

CURRERI, C.; TREVISAN, C.; CARRER, P.; FACCHINI, S.; GIANTIN, V.; MAGGI, S.; NOALE, M.; RUI, M. D.; PERISSINOTTO, E.; ZAMBON, S.; CREPALDI, G.; MANZATO, E.; SERGI, G. Difficulties with fine motor skills and cognitive impairment in an elderly population: The Progetto Veneto Anziani. **Journal of the American Geriatrics Society**. v. 66, n. 2, p. 350-356, February 2018. <https://doi.org/10.1111/jgs.15209>

CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Autonomic neural regulation of immunity. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 2, p. 156-166, February 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01442.x>

DAUNCEY, M. J. Nutrition, the brain and cognitive decline: insights from epigenetics. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, n. 11, p. 1179–1185, November 2014. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.173>

DE CABO, R.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; BERNIER, M.; HALL, M. N.; MADEO, F. The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. **Cell**, v. 157, n. 7, p. 1515-1526, June 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.031>

DE GROOT, A. Linalool Hydroperoxides. **Dermatitis**, v. 30, n. 4, p. 243-246, July 2019. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000471>

DEPARTAMENTO de informática em saúde EPM-UNIFESP. Escola paulista de medicina. Disponível em: <<https://tabnut.dis.epm.br/alimento>>. Acesso em: 15 set. 2019.

DING, W.; LEVY, D. D.; BISHOP, M. E.; PEARCE, M. G.; DAVIS, K. J.; JEFFREY, A. M.; DUAN, J. D.; WILLIAMS, G. M.; WHITE, G. A.; LYN-COOK, L. E.; MANJANATHA, M. G. In vivo genotoxicity of estragole in male F344 rats. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 56, n. 4, p. 356-365, May 2015. <https://doi.org/10.1002/em.21918>

DONG, X.; MILHOLLAND, B.; VIJG, J. Evidence for a limit to human lifespan. **Nature**, v. 13, n. 538, p. 257-259, October 2016. <https://doi.org/10.1038/nature19793>

DUBEY, K.; ANAND, B.; SHEKHAWAT, D.; KAR, K. Eugenol prevents amyloid formation of proteins and inhibits amyloid-induced hemolysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 40744, p. 1-11, February 2017. <https://doi.org/10.1038/srep40744>

EFFECT size calculator. Cambridge University press and assessment – Centre for Evaluation and Monitoring. Disponível em: <<https://www.cem.org/effect-size-calculator>>. Acesso em: 11 out. 2020.

EGASHIRA, T.; TAKAYAMA, F.; YAMANAKA, Y. Effects of bifemelane on muscarinic receptors and choline acetyltransferase in the brains of aged rats following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 57–65, June 1996. <https://doi.org/10.1254/jjp.72.57>

EGGLESTON, K. N.; FUCHS, V. R. The new demographic transition: most gains in life expectancy now realized late in life. **Journal of Economic Perspectives**, v. 26, n. 3, p. 137-156, Junho 2012. <https://doi.org/10.1257/jep.26.3.137>

ELISABETSKY, E.; BRUM, L. Linalool as active component of traditional remedies: anticonvulsant properties and mechanisms of action. **Curare**. v. 26. p. 45-52, January 2003.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D. O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 20, n. 4, p. 461-465, April 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00973103>

ENCIU, A. M.; GHERGHICEANU, M.; POPESCU, B. O. Triggers and effectors of oxidative stress at blood-brain barrier level: Relevance for brain ageing and neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-12, March 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/297512>

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. **Behavioral Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, November 1989. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 39, n. 2, p.139-156, August 2002.

FAN, X.; WHEATLEY, E. G.; VILLEDA, S. A. Mechanisms of hippocampal aging and the potential for rejuvenation. **Annual Review of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 251-272, July 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031357>

FATHY, M.; KHALIFA, E. M. M. A.; FAWZY, M. A. Modulation of inducible nitric oxide synthase pathway by eugenol and telmisartan in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Life Sciences**, v. 216, p. 207-214, January 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.031>

FAVORITO, P. A.; ECHER, M. M.; OFFEMANN, L. C.; SCHLINDWEIN, M. D.; COLOMBARE, L. F.; SCHINEIDER, R. P.; HACHMANN, T. L. Características

produtivas do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento ente plantas e entre linhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 582-586, September 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000500013>

FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioral Brain Research**, v. 58, n. 2, p. 199-202, December 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90103-W](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90103-W)

FINKEL, D.; PEDERSEN, N. L. Processing speed and longitudinal trajectories of change for cognitive abilities: The Swedish adoption/twin study of aging. **Aging, Neuropsychology and Cognition**, v. 11, n.1, p. 325-245, 2004. <https://doi.org/10.1080/13825580490511152>

FISCHER, C.; ENDLE, H.; SCHUMANN, L.; WILKEN-SCHMITZ, A.; KAISER, J.; GERBER, S.; VOGELAAR, C. F.; SCHMIDT, M. H. H.; NITSCH, R.; SNODGRASS, I.; THOMAS, D.; VOGT, J.; TEGEDER, I. Prevention of age-associated neuronal hyperexcitability with improved learning and attention upon knockout or antagonism of LPAR2. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 3, p. 1029-1050, May 2020. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03553-4>

FLOYD, R. A. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: A hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1346-1355, May 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00293-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00293-7)

FLURKEY, K.; CURRER, J. M.; HARRISON, D. E. Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research. **The Mouse in Biomedical Research**, v. 2, p. 637-672, December 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50074-1>

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p. 321-326, April 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>

FRANCICA, P.; AEBERSOLD, D. M.; MEDOVÁ, M. Senescence as biologic endpoint following pharmacological targeting of receptor tyrosine kinases in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 126, p. 1-12, February 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.08.022>

FRICK, K. M.; GRESACK, J. E. Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 6, p. 1283-1291, December 2003. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1283>

FUJISAWA, S.; MURAKAMI, Y. Eugenol and its role in chronic diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 929, p. 45-66, October 2016. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_3)

GALLAGHER, M.; BURWELL, R.; BURCHINAL, M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, n. 4, p. 618-626, August 1993. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.107.4.618>

GARABADU, D.; SINGH, D. Ocimum basilicum attenuates ethidium bromide-induced cognitive deficits and pre-frontal cortical neuroinflammation, astrogliosis and mitochondrial dysfunction in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, n. 3, p. 483-495, March 2020. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00536-z>

GARABADU, D.; SHARMA, M. Eugenol attenuates scopolamine-induced hippocampal cholinergic, glutamatergic, and mitochondrial toxicity in experimental rats. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 4, p. 848-859, May 2019. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-0008-6>

GARDÉ, A.; GARDÉ, N. Culturas Hortícolas. **Coleção Técnica Agrária**. Clássica Editora. 4 ed. 1977.

GAVA, A. A.; ZANONI, J. N. Envelhecimento celular. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v.9, n. 1, p. 41-46, January 2005.

GILCHRIST, A. L.; COWAN, N.; NAVEH-BENJAMIN, M. Working memory capacity for spoken sentences decreases with adult ageing: Recall of fewer but not smaller chunks in older adults. **Memory**, v. 16, n. 7, p. 773–787, October 2008. <https://doi.org/10.1080/09658210802261124>

GIUNTA, S. Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? **Immunity & Ageing**, v. 3, n. 12, p.1-2, December 2006. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-3-12>

GRANTHAM-MCGREGOR, S. Chronic undernutrition and cognitive abilities. **Human Nutrition: Clinical Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 83-94, March 1984.

GRAYER, R. J.; BRYAN, S. E.; VEITCH, N. C.; GOLDSTONE, F. J.; PATON, A.; WOLLENWEBER, E. External flavones in sweet basil, *Ocimum basilicum*, and related taxa. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1041-1047, April 1996. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00430-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00430-X)

GRIMM, A.; ECKERT, A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. **Journal of Neurochemistry**, v. 143, n. 4, p. 418-431, November 2017. <https://doi.org/10.1111/jnc.14037>

GRISSOM, R. J. Probability of the superior outcome of one treatment over another. **Journal of Applied Psychology**, v. 79, n. 2, p. 314-316, April 1994. <https://doi.org/10.1037/0021-9010.79.2.314>

GROSS, A. L.; REBOK, G. W.; UNVERZAGT, F. W.; WILLIS, S. L.; BRANDT, J. Cognitive predictors of everyday functioning in older adults: results from the active cognitive intervention trial. **The Journals of Gerontology**. v. 66B, n. 5, p. 557-566, September 2011. <https://doi.org/10.1093/geronb/gbr033>

GU, Y.; LUCHSINGER, J. A.; STERN, Y.; SCARMEAS, N. Mediterranean diet, inflammatory and metabolic biomarkers, and risk of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 22, n. 2, p. 483-492, October 2010. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100897>

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 975-985, September 2011. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0197>

GUPTA, R. Basil (*Ocimum sp.*). **Gene Banks for Medical & Aromatic Plants**, v. 5/6, p. 1-3, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 1/2, p. 44-49, January 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1997.tb06100.x>

HARADA, C. N.; NATELSON LOVE, M. C.; TRIEBEL, K. L. Normal cognitive aging. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 29, n. 4, p. 737-752, November 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.002>

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, July 1956. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>

HARRISON, F. E.; HOSSEINI, A. H.; MCDONALD, M. P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 198 n. 1, p. 247-251, March 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585-621, December 1961. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)

HEIJNEN, C. G.; HAENEN, G. R.; OOSTVEEN, R. M.; STALPERS, E. M.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**, v. 36, n. 5, p. 575-581, May 2002. <https://doi.org/10.1080/10715760290025951>

HERNANDEZ-SEGURA, A.; DE JONG, T. V.; MELOV, S.; GURYEV, V.; CAMPISI, J.; DEMARIA, M. Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. 2652-2660, September 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033>

HERSSENS, N.; VERBECQUE, E.; HALLEMANS, A.; VEREECK, L.; VAN ROMPAEY, V.; SAEYS, W. Do spatiotemporal parameters and gait variability differ across the lifespan of healthy adults? A systematic review. **Gait Posture**, v. 64, p. 181-190, July 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2018.06.012>

HERTZOG, C.; KRAMER, A. F.; WILSON, R. S.; LINDENBERGER, U. Enrichment effects on adult cognitive development. **Psychological Science in the Public Interest**, v. 9, n. 1, p. 1-65, October 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6053.2009.01034.x>

HO, Y. S.; SO, K. F.; CHANG, R. C.-C. Anti-aging herbal medicine—How and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 3, p. 354-362, July 2010. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.001>

HOU, Y.; DAN, X.; BABBAR, M.; WEI, Y.; HASSELBALCH, S. G.; CROTEAU, D. L.; BOHR, V. A. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 10, p. 565-581, October 2019. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>

HUHN, S.; KHARABIAN MASOULEH, S.; STUMVOLL, M.; VILLRINGER, A.; WITTE, A.V. Components of a mediterranean diet and their impact on cognitive functions in aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, p. 132, July 2015. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00132>

INFORMAÇÃO verbal: Fornecida pela Dra. Michaela Gallagher, da Johns Hopkins University por comunicação pessoal em jun. 2018.

IRIE, Y. Effects of eugenol on the central nervous system: its possible application to treatment of Alzheimer's disease, depression, and Parkinson's disease. **Current Bioactive Compounds**, v. 2, n. 1, p. 57-66, March 2006. <https://doi.org/10.2174/1573407210602010057>

IRITI, M.; VITALINI, S.; FICO, G.; FAORO, F. Neuroprotective herbs and foods from different traditional medicines and diets. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3517-3555, May 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15053517>

ISAEV, N. K.; STELMASHOOK, E. V.; STELMASHOOK, N. N.; SHARONOVA, I. N.; SKREBITSKY, V. G. Brain aging and mitochondria-targeted plastoquinone antioxidants of SkQ-type. **Biochemistry**, v. 78, n. 3, p. 295-300, March 2013. <https://doi.org/10.1134/S0006297913030127>

ISHIKAWA, F. Y. **Caracterização morfológica de genótipos de *Ocimum basilicum* L. na fase vegetativa**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia)- Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2017.

JAMES, L. E.; FOGLER, K. A.; TAUBER, S. K. Recognition memory measures yield disproportionate effects of aging on learning face-name associations. **Psychology and Aging**, v. 23, n. 3, p. 657-664, September 2008. <https://doi.org/10.1037/a0013008>

JANIG, W.; GREEN, P. G. Acute inflammation in the joint: Its control by the sympathetic nervous system and by neuroendocrine systems. **Autonomic Neuroscience**, v. 182, p. 42-54, January 2014. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.01.001>

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; SILVA, J. P. **Manejo de corte de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em três épocas de colheitas no Distrito Federal – DF**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2019.

JIANG, Z.; GUO, X.; ZHANG, K.; SEKARAN, G.; CAO, B.; ZHAO, Q.; ZHANG, S.; KIRBY, G. M.; ZHANG, X. The essential oils and eucalyptol from *Artemisia vulgaris* L. Prevent acetaminophen-induced liver injury by activating NRF2-KEAP1 and enhancing apap clearance through non-toxic metabolic pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 782, p. 1-15, July 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00782>

JOSEPH, J. A.; BERGER, R. E.; ENGEL, B. T.; ROTH, G. S. Age-related changes in the nigrostriatum: a behavioral and biochemical analysis. **Journal of Gerontology**, v. 33, n. 5, p. 643-649, September 1978. <https://doi.org/10.1093/geronj/33.5.643>

JUCÁ, E. **Caracterização morfológica e fenológica de oito procedências de basilicão (*Ocimum basilicum* L.), em condições de estufa**. 2000. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

JUERGENS, U. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1,8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. **Drug Research**, v. 64, n. 12, p. 638-646, December 2014. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1372609>

JUERGENS, U. R.; ENGELEN, T.; RACKÉ, K.; STOBER, M.; GILLISSEN, A.; VETTER, H. Inhibitory activity of 1,8-cieole (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 281-287, October 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2004.06.002>

KADIAN, R.; PARLE, M. Therapeutic potential and phytopharmacology of tulsi. **Journal of Pharmaceutical & Life Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1858-1867, July 2012.

KAEFER, C. M.; MILNER, J. A. The role of herbs and spices in cancer prevention. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 347-361, June 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.003>

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. Linalool – a review of a biologically active compound of commercial importance. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 7, p. 1183-1192, July 2008. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300727>

KASPER, P.; REPGES, R.; DETHLEFSEN, U.; PETRO, W. Comparison of secretolytics. Change of ciliary frequency and lung function after therapy with cineol and ambroxol. **Atemwegs – und Lungenkrankheiten**, v. 20, n. 11, p. 605-614, 1994.

KAUFMANN, D.; DOGRA, A. K.; WINK, M. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 10, p. 1368-1371, October 2011. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01344.x>

KAUSLER, D. H. **Learning and memory in normal aging**. Academic Press, New York, 2 ed. p. 372-374, 1994.

KIECOLT-GLASER, J. K.; PREACHER, K. J.; MACCALLUM, R. C.; ATKINSON, C.; MALARKEY, W. B.; GLASER, R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 9090–9095, July 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1531903100>

KILMOVA, B.; VALIS, M.; KUCA, K. Cognitive decline in normal aging and its prevention: a review on non-pharmacological lifestyle strategies. **Clinical Interventions in Aging**, v. 12, p. 903–910, May 2017. <https://doi.org/10.2147/CIA.S132963>

KOUÉMOU, N. E.; TAIWE, G. S.; MOTO, F. C. O.; PALE, S.; NGOUPAYE, G. T.; NJAPDOUNKE, J. S. K.; NKANTCHOUA, G. C. N.; PAHAYE, D. B.; BUM, E. N. Nootropic and neuroprotective effects of *Dichrocephala integrifolia* on scopolamine mouse model of Alzheimer's disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, n. 847, p. 1-10, November 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00847>

KREGEL, K. C.; ZHANG, H. J. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. 18-36, January 2007. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00327.2006>

KREILING, J. A.; TAMAMORI-ADACHI, M.; SEXTON, A. N.; JEYAPALAN, J. C.; MUNOZ-NAJAR, U.; PETERSON, A. L.; MANIVANNAN, J.; ROGERS, E. S.; PCHELINTSEV, N. A.; ADAMS, P. D.; SEDIVY, J. M. Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tissues. **Aging Cell**, v. 10, n. 2, p. 292-304, April 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00666.x>

KRINSKY, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. **Experimental Biology and Medicine**, v. 200, n. 2, p. 248-254, June 1992. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>

KUSINDARTA, D. L.; WIHADMADYATAMI, H.; HARYANTO, A. The analysis of hippocampus neuronal density (CA1 and CA3) after *Ocimum sanctum* ethanolic extract treatment on the young adulthood and middle-aged rat model. **Veterinary World**, v. 11, n. 2, p. 135-140, February 2018. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.135-140>

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 21-33, November 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>

LEE, Y. B.; LEE, H. J.; WON, M. H.; HWANG, I. K.; KANG, T. C.; LEE, J. Y.; NAM, S. Y.; KIM, K. S.; KIM, E.; CHEON, S. H.; SOHN, H. S. Soy isoflavones improve spatial delayed matching-to-place performance and reduce cholinergic neuron loss in elderly male rats. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 7, p. 1827-1831, July 2004. <https://doi.org/10.1093/jn/134.7.1827>

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 2, p. 336-374, November 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.08.003>

LEUTNER, S.; ECKERT, A.; MÜLLER, W. E. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. **Journal of neural transmission**, v. 108, n. 8-9, p. 955-967, September 2001. <https://doi.org/10.1007/s007020170015>

LINCK, V. M.; DA SILVA, A. L.; FIGUEIRÓ, M.; CARAMÃO, E. B.; MORENO, P. R. H.; ELISABETSKY, E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 679-683, July 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.002>

LINDSAY, D.; ASTLEY, S. B. European research on the functional effects of dietary antioxidants – EUROFEDA. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 23, n. 1-3, p. 1–38, February 2002. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00005-5)

LIU-AMBROSE, T.; BEST, J. R. Exercise is medicine for the aging brain. **Kinesiology Review**, v. 6, n.1, p. 22–29, 2017. <https://doi.org/10.1123/kr.2016-0035>

LOERCH, P. M.; LU, T.; DAKIN, K. A.; VANN, J. M.; ISAACS, A.; GEULA, C.; WANG, J.; PAN, Y.; GABUZDA, D. H.; LI, C.; PROLLA, T. A.; YANKER, B. A. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. **Plos One**, v. 3, n. 10, p. e3329, October 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003329>

LONGO, V. D.; MATTSON, M. P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 181-192, January 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.008>

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, June 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

LÓPEZ-VALDÉS, H. E.; MARTÍNEZ-CORIA, H. The role of neuroinflammation in age-related dementias. **Revista de Investigación Clínica**, v. 68, n. 1, p. 40-48, January 2016.

LOUGHREY, D. G.; LAVECCHIA, S.; BRENNAN, S.; LAWLOR, B. A.; KELLY, M. E. The impact of the Mediterranean diet on the cognitive functioning of healthy older adults: a systematic review and meta-analysis. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 571–586, July 2017. <https://doi.org/10.3945/an.117.015495>

LOURIDA, I.; SONI, M.; THOMPSON-COON, J.; PURANDARE, N.; LANG, I.A.; UKOUMUNNE, O. C.; LLEWELLYN, D. J. Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. **Epidemiology**, v. 24, n. 4, p. 479–489, July 2013. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182944410>

LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 126, n. 55718, August 2017. <https://doi.org/10.3791/55718-v>

MA, L.; MU, Y.; ZHANG, Z.; SUN, Q. Eugenol promotes functional recovery and alleviates inflammation, oxidative stress, and neural apoptosis in a rat model of spinal cord injury. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 36, n. 5, p. 1-10, September 2018. <https://doi.org/10.3233/RNN-180826>

MAHAJAN, N.; RAWAL, S.; VERMA, M.; PODDAR, M.; ALOK, S. A phytopharmacological overview on *Ocimum* species with special emphasis on *Ocimum*

*sanctum*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 185–192, April 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.08.002>

MALLETTE, F. A.; GAUMONT-LECLERC, M.-F.; FERBEYRE, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. **Genes & Development**, v. 21, n. 1, p. 43–48, January 2007. <https://doi.org/10.1101/gad.1487307>

MALVE, H. O.; RAUT, S. B.; MARATHE, P. A.; REGE, N. N. Effect of combination of *Phyllanthus emblica*, *Tinospora cordifolia*, and *Ocimum sanctum* on spatial learning and memory in rats. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 5, n. 4, p. 209–215, October 2014. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.146564>

MANGIAFICO, S. S. Summary and Analysis of Extension Program Evaluation in R, version 1.18.1. rcompanion.org/handbook. [2016]. Disponível em: <[rcompanion.org/documents/RHandbookProgramEvaluation.pdf](http://rcompanion.org/documents/RHandbookProgramEvaluation.pdf)>. Acesso em: 23 out. 2020.

MARTI-NICOLOVIUS, M.; AREVALO-GARCIA, R. Envejecimiento y memoria: efectos de la restricción calórica [Caloric restriction and memory during aging]. **Revista de Neurologia**, v. 66, n. 12, p. 415–422, June 2018. <https://doi.org/10.33588/rn.6612.2017516>

MASTELIC, J.; JERKOVIC, I.; BLAŽEVIĆ, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIĆ, S.; IVANCIC-BACE, I.; SMRECKI, V.; ZARKOVIC, N.; BRCIC-KOSTIC, K.; VIKIC-TOPIC, D.; MÜLLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3989–3996, June 2008. <https://doi.org/10.1021/jf073272v>

MATHERS, C. D.; STEVENS, G. A.; BOERMA, T.; WHITE, R. A.; TOBIAS, M. I. Causes of international increases in older age life expectancy. **The Lancet**, v. 385, n. 9967, p. 540–548, February 2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60569-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60569-9)

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 278–294, April 2006. <https://doi.org/10.1038/nrn1886>

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, June 2000. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5)

MCGRATTAN, A. M.; MCGUINNESS, B.; MCKINLEY, M. C.; KEE, F.; PASSMORE, P.; WOODSIDE, J. V.; MCEVOY, C. T. Diet and inflammation in cognitive ageing and Alzheimer's disease. **Current Nutrition Reports**. v. 8, n. 8, p. 53–65, June 2019. <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0271-4>

MCHUGH, D.; GIL, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. **The Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 1, p. 65–77, January 2018. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>

MEHRI, S.; MESHKI, M. A.; HOSSEINZADEH, H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 162-166, April 2014. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.919585>

METHODS and application of food composition laboratory: Beltsville, MD. USDA. [2012]. Disponível em: <[www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/methods-and-application-of-food-composition-laboratory/](http://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/methods-and-application-of-food-composition-laboratory/)> Acesso em: 20 set. 2019.

MICHAUD, M.; BALARDY, L.; MOULIS, G.; GAUDIN, C.; PEYROT, C.; VELLAS, B.; CESARI, M.; NOURHASHEMI, F. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 12, p. 877-882, December 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.009>

MITIC-CULAFIC, D.; ŽEGURA, B.; NIKOLIC, B.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNEŽEVIC-VUKCEVIC, J.; FILIPIC, M. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 260-266, January 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.015>

MONTAGNE, A., BARNES, S.R.; SWEENEY, M. D.; HALLIDAY, M. R.; SAGARE, A. P.; ZHAO, Z.; TOGA, A. W.; JACOBS, R. E.; LIU, C. Y.; AMEZCUA, L.; HARRINGTON, M. G.; CHUI, H. C.; LAW, M.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. **Neuron**, v. 85, n. 2, p. 296–302, January 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>

MURRAY, M. J; LINCOLN, D. E. The genetic basis of acyclic oil constituents in *mentha citrata* ehrh. **Genetics**, v. 65, n. 3, p. 457-471, July 1970. <https://doi.org/10.1093/genetics/65.3.457>

NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27-31, March 2016. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>

NATIONAL center for biotechnology information. PubChem Compound Summary for CID 2758, Eucalyptol. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol>>. Acesso em: 22 fev. 2022.

NEALE, C.; CAMFIELD, D.; REAY, J.; STOUGH, C.; SCHOLEY, A. Cognitive effects of two nutraceuticals Ginseng and Bacopa benchmarked against modafinil: a review and comparison of effect sizes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 728–737, March 2013. <https://doi.org/10.1111/bcp.12002>

NORTON, S.; MATTHEWS, F. E.; BARNES, D. E.; YAFFE, K.; BRAYNE, C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 8, p. 788–794, August 2014. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70136-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70136-X)

NUNEZ, J. Morris water maze experiment. **Journal of Visualized Experiment**, v. 19, n. 19, p. e897, September 2008. <https://doi.org/10.3791/897>

*OCIMUM basilicum l.* HUNI. Disponível em: <<http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/ocimum-basilicum-l>> Acesso em: 15 ago. 2021.

ODY, P. **The complete medicinal herbal: A practical guide to the healing properties of herbs**. Skyhorse Publishing. New York. 2017.

OPARA, E. I.; CHOCHAN, M. Culinary herbs and spices: their bioactive properties, the contribution of polyphenols and the challenges in deducing their true health benefits. **International Journal of Molecular Science**, v. 15, n. 10, p. 19183-19202, October 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms151019183>

PAGE, T. L.; EINSTEIN, M.; DUAN, H.; HE, Y.; FLORES, T.; ROLSHUD, D.; ERWIN, J. M.; WEARNE, S. L.; MORRISON, J. H.; HOF, P. R. Morphological alterations in neurons forming corticocortical projections in the neocortex of aged Patas monkeys. **Neuroscience Letters**, v. 317, n. 1, p. 37-34, January 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02428-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02428-4)

PANIZZA, S. **Plantas que curam (cheiro de mato)**. IBRASA. São Paulo: Biblioteca Sanidade, 21 ed. 1997.

PARK, D. C.; LAUTENSCHLAGER, G.; HEDDEN, T.; DAVIDSON, N. S.; SMITH, A. D.; SMITH, P. K. Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. **Psychology and Aging**, v. 17, n. 2, p. 299-320, June 2002. <https://doi.org/10.1037/0882-7974.17.2.299>

PARK, H.; SEOL, G. H.; RYU, S.; CHOI, I.-Y. Neuroprotective effects of (-)-linalool against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 4, p. 555-564, April 2016. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0714-z>

PARTRIDGE, L.; GEMS, D. Mechanisms of aging: public or private? **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 3, p. 165–175, March 2002. <https://doi.org/10.1038/nrg753>

PATNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v. 89, n. 358, p. 39-46, January 1997.

PAVITHRA, B. Eugenol – A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 3, p. 153-154, January 2014.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (–)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, n. 7, p. 719-723, January 2006. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.065>

PERUMALSAMY, H.; KIM, J. Y.; KIM, J. R.; HWANG, K. N.; AHN, Y. J. Toxicity of basil oil constituents and related compounds and the efficacy of spray formulations to *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 650-657, May 2014. <https://doi.org/10.1603/ME13235>

PRAKASH, J.; GUPTA, S. Chemopreventive activity of *Ocimum sanctum* seed oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n.1/2, p. 29–34, September 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00194-X)

PRASAD, K. N.; COLE, W. C.; HOVLAND, A. R.; PRASAD, K. C.; NAHREINI, P.; KUMAR, B.; EDWARDS-PRASAD, J.; ANDREATTA, C. P. Multiples antioxidants in the prevention and treatment of neurodegenerative disease: analysis of biologic rationale. **Current Opinion in Neurology**, v. 12, n. 1, p. 761-770, February 1999. <https://doi.org/10.1097/00019052-199912000-00017>

PRENIS, J.; DUDLEY, E. C.; CARTER, A. J. **The Windowsill Herb Garden**. Philadelphia: Running Press, 1990.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329–344, January 2010. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>

RABBIT, P. Frontal brain changes and cognitive performance in old age. **Cortex**, v. 41, n. 2, p. 238-240, April 2005. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(08\)70906-7](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(08)70906-7)

RADULESCU, C. I.; CERAR, V.; HASLEHURST, P.; KOPANITSA, M.; BARNES, S. J. The aging mouse brain: cognition, connectivity and calcium. **Cell Calcium**, v. 94, p. 1-19, March 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102358>

RAGHAVENDRA, M.; MAITI, R.; KUMAR, S.; ACHARYA, S. B. Role of *Ocimum sanctum* in the experimental model of Alzheimer's disease in rats. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 6-15, January 2009. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.49368>

RAMESH, B.; SATAKOPAN, V. N. Antioxidant Activities of Hydroalcoholic Extract of *Ocimum sanctum* against Cadmium Induced Toxicity in Rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 307-310, July 2010. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0039-5>

REESE, C. M.; CHERRY, K. E.; COPELAND, A. L. Knowledge of normal versus pathological memory aging in younger and older adults. **Aging, Neuropsychology, and Cognition**, v. 7, n. 1, p. 1-8, March 2000. <https://doi.org/10.1076/anec.7.1.1.809>

RODIER, F.; CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 4, p. 547-556, February 2011. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>

ROGMANN, J. J. Ordinal Dominance Statistics (orddom): An R Project for Statistical Computing package to compute ordinal, nonparametric alternatives to mean comparison (Version 3.1) [2013]. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/>>. Acesso em: 21 set. 2020.

ROMÁ-MATEO, C.; SECO-CERVERA, M.; IBANEZ-CABELLOS, J. S.; BERENGUER-PASCUAL, E.; PEREZ, G.; RODRIGUEZ, L. R.; GARCIA-GIMENEZ, J. L. Oxidative stress and the epigenetics of cell senescence: insights from progeroid syndromes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4755-4770, January 2018. <https://doi.org/10.2174/1381612824666190114164117>

RUBIÓ, L.; MOTILVA, M. J.; ROMERO, M. P. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 943-953, July 2013. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.574802>

RUDDER, E. A. M. C. **Guia Compacto das Plantas Mediciniais**. São Paulo: Rideel, 2002.

RYDING, O. Notes on the sweet basil and its wild relatives (*Lamiaceae*). **Economic Botany**, v. 48, n. 1, p. 65-67, January 1994. <https://doi.org/10.1007/BF02901382>

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; HOBBIE, F.; KEERTHI, A.; OUN, A.; KORTHOLT, A.; BODDEKE, E.; DOLGA, A. Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 1-12, October 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109295>

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 111-120, March 2016. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.002>

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; POSADA-DUQUE, R.; CORTES, N. C.; ARIAS-LONDOÑO, J. D.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. Changes in the hippocampal and peripheral phospholipid profiles are associated with neurodegeneration hallmarks in a long-term global cerebral ischemia model: Attenuation by Linalool. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 555-571, June 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.04.015>

SALAS, L. H.; BURGADO, J.; ALLEN, N. J. Glia: victims or villains of the aging brain? **Neurobiology of Disease**, v.143, July 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105008>

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. Regulation of the aging process by autophagy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 217-224, September 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.03.004>

SALTHOUSE, T. A. When does age-related cognitive decline begin? **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 4, p. 507-514, April 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.09.023>

SALVADORES, N.; SANHUEZA, M.; MANQUE, P.; COURT, F. A. Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. 452, p. 451, September 2017. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00451>

SANSON, A. D. **Morfologia, produção de biomassa e caracterização química do óleo essencial de seis acessos de *Ocimum ssp.* comercializados em Salvador, BA e Brasília, DF.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2009.

SANTOS, E. F. **Seleção de tipos de *Ocimum basilicum L.* de cor púrpura para o mercado de plantas ornamentais.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2007.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 2, p. 331-337, February 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1005604932760>

SARAHROODI, S.; ESMAEILI, S.; MIKAILI, P.; HEMMATI, Z.; SABERI, Y. The effects of green *Ocimum basilicum* hydroalcoholic extract on retention and retrieval of memory in mice. **Ancient Science of Life**, v. 31, n. 4, p. 185-189, April 2012. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.107354>

SASTRE, J.; PALLARDÓ, F. V.; ASUNCIÓN, J., G.; VIÑA, J. Mitochondria, oxidative stress and aging. **Free Radical Research**, v. 32, n. 3, p. 189-198, March 2000. <https://doi.org/10.1080/10715760000300201>

SCHAE, K. W.; WILLIS, S. L.; CASKIE, G. I. The seattle longitudinal study: relationship between personality and cognition. **Aging, Neuropsychology and Cognition**, v. 11, n.2/3, p. 304-324, June 2004. <https://doi.org/10.1080/13825580490511134>

SCHNEIDER, R. H.; ALEXANDER, C. N.; SALERNO, J. W.; ROBINSON, D. K.; FIELDS, J. Z.; NIDICH, S. I. Disease prevention and health promotion in the aging with a traditional system of natural medicine. **Journal of Aging and Health**, v. 14, n. 1, p. 57-78, February 2002. <https://doi.org/10.1177/089826430201400104>

SENTARI, M.; HARAHA, U.; SAPIIE, T. W. A.; RITARWAN, K. Blood Cortisol Level and Blood Serotonin Level in Depression Mice with Basil Leaf Essential Oil Treatment. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 16, p. 2652-2655, August 2019. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.819>

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7749-7559, October 2005. <https://doi.org/10.1021/jf051513y>

SHOJI, H.; TAKAO, K.; HATTORI, S.; MIYAKAWA, T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. **Molecular Brain**, v. 9, n. 1, January 2016. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0191-9>

SIMON, J. E. et al. **Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. Perspectives on new crops and new uses**. ASHS Press. Alexandria, 1999.

SIMOPOULOS, A. P. The mediterranean diets: what is so special about the diet of greece? The scientific evidence. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 11, p. 3065-3073, November 2001. <https://doi.org/10.1093/jn/131.11.3065S>

SINGH, P.; SIVANANDAM, T. M.; KONAR, A.; THAKUR, M. K. Role of nutraceuticals in cognition during aging and related disorders. **Neurochemistry International**, v. 143, n. 104928, February 2021. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104928>

SINGH, V.; AMDEKAR, S.; VERMA, O. *Ocimum Sanctum* (tulsi): Biopharmacological Activities. **Webmed Central Pharmacology**, v. 1, n. 10, p. 1-7, October 2010.

SINGH, V.; KRISHAN, P.; SHRI, R. Improvement of memory and neurological deficit with *Ocimum basilicum* L. extract after ischemia reperfusion induced cerebral injury in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 4, p. 1111–1120, August 2018. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0215-5>

SOKOLOFF, L., REIVICH, M., KENNEDY, C., ROSIERS, M. H. D., PATLAK, C. S., PETTIGREW, K. D.; SAKURADA, O.; SHINOHARA, M. The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 28, n. 5, p. 897–916, May 1977. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10649.x>

SOKOLOV, A. N.; PAVLOVA, M. A.; KLOSTERHALFEN, S.; ENCK, P. Chocolate and the brain: neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2445–2453, December 2013. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.06.013>

SOLFRIZZI, V.; CUSTODERO, C.; LOZUPONE, M.; IMBIMBO, B. P.; VALIANI, V.; AGOSTI, P.; SCHILARDI, A.; D'INTRONO, A.; LA MONTAGNA, M.; CALVANI, M.; GUERRA, V.; SARDONE, R.; ABBRESCIA, D. I.; BELLOMO, A.; GRECO, A.; DANIELE, A.; SERIPA, D.; LOGROSCINO, G.; SABBA, C.; PANZA, F. Relationships of dietary patterns, foods, and micro- and macronutrients with alzheimer's disease and late-life cognitive disorders: a systematic review. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 59, n. 3, p. 815–849, July 2017. <https://doi.org/10.3233/JAD-170248>

SOTO, I.; GRAHAM, L. C.; RICHTER, H. J.; SIMEONE, S. N.; RADELL, J. E.; GRABOWSKA, W.; FUNKHOUSER, W. K.; HOWELL, M. C.; HOWELL, G. R. APOE stabilization by exercise prevents aging neurovascular dysfunction and complement induction. **Plos Biology**, v. 13, n. 10, p. 1–33, October 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002279>

TAPSELL, L. C.; HEMPHILL, L.; COBIAC, L.; PATCH, C. S.; SULLIVAN, D. R.; FENECH, M.; ROODENRYS, S.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M.; WILLIAMS, P. G.; FAZIO, V. A.; INGE, K. E. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. **Medical Journal of Australia**, v. 185, n. 4, p. 4-24, August 2006. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00548.x>

THE european market potential for fresh herbs. CBI Ministry of Foreign Affairs [2020]. Disponível em: <<https://www.cbi.eu/market-information/fresh-fruit-vegetables/fresh-herbs/market-potential>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, December 2002. <https://doi.org/10.1038/nature01321>

TUCKER-DROB, E. M. Cognitive aging and dementia: a life-span perspective. **Annual Review of Developmental Psychology**, v. 1, p. 177–196, December 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-devpsych-121318-085204>

VALLS-PEDRET, C.; SALA-VILA, A.; SERRA-MIR, M.; CORELLA, D.; DE LA TORRE, R.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; MARTÍNEZ-LAPISCINA, E. H.; FITO, M.; PEREZ-HERAS, A.; SALAS-SALVADO, J.; ESTRUCH, R.; ROS, E. Mediterranean diet and age-related cognitive decline: a randomized clinical trial. **JAMA Internal Medicine**, v. 175, n. 7, p. 1094–1103, July 2015. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.1668>

VAN DEURSEN, J. M. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 439–446, May 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13193>

VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical Characterization of basil (*Ocimum spp.*) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, v. 54, n. 2, p. 207-216, April 2000. <https://doi.org/10.1007/BF02907824>

VISIOLI, F.; GRANDE, S.; BOGANI, P.; GALLI, C. The role of antioxidants in the Mediterranean diets: focus on cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 4, p. 337–343, August 2004. <https://doi.org/10.1097/01.cej.0000137513.71845.f6>

VLACHOS, G. S.; SCARMEAS, N. Dietary interventions in mild cognitive impairment and dementia. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 69–82, March 2019. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.1/nscarmeas>

WALPOLE, S. C.; PRIETO-MERINO, D.; EDWARDS, P.; CLELAND, J.; STEVENS, G.; ROBERTS, I. The weight of nations: an estimation of adult human biomass. **BMC Public Health**, v. 12, n. 439, p. 1-6, June 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-439>

WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S. Invited review: theories of aging. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 4, p. 1706–1716, October 2003. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00288.2003>

WHAT is the difference between basil and tulsi? Quora [2021]. Disponível em: <<https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-basil-and-tulsi>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

WILCOX, R. Modern statistics for the social and behavioral sciences: A practical introduction. Chapman and Hall/CRC, 2 ed. 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315154480>

WILLCOX, B. J.; WILLCOX, D. C. Caloric restriction, caloric restriction mimetics, and healthy aging in Okinawa. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 1, p. 51-58, January 2013. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000019>

WILLIAMS, K. N.; KEMPER, S. Interventions to Reduce Cognitive Decline in Aging. **Journal Psychosocial Nursing and Mental Health Services**, v. 48, n. 5, p. 42-51, May 2010. <https://doi.org/10.3928/02793695-20100331-03>

WILMOTH, J. R. Demography of longevity: past, present, and future trends. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 9-10, p. 1111-1129, December 2000. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00194-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00194-7)

XU, P.; WANG, K.; LU, C.; DONG, L.; GAO, L.; YAN, M.; AIBAI, S.; YANG, Y.; LIU, X. Protective effects of linalool against amyloid beta-induced cognitive deficits and damages in mice. **Life Sciences**, v. 174, p. 21–27, April 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.010>

YANKNER, B. A.; LU, T.; LOERCH, P. The aging brain. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 41–66, February 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044>