

SARA CRISTIANE BARAUNA

**EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E ANTIOXIDANTE DE *Eugenia
catharinensis* EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO
CRÔNICA DE CORTICOSTERONA**

**JOINVILLE
2020**

SARA CRISTIANE BARAUNA

EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E ANTIOXIDANTE DE *Eugenia catharinensis* EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Dr^a. Daniela Delwing de Lima. Coorientadora: Dr^a. Débora Delwing Dal Magro.

JOINVILLE

2020

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

B227e Barauna, Sara Cristiane
Efeito tipo-antidepressivo e antioxidante de *Eugenia catharinensis* em camundongos submetidos à administração crônica de corticosterona / Sara Cristiane Barauna; orientador Dr. Daniela Delwig de Lima; coorientador Débora Dalvig Dal Magro. – Joinville: UNIVILLE, 2020.

72 p.: il.

Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. *Eugenia catharinensis*. 2. Ácidos cumáricos. 3. Depressão mental. 4. Stress oxidativo. 5. Córtex cerebral. I. Lima, Daniela Delwig de (orient.). II. Dal Magro, Débora Dalvig (coorient.). III. Título.

CDD 616.8527

Termo de Aprovação

“Efeito Tipo-Antidepressivo e Antioxidante de *Eugenia catharinensis* em Camundongos submetidos à Administração Crônica de Corticosterona”

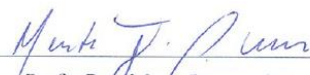
por

Sara Cristiane Barauna

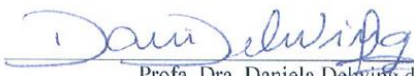
Tese julgada para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

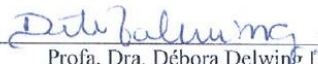

Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Débora Delwing Dal Magro
Coorientadora (FURB)


Prof. Dra. Marta Jussara Cremer
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Débora Delwing Dal Magro
Coorientadora (FURB)



Documento assinado digitalmente
Ana Lucia Severo Rodrigues
Data: 03/09/2020 19:05:37-0300
CPF: 421.020.730-68

Prof. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues
(UFSC)


Prof. Dra. Ana Lúcia Bertarello Zeni
(FURB)


Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
(UNIVILLE)

Joinville, 21 de agosto de 2020

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos antioxidante e tipo-antidepressivo da *Eugenia catharinensis* e do ácido *p*-cumárico em um modelo animal de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona (CORT). Após a coleta das folhas da *E. catharinensis*, foi realizado o preparo dos extratos e a identificação dos compostos por HPLC-ESI-MS/MS. Camundongos receberam CORT (20 mg/kg, s.c.) ou salina durante 21 dias e nos últimos 7 dias foram tratados, via oral, com os extratos hidroalcolico (EHA), acetato de etila (EAE) ou diclorometano (EDM) (50, 125, 200 ou 250 mg/kg) ou o ácido *p*-cumárico (5, 10 ou 20 mg/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg) ou água destilada. Após 24 horas do último tratamento os animais foram submetidos aos testes comportamentais e então sacrificados. O córtex e hipocampo foram removidos para análise dos parâmetros moleculares, morfológicos e de estresse oxidativo. Os resultados mostram que a CORT induz um comportamento do tipo-depressivo no teste do nado forçado, ao mesmo tempo que altera a atividade das enzimas CAT, SOD e GSH-Px e diminui a densidade de neurônios no hipocampo, sem alterar a expressão de BDNF, CREB e Bcl-2. Os extratos de *E. catharinensis* apresentam um efeito tipo-antidepressivo, o qual está relacionado com a regulação da atividade das enzimas antioxidantes. Já o ácido *p*-cumárico apresenta um efeito tipo-antidepressivo o qual parece ser dependente do envolvimento do sistema de monoaminas, da regulação das enzimas antioxidantes no tecido nervoso, da densidade de neurônios e da expressão gênica de Bcl-2 no hipocampo, resultados que são comparáveis àqueles induzidos pelo tratamento com fluoxetina. Nos ensaios *in vitro*, os extratos provocaram uma diminuição na concentração do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o EAE apresentou maior poder de redução do ferro e inibição da peroxidação lipídica. Um total de 18 compostos fenólicos foram identificados nos extratos, sendo os ácidos gálico, salicílico e siríngico os de maior concentração. Nossos resultados indicam que a *E. catharinensis* possui atividade antioxidante e tipo-antidepressiva, a qual parece ser dependente dos compostos fenólicos presentes em seus extratos. Além disso, o ácido *p*-cumárico reverte as alterações causadas pelo estresse crônico induzido pela administração de CORT neste modelo animal, efeito que possivelmente é mediado por suas propriedades antioxidantes.

Palavras-chave: *Eugenia catharinensis*, depressão, ácido *p*-cumárico, estresse oxidativo, córtex cerebral, hipocampo.

ABSTRACT

This work aims to evaluate the antioxidant and antidepressant-like effects of *Eugenia catharinensis* and *p*-coumaric acid in an animal model of depression induced by chronic corticosterone (CORT) administration. After collecting *E. catharinensis* leaves, extracts were prepared and compounds were identified by HPLC-ESI-MS/MS. Mice received CORT (20mg/kg, s.c.) or saline for 21 days and in the last 7 days they were treated, orally, with hydroalcoholic (EHA), ethyl acetate (EAE) or dichloromethane (EDM) extracts (50, 125, 200 or 250 mg/kg) or *p*-coumaric acid (5, 10 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) or distilled water. 24 hours after the last treatment, the animals were submitted to behavioral tests and then sacrificed. The brain was removed for analysis of the molecular, morphological and oxidative stress parameters. Our results show that CORT induced a depressive-like behavior in the forced swim test, while it altered the activity of CAT, SOD and GSH-Px and decreased the density of neurons in the hippocampus, without altering BDNF, CREB and Bcl-2 expression. Meanwhile, *E. catharinensis* extracts presented an antidepressant-like effect, which is related to the regulation of antioxidant enzymes activity and seems to be dependent on the presence of phenolic compounds in these extracts. On the other hand, *p*-coumaric acid presented an antidepressant-like effect mediated by the monoaminergic system, by the regulation of antioxidant enzymes in nervous tissue, the density of neurons and the gene expression of Bcl-2 in the hippocampus, results that are comparable to those induced by treatment with fluoxetine. In *in vitro* tests, the extracts caused a decrease in the concentration of the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) and the EAE showed greater efficacy to reduce iron and inhibit lipid peroxidation. A total of 18 phenolic compounds were identified in the extracts, with the highest concentration of gallic, salicylic and syringic acids. Our results indicate that *E. catharinensis* has antioxidant and antidepressant-like activities. In addition, *p*-coumaric acid reverses the changes caused by chronic stress induced by the CORT administration in this animal model, an effect that is possibly mediated by its antioxidant properties.

Key words: *Eugenia catharinensis*, depression, *p*-coumaric acid, oxidative stress, cerebral cortex, hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio e a ação das enzimas antioxidantes.....	16
Figura 2 – Imagem ilustrativa de corte histológico do hipocampo.....	21
Figura 3 – Aspecto das Folhas (A), Tronco (B), Flores (C) e Frutos (D) da Espécie <i>Eugenia catharinensis</i>	26
Figura 4 – Compostos Fenólicos.....	28
Figura 5 – Estrutura química do ácido <i>p</i> -cumárico.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento dos extratos EHA, EAE e EDM da espécie <i>Eugenia catharinensis</i>	33
Tabela 2 - Grupos experimentais tratados com EHA, EAE e EDM de <i>Eugenia catharinensis</i>	37
Tabela 3 –Grupos experimentais tratados com o ácido <i>p</i> -cumárico.....	39
Tabela 4 –Grupos experimentais tratados com o ácido <i>p</i> -cumárico e antagonistas específicos.....	40
Tabela 5 – Iniciadores utilizados na reação de PCR.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-ethylobenzthioazoline-6-sulfonic acid)

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ADT's – Antidepressivos tricíclicos

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

Bcl-2 – Linfoma de células B2

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BHT – Butil-hidroxi-tolueno

CA – *Cornu Ammonis*

CAT – Catalase

cDNA – DNA complementar

CORT – Corticosterona

CREB – Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

CTF – Conteúdo total de fenóis

CTFI – Conteúdo total de flavonoides

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DTNB – Ácido ditionitrobenzóico

EAE – Extrato acetato de etila

EDM – Extrato diclorometano

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EHA – Extrato hidroalcoólico

ERK – Proteína quinase regulada por sinal extracelular

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GD – Giro denteado

GR – Receptores glicocorticoides

GSH – Glutathiona reduzida

GSH-Px – Glutathiona Peroxidase

GSSG – Glutathiona oxidada

HHA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

IDO – Indoleamina-2,3-dioxigenase

i.p. – intraperitoneal

MAO – Inibidores de monoamino oxidase

ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

K⁺ – Potássio

LPS – Lipopolissacarídeos

MAO – Monoamino oxidase

MAPK – Proteína ativada por mitogênico neurotrófico

MDA – Malondialdeído

MR – Receptores mineralocorticoides

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PCPA – *p*-clorofenilalanina

PCR – do inglês, “Polymerase chain reaction quantitative real time”; reação em cadeia da polimerase

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

rsk – Proteína ribossomal S6 quinase

s.c. – subcutânea

SOD – Superóxido dismutase

SUS – Sistema único de saúde

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – Teste do Campo Aberto

TNB – Ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico

TNF – Teste do Nado Forçado

trkB – Receptor tirosina quinase

TSC – Teste da Suspensão pela Cauda

ZSG – Zona subgranular

ZSV – Zona subventricular

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Depressão.....	12
3.2 Antidepressivos.....	14
3.3 Estresse Oxidativo, Defesas Antioxidantes e Depressão.....	15
3.4 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e Depressão.....	18
3.5 Córtex Pré-Frontal, Hipocampo e Neurogênese.....	20
3.6 Neuroplasticidade.....	22
3.7 Plantas Medicinais e o Uso de Fitoterápicos.....	24
3.8 <i>Eugenia catharinensis</i>	26
3.9 Compostos Fenólicos e seu Potencial Antioxidante e Neuroprotetor.....	27
3.10 Ácido <i>p</i> -cumárico.....	29
4 INTERDISCIPLINARIDADE	32
5 MÉTODOS.....	33
5.1 Preparação dos extratos de <i>Eugenia catharinensis</i>	33
5.1.1 Obtenção do material vegetal.....	33
5.1.2 Obtenção dos extratos brutos.....	33
5.1.3 Prospeção Fitoquímica do EAE.....	34
5.1.3.1 Análise Fitoquímica Preliminar do EAE.....	34
5.1.3.2 Determinação do Conteúdo Total de Fenóis (CTF).....	34
5.1.3.3 Determinação do Conteúdo Total de Flavonoide (CTFI).....	35
5.1.3.4 Determinação dos Compostos Fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS.....	35

5.2 Animais e tratamento.....	36
5.2.1 Atividade dos EHA, EAE e EDM de <i>Eugenia catharinensis</i>	36
5.2.2 Atividade do Ácido <i>p</i> -cumárico.....	38
5.2.2.1 Envolvimento do Sistema de Monoaminas.....	39
5.3 Testes Comportamentais.....	41
5.3.1 Teste do Nado Forçado (TNF).....	41
5.3.2 Atividade Locomotora no Campo Aberto (TCA).....	41
5.3.3 Teste do <i>Splash</i>	41
5.4 Análise dos Parâmetros de Estresse Oxidativo <i>in vivo</i>.....	42
5.4.1 Preparação do tecido.....	42
5.4.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS).....	42
5.4.3 Conteúdo Total de Sulfidrilas.....	43
5.4.4 Catalase (CAT).....	43
5.4.5 Glutathione peroxidase (GSH-Px).....	43
5.4.6 Superóxido dismutase (SOD).....	44
5.4.7 Dosagem de proteínas.....	44
5.5 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....	44
5.5.1 Ensaio DPPH.....	44
5.5.2 Determinação do Poder Redutor do Ferro (III).....	45
5.5.3 Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando o Modelo de Linoleato de β -caroteno.....	45
5.6 Análise Morfológica.....	46
5.7 Verificação da Expressão de BDNF, CREB e Bcl-2.....	47
5.7.1 Extração de RNA.....	47
5.7.2 Obtenção do cDNA.....	47
5.7.3 Iniciadores Utilizados.....	47
5.7.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR).....	48
5.8 Análise Estatística.....	48
 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 49
6.1 Artigo Científico 1 - Antioxidant and antidepressant-like effects of <i>Eugenia catharinensis</i> D. Legrand in an animal model of depression induced by corticosterone.....	49

6.2 Artigo Científico 2 – <i>Eugenia catharinensis</i> D. Legrand exerts antioxidant effect on the hippocampus and cerebral cortex of corticosterone chronically treated mice...	49
6.3 Artigo Científico 3 – Antidepressant-like effect from <i>p</i>-coumaric acid in an animal model of depression induced by corticosterone.....	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8 REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO 1.....	69
ANEXO 2.....	72
ANEXO 3.....	83
ANEXO 4.....	106

1 INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno de humor caracterizado por tristeza profunda, difusa e duradoura. Assume um padrão diferente em cada paciente por se tratar de um transtorno com bases culturais, genéticas e experiências emocionais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030 será o transtorno mental mais comum do mundo, atingindo mais pessoas do que doenças como o câncer. Na América Latina, o Brasil lidera o ranking de casos de depressão, atingindo cerca de 6% da população do país. Além disso, a depressão é um problema de saúde pública, já que no Brasil os transtornos psiquiátricos representaram 33,5% dos casos de afastamento do trabalho entre 2000 e 2005, sendo em 2008 a terceira causa de auxílio-doença concedido pelo Ministério da Previdência Social. Isso teve um custo total de 669 milhões de reais para os cofres públicos (OMS, 2016).

Ainda não se sabe ao certo a fisiopatologia da depressão. Há evidências que indicam uma desregulação mitocondrial e do sistema imune, o que acaba levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo resultar em estresse oxidativo (BAKUNINA *et al.*, 2015; NG *et al.*, 2008). As ERO podem causar alteração da atividade enzimática, peroxidação lipídica e modificações mitocondriais (HALLIWELL, 1999). Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px) promovem a conversão de ERO em moléculas menos tóxicas para as células (WINTERBOURN, 1993). A atividade da SOD, CAT e GSH-Px aparecem alteradas em casos de depressão, podendo contribuir para disfunções dos sistemas de monoaminas (NG *et al.*, 2008).

Do ponto de vista biológico, acredita-se que, em quadros de depressão, ocorre uma diminuição das monoaminas endógenas – serotonina, noradrenalina e dopamina. Logo, a maioria dos antidepressivos atua nos neurotransmissores e seus receptores (FUCHS; WANNMASHER; FERREIRA, 2010). Alguns antidepressivos regulam, indiretamente, fatores envolvidos na sobrevivência celular, como a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), o linfoma de células B2 (Bcl-2) e o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001).

Os primeiros antidepressivos que surgiram na década de 50 foram os tricíclicos (ADT's) e os inibidores de monoamino oxidases (iMAO). Na década de 80 foi aprovado o uso de fármacos de segunda geração, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Esses medicamentos inibem a recaptação de serotonina no terminal nervoso pré-sináptico, potencializando a sua ação. A fluoxetina faz parte desse grupo e desde então tem sido o antidepressivo mais prescrito no mundo todo (ROSSI *et al.*, 2004). Atualmente, existem diversos fármacos para o tratamento da depressão, porém, cerca de 33% dos pacientes tratados não respondem satisfatoriamente a estes tratamentos (AMMENDOLA; KORNREICH, 2015). Sendo assim, novos estudos devem ser realizados para o desenvolvimento de fármacos mais efetivos para o tratamento da depressão.

Muitas substâncias utilizadas para o tratamento de transtornos psiquiátricos têm sido isoladas de plantas, demonstrando uma variedade de efeitos farmacológicos de diferentes espécies em modelos animais (ZHANG, 2004). A Erva de São João, cuja substância ativa é a hiperforina, por exemplo, vem sendo amplamente utilizada para o tratamento da depressão (RANG *et al.*, 2016). O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo e as plantas são matérias-primas importantes de produtos naturais biologicamente ativos (DUTRA *et al.*, 2016). Essa característica dos compostos naturais causa muito interesse por parte dos pesquisadores que buscam na natureza novas substâncias para produção de medicamentos.

A *Eugenia catharinensis*, uma arvoreta perenifólia, pertencente à família Myrtaceae, é encontrada amplamente no estado de Santa Catarina e é popularmente chamada de Guamirim (BACKES; IRGANG, 2002). Plantas do gênero *Eugenia* têm sido utilizadas pela população para fins terapêuticos como diurético, hipoglicemiante, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, entre outros (FISCHER *et al.*, 2005; ZAKI *et al.*, 2013).

Diversas espécies da família Myrtaceae são utilizadas popularmente, como a *Eugenia uniflora* que tem finalidade antirreumática, antidiabética, antifebrífuga, adstringente, analgésica, hipoglicemiante, diurética e reguladora do sistema digestório (SAHA *et al.*, 2013). As atividades antimicrobiana, antiviral, hipoglicemiante, antioxidante, anticancerígena, antinociceptiva e antidepressiva de *Eugenia jambolana*, *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia caryophyllata*, todas pertencentes à família Myrtaceae, têm sido comprovadas cientificamente (COLLA *et al.*, 2012; SAHA *et al.*,

2013). Ogunwande *et al.* (2005) demonstraram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia uniflora* promove diminuição da atividade da enzima xantina oxidase (envolvida no desenvolvimento da gota e artrite reumatoide), além de apresentar atividade antibacteriana, antimalárica (MORIOKA *et al.*, 2000) e promover diminuição dos níveis de triglicerídeos sanguíneos (CONSOLINI, 1999). O extrato etanólico da *Eugenia uniflora* parece ter alta atividade contra o *Trypanossoma cruzi* (SANTOS *et al.*, 2012). A presença de compostos fenólicos nesta espécie parece ser o principal responsável pela sua atividade antioxidante (GARMUS *et al.*, 2014). Estes compostos também estão presentes em grande quantidade na espécie *Eugenia stipitata*, a qual possui um elevado efeito antioxidante (NERI-NUMA *et al.*, 2013), bem como a *Eugenia pollicina* (RAMFUL *et al.*, 2011). Colla *et al.* (2012) avaliaram o efeito antidepressivo do extrato hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis*, o qual parece ser mediado pelos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico.

Tendo em vista o crescente uso de antidepressivos em todo o mundo, a gama de efeitos farmacológicos das espécies da família Myrtaceae, além da evidente ação antioxidante e antidepressiva dos compostos já estudados desta família, como os flavonoides e compostos fenólicos, é de extrema importância pesquisar um possível efeito antidepressivo e antioxidante de outras espécies de Myrtaceae ainda não estudadas, como a *Eugenia catharinensis*. Além disto, identificar e isolar possíveis compostos desta espécie amplamente distribuída no estado de Santa Catarina, a fim de verificar qual deles está associado com a ação farmacológica da planta e futuramente poder contribuir com ensaios pré-clínicos e clínicos da depressão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos tipo-antidepressivo e antioxidante de *Eugenia catharinensis* e de um composto identificado nesta espécie, o ácido *p*-cumárico, em um modelo animal de depressão.

2.2 Objetivos Específicos

-Investigar o efeito tipo-antidepressivo dos extratos hidroalcoólico, acetato de etila e diclorometano de *Eugenia catharinensis*, bem como do ácido *p*-cumárico, em testes comportamentais em camundongos.

-Analisar o envolvimento do sistema de monoaminas no efeito tipo-antidepressivo do ácido *p*-cumárico através da administração de antagonistas específicos.

-Identificar os compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólico, acetato de etila e diclorometano de *Eugenia catharinensis*.

-Confirmar a indução de estresse oxidativo através de alterações na atividade de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase), formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e conteúdo total de sulfidrilas em estruturas cerebrais (córtex cerebral e hipocampo) de camundongos que apresentam um comportamento tipo-depressivo induzido por corticosterona.

-Verificar a influência da administração dos extratos hidroalcoólico, acetato de etila e diclorometano de *Eugenia catharinensis* e do ácido *p*-cumárico sobre os efeitos causados pela corticosterona nos níveis de TBA-RS e conteúdo total de sulfidrilas, bem como na atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em estruturas cerebrais de camundongos.

-Analisar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos acetato de etila, hidroalcoólico e diclorometano de *Eugenia catharinensis*.

-Pesquisar os efeitos do ácido *p*-cumárico na densidade neuronal em regiões do hipocampo através de técnicas morfológicas.

-Investigar a participação do ácido *p*-cumárico na modulação da expressão de BDNF, CREB e Bcl-2 em camundongos que apresentam um comportamento tipo-depressivo induzido por corticosterona.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Depressão

A depressão é um transtorno neuropsiquiátrico grave, recorrente e altamente prevalente, caracterizado por tristeza profunda, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa autoestima, função cognitiva prejudicada e sintomas que prejudicam o sono e o apetite (NESTLER *et al.*, 2002; OTTE *et al.*, 2016). O distúrbio acarreta prejuízo ou perda considerável da produtividade no trabalho ou na escola, além de afetar quantitativamente a qualidade de vida dos acometidos. Na sua forma mais grave, a doença está relacionada a um alto índice de suicídio, que por si só, em 2015, foi responsável por aproximadamente 1,5% dos óbitos em âmbito mundial (NESTLER *et al.*, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A depressão, hoje, é a maior causa de invalidez no mundo, afetando mais de 320 milhões de pessoas, e o Brasil é o país com maior prevalência da doença na América Latina. A depressão acomete todas as idades e gêneros, entretanto, as mulheres são duas vezes mais afetadas pela doença do que os homens (OTTE *et al.*, 2016).

A fisiopatologia do distúrbio está associada a diversos fatores ambientais, genéticos e biológicos, mas ainda não se encontra totalmente elucidada. A teoria primordial responsável pela explicação dos mecanismos biológicos da depressão é definida pela desregulação dos sistemas monoaminérgicos, que inclui uma diminuição ou deficiência de neurotransmissores serotonina, dopamina e noradrenalina. Existem consideráveis evidências que apoiam a teoria das monoaminas, como a utilização de substâncias que inibem a síntese de serotonina e noradrenalina, as quais promovem a reversão dos efeitos dos medicamentos antidepressivos que atuam seletivamente nestes dois sistemas (RANG *et al.*, 2016). Diversos autores trazem revisões sobre o estado evolutivo das teorias, que apesar de ter sido um marco na história da psicofarmacologia, não pode deixar de ser levado em conta o fato de que os efeitos bioquímicos dos antidepressivos (inibição da recaptação das monoaminas ou inibição das enzimas que as degradam) sejam imediatos, enquanto os efeitos antidepressivos levam semanas para se desenvolver. Assim, a discrepância temporal existente entre os efeitos clínicos dos antidepressivos e o metabolismo de monoaminas indica que vários outros sistemas de neurotransmissores e mecanismos de transdução estejam

envolvidos (STAHL, 2000). Ademais, algumas evidências apontam que o aumento do estresse oxidativo devido a uma diminuição das defesas antioxidantes pode estar relacionado à depressão, uma vez que estudos relatam um aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo e déficit da atividade antioxidante em casos de depressão maior (KHANZODE *et al.*, 2003; BEHR *et al.*, 2012). Além disso, existe uma hipótese que prediz que os antidepressivos estimulam a produção e sinalização de proteínas relacionadas com plasticidade, como as neurotrofinas (CASTRÉN, 2004). Também conhecidas como fatores neurotróficos, as neurotrofinas são capazes de se ligar aos receptores de determinadas células estimulando sua sobrevivência, crescimento ou diferenciação. Dentre eles, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) promove a diferenciação e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento do sistema nervoso e participa de mecanismos relacionados à plasticidade neural e neurogênese no cérebro adulto (NOBLE *et al.*, 2011). Foi observado que o tratamento crônico com antidepressivos aumentou a expressão de BDNF e de seu receptor TrkB (Tyrosine-related kinase B Tropomyosin receptor kinase B) no hipocampo de ratos adultos e preveniu os efeitos deletérios do estresse de contenção sobre esses dois marcadores (NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995). Neste contexto, é interessante notar que o tratamento crônico com antidepressivos também regula a neurogênese adulta no hipocampo. Esses estudos evidenciam a importante relação entre os antidepressivos e a plasticidade neural.

Recentemente, uma nova teoria, a teoria da inflamação, tem sido descrita como uma possível causa da depressão. Uma hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) associada a uma disfunção do sistema imune levam a uma desregulação da atividade da via da quinurenina, comprometendo a conversão do triptofano em serotonina e melatonina, duas substâncias envolvidas na regulação do humor (KANCHANATAWAN *et al.*, 2017). Com base nesta teoria, fatores pró-inflamatórios causam uma excessiva ativação da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), a qual é encontrada em astrócitos, neurônios e micróglia. Esta enzima cataboliza o triptofano em quinurenina, uma substância neurotóxica. Neste contexto, a IDO reduz a quantidade de triptofano disponível para a síntese de serotonina, a qual está diretamente ligada à etiologia da depressão (ANDERSON, 2016).

3.2 Antidepressivos

Com a descoberta da iproniazida, um inibidor da monoamino oxidase (iMAO), surgiram os primeiros antidepressivos, na década de 1950. Inicialmente o fármaco foi desenvolvido para tratar tuberculose, mas foi observado que os pacientes que faziam uso da medicação apresentavam uma elevação prolongada do humor (SANDLER, 1990). O mecanismo de ação da iproniazida está relacionado à inibição da enzima monoamino oxidase (MAO), responsável por degradar as monoaminas endógenas (ZELLER, 1952). O auge dos antidepressivos iMAO teve a mesma rapidez que seu fim, quando uma nova geração de fármacos foi reportada em 1957 (LOPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009).

Durante uma tentativa de desenvolver um medicamento para tratamento da esquizofrenia, foram iniciados testes com a imipramina. Em seus ensaios clínicos, pacientes que também apresentavam depressão demonstraram uma melhora no humor. Logo, o sucesso da imipramina se espalhou e representou um grande passo para o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos para o tratamento da depressão: os antidepressivos tricíclicos (ADT's) (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009). Seu mecanismo de ação foi descoberto logo depois em estudos que observaram a inibição da recaptação de monoaminas na fenda sináptica, principalmente a noradrenalina e a serotonina. Essas evidências foram cruciais para postular a hipótese das monoaminas, a primeira teoria que buscou explicar a fisiopatologia da depressão (SCHILDKRAUT, 1965).

Apesar de eficazes, os iMAO e os ADT's possuem muitos efeitos colaterais indesejados, dentre os quais podemos citar os associados ao bloqueio muscarínico como boca seca, visão turva e retenção urinária; os cardiovasculares como aumento da frequência cardíaca e hemorragias subaracnóideas; os neurológicos como tremores nas mãos, sedação e estados confusionais; os metabólicos, as reações cutâneas, os gastrointestinais, síndrome da abstinência, entre outros (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Diferente dos iMAOs e dos ADT's, os quais tiveram seu efeito antidepressivo descoberto ocasionalmente, uma nova classe de fármacos foi desenhada especificamente para ser um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, agindo exatamente neste alvo e evitando assim os efeitos indesejados (LÓPEZ-MUÑOZ;

ÁLAMO, 2009). Surgiram então os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), sendo a fluoxetina o medicamento pioneiro que apresentou a maior seletividade (WONG, 1974). Seu uso foi aprovado na década de 80 e desde então tem sido o antidepressivo mais prescrito no mundo todo, comercializado com o nome de Prozac® (ROSSI; BARRACO; DONDA, 2004). Os ISRS inibem a recaptação de serotonina no terminal nervoso, potencializando a sua ação. A fluoxetina é indicada em casos de depressão maior leve e moderada por apresentar efeitos adversos mais brandos (FUCHS; WANNMASCHER; FERREIRA, 2010).

Tem se observado um aumento significativo da prescrição de medicamentos antidepressivos no mundo e esse aumento pode estar relacionado à sensação de instabilidade e crise econômica (SICRAS-MAINAR; NAVARRO-ARTIEDA, 2016). Segundo a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (2013), os dados recolhidos apontam que, frente às cerca de 30 prescrições em 2000, em 2011, último ano comparado, a média aumentou para 56 para cada mil habitantes. Islândia, Austrália e Canadá lideram a lista de países com consumo mais elevado. No Brasil, uma pesquisa realizada pela IMS Health (empresa responsável pela Auditoria no mercado de medicamentos para a ANVISA) demonstrou que a venda de medicamentos antidepressivos cresceu 44,8% de 2005 a 2009, demonstrando que o mercado brasileiro de antidepressivos cresce acima da média mundial (GUIMARÃES, 2009).

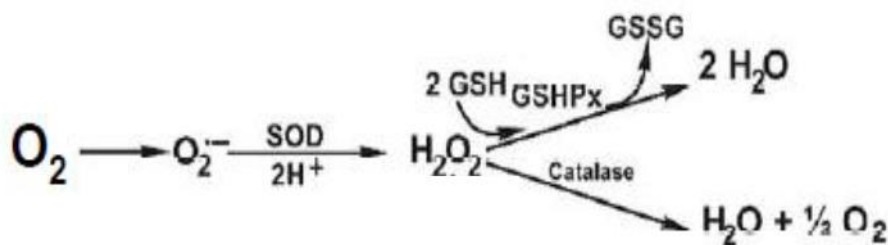
3.3 Estresse Oxidativo, Defesas Antioxidantes e Depressão

O estresse oxidativo se refere aos efeitos biológicos danosos dos radicais livres (VALKO *et al.*, 2007). A produção de radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), incluindo peroxinitrito, superóxidos, peróxidos e óxido nítrico (NO), é um processo fisiológico do metabolismo aeróbico. O metabolismo energético, responsável pela produção de adenosina trifosfato (ATP), tem papel fundamental no estresse oxidativo. O oxigênio (O₂) consumido pelo organismo é reduzido a água por meio da transferência de elétrons ao longo da cadeia mitocondrial, porém cerca de 5% desse oxigênio não é completamente reduzido devido ao “escape fisiológico” durante a produção de ATP. Desta maneira, ocorre a geração de ERO que possuem efeitos oxidantes e podem causar danos biológicos. O ânion superóxido (O₂⁻

), o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são as principais ERO formadas durante o estresse oxidativo. Em baixas concentrações, eles atuam na defesa do organismo contra agentes infecciosos, na regulação da síntese proteica e nos processos de sinalização celular (HALLIWELL, 2012). Entretanto, o excesso e acúmulo de ERO que ocorre no estresse oxidativo provoca diversos efeitos deletérios, principalmente danos oxidativos à lipídeos, proteínas e ao DNA. Desta forma, os fosfolipídios de membrana podem sofrer peroxidação lipídica, o que provoca alterações na fluidez e na seletividade iônica e até mesmo causar morte celular (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Fisiologicamente, o corpo humano possui defesas antioxidantes que são capazes de eliminar as espécies reativas, tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Conforme ilustrado na figura 1, a SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido, formando o H_2O_2 que posteriormente será neutralizado pela ação da CAT e da GSH-Px.

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio e a ação das enzimas antioxidantes



Fonte: Adaptado de HORST (2011).

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a quantidade de ERO e a capacidade de defesas antioxidantes (HALLIWELL, 2012). O sistema nervoso é mais vulnerável à formação de radicais livres, visto que consome uma alta taxa de oxigênio, possui uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, apresenta altos níveis de ferro e uma baixa capacidade antioxidante. Consequentemente o dano neuronal proveniente do estresse oxidativo é implicado na fisiopatologia da depressão (ZAFIR; BANU, 2009). Além disso, tem sido demonstrado que a depleção de serotonina e a administração de corticosterona (CORT) em modelo animal promovem o estresse oxidativo e que diversos antidepressivos como a

fluoxetina são capazes de reverter esse quadro (BEHR; MOREIRA; FREY, 2012; ZAFIR; BANU, 2009). Neste contexto, a depressão e o estresse emocional têm sido associados ao estresse oxidativo (KHANZODE *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que o aumento do estresse oxidativo desempenha um papel crucial na patogênese da depressão, sendo que ocorre uma elevação de ERO e da peroxidação lipídica em pacientes com este transtorno (ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2014; ANDERSON; MAES, 2014). As ERO podem causar danos a biomoléculas como o DNA, sendo que foi encontrado, em pacientes com depressão, uma elevação na quantidade de 8-oxoguanina no sangue, um marcador de dano ao DNA (LINDQVIST *et al.*, 2016).

Estudos realizados em populações com depressão demonstraram um aumento de ERO e ERN e diminuição das defesas antioxidantes (PALTA *et al.*, 2014), representado pelos baixos níveis plasmáticos das vitaminas C (KHANZODE *et al.*, 2003) e E (OWEN *et al.*, 2005), diminuição nos níveis de antioxidantes como o zinco, glutatona (GSH) e coenzima Q10 (MAES *et al.*, 2000), além de diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px (MAES *et al.*, 2011a). Foi encontrado, em modelos animais de depressão, uma redução dos marcadores de estresse oxidativo e aumento das defesas antioxidantes após tratamento com diferentes classes de antidepressivos (MAES *et al.*, 2011b).

Vários fatores parecem ser responsáveis por desencadear estresse oxidativo em indivíduos com depressão. Processos inflamatórios afetam a expressão de neurotransmissores envolvidos na patogênese da depressão como serotonina e noradrenalina (SPERNER-UNTERWEGER; KOHL; FUCHS, 2014). A ativação de macrófagos produz grande quantidade de ERO e ERN. Citocinas liberadas durante os processos inflamatórios ativam a produção de ERO em células epiteliais, neutrófilos, macrófagos e micróglia. Além disso, ocorre uma diminuição das defesas antioxidantes durante a inflamação (MAES *et al.*, 2012). Todos estes processos levam a disfunções da sinalização celular, mitocondrial, neurotransmissão, neuroplasticidade, proliferação, crescimento celular e apoptose, o que pode contribuir para a complexidade da patogênese da depressão (MOYLAN *et al.*, 2014).

A vulnerabilidade do cérebro e a associação entre alterações neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos sugerem que o dano provocado pelo estresse oxidativo pode estar implicado na patogênese da depressão, e a

suplementação com antioxidantes pode ser uma estratégia terapêutica para o tratamento da doença (BERK *et al.*, 2008).

3.4 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e Depressão

O estresse crônico tem sido apontado como um dos principais fatores ambientais que predispõem o desenvolvimento de quadros de depressão. Alterações no eixo HHA são observadas em 50 – 75% dos pacientes com este transtorno, levando a um aumento da concentração de glicocorticoides no plasma, urina e líquido cefalorraquidiano, além do aumento do volume das glândulas hipófise e adrenais (HANSSON *et al.*, 2015). Corticosteroides promovem um impacto fortemente negativo nas funções do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, regiões relacionadas com a depressão (STEWART *et al.*, 2013).

Em condições fisiológicas, a exposição a um agente estressante desencadeia uma reação adaptativa do organismo promovendo a ativação do eixo HHA. Através da estimulação do sistema límbico, neurônios do núcleo para-ventricular do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) que por sua vez estimula a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH é disponibilizado na circulação sanguínea e atua no córtex das glândulas adrenais, na qual estimula a produção e secreção de glicocorticoides, como o cortisol (BOSCH; SEIFRITZ; WETTER, 2012; INCOLLINGO RODRIGUEZ *et al.*, 2015; NESTLER *et al.*, 2002; SCHLOESSER; MARTINOWICH; MANJI, 2012). Nos tecidos, o cortisol interage com receptores mineralocorticoides (MR), que possuem alta afinidade pelo cortisol e regulam o ritmo circadiano e com receptores glicocorticoides (GR), que possuem menor afinidade pelo cortisol e são ativados em momentos de concentração elevada, sendo estes responsáveis pelo sistema de retroalimentação negativa do eixo HHA (ANACKER *et al.*, 2011). O cortisol eleva a glicemia, direcionando a energia para as funções vitais e essenciais a fim de combater o agente estressor. Os sistemas cardiovascular, respiratório, muscular e as funções cognitivas e comportamentais são priorizados enquanto a digestão, o crescimento, a reprodução e a percepção à dor são inibidas (FALKENSTEIN *et al.*, 2000). As situações de estresse produzem, portanto, um aumento geral da ativação do organismo, para que o indivíduo consiga reagir. Após a interrupção do estímulo estressante, ocorre a inibição via feedback

negativo mediada pela concentração de cortisol circulante, a fim de normalizar a hiperatividade do eixo HHA (PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). Neste sentido, a presença de diversos receptores GR no hipocampo sugere grande envolvimento do órgão na limitação da resposta ao estresse (ANACKER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012).

Apesar deste mecanismo restabelecer a homeostase, acredita-se que uma exposição prolongada ao estresse desregula o feedback negativo mediado pelo hipocampo, provocando uma elevação contínua de glicocorticoides e tornando os neurônios mais vulneráveis à agressões (GIGANTE *et al.*, 2011; SCHLOESSER; MARTINOWICH; MANJI, 2012). De fato, inúmeras evidências sugerem que a exposição ao estresse crônico causa diversas alterações no hipocampo como diminuição da arborização dendrítica e atrofia e diminuição da neurogênese (SNYDER *et al.*, 2011; LEBEDEVA *et al.*, 2018; MURRAY; SMITH; HUTSON, 2008). Em conjunto, esses eventos favorecem o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo a depressão. Tem sido demonstrado, em estudos comparativos utilizando ressonância magnética, que pacientes deprimidos apresentam perda do volume hipocampal, assim como elevação dos níveis basais de cortisol. Ainda, pesquisas *post mortem* em pacientes com depressão também demonstram atrofia ou diminuição do hipocampo e do córtex pré-frontal em paralelo com alterações no eixo HHA (ELBEJJANI *et al.*, 2015; FISCHER *et al.*, 2017; GEERLINGS; GERRITSEN, 2017; LEBEDEVA *et al.*, 2018; OTTE *et al.*, 2016).

Sendo assim, entre os modelos animais para o estudo da depressão destacam-se os referentes a indução ao estresse, os quais se fundamentam na hipótese neuroendócrina e no estresse como um fator de risco para o desenvolvimento da doença (CZÉH *et al.*, 2002). A administração crônica de CORT em camundongos é um modelo farmacológico que mimetiza as condições de estresse nos animais. Atuando como glicocorticoide sintético, a administração de doses elevadas de CORT por um longo período simula a disfunção do eixo HHA que ocorre em pacientes com depressão. Estudos destacam que a administração crônica de CORT aumenta o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão pela cauda (TSC), além da diminuição da autolimpeza em testes de anedonia, o que representa um comportamento preditivo tipo-depressivo (BARAUNA *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2008). Além disso, diversas alterações morfológicas,

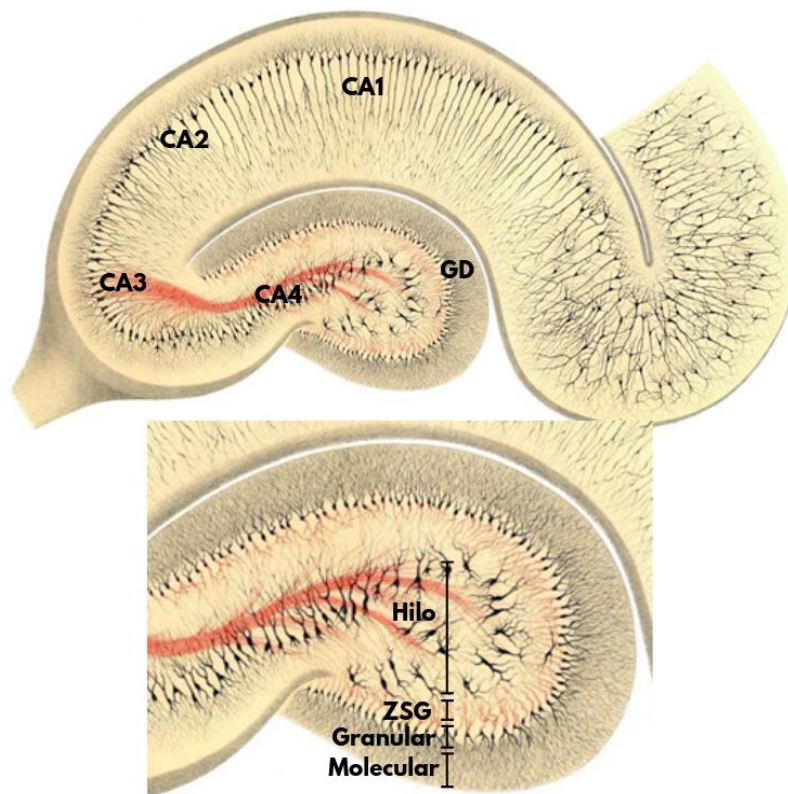
neuroquímicas e moleculares semelhantes às observadas em pacientes depressivos são descritas na literatura, como redução do volume do hipocampo e do córtex pré-frontal, diminuição das monoaminas endógenas, geração de estresse oxidativo, diminuição de fatores tróficos, redução da neurogênese, entre outros (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015; MURRAY; SMITH; HUTSON, 2008).

3.5 Córtex Pré-Frontal, Hipocampo e Neurogênese

Estudos de imagem têm demonstrado a ativação do córtex pré-frontal e do hipocampo em pacientes com depressão. O córtex pré-frontal tem sido relacionado principalmente com funções cognitivas como manutenção da memória de trabalho, raciocínio e controle da atenção (MILLER; COHEN, 2001). Porém, alguns estudos têm demonstrado o envolvimento desta região com as emoções, especificamente as emoções negativas (PHAN *et al.*, 2005; EIPPERT *et al.*, 2007). Apesar de ser tradicionalmente relacionado a eventos cognitivos como a memória, aprendizado e alterações do espaço e tempo (RIEDEL; MICHEAU, 2001), parte do hipocampo contribui com respostas emocionais e cognitivas que tem um papel fundamental em comportamentos motivacionais e afetivos (FANSELOW; DONG, 2010).

Como demonstrado na figura 2, o hipocampo é uma estrutura dividida em camadas, constituídas por dois principais tipos de células: células granulares do giro denteado (GD) e células piramidais do *Cornu Ammonis* (CA), sendo essa subdividida em quatro zonas denominadas CA1, CA2, CA3 e CA4. Já o GD pode ser histologicamente dividido em três subcamadas: molecular, granular e polimórfica. A camada granular é constituída por corpos celulares de neurônios granulares que projetam seus dendritos e axônios para a camada molecular enquanto a camada polimórfica, ou hilo, contém as fibras musgosas. Entre a camada granulosa e o hilo existe uma região chamada de zona subgranular (ZSG) que está diretamente relacionada à neurogênese (ANDERSEN, 2007).

Figura 2 – Imagem ilustrativa de corte histológico do hipocampo



Fonte: adaptado de Bentivoglio e Swanson (2001).

Por possuir diversos receptores GR que permitem a inibição do eixo HHA, o hipocampo limita a resposta ao estresse que é mediada fisiologicamente (ANACKER *et al.*, 2011; MCINTYRE; MCGAUGH; WILLIAMS, 2012; WANG *et al.*, 2012). A exposição ao estresse crônico causa alterações significativas no hipocampo, em modelos animais, desde diminuição da arborização dendrítica, diminuição da proliferação e até danos irreversíveis aos neurônios que são mediados pela administração crônica de CORT ou de outros glicocorticoides (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015; MURRAY; SMITH; HUTSON, 2008). A partir desses achados surge a teoria neurogênica da depressão, baseando-se na morte celular que ocorre no hipocampo, assim como na formação de novos neurônios no tratamento com antidepressivos, como importante fatores na fisiopatologia da doença.

Acreditava-se que o processo de formação de novos neurônios, conhecido como neurogênese, ocorria apenas durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos. Eriksson *et al.* (1998) foi o primeiro pesquisador a demonstrar que os humanos têm a capacidade de gerar novos neurônios ao longo da vida adulta. Dando continuidade a seus achados, estudos posteriores constataram que a neurogênese

ocorre na zona subventricular (ZSV) do ventrículo lateral e na ZSG do giro denteado do hipocampo (ZHAO; DENG; GAGE, 2008). A neurogênese é um processo ativo regulado por diversos fatores fisiológicos que englobam a proliferação de células-tronco neurais adultas, diferenciação, migração e maturação (SCHLOESSER; MARTINOWICH; MANJI, 2012; ZHAO; DENG; GAGE, 2008). As células originadas na ZSG migram para a camada de células granulares do GD e integram-se com o circuito neuronal, enquanto as células que originam-se na ZSV migram através do fluxo migratório rostral e se tornam interneurônios (ZHAO; DENG; GAGE, 2008).

Diversos processos patológicos como convulsões, danos isquêmicos e doenças neurodegenerativas são capazes de alterar a neurogênese no adulto. Além delas, a literatura demonstra que estressores crônicos variados são capazes de reduzir a proliferação celular na ZSG (DUMAN; NAKAGAWA; MALBERG, 2000). A elevação dos níveis de glicocorticoides é um dos principais mecanismos associados a essa redução, o que tem sido relacionado tanto as anormalidades cognitivas quanto a redução do volume do hipocampo observadas em pacientes com depressão (SNYDER *et al.*, 2011; MURRAY; SMITH; HUTSON, 2008). Estudos sugerem que o aumento da neurotoxicidade devido aos glicocorticoides e ao glutamato e a diminuição de fatores neurotróficos como o BDNF seriam responsáveis pela redução da neurogênese a nível hipocampal (ZHAO; DENG; GAGE, 2008).

3.6 Neuroplasticidade

A plasticidade neuronal é uma ferramenta que permite ao sistema nervoso responder e adaptar-se à desafios ambientais através de mecanismos funcionais e estruturais que podem levar à remodelação neuronal, à formação de novas sinapses e à diferenciação de novos neurônios (CALABRESE *et al.*, 2009). Muitos achados sugerem que a plasticidade pode ser essencial para função normal e para a sobrevivência dos neurônios e células da glia (DUMAN *et al.*, 2000). Por isso, um dano a esse mecanismo pode tornar o cérebro mais vulnerável e aumentar a susceptibilidade a desafios ambientais como o estresse (CALABRESE *et al.*, 2009). Desta forma, foi observado que a depressão pode ser mais suscetível em pacientes que exibem uma incapacidade de lidar ou se adaptar ao meio ambiente e que são mais vulneráveis a experiências desafiadoras. Essas anormalidades estão

intimamente ligadas à plasticidade neuronal e à capacidade de modular uma cascata de eventos de mecanismos de sinalização intracelular à expressão gênica.

De fato, o cérebro de indivíduos deprimidos apresenta anormalidades estruturais e expressão reduzida de vários marcadores para a função e viabilidade neuronal, dentre os quais os fatores neurotróficos parecem desempenhar um papel fundamental (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001). O BDNF é um dos fatores neurotróficos responsável pelo nascimento, sobrevivência e maturação das células durante o desenvolvimento (ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009), mas que também desempenha um papel importante na plasticidade neuronal e sináptica durante a vida adulta podendo induzir alterações na liberação de neurotransmissores, regular a síntese proteica, ativar a transcrição e modular a plasticidade estrutural de dendritos (LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017). O BDNF estimula a transcrição de diversos genes, como o Bcl-2, o transportador de serotonina e triptofano hidroxilase (enzima sintetizadora de serotonina). Ainda, a ativação de receptores de serotonina pelo neurotransmissor liberado a partir dos núcleos da rafe estimula a expressão do gene do BDNF (MARTINOWICH; LU, 2008).

A influência dos fatores neurotróficos na sobrevivência celular é mediada pela ativação da cascata de sinalização da proteína ativada por mitogênico neurotrófico (MAPK). Quando o BDNF se liga ao seu receptor tirosina quinase (trkB), sofre dimerização e autofosforilação, ativando a cascata MAPK. Este evento é seguido pela estimulação de diversas proteínas, como a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A ERK ativa a proteína ribossomal S6 quinase (rsk), que migra para o núcleo celular, onde causa a fosforilação da proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB). A CREB está diretamente associada a transcrição de diversos genes, regulando a expressão de BDNF e do linfoma de células B2 (Bcl-2) que atua como fator anti-apoptótico através da inibição da liberação do citocromo C em mitocôndrias (DUMAN *et al.*, 2000).

Alguns estudos clínicos relatam a associação dos baixos níveis de BDNF em pacientes com depressão, além de demonstrar que os antidepressivos são capazes de normalizá-los (MATRISCIANO *et al.*, 2009). Ainda, modelos animais demonstram que os fatores e proteínas relacionadas a plasticidade neuronal, como o BDNF, a CREB e a ERK estão diminuídos em animais que apresentam um comportamento tipo-depressivo (ALFONSO *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; YI *et al.*, 2013). Estudos

corroboram o fato de que a CORT é capaz de diminuir a expressão de BDNF, ERK e CREB no hipocampo ou no córtex pré-frontal dos animais tratados com o glicocorticoide (SHEN *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2016). Assim, ocorre redução da neurogênese, diminuição da formação dendrítica e o aumento da vulnerabilidade celular, mimetizando uma das hipóteses da fisiopatologia da depressão.

3.7 Plantas Medicinais e o Uso de Fitoterápicos

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, estimada em 20% do número total de espécies do planeta (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008). As plantas são matérias-primas importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais fazem parte da constituição de um fármaco (DUTRA *et al.*, 2016). Esse produto biologicamente ativo é o que chamamos de princípio ativo, constituído de uma substância presente na planta ou de complexos fitoterápicos que atuam sinergicamente (LORENZI; MATOS, 2002). Devido a isso e a grande tradição brasileira de uso de medicamentos naturais, o interesse pelo estudo de plantas medicinais por pesquisadores brasileiros e indústrias farmacêuticas vem crescendo ao longo dos anos (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

É estimado que cerca de 30% dos medicamentos utilizados na clínica sejam derivados de produtos naturais, principalmente pela aplicação da tecnologia moderna ao conhecimento tradicional (CLARDY; WALSH, 2004). Comparado com os medicamentos sintéticos, os produtos naturais exibem certas diferenças: seus princípios ativos são geralmente desconhecidos, seu controle de qualidade não é fácil, a avaliação e a qualidade da matéria-prima muitas vezes são problemáticas, estudos clínicos e toxicológicos controlados são raros, seu uso empírico pela medicina popular é uma característica importante, possuem uma vasta gama terapêutica, seus efeitos colaterais são geralmente menores e geralmente custam menos que produtos sintéticos (CALIXTO, 2000).

Segundo a OMS, cerca de 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento depende de produtos naturais como fonte de atenção primária à saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011), sendo as plantas medicinais consideradas como importantes instrumentos da assistência farmacêutica. De forma semelhante, cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas

medicinais nos seus cuidados com a saúde, sendo por influência cultural, uso popular ou em busca de medicina alternativa (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

Com base neste conceito, o Ministério da Saúde, visando diminuir o número de pessoas excluídas do atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e a preservação da cultura, criou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como princípios orientadores a ampliação de opções terapêuticas, uso sustentável da biodiversidade brasileira, valorização e preservação do conhecimento tradicional, entre outros (BRASIL, 2009). Esse programa vai ao encontro de uma grande parte da população que utiliza plantas medicinais em vez de medicamentos alopáticos. Em um estudo de 2008, a Veiga Junior realizou uma pesquisa em cidades no interior do Rio de Janeiro e verificou que 63% da população utiliza plantas medicinais como primeira forma de tratamento. Outro estudo realizado no interior do estado de Santa Catarina com pacientes diabéticos mostrou que dos entrevistados, 59,4% utilizavam plantas medicinais para tratamento da patologia. A utilização dessa forma de tratamento era feita na maioria dos casos por pacientes idosos. Porém, das 21 plantas citadas como fonte de tratamento, 81% delas não tinha relato científico hipoglicemiante (ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012). Observa-se a necessidade de maior conhecimento sobre as plantas medicinais tanto pelos pacientes como pelos profissionais da área da saúde para que possam auxiliar na sua administração.

Ao contrário dos medicamentos sintéticos que demandam muito investimento e correm altos riscos de serem barrados em etapas avançadas de ensaios clínicos, os fitoterápicos com comprovação científica de segurança demandam menos investimento, são mais baratos financeiramente e oferecem menos riscos para o investidor (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008). Um exemplo de planta medicinal que já foi estudada e tem comprovação científica de sua ação no tratamento da depressão é a *Hypericum perforatum*, popularmente conhecida como Erva de São João (GRUNDMANN *et al.*, 2010). A lavanda Inglesa, *Lavandula officinalis*, também tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso central como epilepsia e depressão (NIKFARJAM; RAKHSHAN; GHADERI, 2017). As plantas medicinais continuam sendo uma alternativa interessante para pacientes sem acesso a medicamentos sintéticos ou aqueles que buscam um tratamento alternativo ou complementar para a doença.

3.8 *Eugenia catharinensis*

Eugenia catharinensis D. Legrand (figura 3) é uma espécie rara da família Myrtaceae conhecida popularmente como “Guamirim-de-folha-miúda”, é um arbusto ou arvoreta de apenas 1-6 metros de altura, endêmica do litoral de Santa Catarina, nos municípios de Blumenau, Brusque, Campo Alegre, Florianópolis, Ibirama, Itajaí e Palhoça, também é possível sua ocorrência na costa Sul do Paraná, na região da Serra do Mar. As folhas são pequenas, tendo cerca de 3-6 cm de comprimento, são ovadas ou ovado-oblongas, com base muitas vezes larga e cordada. As folhas possuem coloração avermelhada enquanto são novas. O fruto desta espécie é oval, de aproximadamente 12 mm, e amadurece de setembro a janeiro (LEGRAND; KLEIN, 1969). O gênero *Eugenia* L. compreende cerca de 1000 espécies, sendo um dos maiores gêneros da família Myrtaceae (ZAKI *et al.*, 2013).

Figura 3 – Aspecto das Folhas (A), Tronco (B), Flores (C) e Frutos (D) da Espécie *Eugenia catharinensis*



Fonte: Compêndio Gerson L. Lopes (<https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/10299-2/>)

Diversas espécies da família Myrtaceae são utilizadas popularmente, como a *Eugenia uniflora* que tem finalidade antirreumática, antidiabética, antifebrífuga,

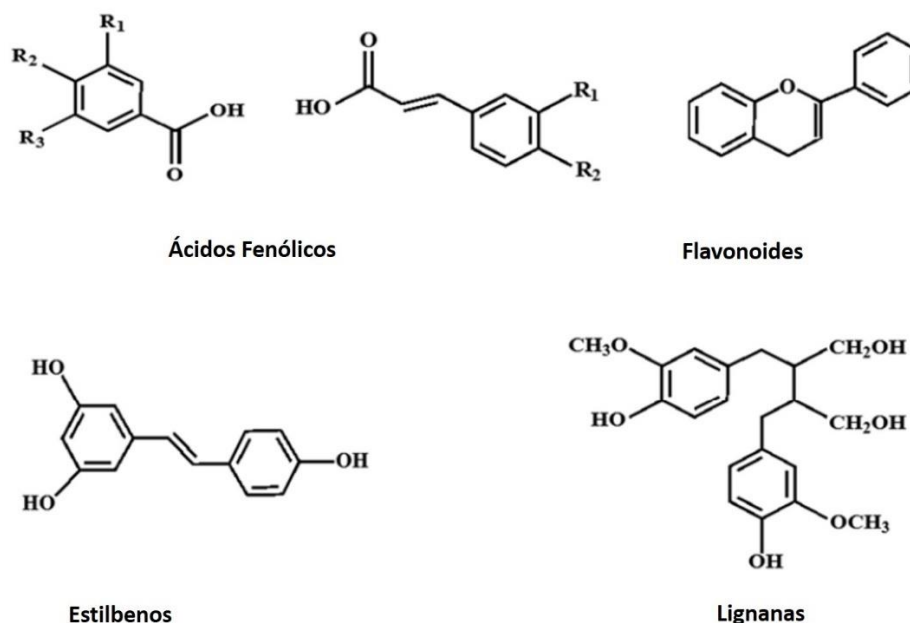
adstringente, analgésica, hipoglicemiante, diurética e reguladora do sistema digestório (SAHA *et al.*, 2013), além de ser utilizada pela população para tratamento de transtornos do humor, como a depressão (COLLA *et al.*, 2012). As atividades antimicrobiana, antiviral, hipoglicemiante, antioxidante, anticancerígena, antinoceptiva, antidepressiva e hipolipemiante de *Eugenia jambolana*, *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia caryophyllata*, todas pertencentes à família Myrtaceae, têm sido comprovadas cientificamente (COLLA *et al.*, 2012; SAHA *et al.*, 2013). Ogunwande *et al.* (2005) demonstraram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia uniflora* promove diminuição dos níveis da enzima xantina oxidase, a qual parece estar envolvida no desenvolvimento da gota e artrite reumatoide. Além de apresentar atividade antibacteriana, antimalárica (MORIOKA, 2000) e diminuição dos níveis de triglicerídeos sanguíneos (CONSOLINI, 1999). O extrato etanólico da *Eugenia uniflora* parece ter alta atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (SANTOS *et al.*, 2012). Victoria *et al.* (2013) demonstraram que o óleo essencial de *Eugenia uniflora* possui efeito tipo-antidepressivo no teste da suspensão pela cauda e atividade antioxidante *in vitro*. A presença de compostos fenólicos nesta espécie parece ser o principal responsável pela sua atividade antioxidante (GARMUS *et al.*, 2014). Estes compostos também estão presentes em grande quantidade na espécie *Eugenia stipitata*, a qual possui um elevado efeito antioxidante (NERI-NUMA *et al.*, 2013), bem como a *Eugenia pollicina* (RAMFUL *et al.*, 2011). Colla *et al.* (2012) avaliaram o efeito antidepressivo do extrato hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis*, o qual parece ser mediado pelos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico.

3.9 Compostos Fenólicos e seu Potencial Antioxidante e Neuroprotetor

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas encontrados amplamente em frutas, vegetais e cereais. Todos os mais de 8 mil tipos diferentes de compostos fenólicos já identificados originam-se de um intermediário em comum, a fenilalanina ou o seu precursor, o ácido chiquímico. Estão envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta e patógenos. O consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos está relacionado com um efeito protetor contra o desenvolvimento de tumores, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças neurodegenerativas (PANDEY; RIZVI, 2009).

Conforme ilustrado na figura 4, os compostos fenólicos podem ser classificados em diferentes grupos de acordo com o número de anéis fenólicos e com base nos elementos que unem os anéis entre si, sendo que as principais classes incluem os ácidos fenólicos, os flavonoides, os estilbenos e as lignanas. Os ácidos fenólicos representam cerca de um terço dos compostos fenólicos em nossa dieta e são encontrados em todo material vegetal, mas são particularmente abundantes em frutas com sabor ácido, sendo o ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico alguns ácidos fenólicos comuns. Os flavonóides são os compostos fenólicos mais abundantes na dieta humana e sua estrutura consiste em dois anéis aromáticos que são ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado. Os estilbenos contêm duas porções fenil conectadas por uma ponte de metocarboneto e metanol. A maioria dos estilbenos nas plantas atua como antifúngicos, sendo sintetizados apenas em resposta a infecção ou lesão. O estilbeno mais estudado é o resveratrol. As lignanas são compostos difenólicos que contêm uma estrutura de 2,3-dibenzilbutano formada pela dimerização de dois resíduos de ácido cinâmico (PANDEY; RIZVI, 2009).

Figura 4 – Compostos Fenólicos



Fonte: Adaptado de Pandey; Rizvi (2009).

Estudos têm demonstrado que uma dieta rica em compostos fenólicos diminui o risco de desenvolver alguns tipos de doenças crônicas (SCALBERT *et al.*, 2005;

ARTS; HOLLMAN, 2005), uma vez que alimentos ricos em compostos fenólicos podem aumentar a capacidade antioxidante das células. Os grupos fenólicos têm a capacidade de aceitar um elétron para formar radicais relativamente estáveis, interrompendo assim as reações de oxidação celulares (CLIFFORD, 2000). O consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos foi associado a uma redução nos danos oxidativos ao DNA, efeito semelhante ao observado pelos antioxidantes (VITRAC *et al.*, 2002). Os compostos fenólicos podem proteger os constituintes celulares do dano oxidativo e, portanto, limitam o risco do desenvolvimento de várias doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo (PANDEY; MISHRA; RIZVI, 2009).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar os efeitos neuroprotetores de diferentes compostos fenólicos. O ácido cafeico, por exemplo, exerce atividade antioxidante nas células neuronais *in vitro* e reverte a atividade da SOD induzida pela exposição pulmonar ao fosgênio (WANG *et al.*, 2013). Sakamula; Thong-asa (2018) demonstraram que o ácido *p*-cumárico exerce um efeito protetor durante a isquemia-reperfusão cerebral em camundongos. Sabe-se também que o ácido ferúlico atenua o estresse oxidativo promovido pelo tratamento com CORT no cérebro de ratos (ZENI; CAMARGO; DAL MAGRO, 2017). Estudos demonstraram que o ácido gálico pode aumentar a capacidade antioxidante cerebral (MANSOURI *et al.*, 2013; KORANI *et al.*, 2014) e nanopartículas de ácido gálico reduzem a inflamação e melhoram as defesas antioxidantes em um modelo de acidente vascular cerebral isquêmico (YONGMEI *et al.*, 2019). Haydari *et al.* (2019) demonstraram os efeitos antioxidantes do ácido salicílico em plantas estressadas pelo calor, sendo que a atividade das enzimas antioxidantes foi aumentada. O ácido siríngico apresenta efeitos neuroprotetores contra a neurotoxicidade e danos oxidativos em neurônios piramidais (OGUTA *et al.*, 2019).

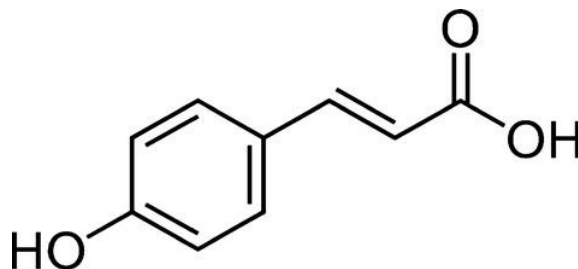
3.10 Ácido *p*-cumárico

O ácido *p*-cumárico é um composto fenólico derivado do ácido hidroxicinâmico, assim como os ácidos cafeico e ferúlico (SIMÕES, 2010). Está presente em diversas frutas, vegetais e cereais como maçã, tomate, laranja, feijão, batata, aveia e trigo (PEI *et al.*, 2016). Sintetizado biologicamente utilizando a fenilalanina e tirosina como

precursoras, ele é essencial no metabolismo secundário de plantas, visto que é capaz de ser transformado em outros ácidos fenólicos, como o ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido clorogênico e o ácido sináptico; além de flavonoides e ligninas (EL-SEEDI *et al.*, 2012).

Os ácidos fenólicos, como o *p*-cumárico, são formados por um anel aromático, um grupo carboxila e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila, que conferem uma marcante atividade antioxidante a esses compostos (ANGELO; JORGE, 2007). A estrutura do ácido *p*-cumárico, como demonstrado na figura 5, exhibe uma hidroxila na posição *para* ligada ao anel benzênico, além de dois carbonos que se conectam à carboxila na cadeia lateral (CH=CH-COOH). A disposição dos grupos funcionais, principalmente a posição na qual a hidroxila se encontra, favorece a estabilização e captação de espécies reativas fornecendo uma maior ação antioxidante aos compostos (SILVA *et al.*, 2010; VAROTTO, 2014).

Figura 5 – Estrutura química do ácido *p*-cumárico



Fonte: Boz (2015).

Alguns estudos evidenciam que o ácido *p*-cumárico é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e que apresenta baixa toxicidade em camundongos tornando-o promissor para ser administrado oralmente (KONISHI; HITOMI; YOSHIOKA, 2004; ZHAO; MOGHADASIAN, 2010).

De fato, o ácido *p*-cumárico destaca-se na literatura devido sua ação antioxidante, sendo capaz de eliminar radicais livres como 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthioazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) em estudos *in vitro* (MASEK; CHRZESCIJANSKA; LATOS, 2016; MATHEW; ABRAHAM; ZAKARIA, 2015). Além disso, o composto também exerce ação positiva em células. Bouzaiane *et al.* (2015) verificou que o ácido *p*-cumárico foi capaz de inibir

a produção de radicais livres em células cancerígenas de pulmão e cólon, impedindo a proliferação dos tumores. Da mesma forma, o composto previne danos hepáticos e renais induzidos pela cisplatina ao aumentar a atividade das enzimas antioxidantes e reduzir parâmetros oxidativos em ratos Wistar (AKDEMIR *et al.*, 2017). Ainda, há diversos relatos na literatura que demonstram outros efeitos do ácido, como atividade anti-inflamatória (ZHAO; LIU, 2016), antimicrobiana (ALVES *et al.*, 2013) antitumoral (SHARMA *et al.*, 2017), neuroprotetora em modelos de acidente vascular cerebral e diabetes (ABDEL-MONEIM *et al.*, 2017; GUVEN *et al.*, 2015), entre outros.

A atividade antidepressiva dos compostos derivados do ácido hidroxicinâmico, como o ácido cafeíco e o ácido ferúlico é bem estabelecida na literatura (LIU *et al.*, 2017). Já em relação ao ácido *p*-cumárico há apenas um relato. Lee *et al.* (2018) aponta que o ácido pode causar diminuição do tempo de imobilidade no TNF e no TSC, além de prevenir o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição de BDNF induzidos pela administração de lipopolissacarídeos (LPS). Dessa forma, a atividade antioxidante e anti-inflamatória do composto pode estar envolvida nos efeitos biológicos observados.

4 INTERDISCIPLINARIDADE

A depressão é um transtorno psiquiátrico multifatorial, dependente de influências sociais, genéticas e ambientais. A exposição a poluentes ambientais está relacionada, indiretamente, ao desenvolvimento de transtornos mentais. Estudos epidemiológicos têm demonstrado elevada incidência de depressão e suicídio em agricultores (SANNE *et al.*, 2003), sendo que o principal fator desencadeante parece ser a exposição destes indivíduos a agrotóxicos, principalmente os organofosforados (WESSELING *et al.*, 2010). Além disso, estas substâncias são capazes de aumentar a quantidade de radicais livres nas células, gerando estresse oxidativo.

A depressão é um problema de saúde pública, causando prejuízos não apenas para o paciente, mas para os familiares e o governo, uma vez que, no Brasil, os transtornos psíquicos representam cerca de 33,5% dos casos de afastamento do trabalho, levando a um alto custo para os cofres públicos. As pessoas afetadas acabam se isolando socialmente, gerando um grande sofrimento e ainda, em casos mais graves, a doença pode levar ao suicídio.

Em muitos casos, o meio ambiente pode contribuir positivamente no tratamento de transtornos depressivos. Muitos fármacos utilizados para o tratamento da depressão são provenientes de compostos isolados da natureza. Plantas medicinais, como a Erva de São João, têm sido utilizadas para o tratamento da depressão.

As plantas produzem uma diversidade de produtos secundários com alto poder antioxidante, como os ácidos fenólicos, os flavonoides, os taninos e as cumarinas. Estas substâncias provenientes do meio ambiente, têm sido amplamente estudadas no tratamento de doenças devido, por exemplo, ao seu potencial para reduzir o estresse oxidativo celular, a inflamação e melhorar as defesas imunológicas.

Nesse contexto, percebemos uma forte interrelação entre saúde e meio ambiente. Fatores ambientais causam danos celulares que podem levar a um quadro de depressão, a qual, por sua vez, desencadeia o estresse oxidativo. Porém, o próprio ambiente pode ser benéfico no combate à depressão, a inflamação e aos radicais livres devido à ação de compostos naturais presentes nas plantas.

5 MÉTODOS

5.1 Preparação dos Extratos de *Eugenia catharinensis*

5.1.1 Obtenção do Material Vegetal

Foram realizadas duas coletas das partes aéreas da espécie *Eugenia catharinensis*, as duas feitas no campus I da Universidade Regional de Blumenau (FURB) (26°54'18.2"S 49°04'44.5"W), a primeira em setembro de 2016 (na primavera) e a segunda em maio de 2017 (no outono), sob a supervisão dos botânicos André Luiz de Gasper e Marcos Sobral. A exsicata está catalogada no herbário Roberto Miguel Klein, da Universidade Regional de Blumenau sob o registro FURB 14995.

5.1.2 Obtenção dos Extrato Brutos

As folhas coletadas foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas. A amostra pulverizada foi macerada em três diferentes solventes de polaridade distinta: álcool etílico 70%, acetato de etila e diclorometano, para obtenção dos extratos brutos. O processo de maceração foi realizado durante três dias, procedendo-se então a filtração à vácuo e repetindo-se o procedimento mais uma vez. Os extratos resultantes das duas macerações foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida até completa secagem.

Depois do processo de maceração, filtração e secagem completa dos extratos hidroalcológico (EHA), acetato de etila (EAE) e diclorometano (EDM) foi possível calcular o rendimento utilizando a quantidade de material vegetal inicial (tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento dos extratos EHA, EAE e EDM da espécie *Eugenia catharinensis*.

Material	Folhas secas e trituradas (g)	Massa do extrato obtido (g)	% de rendimento
EHA	353,50	19,70	5,57
EAE	329,50	9,57	2,90
EDM	329,50	8,40	2,54

Fonte: Dados do Autor (2020)

5.1.3 Prospecção Fitoquímica do EAE

Os extratos brutos (EHA, EAE e EDM), após concentrados, foram encaminhados aos testes *in vitro* e *in vivo* da *Eugenia catharinensis* e testados. Uma vez que o EAE obteve resultados mais promissores, o mesmo foi fracionado para a busca de compostos ativos. A amostra foi submetida às técnicas de cromatografia em coluna, empregando como eluentes misturas de solventes de grau crescente de polaridade (geralmente misturas de hexano:acetato de etila e acetato de etila:etanol). Os compostos foram isolados da amostra através dos procedimentos descritos acima e suas estruturas determinadas através de técnicas espectroscópicas como infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

5.1.3.1 Análise Fitoquímica Preliminar dos Extratos

A análise fitoquímica preliminar foi utilizada para identificar as classes de compostos presentes nos extratos proveniente das folhas de *Eugenia catharinensis*. Sendo assim, foram realizados ensaios colorimétricos seguindo a metodologia descrita por Matos (2009). As classes de compostos pesquisadas foram fenóis, taninos, leucoantocianidinas, catequinas, flavanonas, flavonois, flavononois, xantonas, esteroides, triterpenos, saponinas, resinas, alcaloides, bases quaternárias, quinonas, antranois e cumarinas.

5.1.3.2 Determinação do Conteúdo Total de Fenóis (CTF)

O CTF foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu descrito por Anagnostopolou *et al.* (2006). Uma quantidade de 0,5 mL dos extratos foi testada na concentração de $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, na qual, foram adicionados 5,0 mL de água destilada, 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu e 1,0 mL da solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após 1 hora de repouso, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 725 nm. Como branco utilizou-se uma solução sem a presença da amostra, preparada conforme descrito acima. A concentração de fenóis totais foi estimada por interpolação com uma curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 15,62 até $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, diluídas em metanol. O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ($y = 0,0013x +$

0,0074, $R^2 = 0,9981$). O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em mg de ácido gálico por g de extrato (mgAG/g).

5.1.3.3 Determinação do Conteúdo Total de Flavonoide (CTFI)

O CTFI foi determinado pelo método do $AlCl_3$, conforme descrito por Woisky; Salatino (1998), com pequenas modificações. Uma alíquota de 0,5 ml da solução teste diluída em metanol ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi misturada com 0,5 ml de $AlCl_3$ diluído em metanol a 2%. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente a absorbância foi determinada em 415 nm comparado com o branco (metanol). Os resultados foram expressos como mg de quercetina/g de extrato seco (mg QE/g), usando uma curva padrão de quercetina determinada por regressão linear ($R^2 = 0,9967$): $Y = 0,0019X + 0,0698$.

5.1.3.4 Determinação dos Compostos Fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

A coluna analítica utilizada nesta análise foi C18 Phenomenex® (150 mm x 2 mm, 4 μm) e a temperatura da coluna ajustada em 30 °C. A fase móvel empregada foi composta pela mistura de solventes B (MeOH:H₂O na proporção de 95:5, v/v) e C (H₂O ultrapura/Ácido fórmico (0,1%)), como segue: 1º estágio – 10% de solvente B e 90% de C (modo isocrático) por 5 minutos; 2º estágio – gradiente linear dos solventes B e C (de 10 a 90% de B), por 7 minutos; 3º estágio – 9% de solvente B e 10% de C (modo isocrático), por 10 minutos, e 4º estágio – gradiente linear dos solventes B e C (de 90% a 10% de B) durante 17 minutos com taxa de fluxo de $250 \mu\text{L min}^{-1}$. Em todas as análises o volume injetado das amostras foi de 5 μL , a uma concentração de 300 ppm. Para a identificação dos compostos presentes nas frações, foram utilizados os padrões: (ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxicinâmico, 4-metil-umbeliferona, acacetina, ácido 4-hidroximetilbenzóico, ácido *p*-anísico, ácido cafeico, ácido carnósico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, ácido *o*-cumarico, ácido *m*-cumarico, ácido *p*-cumárico, ácido, rosmarínico, ácido salicílico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido vanílico, apigenina-7-*O*-glucosídeo, apigenina, apigenina-7-*O*-rutinosídeo, apiina, aromadendrina, ácido cafeico-*O*-hexosídeo, carnosol, catequina, crisina, circimaritina, coniferaldeído, cumarina, ácido dicafeoilquínico, epicatequina, epigallocatequina-galato, epirosmanol,

eriodictiol, escopoletina, fustina, galangina, galocatequina, ácido hidroxibenzóico-O-hexosídeo, hispidulina, isoquercetrina, isorhamnetina, isorhamnetina-3-O-hexosídeo, canferol, luteolina, luteolina-3-O-glucuronídeo, luteolina-7-O-glucosídeo, luteolina-7-O-rutinosídeo, medioresinol, metoxicarnosol, metil carnosato, miricetrina, naringenina, naringina, poridzina, pinocembrina, ácido protocatecuico, quercetina-3-O-hexosídeo, quercetina, resveratrol, rosmadial, rutina, sinapaldeido, siringaldeido, taxifolina, timol, umbeliferona, vanilina e vitexina), diluídos em metanol 1 mg L⁻¹ e analisados nas mesmas condições descritas acima descritas.

O cromatógrafo líquido foi acoplado a um espectrômetro de massas com Fonte de ionização por electrospray usando o modo negativo de ionização com os seguintes parâmetros da Fonte: interface íon-spray à 400 °C; voltagem íon-spray de 4.500V; *curtain gas*, 10psi; gás de nebulização, 45psi; gás auxiliar, 45psi; gás de colisão, médio. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para o registro e tratamento dos dados. Os pares de íons foram monitorados no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

5.2 Animais e Tratamento

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss com peso médio de 30-40 g e idade aproximada de 60 dias, provenientes do Biotério da Universidade Regional de Blumenau- FURB. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (41x34x16cm), à temperatura constante de 22°C com água e comida *ad libitum*, em ciclo claro/escuro 12:12h. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Regional de Blumenau sob números 107/16 e 027/17 (anexo).

5.2.1 Atividade dos EHA, EAE e EDM de *Eugenia catharinensis*

Os animais foram divididos aleatoriamente em 26 grupos de 8 animais cada, totalizando 208 animais: controle 1, controle 2, G1a, G1b, G1c, G2a, G2b, G2c, G3a, G3b, G3c, G4a, G4b, G4c, G5a, G5b, G5c, G6a, G6b, G6c, G7a, G7b, G7c, G8a, G8b e G8c. Os animais do grupo controle 1 foram tratados por 21 dias via subcutânea (s.c.) com salina e nos últimos 7 dias de tratamento foi administrado água destilada via oral.

Vinte e quatro horas depois do último tratamento os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Nos animais dos grupos Controle 2, G2a, G2b, G2c, G4a, G4b, G4c, G6a, G6b, G6c, G8a, G8b e G8c foi administrado por 21 dias CORT (Sigma-Aldrich®) (20 mg/kg) via s.c. (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e nos últimos sete dias de tratamento com CORT foi introduzido o tratamento via oral com água destilada (Controle 2) ou o EHA de *Eugenia catharinensis* nas doses de 50 mg/kg (G2a), 125 mg/kg (G4a), 200 mg/kg (G6a) ou 250 mg/kg (G8a) ou o EAE de *Eugenia catharinensis* nas doses de 50 mg/kg (G2b), 125 mg/kg (G4b), 200 mg/kg (G6b) ou 250 mg/kg (G8b) ou o EDM de *Eugenia catharinensis* nas doses de 50 mg/kg (G2c), 125 mg/kg (G4c), 200 mg/kg (G6c) ou 250 mg/kg (G8c). Vinte e quatro horas depois do último tratamento foram realizados os testes comportamentais. Os animais dos grupos G1a, G1b, G1c, G3a, G3b, G3c, G5a, G5b, G5c, G7a, G7b e G7c foram tratados com salina via s.c. por vinte e um dias consecutivos e nos últimos sete dias de tratamento com salina, foi introduzido o tratamento via oral com o EHA de *Eugenia catharinensis* nas doses de 50 mg/kg (G1a), 125 mg/kg (G3a), 200 mg/kg (G5a) ou 250 mg/kg (G7a) ou o EAE de *Eugenia catharinensis* nas doses de 50 mg/kg (G3b), 125 mg/kg (G5b), 200 mg/kg (G7b) ou 250 mg/kg (G9b) ou o EDM de *Eugenia catharinensis* nas doses de 50 mg/kg (G1c), 125 mg/kg (G3c), 200 mg/kg (G5c) ou 250 mg/kg (G7c). Vinte e quatro horas depois do último tratamento os animais foram submetidos aos testes comportamentais (tabela 2).

Ao fim dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e em seguida foi coletado o tecido nervoso (córtex cerebral e hipocampo) para realização dos parâmetros de estresse oxidativo.

Tabela 2 - Grupos experimentais tratados com EHA, EAE e EDM de *Eugenia catharinensis*.

Grupos	Tratamento
Controle 1	Salina (s.c.) + água destilada (via oral)
Controle 2	CORT 20 mg/kg (s.c.) + água destilada (via oral)
G1a	Salina (s.c.) + EHA 50 mg/kg (via oral)
G1b	Salina (s.c.) + EAE 50 mg/kg (via oral)
G1c	Salina (s.c.) + EDM 50 mg/kg (via oral)
G2a	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EHA 50 mg/kg (via oral)

G2b	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EAE 50 mg/kg (via oral)
G2c	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EDM 50 mg/kg (via oral)
G3a	Salina (s.c.) + EHA 125 mg/kg (via oral)
G3b	Salina (s.c.) + EAE 125 mg/kg (via oral)
G3c	Salina (s.c.) + EDM 125 mg/kg (via oral)
G4a	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EHA 125 mg/kg (via oral)
G4b	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EAE 125 mg/kg (via oral)
G4c	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EDM 125 mg/kg (via oral)
G5a	Salina (s.c.) + EHA 200 mg/kg (via oral)
G5b	Salina (s.c.) + EAE 200 mg/kg (via oral)
G5c	Salina (s.c.) + EDM 200 mg/kg (via oral)
G6a	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EHA 200 mg/kg (via oral)
G6b	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EAE 200 mg/kg (via oral)
G6c	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EDM 200 mg/kg (via oral)
G7a	Salina (s.c.) + EHA 250 mg/kg (via oral)
G7b	Salina (s.c.) + EAE 250 mg/kg (via oral)
G7c	Salina (s.c.) + EDM 250 mg/kg (via oral)
G8a	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EHA 250mg/kg (via oral)
G8b	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EAE 250 mg/kg (via oral)
G8c	CORT 20 mg/kg (s.c.) + EDM 250 mg/kg (via oral)

Fonte: Dados do Autor (2020)

5.2.2 Atividade do Ácido *p*-cumárico

Para verificar os possíveis efeitos do ácido *p*-cumárico, empregou-se um tratamento crônico através da administração de CORT (20mg/Kg, s.c.) com a finalidade de mimetizar um comportamento do tipo-depressivo nos camundongos tratados.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 10 grupos com 13 animais cada (tabela 3) e tratados via s.c. durante 21 dias com CORT (20mg/kg) ou salina no caso dos grupos controle. Durante os últimos 7 dias, além da administração de CORT, os camundongos foram tratados via oral com veículo, ácido *p*-cumárico (5, 10 ou 20mg/kg) ou fluoxetina (10mg/kg).

Tabela 3 – Grupos experimentais tratados com o ácido *p*-cumárico

Grupos	Tratamento
Controle 1	Veículo (s.c.) + Água destilada (via oral)
Controle 2	CORT (s.c.) + Água destilada (via oral)
G1	CORT (s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 5 mg/kg (via oral)
G2	CORT (s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 10 mg/kg (via oral)
G3	CORT (s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)
G4	CORT (s.c.) + Fluoxetina 10 mg/kg (via oral)
G5	Veículo (s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 5 mg/kg (via oral)
G6	Veículo (s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 10 mg/kg (via oral)
G7	Veículo (s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)
G8	Veículo (s.c.) + Fluoxetina 10 mg/kg (via oral)

Fonte: Dados do Autor (2020)

Os animais do grupo controle 1 foram tratados por vinte e um dias consecutivos via s.c. com veículo (salina) e nos últimos sete dias de tratamento receberam água destilada via oral. Enquanto isso, os animais dos grupos Controle 2, G1, G2, G3 e G4 foram submetidos ao tratamento com CORT na dose de 20mg/kg via s.c. durante os vinte e um dias consecutivos e nos últimos sete dias foram tratados via oral com água destilada (Controle 2), ou com ácido *p*-cumárico nas doses de 5 mg/kg (G1), 10 mg/kg (G2) ou 20 mg/kg (G3); ou fluoxetina na dose de 10 mg/kg (G4). Os animais dos grupos G5, G6, G7 e G8 foram submetidos a um tratamento crônico com veículo (salina) durante os vinte e um dias consecutivos via s.c. e nos últimos sete dias de tratamento com salina foi introduzido o tratamento com o ácido *p*-cumárico nas doses de 5 mg/kg (G5), 10 mg/kg (G6) ou 20 mg/kg (G7); ou fluoxetina na dose de 10 mg/kg (G8). Vinte e quatro horas após o último tratamento foi realizado o teste do campo aberto (TCA), o TNF e o teste do *splash*, respectivamente. Em seguida, foi feita a eutanásia dos animais e o hipocampo foi coletado para avaliação bioquímica, morfológica e molecular.

5.2.2.1 Envolvimento do Sistema de Monoaminas

Para verificar o envolvimento do sistema monoaminérgico no efeito tipo-antidepressivo do ácido *p*-cumárico 96 camundongos Swiss machos foram divididos

em 12 grupos experimentais (tabela 4) e tratados por 7 dias consecutivos com o ácido *p*-cumárico (10 mg/kg, via oral) ou veículo. No último dia de tratamento os animais receberam antagonistas de receptores específicos: WAY-100635 (0,3 mg/kg, via s.c., antagonista do receptor 5-HT_{1A}), SCH23390 (0,05 mg/kg, via s.c., antagonista do receptor D1), prazosina (1 mg/kg, via intraperitoneal – i.p., antagonista do receptor α 1), ioimbina (1 mg/kg, via i.p., antagonista do receptor α 2) ou veículo. Então, 30 minutos após o pré-tratamento com o antagonista específico, os camundongos receberam ácido *p*-cumárico ou veículo e 1 hora depois foram submetidos ao TNF. Um grupo recebeu *p*-clorofenilalanina (PCPA) (100 mg/kg, via i.p., um inibidor da síntese de serotonina) ou veículo por 4 dias consecutivos e após 24 horas os animais foram tratados com o ácido *p*-cumárico ou veículo e após 1 hora foi realizado o TNF. As doses e o protocolo foram realizados com base nos estudos de Gesser *et al.* (2015). Todos os fármacos foram obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA.

Tabela 4 – Grupos experimentais tratados com o ácido *p*-cumárico e antagonistas específicos

Grupos	Tratamento
Controle 1	Veículo (i.p.) + veículo (via oral)
Controle 2	Veículo (i.p.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)
G1	WAY-100635 (0,3 mg/kg, s.c.) + veículo (via oral)
G2	WAY-100635 (0,3 mg/kg, s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)
G3	SCH 23390 (0,05 mg/kg, s.c.) + veículo (via oral)
G4	SCH 23390 (0,05 mg/kg, s.c.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)
G5	Prazosina (1 mg/kg, i.p.) + veículo (via oral)
G6	Prazosina (1 mg/kg, i.p.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)
G7	Ioimbina (1 mg/kg, i.p.) + veículo (via oral)
G8	Ioimbina (1 mg/kg, i.p.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)
G9	PCPA (4 dias consecutivos 100 mg/kg, i.p.) + veículo (via oral)
G10	PCPA (4 dias consecutivos 100 mg/kg, i.p.) + ácido <i>p</i> -cumárico 20 mg/kg (via oral)

Fonte: Dados do Autor (2020)

5.3 Testes Comportamentais

5.3.1 Teste do Nado Forçado (TNF)

O TNF foi criado por Porsolt; Bertin; Jalfre (1977) para facilitar o desenvolvimento de pesquisas com fármacos antidepressivos. Tal teste busca reproduzir em um modelo animal um comportamento que se assemelhe à depressão. Além disso, é sensível à fármacos clinicamente efetivos utilizados no tratamento desta doença. O teste se baseia na observação de camundongos, que sendo forçados ao nado em uma situação da qual eles não possam escapar, passam por um período de agitação que é seguida por uma postura de imobilidade. Considera-se imóvel o animal que flutua ou faz apenas os movimentos necessários apenas para que sua cabeça se mantenha acima da água. O teste foi realizado em uma sessão com duração de 6 minutos. Foi usado um cilindro plástico com 24 cm de altura, 10 cm de diâmetro e com um nível de 19 cm de água a 25°C. O tempo de imobilidade foi cronometrado e registrado (ECKELI; DACH; RODRIGUES, 2000). Sabe-se que os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade no TNF (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

5.2.3 Atividade Locomotora no Campo Aberto (TCA)

Para eliminar a possibilidade de que ocorra uma redução da imobilidade no TNF devido a um aumento na atividade locomotora, mas que não represente efeito antidepressivo, foi realizada uma sessão no TCA. O teste foi feito em uma caixa de madeira com 40 x 60 cm e 50 cm de altura. O chão da caixa é dividido em 12 quadrados de igual tamanho. Foi realizado o registro do número de quadrados que cada camundongo cruza com as quatro patas durante seis minutos.

5.3.3 Teste do *Splash*

O teste do *splash* é utilizado para avaliar um comportamento de anedonia dos animais após a vaporização deles com uma solução de sacarose a 10%. A viscosidade da sacarose desencadeia um comportamento de autolimpeza, considerado um movimento de autocuidado (WILLNER, 2005). Por isso esse teste

avalia um índice motivacional que está relacionado a alguns sintomas da depressão, como a anedonia (NEIS *et al.*, 2016). O teste segue o protocolo baseado na metodologia de Amini-Khoei *et al.* (2017), com algumas modificações. A solução de sacarose a 10% foi borrifada no dorso de cada animal individualmente, na mesma caixa utilizada no TCA. O comportamento geralmente inicia-se nas patas, em seguida prolonga-se pelo nariz, e face, cabeça, corpo, pernas e cauda (SMOLINSKY *et al.*, 2009). Durante 5 minutos, foram cronometrados o tempo total de autolimpeza e o tempo para iniciar este comportamento, chamado de latência.

5.4. Análise dos Parâmetros de Estresse Oxidativo *in vivo*

5.4.1 Preparação do Tecido

Para a análise dos parâmetros de estresse oxidativo os camundongos foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, o cérebro foi rapidamente removido e o hipocampo e o córtex cerebral foram dissecados e mantidos em gelo com tampão fosfato de sódio, pH 7,4. O homogeneizado foi preparado em tampão adequado usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 1.000G, a 4 °C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80 °C para posterior determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), do conteúdo total de sulfidrilas e da atividade das enzimas antioxidantes.

5.4.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

TBA-RS é usado como um índice de dano a lipídeos e mede o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxila. Foi determinado pelo método de Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). Os tecidos foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecido em banho de água fervente durante 60 min. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes TBA-RS foi

determinado espectrofotometricamente a 535nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído por mg de proteína.

5.4.3 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov; Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Resumidamente, 50 µL de homogeneizado foram adicionados a 1mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µL de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

5.4.4 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984). O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H₂O₂ à 240 nm num meio de reação contendo 20 mM de H₂O₂, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0. Uma unidade de CAT é definida como 1 µmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

5.4.5 Glutathiona Peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi determinada pelo método de Wendel (1981) com algumas modificações.

A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro à 340 nm por 4 minutos. O meio continha 2 mM de GSH, 0,15 U/mL de GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tert-butil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

5.4.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é um substrato para a SOD. Primeiramente, 15 μ L de cada amostra foi adicionado à 215 μ L de uma mistura contendo 50 μ M de tampão Tris, 1 μ M de EDTA, pH 8,2, e 30 μ M de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20 μ L de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos à 420 nm usando um espectrofotômetro. A inibição da auto oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatada como unidades de SOD/mg de proteína.

5.4.7 Dosagem de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão, o qual se baseia na complexação do cobre em meio alcalino, gerando um derivado de cor azul, que é mensurado espectrofotometricamente em 650 nm. O meio continha NaOH 0,10 M, Na_2CO_3 2%, $CuSO_4$ 1%, Tartarato de Na^+ e K^+ 2%. Resumidamente, 10 μ L de homogeneizado foi adicionado a 1 mL do meio e 190 μ L de água destilada. A reação foi iniciada pela adição de 100 μ L de Reagente de Folin 1 N e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína. Após o procedimento, os fatores de calibração parcial foram calculados.

5.5 Atividade Antioxidante *in vitro*

5.5.1 Ensaio DPPH

O método para a determinação da atividade antioxidante do DPPH foi baseada no método descrito por Cavin *et al.* (1998), com pequenas modificações. 2 mL da

solução de DPPH (0,004% em metanol) foi adicionado a 1 mL da solução testada nas concentrações de 1000 a 0,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A mistura foi agitada e deixada em repouso, no escuro, por 30 minutos. A absorbância foi observada em um espectrofotômetro (517 nm). Com o objetivo de eliminar uma possível interferência do extrato, utilizamos uma solução branco (1 mL da solução teste + 2 mL de metanol). O butil-hidroxi-tolueno (BHT) foi utilizado como controle positivo e uma solução de 2 mL de DPPH e 1 mL de metanol como controle negativo. A inibição do radical DPPH foi calculada através da fórmula: Capacidade antioxidante do DPPH = $[A_0 - A_1/A_0] \times 100$, aonde A_0 e A_1 são os valores da absorbância após 30 minutos do controle negativo e da amostra, respectivamente. A atividade sequestradora de radicais livres foi expressa como IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$), a dose de extrato necessária para causar uma redução de 50% da absorbância em 517 nm. Um valor mais baixo de IC_{50} corresponde a uma maior atividade antioxidante. O teste foi realizado em triplicata.

5.5.2 Determinação do Poder Redutor do Ferro (III)

O poder redutor foi determinado de acordo com o método de Waterman; Mole (1994). O poder redutor é medido através da habilidade dos extratos de formar um complexo colorido com ferrocianida, o qual é um aceptor de elétrons. Cada extrato (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 0,1 mL de metanol) foi misturado com 1 mL de FeCl_3 (0,1 M) e após 3 minutos foi adicionado 1 mL de ferrocianida de potássio (0,008 M). A mistura foi realizada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Após 15 minutos a absorbância foi mensurada em um comprimento de onda de 720 nm contra o branco. Quanto mais alta a absorbância, maior o poder redutor, o qual foi expresso como mg de ácido ascórbico/g de extrato seco (mgAA/g), utilizando uma curva padrão de ácido ascórbico, determinada por regressão linear ($R^2 = 0,9951$): $Y = 0,0019X + 0,0698$.

5.5.3 Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando o Modelo de Linoleato de β -caroteno

A atividade antioxidante foi mensurada através do método de Mokbel; Hashinaga (2006) com pequenas modificações. Uma solução de 3,0 mg de β -caroteno diluído em 1 mL de clorofórmio, 45 mg de ácido linoleico e 215 mg de Tween-80 foram

misturadas. O clorofórmio foi removido a 40° sob vácuo através de um evaporador rotativo. A mistura resultante foi imediatamente diluída em 5 – 10 mL de água destilada e misturada e completada com 100 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,1 M. Alíquotas de 2 mL desta solução foram transferidas para diferentes tubos teste contendo 0,1 mL das amostras em metanol (1000 µg mL⁻¹). Nestes experimentos o BHT foi utilizado para fins de comparação. Um controle negativo contendo 0,1 mL de metanol e 2 mL da solução foi utilizado. Os tubos foram então colocados em banho-maria a 50° C. A absorbância das amostras foi lida a 470 nm no tempo zero e a cada 30 minutos até o tempo total de 180 minutos. O branco foi preparado de acordo com a mistura anterior, porém, sem β-caroteno. O poder antioxidante foi calculado da seguinte maneira: $AA\% = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A^0_0 - A^0_t)]$, aonde A₀ e A_t correspondem a absorbância das amostras no tempo zero e após 180 minutos, respectivamente, e A⁰₀ e A⁰_t são as absorbâncias do controle negativo no tempo zero e após 180 minutos.

5.6 Análise Morfológica

Os aspectos morfológicos do hipocampo foram avaliados utilizando a coloração de nissl pelo método de Zhang *et al.* (2015), com algumas modificações. Imediatamente após a coleta, os tecidos foram fixados em formaldeído a 10% por 48 horas a fim de conservar a integridade morfológica, mantendo-os o mais próximo possível das características *in vivo* (LILLIE, 1954). Em sequência, o material foi desidratado com banhos crescentes de álcool (70%, 80% e 100%), diafanizado em xilol e incluído em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo ZEISS® Hyrax M60 (5µm) e distendidos em banho-maria (37 °C) para serem colocados sobre lâminas de vidro.

A avaliação morfológica é baseada na visualização de aspectos irreconhecíveis a nível macroscópico, o que pode fornecer bases mais sólidas para o estudo apresentado. Considerando a importância do hipocampo na fisiopatologia da depressão, principalmente devido à hipótese neurotrófica, foi feita uma análise estereológica de células granulares e piramidais. A contagem foi realizada utilizando a gráticula de Weibel nº2 – M42 acoplada ao microscópio óptico Olympus®, em aumento de 400x. Foram observados três campos na região do GD e um campo na

CA2, nos quais apenas células viáveis foram contabilizadas. O cálculo da densidade celular por área foi feito através da fórmula de Weibel; Kistler; Scherle (1966):

$$\text{Densidade celular} = \frac{\text{número de células positivas}}{36,36} \times 45 \mu\text{m}^2$$

5.7 Verificação da Expressão de BDNF, CREB e Bcl-2

5.7.1 Extração de RNA

Para a verificação de eventuais alterações na expressão gênica de BDNF, CREB e Bcl-2, o RNA total foi extraído utilizando High Pure RNA Isolation Kit (Roche®), segundo as instruções do fabricante, a partir das amostras do tecido de hipocampo dos animais. O kit contém a enzima Dnase para tratamento da amostra purificada, a fim de eliminar qualquer DNA genômico restante.

5.7.2 Obtenção do cDNA

Para obtenção de cDNA foi utilizado o kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems®), segundo instruções do fabricante.

5.7.3 Iniciadores Utilizados

Foram desenhados iniciadores (para qPCR) utilizando o programa Primer Select do pacote DNA STAR (Lasergene) e o algoritmo PrimerBlast (NCBI). Os iniciadores foram dirigidos às regiões conservadas dos genes estudados, determinadas a partir do alinhamento das sequências nucleotídicas existentes no Genbank (NCBI). As sequências de iniciadores específicos de genes são mostradas na tabela 5.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados na reação de PCR

• β-actina	5' GAT GTA TGA AGG CTT TGG TC 3' 5' TGT GCA CTT TTA TTG GTC TC 3'
---	--

• BDNF	5' ATC AAA ACT CGG CAG AAT G 3' 5' CCT GTG TTC TTG TCT CTT TC 3'
• Bcl-2	5' AAG GCA AGG CTT TAA GTT AC 3' 5' CCA CAT TCC ATA CAT TCC TG 3'
• CREB	5' CCA ATC CAC TGA TGA ATG ATG 3' 5' GCT TGA ACG AGT TTA TGG AC 3'

Fonte: Dados do Autor (2020)

5.7.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

O cDNA obtido foi diluído até uma concentração de 500 ng de RNA transcrito reversamente em cDNA. A análise dos genes-alvo e dos genes endógenos (β -actina) foram feitas sempre na mesma placa. Foi preparado um master mix usando FastStart Essential DNA Green Master (Roche®), seguindo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas no instrumento *LightCycler 96* (Roche®). Durante a amplificação, o corante é incorporado aos produtos de PCR amplificados e produz um sinal de fluorescência, permitindo medir a quantidade de DNA que é amplificado em tempo real. O programa de amplificação consistiu de 1 ciclo de 95 °C com 60 s, seguido por 45 ciclos de 95 °C com 10 s, temperatura de anelamento a 54 °C com 10 s espera, 72 °C com 15 s. Um controle negativo sem DNA foi corrido com cada ensaio para avaliar a especificidade geral. A concentração de cada gene foi determinada com base na abordagem cinética usando o software *Light Cycler*. Os valores de expressão gênica obtidos foram normalizados usando o gene da β -actina como controle.

5.8 Análise Estatística

Os resultados coletados foram avaliados através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e após, foi realizado ANOVA, seguida dos testes de Newman-Keuls ou Duncan, quando necessário. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1 – ANTIOXIDANT AND ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS OF *Eugenia catharinensis* D. LEGRAND IN AN ANIMAL MODEL OF DEPRESSION INDUCED BY CORTICOSTERONE.

Situação: Publicado na revista Metabolic Brain Disease.

6.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2 - *Eugenia catharinensis* D. LEGRAND EXERTS ANTIOXIDANT EFFECT ON THE HIPPOCAMPUS AND CEREBRAL CORTEX OF CORTICOSTERONE CHRONICALLY TREATED MICE.

Situação: Submetido para a revista Journal of the Science of Food and Agriculture.

6.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3 - ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT FROM *p*-COUMARIC ACID IN AN ANIMAL MODEL OF DEPRESSION INDUCED BY CORTICOSTERONE.

Situação: Submetido para a revista Pharmacology Biochemistry and Behavior.

7 COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos estão descritos abaixo:

Efeito tipo-antidepressivo de *Eugenia catharinensis*:

- O extrato acetato de etila de *Eugenia catharinensis* apresenta efeito tipo-antidepressivo no TNF em camundongos.
- O tratamento por 21 dias com CORT promove um efeito tipo-depressivo no TNF em camundongos, sendo que o extrato acetato de etila de *E. catharinensis* promove a reversão do efeito causado pela CORT.

Efeito tipo-antidepressivo do ácido *p*-cumárico:

- O ácido *p*-cumárico apresenta efeito tipo-antidepressivo quando administrado nas doses de 5, 10 e 20mg/Kg, sendo capaz de reverter o comportamento provocado pela CORT.
- O efeito tipo-antidepressivo do ácido *p*-cumárico parece ser dependente da participação do sistema de monoaminas.
- A administração de CORT induziu um aumento da latência no teste de *splash*, entretanto não foi capaz de alterar o comportamento de autolimpeza dos animais.
- O ácido *p*-cumárico provoca uma diminuição da latência e um aumento do tempo de autolimpeza no teste do *splash* comparado ao grupo controle.
- O tratamento com o ácido *p*-cumárico nas doses de 5 e 10mg/Kg reverteu o comportamento induzido pela CORT sobre o tempo de latência, assim como a fluoxetina (10mg/Kg).

Efeito antioxidante *in vivo* de *Eugenia catharinensis*:

Córtex Cerebral:

- A CORT aumentou a atividade da CAT e da SOD e os níveis de TBA-RS.
- O EAE aumentou a atividade da SOD.
- O EHA aumentou a atividade da CAT e da SOD e diminuiu os níveis de TBA-RS.
- O EDM aumentou a atividade da SOD e diminuiu os níveis de TBA-RS.

- O EAE reverteu o aumento na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD e nos níveis de TBA-RS provocado pela CORT.
- O EHA reverteu o aumento na atividade da SOD e nos níveis de TBA-RS provocado pela CORT.
- O EDM reverteu o aumento na atividade da CAT e da SOD e nos níveis de TBA-RS provocado pela CORT.

Hipocampo:

- A CORT aumentou a atividade da CAT, da SOD e diminuiu a atividade da GSH-Px.
- O EAE aumentou a atividade da CAT e da SOD.
- O EHA aumentou a atividade da SOD.
- O EDM aumentou a atividade da CAT.
- O EAE reverteu os efeitos causados pela CORT sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px.
- O EHA reverteu os efeitos causados pela CORT sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px.
- O EDM reverteu os efeitos causados pela CORT sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px.

Efeito antioxidante *in vivo* do ácido *p*-cumárico no hipocampo:

- O ácido *p*-cumárico, quando administrado nas doses de 10 e 20mg/kg por 7 dias consecutivos, promoveu uma diminuição nos níveis de TBA-RS em comparação aos animais do grupo controle, assim como a fluoxetina (10mg/Kg).
- Quando administrado nas doses de 5mg/Kg e 10 mg/Kg o ácido *p*-cumárico causa diminuição da atividade da CAT e aumento da atividade da GSH-Px, enquanto apenas a dose de 20 mg/Kg é capaz de diminuir a atividade da SOD, revertendo os efeitos causados pela CORT. O tratamento com fluoxetina demonstra resultados similares aos observados pelo ácido *p*-cumárico.

Efeito antioxidante *in vitro* de *Eugenia catharinensis*:

- Todos os extratos testados, EAE, EHA e EDM, provocaram uma diminuição na concentração de DPPH.
- O EAE apresentou maior poder de redução do ferro e inibição da peroxidação lipídica em relação ao EHA e ao EDM.

Análise morfológica do hipocampo:

- A CORT induziu uma diminuição da densidade de células piramidais da CA2 do hipocampo.
- A administração de CORT promoveu uma diminuição da densidade de células viáveis no GD do hipocampo.
- O ácido *p*-cumárico é capaz de aumentar a densidade celular tanto na CA2 quanto no GD do hipocampo, assim como a fluoxetina.

Análise da expressão gênica de BDNF, CREB e Bcl-2:

- O tratamento com CORT (20mg/Kg) por 21 dias não alterou a expressão de BDNF, CREB ou de Bcl-2 no hipocampo dos animais.
- O tratamento com o ácido *p*-cumárico na dose de 20mg/Kg e com fluoxetina (10mg/Kg) aumentou a expressão de Bcl-2 nos animais pré-tratados com CORT, enquanto a expressão dos outros genes não foi modificada.

Identificação dos compostos fenólicos:

- O EAE e o EHA possuem maior concentração de compostos fenólicos e conteúdo total de flavonoides em relação ao EDM.
- 18 compostos fenólicos, do total de 47 padrões utilizados, foram identificados nos extratos de *E. catharinensis*, sendo 10 deles comuns aos 3 extratos.
- No EAE o composto que apresentou maior concentração foi o ácido gálico.
- No EHA os compostos que apresentaram maior concentração foram o ácido salicílico e o ácido siríngico.
- No EDM o composto que apresentou maior concentração foi o ácido siríngico.

8 CONSIDERAÇÃO FINAL

Os resultados obtidos nos permitem concluir que o EAE obtido das folhas de *Eugenia catharinensis* apresenta efeito tipo-antidepressivo no TNF em camundongos sem alterar a atividade locomotora dos animais no TCA. Além disso, os extratos EAE, EHA e EDM de *Eugenia catharinensis* possuem atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*. Os efeitos tipo-antidepressivo e antioxidante de *Eugenia catharinensis* parecem ser dependentes, pelo menos em parte, dos compostos fenólicos presentes nos extratos, uma vez que o ácido *p*-cumárico, um dos compostos identificados no EAE, promoveu efeito tipo-antidepressivo e antioxidante, além de levar a um aumento na densidade de células do hipocampo e na expressão de Bcl-2.

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A.; YOUSEF, A.I.; EL-TWAB, S.M.A.; REHEIM, E.S.A.; ASHOUR, M.B. Gallic acid and *p*-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced neurodegeneration in rats. **Metab Brain Dis**, v. 32, n. 4, p. 1279–1286, 2017.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Method Enzym**, v. 105, p. 121 – 126, 1984.

AKDEMIR, F.N.E.; ALBAYRAK, M.; ÇALIK, M.; BAYIR, Y.; GÜLÇİN, I. The Protective Effects of *p*-Coumaric Acid on Acute Liver and Kidney Damages Induced by Cisplatin. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p. 18, 2017.

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302, p. 141 – 145, 2001.

ALCOCER-GÓMEZ, E.; DE MIGUEL, M.; CASAS-BARQUERO, N.; NÚÑEZ-VASCO, J.; SÁCHEZ-ALCAZAR J.A.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; CORDEROL, M.D. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. **Brain Behav Immun**, v. 36, p. 111-117, 2014.

ALFONSO, J.; FRICK, L.R.; SILBERMAN, D.M.; PALUMBO, M.L.; GENARO, A.M.; FRASCH, A.C. Regulation of Hippocampal Gene Expression Is Conserved in Two Species Subjected to Different Stressors and Antidepressant Treatments. **Biol. Psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 244–251, 2006.

ALVES, M.J.; FERREIRA, I.C.F.R.; FROUFE, H.J.C.; ABREU, R.M.V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **J. Appl. Microbiol.**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.

AMINI-KHOEI, H.; MOHAMMADI-ASL, A.; AMIRI, S.; HOSSEINI, M.-J.; MOMENY, M.; HASSANIPOUR, M.; RASTEGAR, M.; HAJ-MIRZAIAN, A.; HAJ-MIRZAIAN, A.; SANJARIMOOGHADDAM, H.; MEHR, S.E.; DEHPOUR, A.R. Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 76, p. 169–178, 2017.

AMMENDOLA, S.; KORNREICH, C. “Are antidepressants really effective?” **Rev Med Brux**, v. 36, n 5, p. 421-429, 2015.

ANACKER, C.; ZUNSZAIN, P.A.; CARVALHO, L.A.; PARIANTE, C.M. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 415–425, 2011.

ANAGNOSTOPOULOU, M.A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V.P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel *Citrus sinensis*. **Food Chem**, v. 94, n. 1, p. 19 – 25, 2006.

ANDERSON, G. Editorial: The kynurenine and melatonergic pathways in psychiatric and CNS disorders. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 8, p. 947-948, 2016.

ANDERSON, G.; MAES, M. Oxidative/nitrosative stress and immune-inflammatory pathways in depression: treatment implications. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 23, p. 3812-3847, 2014.

ANDERSEN, P. **The hippocampus book**. [s.l.] Oxford University Press, 2007.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão**. [s.l.] Instituto Adolfo Lutz, 2007. v. 66

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 317 – 325, 2005.

BACKES, P.; IRGANG, B. (2002). **Árvores do Sul: Guia de identificação e interesse ecológico**. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz. 321p.

BAKUNINA, N.; PARIANTE, C.M.; ZUNSZAIN, P.A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, p. 365-373, 2015.

BARAUNA, S.C.; DELWING-DAL MAGRO, D.; BRUECKHEIMER, M.B.; MAIA, T.P.; SALA, G.A.B.N.; DÖHLER, A.W.; HARGER, M.C.; MELO, D.F.M.; GASPER, A.L.; ALBERTON, M.D.; SIEBERT, D.A.; MICKE, G.A.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; DELWING-DE LIMA, D. Antioxidant and antidepressant-like effects of *Eugenia catharinensis* D. Legrand in an animal model of depression induced by corticosterone. **Metab Brain Dis**, v. 33, n. 6, p. 1985–1994, 2018.

BEHR, G.A.; MOREIRA, G.C.F.; FREY, B.N. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, 2012.

BENTIVOGLIO, M.; SWANSON, L.W. On the fine structure of the *pes Hippocampi major* (with *plates XIII-XXIII*). **Brain Res Bull**, v. 54, n. 5, p. 461 – 483, 2001.

BERK, M.; NG, F.; DEAN, O.; DODD, S.; BUSH, A.I. Glutathione: a novel target in psychiatry. **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, p. 346-351, 2008.

BOSCH, O.G.; SEIFRITZ, E.; WETTER, T.C. Stress-related depression: neuroendocrine, genetic, and therapeutical aspects. **World J Biol Psychiatry**, v. 13, p. 556-568, 2012.

BOUZAIENE, N.N.; JAZIRI, S.K.; KOVACIC, H.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K.; LUIS, J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 766, p. 99–105, 2015.

BOZ, H. *p* -Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. **Int. J. Food Sci.**, v. 50, n. 11, p. 2323–2328, 2015.

BRASIL, Ministério Da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2009. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

CALABRESE, F.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; RIVA, M.A. Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 208–216, 2009.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JUNIOR, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008.

CARDOSO, F.A.G.; ULIANO, V.G.; BOHATCH JÚNIOR, M.S.; MATKOVSKI, P.D.; ALBERTON, M.D.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; DAL MAGRO, D.D.; BARAUNA, S.C. Antidepressant-like effect of *Tabernaemontana catharinensis* hydroalcoholic extract in mice: Evidence of the involvement of 5-HT_{1A} receptors. **Psychology & Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 280-289, 2015.

CASTRÉN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, p. 58-64, 2004.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and Lipophilic Constituents of *Tinospora crispa*. **Planta medica**, v. 64, n. 05, p. 393-396, 1998.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J Sci Food Agric**, v. 80, p. 1033 – 1043, 2000.

COLLA, A.R.S.; MACHADO, D.; BETTIO, L.E.B.; COLLA, G., MAGINA, M.D.A.; BRIGHENTE, I.M.C.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **J Ethnopharmacol**, v.143, p.720-731, 2012.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J Ethnopharmacol**, v. 66, p. 33-39, 1999.

CZÉH, B.; FUCHS, E.; WIBORG, O.; SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, 2016.

DUMAN, R.; NAKAGAWA, S.; MALBERG, J. Regulation of Adult Neurogenesis by Antidepressant Treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 836 – 844, 2001.

DUMAN, R.S.; MALBERG, J.; NAKAGAWA, S.; D`SA, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol. Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 732–739, 2000.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO J.B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 4-29, 2016.

ECKELI, A.L.; DACH, F.; RODRIGUES, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effect in mice. **Neuroreport**, v. 11, p. 839 – 843, 2000.

EIPPERT, F.; VEIT, R.; WEISKOPF, N.; ERB, M.; BIRBAUMER, N.; ANDERS, S. Regulation of emotional responses elicited by threat-related stimuli. **Hum Brain Mapp**, v. 28, n. 5, p. 409 – 423, 2007.

ELBEJJANI, M.; FUHRER, R.; ABRAHAMOWICZ, M.; MAZOYER, B.; CRIVELLO, F.; TZOURIO, C.; DUFOUIL, C. Depression, depressive symptoms, and rate of hippocampal atrophy in a longitudinal cohort of older men and women. **Psychol. Med.**, v. 45, n. 9, p. 1931–1944, 2015.

EL-SEEDI, H.R.; EL-SAID, A.M.A.; KHALIFA, S.A.M.; GÖRANSSON, U.; BOHLIN, L.; BORG-KARLSON, A.-K. Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 44, p. 10877–10895, 2012.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJÖRK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat. Med.**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, 1998.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H.C.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 513–566, 2000.

FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.

FISCHER, D.C.H.; LIMBERGER, R.P.; HENRRIQUES, A.T.; MORENO, P.R.H. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from soouthastern Brazil. **J Essent Oil Res**, v. 17, p. 499-500, 2005.

FISCHER, S.; STRAWBRIDGE, R.; VIVES, A.H.; CLEARE, A.J. Cortisol as a predictor of psychological therapy response in depressive disorders: Systematic review and meta-analysis. **Brit J Psychiat**, v. 210, n. 2, p. 105–109, 2017.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. *Farmacologia Clínica*. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

GARMUS, T.T.; PAVIANI, L.C.; QUEIROGAB, C.L.; MAGALHÃES, P.M.; CABRAL, F.A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **J Supercrit Fluid**, v. 86, p. 4-14, 2014.

GEERLINGS, M. I.; GERRITSEN, L. Late-Life Depression, Hippocampal Volumes, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation: A Systematic Review and Meta-analysis. **Biol. Psychiatry**, v. 82, n. 5, p. 339–350, 2017.

GIGANTE, A.D.; YOUNG, L.T.; YATHAM, L.N.; ANDREAZZA, A.C.; NERY, F.G.; GRINBERG, L.T.; HEINSEN, H.; LAFER, B. Morphometric post-mortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. **Int J Neuropsychoph**, v. 14, n. 08, p. 1075–1089, 2011.

GRUNDMANN, O.; LV, Y.; KELBER, O.; BUTTERWECK, V. Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the interrelationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 767-773, 2010.

GUIMARÃES, L. Venda de antidepressivos no Brasil cresce 44,8% em 4 anos, diz pesquisa. **G1** São Paulo, 2009. Disponível em:<http://g1.globo.com/Noticias/Economia_Negocios/0,,MUL1411781-9356,00-VENDA+DE+ANTIDEPRESSIVOS+NO+BRASIL+CRESCE+EM+ANOS+DIZ+PESQUIS A.html> Acesso em: 05 mar 2016.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.

GUVEN, M.; ARAS, A.B.; AKMAN, T.; SEN, H.M.; OZKAN, A.; SALIS, O.; SEHITOGLU, I.; KALKAN, Y.; SILAN, C.; DENIZ, M.; COSAR, M. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. **Iran J Basic Med Sci**, v. 18, n. 4, p. 356–63, 2015.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radic Res**, v. 31, n. 4, 261-272, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutr Res**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HANSSON, P.B.; MURISON, R.; LUND, A.; HAMMAR, Å. Cognitive functioning and cortisol profiles in first episode major depression. **Scand J Psychol**, v. 56, n. 4, p. 379-383, 2015.

HAYDARI, M.; MARESCA, V.; RIGANO, D.; TALEEI, A.; SHAHNEJAT-BUSHEHRI, A.A.; HADIAN, J.; SORBO, S.; GUIDA, M.; MANNA, C.; PISCOPO, M.; NOTARIALE, R.; DE RUBERTO, F.; FUSARO, L.; BASILE, A. Salicylic Acid and Melatonin Alleviate the Effects of Heat Stress on Essential Oil Composition and Antioxidant Enzyme Activity in *Mentha × piperita* and *Mentha arvensis* L. **Antioxidants**, v. 8, p. 547, 2019.

HORST, A. **Efeito do tratamento com N-acetilcisteína sobre parâmetros nociceptivo e de estresse oxidativo e nitrosativo em medula espinal de ratos com constrição no nervo isquiático**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 73. 2011.

INCOLLINGO RODRIGUEZ, A.C.; EPEL, E.S.; WHITE, M.L.; STANDEN, E.C.; SECKL, J.R.; TOMIYAMA, J. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. **Psychoneuroendocrinology**, v. 62, p. 301–318, 2015.

KANCHANATAWAN, B.; SIRIVICHAYAKUL, S.; THIKA, S.; RUXRUNGTHAM, K.; CARVALHO, A.F.; GEFFARD, M.; ANDERSON, G.; NOTO, C.; IVANOVA, R.; MAES, M. Physio-somatic symptoms in schizophrenia: Association with depression, anxiety, neurocognitive deficits and the tryptophan catabolite pathway. **Metab Brain Dis**, v. 32, n. 4, p. 1003-1016, 2017.

KHANZODE, S.D.; DAKHALE, G.N.; KHANZODE, S.S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep**, v. 8, p. 365-370, 2003.

KONISHI, Y.; HITOMI, Y.; YOSHIOKA, E. Intestinal Absorption of *p* -Coumaric and Gallic Acids in Rats after Oral Administration. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 9, p. 2527–2532, 2004.

KORANI, M.S.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; MOGHADDAM, H.F.; MANSOURI, M.T. Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 733, p. 62 – 67, 2014.

LEAL, G.; BRAMHAM, C.R.; DUARTE, C.B. **BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 104.

LEBEDEVA, A.; SUNDSTRÖM, A.; LINDGREN, L.; STOMBY, A.; AARSALND, D.; WESTMAN, E.; WINBLAD, B.; OLSSON, T.; NYBERG, L. Longitudinal relationships

among depressive symptoms, cortisol, and brain atrophy in the neocortex and the hippocampus. **Acta Psychiatr. Scand.**, v. 137, n. 6, p. 491–502, 2018.

LEE, S.; KIM, H.-B.; HWANG, E.-S.; KIM, E.-S.; KIM, S.-S.; JEON, T.-D.; SONG, M.; LEE, J.-S.; CHUNG, M.-C.; MAENG, S.; PARK, J.-H. Antidepressant-like Effects of p-Coumaric Acid on LPS-induced Depressive and Inflammatory Changes in Rats. **Exp. Neurol.**, v. 27, n. 3, p. 189, 2018.

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M.; **Flora ilustrada catarinense: Mirtáceas**. Itajaí, R. Reitz, 1969.

LI, S.; WANG, C.; WANG, M.; LI, W.; MATSUMOTO, K.; TANG, Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. **Life Sci.**, v. 80, n. 15, p. 1373–1381, 2007.

LILLIE, R. D. **Histologic technic and practical histochemistry**. [s.l.]. 1954.

LINDQVIST, D.; DHABHAR, F.S.; JAMES, S.J.; HOUGH, C.M.; JAIN, F.A.; BERSANI, F.S.; REUS, V.I.; VERHOEVEN, J.E.; EPEL, E.S.; MAHAN, L.; ROSSER, R.; WOLKOWITZ, O.M.; MELLON, S.H. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 76, p. 197-205, 2016.

LIU, Y.-M.; HU, C.-Y.; SHEN, J.-D.; WU, S.-H.; LI, Y.-C.; YI, L.-T. Elevation of synaptic protein is associated with the antidepressant-like effects of ferulic acid in a chronic model of depression. **Physiol Behav**, v. 169, p. 184–188, 2017.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 14, p. 1563-1586, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265 – 275, 1951.

MAES, M.; DE VOS, N.; PIOLI, R.; DEMEDTS, P.; WAUTERS, A.; NEELS, H.; CHRISTOPHE, A. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. **J Affect Disord**, v. 58, p. 241-246, 2000.

MAES, M.; FISAR, Z.; MEDINA, M.; SCAPAGNINI, G.; NOWAK, G.; BERK, M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates—Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 127-150, 2012.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, p. 676-692, 2011a.

MAES, M.; MIHAYLOVA, I.; KUBERA, M.; LEUNIS, J.C.; GEFFARD, M. IgM-mediated autoimmune responses directed against multiple neoepitopes in depression: new pathways that underpin the inflammatory and neuroprogressive pathophysiology. **J Affect Disord**, v. 135, p. 414-418, 2011b.

MANJI, H.K.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med**, v. 7, n. 5, p. 541-547, 2001.

MANSOURI, M.T.; FARBOOD, Y.; SAMERI, M.J.; SARKAKI, A.; NAGHIZADEH, B.; RAFEIRAD, M. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6- hydroxydopamine in rats. **Food chem**, v. 138, n. 2-3, p. 1028 – 1033, 2013.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. Greenwald, Press boca raton: p. 243-247, 1985.

MARTINOWICH, K.; LU, B. Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 73–83, 2008.

MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; LATOS, M. Determination of Antioxidant Activity of Caffeic Acid and p-Coumaric Acid by Using Electrochemical and Spectrophotometric Assays. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 11, p. 10644–10658, 2016.

MATHEW; ABRAHAM, T.E.; ZAKARIA, Z.A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **J. Food Sci. Technol.**, v. 52, n. 9, p. 5790 – 5798, 2015.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 141, 2009.

MATRISCIANO, F.; BONACCORSO, S.; RICCIARDI, A.; SCACCIANOCE, S.; PANACCIONE, I.; WANG, L.; RUBERTO, A.; TATARELLI, R.; NICOLETTI, F.; GIRARDI, P.; SHELTON, R.C. Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine. **J. Psychiatr. Res.**, v. 43, n. 3, p. 247–254, 2009.

MCINTYRE, C.K.; MCGAUGH, J.L.; WILLIAMS, C.L. Interacting brain systems modulate memory consolidation. **Neurosci Biobehav R**, v. 36, n. 7, p. 1750–62, 2012.

MILLER, E.K; COHEN, J.D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 167 – 202, 2001.

MOKBEL, M.S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chem**, v. 94, n. 4, p. 529-534, 2006.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

MORIOKA, K.; NOJIMA, H.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; KURAISHI, Y.; MOMOSE, Y. Hypotensive action of Ñangapiry, a Paraguayan Natural Medicine, in rodents. **Phytomedicine**, v. 7, n.2, p. 99-103, 2000.

MURRAY, F.; SMITH, D.W.; HUTSON, P.H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 1, p. 115-127, 2008.

MOYLAN, S.; BERK, M.; DEAN, O.M.; SAMUNI, Y.; WILLIAMS, L.J.; O'NEIL, A.; HAYLEY, A.C.; PASCO, J.A.; ANDERSON, G.; JACKA, F.N.; MAES, M.; Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 45, p. 46–62, 2014.

NEIS, V.B.; BETTIO, L.E.B.; MORETTI, M.; ROSA, P.B.; RIBEIRO, C.M.; FREITAS, A.E.; GOMÇALVES, F.M.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L.S. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 150–151, p. 108–114, 2016.

NERI-NUMA, I.A.; CARVALHO-SILVA, L.B.; MORALES, J.P.; MALTA, L.G.; MUTAMOTO, M.T.; FERREIRA, J.E.M.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, M.G. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçáboi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Res Int**, v. 50, p. 70-76, 2013.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v 34, n 1, p 13-25, 2002.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 6, p. 851-876, 2008.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. **J Neurosci**, v. 75, p. 7539-7547, 1995.

NIKFARJAM, M.; RAKHSHAN, R.; GHADERI, H. Comparison of effect of *Lavandula officinalis* and venlafaxine in treating depression: a double blind clinical trial. **J Clin Diagn Res**, v. 1, n. 7, p. KC01–KC04, 2017.

NOBLE, E.E.; BILLINGTON, C.J.; KOTZ, C.M.; WANG, C. The lighter side of BDNF. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, p. 1053-1069, 2011.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORA, N.O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T.M.; SCHIDT, J.M.; SETZER, W.N. Studies on the essential oil composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **Int J Aromather**, v. 15, p. 147, 2005.

OGUTA, E.; SEKERIB, R.; AKCAYC, G.; YILDIRIMB, F.B.; DERINC, N.; ASLAND, M.; SATIE, L. Protective effects of syringic acid on neurobehavioral deficits and hippocampal tissue damages induced by sub-chronic deltamethrin exposure. **Neurotoxicol Teratol**, v. 76, 2019.

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

OLIVEIRA, T. DE Q.; DE SOUSA, C.N.S.; VASCONCELOS, G.S.; DE SOUSA, L.C.; DE OLIVEIRA, A.A.; PATROCÍNIO, C.F.V.; MEDEIROS, I. DA S.; JÚNIOR, J.E.R.H.; MAES, M.; MACEDO, D.; VASCONCELOS, S.M.M. Brain antioxidant effect of mirtazapine and reversal of sedation by its combination with alpha-lipoic acid in a model of depression induced by corticosterone. **J. Affect. Disord.**, v. 219, p. 49–57, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Mental disorders**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en/>> Acesso em: 15 jan 2016.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. Health at a glance 2013 - **OECD Indicators** < <http://www.oecd.org/els/health-systems/Health-at-a-Glance-2013-Chart-set.pdf>> Acesso em: 05 mar 2016.

OTTE, C.; GOLD, S.M.; PENNINX, B.W.; PARIANTE, C.M.; ETKIN, A.; FAVA, M.; MOHR, D.C.; SCHATZBERG, A.F. Major depressive disorder. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, 2016.

OWEN, A.J.; BATTERHAM, M.J.; PROBST, Y.C.; GRENYER, B.F.; TAPSELL, L.C. Low plasma vitamin E levels in major depression: diet or disease? **Eur J Clin Nutr**, v. 59, p. 304-306, 2005.

PALTA, P.; SAMUEL, L.J.; MILLER, E.R.; SZANTON, S.L. Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. **Psychosom Med**, v. 76, p. 12-19, 2014.

PHAN, K.L.; FITZGERALD, D.A.; NATHAN, P.J.; MOORE, J.G.; UHDE, T.W.; TANCER, M.E. Neural substrates for voluntary suppression of negative affect: a functional magnetic resonance imaging study. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 3, p. 210 – 219, 2005.

PANDEY, K.B.; MISHRA, N.; RIZVI, S.I. Protective role of myricetin on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to oxidative stress. **Nat Prod Commun**, v. 4, p. 221 – 226, 2009.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2, n. 5, p. 270 – 278, 2009.

PARIANTE, C.M.; LIGHTMAN, S.L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 9, p. 464–468, 2008.

PEI, K.; OU, J.; HUANG, J.; OU, S. *p*-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **J. Sci.**, v. 96, n. 9, p. 2952–2962, 2016.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, p.327 – 336, 1977.

RAMFUL, D.; AUMJAUD, B.; NEERGHEEN, V.S.; SOOBTRATREE, M.A.; GOOGOLLYE, K.; AROUMA, O.I.; BAHORUN, T. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract *in vitro*. **Food Res Int**, v. 44, p. 1190-1196, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. (2016). *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 835–853, 2001.

RODRIGUES, A.G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D'Oeste-SC. **Rev Bras Plant Med**, v. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

ROSSI, A.; BARRACO, A.; DONDA, P. Fluoxetine: a review on evidence based medicine. **Ann Gen Hosp Psychiatry**, v. 3, 2004.

ROT, M.A.H.; MATHEW, S.J.; CHARNEY, D.S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **Cmaj**, v. 180, n. 3, p. 305–313, 2009.

SAKAMULA, R.; THONG-ASA, W. Neuroprotective effect of *p*-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. **Metab Brain Dis**, v. 33, n. 3, p. 765–773, 2018.

SAHA, S.; SUBRAHMANYAM, E.V.S.; CHANDRASHEKAR, K.; MANDAL, S.C.; SHASTRY, S.C. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Braz J Pharmacog**, v. 23, n. 4, p. 651-666, 2013.

SANDLER, M. Monoamine oxidase inhibitors in depression: history and mythology. **J Psychopharmacol**, 1990.

SANNE, B.; MYKLETUN, A.; DAHL, A.A.; MOEN, B.E.; TELL, G.S. Occupational differences in levels of anxiety and depression: the Hordal and health study. **J Occup Environ Med**, v. 45, n. 6, p. 628-638, 2003.

SANTOS, K.A.K.; MATIAS, E.F.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.S.; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES, G.M.M.; ROLON, M.; VEJA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Exp Parasitol**, v. 131, p. 130-132, 2012.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 45, p. 287 – 306, 2005.

SCHILDKRAUT, J.S. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, p. 509-522, 1965.

SCHLOESSER, R.J.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H.K. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 36–46, 2012.

SHARMA, S.H.; CHELLAPPAN, D.R.; CHINNASWAMY, P.; NAGARAJAN, S. Protective effect of *p*-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. **Biomed Pharmacother**, v. 94, p. 577–588, 2017.

SHEN, J.; MA, L.; HU, C.; PEI, Y.; JIN, S.; FANG, X.; LI, Y. Berberine up-regulates the BDNF expression in hippocampus and attenuates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 614, p. 77–82, 2016.

SICRAS-MAINAR, A.; NAVARRO-ARTIEDA, R. Use of antidepressants in the treatment of major depressive disorder in primary care during a period of economic crisis. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v.12, p. 29-40, 2016.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. [s.l.] Editora da UFSC, 2010.

SMOLINSKY, A.N.; BERGNER, C.L.; LAPORTE, J.L.; KALUEFF, A.V. Analysis of Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression. In: [s.l: s.n.]. p. 21–36, 2009.

SNYDER, J.S.; SOUMIER, A.; BREWER, M.; PICKEL, J.; CAMERON, H.A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, v. 476, p. 458 – 461, 2011.

SPERNER-UNTERWEGER, B.; KOHL, C.; FUCHS, D. Immune changes and neurotransmitters: possible interactions in depression? **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 48, p. 268-276, 2014.

STAHL, S.M. *Essencial Psychopharmacology de Depression and Bipolar disorder*. Cambridge University, 2000. 175 p.

STEWART, J.G.; MAZURKA, R.; BOND, L.; WYNNE-EDWARDS, K.E.; HARKNESS, K.L. Rumination and impaired cortisol recovery following a social stressor in adolescent depression. **J Abnorm Child Psychol**, v. 41, n. 7, p. 1015-1026, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAROTTO, B.T.R. **Avaliação da capacidade antioxidante de derivados dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, em sistemas-modelo in vitro**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/124201/000834128.pdf;jsessionid=4DE3B9579F579D8EE41C1C48E348FD1B?sequence=1>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

VICTORIA, F.N.; DE SIQUEIRA, B.A.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E.J. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neurosci Lett**, v. 544, p. 105-109, 2013.

VITRAC, X.; MONI, J.P.; VERCAUTEREN, J.; DEFFIEUX, G.; MÉRILLON, J.M. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. **Anal Chim Acta**, v. 458, p. 103 – 110, 2002.

WANG, M.; HILL, M.N.; ZHANG, L.; GORZALKA, B.B.; HILLARD, C.J.; ALGER, B.E. Acute restraint stress enhances hippocampal endocannabinoid function via glucocorticoid receptor activation. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 1, p. 56–70, 2012.

WANG, P.; YE, X.L.; LIU, R.; CHEN, H.L.; LIANG, X.; LI, W.L.; ZHANG, X.D.; QIN, X.J.; BAI, H.; ZHANG, W.; WANG, X.; HAI, C.X. Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat. **Exp Toxicol Pathol**, v. 65, n. 3, p. 311 – 318, 2013.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific, 238f. 1994.

WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **Int J Cell Biol**, v. 30, n. 1, p. 23–38, 1966.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325 – 333, 1981.

WESSELING, C.; VAN WENDEL DE JOODE, B.; KEIFER, M.; LONDON, L.; MERGLER, D.; STALLONES, L. Symptoms of psychological distress and suicidal ideation among banana workers with a history of poisoning by organophosphate or n-methyl carbamate pesticides. **Occup Environ Med**, v. 67, p. 778-784, 2010.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.

WINTERBOURN, C.C. Superoxide as an intracellular radical sink. **Free Radic Biol Med**, v. 14, n. 1, p. 85-90, 1993.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. **J. Apic. Res.**, v. 37, n. 2, p. 99 – 105, 1998.

WONG, D.T.; HORNG, J.S.; BYMASTER, F.P.; HAUSER, K.L.; MOLLOY, B.B. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(*p*-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. **Life Sci**, v. 15, n. 3, p. 471-479, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicines situation 2011**: traditional medicines, global situation, issues and challenges. Geneva, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. 2017.

YAN, T.; XU, M.; WAN, S.; WANG, M.; WU, B.; XIAO, F.; BI, K.; JIA, Y. Schisandra chinensis produces the antidepressant-like effects in repeated corticosterone-induced mice via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway. **Psychiatry Res.**, v. 243, p. 135–142, 2016.

YI, L.-T.; LI, J.; LIU, Q.; GENG, D.; ZHOU, Y.-F.; KE, X.-Q.; CHEN, H.; WENG, L.-J. *et al.* Antidepressant-like effect of oleanolic acid in mice exposed to the repeated forced swimming test. **J. Psychopharmacol. (Oxford)**, v. 27, n. 5, p. 459–68, 2013.

YONGMEI, Z.; DUOLU, L.; ZHENFENG, Z.; YA, S. Improved neuroprotective effects of gallic acid-loaded chitosan nanoparticles against ischemic stroke. **Rejuvenation Res**, v. 2, 2019.

ZAFIR, A.; BANU, N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 2, p. 167-177, 2009.

ZAKI, M.A.; BALACHANDRAN, P.; KHAN, S.; WANG, M.; MOHAMMED, H.; HETTA, M.H.; PASCO, D.S.; MUHAMMAD, I. Cytotoxicity and Modulation of Cancer-Related Signaling by (Z)- and (E)-3,4,3',5'-Tetramethoxystilbene Isolated from *Eugenia rigida*. **J Nat Prod**, v. 76, p. 679-684, 2013.

ZELLER, E.A.; BARSKY, J.; FOUTS, J.R.; KIRCHHEIMER, W.F.; VAN ORDEN, L.S. Influence of isonicotinic acid hydrazide (INH) and 1-isonicotinyl-2-isopropyl hydrazide (IIH) on bacterial and mammalian enzymes. **Experientia**, v. 8, n. 9, p. 349-350, 1952.

ZENI, A.L.B.; CAMARGO, A.; DALMAGRO, A.P. Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Steroids**, v. 125, n. May, p. 131–136, 2017.

ZHANG, Z.J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sci**, v. 75, p. 1659-1699, 2004.

ZHANG, Z.; SUN, T.; NIU, J.; HE, Z.; LIU, Y.; WANG, F. Amentoflavone protects hippocampal neurons : antiapoptotic effects. **Neural Regen Res**, v. 10, n. 7, p. 1125–1133, 2015.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645-660, 2008.

ZHAO, Y.; LIU, J. Anti-Inflammatory Effects of p-coumaric Acid in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells: Involvement of NF- κ B and MAPKs Pathways. **Med Chem**, v. 6, n. 5, 2016.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M.H. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. **Phytochem Rev**, v. 9, n. 1, p. 133–145, 2010.

ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado **Investigação do efeito tipo-antidepressivo de *Eugenia catharinensis* em um modelo animal de depressão induzido por corticosterona**, protocolo n.º 107/16, sob a responsabilidade da pesquisadora/orientadora Prof.ª Sara Cristiane Barauna, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), em reunião de 01/06/2016.

Vigência do projeto	03/08/2016 a 31/07/2017
Espécie/linhagem	Camundongo <i>Swiss</i>
N.º de animais	208
Peso/Idade	30 g / 50 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da FURB

Blumenau, 1º de junho de 2016.

Prof.ª Dr.ª Simone Wagner
 Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado **Avaliação dos efeitos do ácido *p*-cumárico em modelo animal de depressão: parâmetros oxidativos, comportamentais e morfológicos**, sob a responsabilidade da pesquisadora/orientadora Prof.^a Sara Cristiane Barauna, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o ser humano), para fins de pesquisa científica, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), sob protocolo de n.º 027/17.

Vigência do projeto	01/02/2018 a 01/06/2019
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> / Swiss
N.º de animais	344
Idade / Peso	50 dias / 20 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da FURB

Blumenau, 06 de dezembro de 2017.

Prof.^a Ana Carolina dos Santos Oliveira
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais/FURB

ANEXO 2 – ARTIGO 1



Antioxidant and antidepressant-like effects of *Eugenia catharinensis* D. Legrand in an animal model of depression induced by corticosterone

Sara Cristiane Barauna^{1,2} · Débora Delwing-Dal Magro² · Maitê Beatriz Brueckheimer³ · Thayná P. Maia³ · Geraldo Antonio Bunick Neto Sala³ · André Wolff Döhler² · Mateus Campestrini Harger² · Dayse Fabiane Machado de Melo⁴ · André Luís de Gasper² · Michele Debiasi Alberton⁴ · Diogo Alexandre Siebert⁵ · Gustavo Amadeu Micke⁵ · Cláudia Almeida Coelho de Albuquerque² · Daniela Delwing-De Lima^{1,3}

Received: 27 April 2018 / Accepted: 12 August 2018 / Published online: 22 August 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

This work investigated the antioxidant and antidepressant-like effects of ethyl acetate extract from *Eugenia catharinensis* in mice treated with corticosterone (20 mg/Kg). The animals received saline or corticosterone (21 days) and, in the last 7 days, they were treated with the extract (50, 125, 200 or 250 mg/Kg) or vehicle. After 24 h, the mice were submitted to the open field and forced swimming tests, after which the hippocampus and cerebral cortex were removed. Our results showed that the extract decreased the immobility time of mice in the forced swimming test and that the extract was able to reverse the effect caused by corticosterone. Corticosterone pre-treatment generated oxidative stress, altering antioxidant enzymes in the nervous tissue. The extract increased the catalase and superoxide dismutase activities and reversed the effects of corticosterone. In the hippocampus, the extract increased superoxide dismutase activity and reversed the increase in catalase activity elicited by corticosterone. We propose that the effects elicited by the *Eugenia catharinensis* are dependent on the presence of phenolic compounds (gallic acid, protocatechuic acid, syringic acid, 4-hydroxy methylbenzoic acid, chlorogenic acid, salicylic acid, caffeic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, isomerocoumaric acid, ferulic acid, aromadendrin, galangin and apigenin) in this extract, as demonstrated by HPLC-ESI-MS/MS.

Keywords Myrtaceae · Depression · Oxidative stress · Phenolic compounds

Introduction

Depression is a debilitating disease characterized by depressed mood, diminished interests, impaired cognitive function and vegetative symptoms, such as disturbed sleep or appetite. More than 300 million people live with depression, an increase of more than 18% between 2005 and 2015 (World Health Organization 2017). According to the World Health Organization (WHO 2017), depression will be the most common mental disorder in the world by 2030, affecting more people than diseases like cancer. Although several neurobiological-based hypotheses for the cause of depression have been proposed, the underlying molecular mechanisms remain obscure (Umeshima et al. 2017).

In depressive disorders, alteration in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, often linked to stress, has been frequently observed. In this process, there is deregulation of negative feedback on this axis, leading to a continuous elevation of cortisol secretion. Chronic corticosterone (CORT)

✉ Daniela Delwing-De Lima
daniela.delwing@univille.br; danielwing@hotmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil

² Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89030-203, Blumenau, SC, Brazil

³ Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil

⁴ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil

⁵ Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

administration in rodents is shown to promote depressive-like behaviors (Weng et al. 2016) and repeated CORT treatment alters antioxidant enzyme activities in the brain and increases pro-oxidant markers such as lipid peroxidation (Zafir and Banu 2009). Although depression is a multifactorial disease, oxidative stress, the result of excessive reactive oxygen species (ROS) production, has been implicated in the pathogenesis of this disorder (Ng et al. 2008). ROS may cause enzyme inhibition, lipid peroxidation and mitochondrial changes. Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) decompose ROS molecules, producing less toxic compounds (Zanoveli et al. 2016).

The use of alternative therapies is highly sought after by patients with depression, especially as medicinal plants. St. John's herb has been widely used for mild-to-moderate depression (Grundmann et al. 2010). *Lavandula officinalis* tincture, commonly known as English Lavender, has long been used in traditional medicine for some nervous disorders such as epilepsy and depression (Nikfarjam et al. 2017). Thus, developing safe and effective agents from traditional herbs may provide us with a good way to lessen their side effects, as well as improve their efficacy.

Eugenia catharinensis D. Legrand is a rare Myrtaceae species, found in lower layer Atlantic Rainforest in the States of Santa Catarina, Paraná and São Paulo and is popularly called Guaminim. The genus *Eugenia* L. (Myrtaceae) comprises about 1000 species, being one of the largest of the Myrtaceae family and has been widely used by the population for therapeutic purposes as a diuretic, hypoglycemic, antihypertensive, and anti-inflammatory, among others (Zaki et al. 2013). Another common species, *E. uniflora* is used in folk medicine for the treatment of symptoms related to depression and mood disorders (Colla et al. 2012). Different *Eugenia* species have presented antioxidant effects, which seem to be dependent on the phenolic compounds present in this genus (Magina et al. 2010).

In view of the growing number of individuals affected by depression worldwide, an understanding of the range of pharmacological effects of species from the Myrtaceae family is of extreme importance to investigate the possible antioxidant and antidepressant-like effects of other Myrtaceae species, such as *E. catharinensis*. The present study aims to investigate the antioxidant and antidepressant-like effects of the ethyl acetate extract from *E. catharinensis* (EAE) leaves in an animal model of depressive-like behavior induced by chronic CORT administration.

Material and methods

Analyses of phenolic compounds in the EAE were conducted in an Agilent® 1200 chromatograph with TurbolonSpray® as an ionization source coupled to a Qtrap® 3200 mass spectrometer. Biochemical analyzes were performed using a UV-

visible Shimadzu® spectrophotometer. All reagents are analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich®. Solvents used in the extraction process were obtained from Vetec.

Preparation of *Eugenia catharinensis* extract

Leaves from *Eugenia catharinensis* were collected in Blumenau, Santa Catarina, Brazil (26°90'63" S, 49°08'01" W) on October 2016. The identification was made by the botanical André Luís de Gasper. A voucher specimen from this plant was deposited in the Dr. Roberto Miguel Klein Herbarium (FURB, <http://furb.jbrj.gov.br>) under registration number 14995. The collected leaves were dried at room temperature and ground in a knife mill. The pulverized sample was macerated in three different solvents of different polarity, 70% ethyl alcohol, ethyl acetate and dichloromethane, to obtain crude extracts. The maceration process was carried out for three days, after which the extract was filtered, and the procedure was repeated once more. The extracts resulting from the two macerations were pooled and concentrated with a rotary evaporator under reduced pressure until complete drying.

Analysis of phenolic compounds in the EAE by HPLC-ESI-MS/MS

EAE was analyzed by HPLC-ESI-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization) in the LABEC (Laboratório de eletroforese capilar) at the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), according to Pauleti et al. (2017) with slight modifications. Analyses were conducted with a Phenomenex® Synergi 4 μ Polar-RP 80A (150 mm $\times$ 2 mm ID, particle size of 4 μ m) at a temperature of 30 °C. The eluents were formed by mixing solvents A (MeOH/H₂O in ratio of 95:5, v v⁻¹) and B (H₂O ultrapure/formic acid (0.1%) as follows: 1st stage – 10% solvent A and 90% B (isocratic mode) for 5 min; 2nd stage – linear gradient of solvents A and B (from 10 to 90% of A) for 2 min; 3rd stage – 90% solvent A and 10% B (isocratic mode) for 3 min; 4th stage – linear gradient of solvents A and B (from 90 to 10% of A) for 7 min with a flow rate of 250 μ L min⁻¹ for the mobile phase. For the analysis, an aliquot of 50 mg of EAE was resuspended in 5 mL of HCl at pH 2. These 5 mL were extracted three times with 2 mL of ethyl ether each, which were then combined. After drying the combined extract, it was stored sealed at -20 °C. To perform the analysis, the dried material was dissolved in 1 mL of MeOH and centrifuged at 12,000 rpm for 120 s. Three parts of the supernatant was added to 7 parts of ultrapurified water and the injected volume was 5 μ L.

For the identification of compounds, 47 standard phenolic compounds (4-aminobenzoic acid, 4-methyl-umbelliferone, 4-hydroxymethylbenzoic acid, p-anisic acid, caffeic acid, cinnamic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, ferulic acid,

gallic acid, mandelic acid, methoxyphenylacetic acid, *p*-coumaric acid, rosmarinic acid, salicylic acid, sinapic acid, syringic acid, vanillic acid, apigenin, aromadendrin, carnosol, catechin, chrysin, coniferaldehyde, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin-gallate eriodictyol, scopoletin, fustin, galangin, hispidulin, isoquercitrin, kaempferol, myricitrin, naringenin, naringin, pinocembrin, protocatechuic acid, quercetin, resveratrol, rutin, sinapaldehyde, syringaldehyde, taxifolin, umbelliferone and vanillin) diluted in methanol (1 mg L^{-1}) were analysed under the same conditions as described above. For the quantitative analysis of the identified compounds, the area of each peak was interpolated into calibration curves performed with the identified standards ($r^2 > 0.98$), under the same conditions of analysis. The experiments were performed in duplicate.

The liquid chromatograph was coupled to a mass spectrometer with an electrospray ionization source using a negative ionization mode with the following source parameters: ion spray interface at 400°C ; ion spray voltage of 4500 V ; curtain gas, 10 psi ; nebulizer gas, 45 psi ; auxiliary gas, 45 psi ; collision gas, medium. The Analyst® (version 1.5.1) software was used for recording and processing the data. Pairs of ions were monitored in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode.

Animals

Male Swiss mice (30–40 g) were used in the study and maintained at a constant temperature (26°C), under a 12:12 h light-dark cycle and with free access to water and food. Each animal was used only once and was sacrificed after the behavior tests by decapitation with no anesthesia. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85–23, revised 1985) were followed in all experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Brazil, under the protocol number 107/16. The animals were randomly divided into 10 experimental groups as follows: control 1, control 2, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 and G8. The animals of the control 1, G1, G3, G5 and G7 groups were treated for 21 days, subcutaneously (sc), with saline. For the animals of the Control 2, G2, G4, G6 and G8 groups CORT (Sigma-Aldrich®) was administered for 21 days at a dose of 20 mg/kg (sc). During the last 7 days of treatment, vehicle (distilled water with tween 80 2%) (control 1, control 2 groups) or EAE were administered at doses of 50 mg/Kg (G1, G2 groups), 125 mg/Kg (G3, G4 groups), 200 mg/Kg (G5, G6 groups) or 250 mg/Kg (G7, G8 groups). Twenty-four hours after the last treatment, the animals were submitted to behavioral tests before being sacrificed by decapitation. The hippocampi and cerebral cortexes were removed from animals for the evaluation of oxidative stress parameters (Fig. 1).

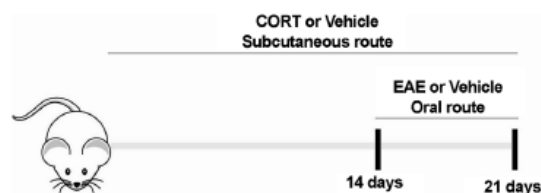


Fig. 1 Treatment procedure

Forced-swimming test

The test was performed in a plastic cylinder with 24 cm in height, 10 cm in diameter and 19 cm of water at 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). The immobility time was recorded. It is known that antidepressants generate an action that reduces the time of immobility in the forced swimming test (Porsolt et al. 1977).

Open field test

To eliminate the possibility of immobility reduction in the FST due to an increase in locomotor activity but not an antidepressant effect, a session was held in the OFT. The test was done in a wooden box measuring $40 \times 60 \text{ cm}$ and 50 cm high. The floor of the box is divided into 12 squares of equal size. The number of squares that each mouse crossed with all four legs for 6 min was recorded (Pauleti et al. 2017).

Oxidative stress determination procedure

The hippocampus and cerebral cortex were removed and kept on ice-cold buffered sodium phosphate (20 mM , $\text{pH } 7.4$, 140 mM KCl). The organs were homogenized in ten volumes ($1:10 \text{ w/v}$) of appropriate buffer, according to the technique to be performed. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuging at $800 \times g$ for 10 min at 4°C before discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded, and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for assaying the activity of antioxidant enzymes and damage to proteins and lipids (Delwing-de Lima et al. 2017).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979).

Total sulfhydryl content

The total thiol group concentration was determined by the method of Aksenov & Markesbery (Aksenov and Markesbery 2001).

Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method described by Aebi (1984), using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer.

Glutathione peroxidase assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate.

Superoxide dismutase assay (SOD)

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide ($O_2^{\cdot-}$), which is a substrate for SOD (Marklund 1985).

Protein determination

Protein was measured by the Lowry et al. (1951) method, using serum bovine albumin as standard (Lowry et al. 1951).

Statistical analysis

The results were evaluated through the Kolmogorov-Smirnov normality test and the two-way ANOVA was performed afterwards, followed by the Newman-Keuls test, when necessary. The effects of CORT administration in the CAT, SOD and GSH-Px activities, TBA-RS levels and total sulfhydryl content were analyzed by the student-*t* test. The results were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

The mass spectra data and results of quantification of the compounds identified are shown on Table 1. Results indicate that from the 47 phenolic standards, 15 of them could be identified in the EAE extracts, of which 9 were phenolic acids and 5 were flavonoids. 14 of these compounds could be quantified, with the exception of rutin, whose concentration was below the limit of quantification of the methodology applied.

In order to verify the antidepressant-like effect of the EAE, the animals were treated with the extract at doses of 50, 125, 200 and 250 mg/Kg. As shown in Fig. 2, EAE (50, 125 and 200 mg/Kg), decreased the immobility time of mice in the FST, when compared to the control group, and CORT (20 mg/Kg) treatment provoked a depressive-like behavior (Fig. 2a). EAE was able to reverse the effect caused by CORT, without altering the animals' locomotion at OFT (Fig. 2b) indicating that the reduction in the animals' immobility time in the FST is not due to a psychostimulant effect. Several species belonging to the *Eugenia* genus have shown antidepressant-like effects in mice; these species include *E. brasiliensis*, *E. catharinae*, *E. umbelliflora* (Colla et al. 2012) and *E. uniflora* (Novack et al. 2013).

Although depression has been strongly associated with genetic causes, other factors, such as the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, especially the release of glucocorticoids, have been associated with increased risk of depression development. Some animal models used to study depression have focused on chronic CORT administration, which increases the animal's immobility time in the FST (Levinstein and Samuels 2014). Our results are consistent

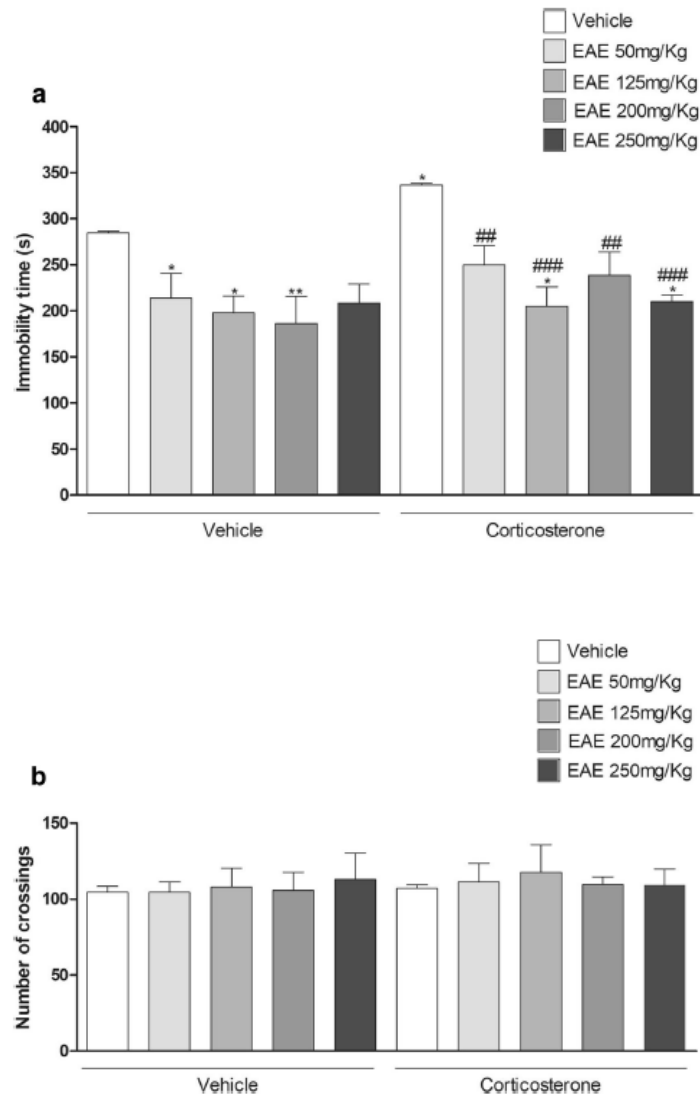
Table 1 Phenolic compounds identified in EAE by HPLC-ESI-MS/MS

Compounds	Rt (min)	Calculated mass (M)	Experimental mass (M-H) ⁺	MS/MS (<i>m/z</i>)	Concentration* ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Gallic acid	2.79	170.12	168.83	122.70	185.10 ± 9.40
Protocatechuic acid	9.10	154.12	152.92	109.00	6.51 ± 0.17
Syringic acid	9.69	198.17	196.86	119.60	76.85 ± 11.29
4-hydroxy methylbenzoic acid	9.99	152.15	150.96	107.00	5.69 ± 0.17
Chlorogenic acid	10.58	354.31	353.15	191.00	1.25 ± 0.09
Salicylic acid	10.58	138.12	136.85	90.11	135.91 ± 12.30
Caffeic acid	10.76	180.16	178.92	135.00	5.29 ± 2.58
Vanillic acid	10.90	168.14	166.92	108.00	55.06 ± 11.02
<i>p</i> -coumaric acid	12.19	164.05	162.92	119.00	10.09 ± 0.01
Isoquercetin	12.34	464.38	465.10	303.10	2.78 ± 1.09
Rutin	12.46	610.52	611.10	303.10	< LOQ
Ferulic acid	12.77	194.18	192.95	134.00	2.99 ± 0.07
Aromadendrin	13.81	288.25	287.01	125.00	4.07 ± 1.43
Galangin	17.35	270.24	271.10	77.10	2.18 ± 0.13
Apigenin	17.79	270.24	271.00	153.10	2.14 ± 0.25

Rt, retention time; LOQ, limit of quantification

*Concentrations are shown as means ± standard deviation

Fig. 2 Effects of EAE, administered by the oral route, in the FST (a) and OFT (b). Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with vehicle-treated group (control); ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ as compared with the same group pretreated with CORT ($n = 7$)



with this model, since CORT treatment increased the immobility time in the FST. Furthermore, EAE reversed the effect exerted by CORT in the FST. Some antidepressant treatments reverse the effects of CORT on the depression-like behaviour of animals (Rainer et al. 2012). The increase in immobility time in the FST is characteristic of a depressive-like behaviour, while the inverse corresponds to an antidepressant-like effect (Porsolt et al. 1977).

CORT is toxic for neurons and causes an increase in ROS, which, when elevated due to an imbalance in the production and efficiency of antioxidant defences, leads to oxidative stress. Due to high rate of oxygen consumption, the central nervous system (CNS) is more vulnerable to free radical formation and consequently neuronal damage has been

implicated in depression (Zafir and Banu 2009). Antioxidant enzymes, such as CAT, SOD and GSH-Px, are essential for neutralizing these free radicals; however, these enzymes are altered in depression (Thakare et al. 2017). During oxidative stress, the amount of ROS produced promotes lipid peroxidation, which causes injury to tissue cells. This process can be illustrated by the increase in the TBA-RS levels, a parameter of lipid oxidation that reflects the amount of malondialdehyde formation, a product of membrane fatty acid peroxidation. Moreover, experimental animals subjected to CORT treatment (20 mg/Kg, 21 days) exhibit elevated TBA-RS levels in the brain (Zeni et al. 2017).

In order to determine the effects of CORT administration on CAT, SOD and GSH-Px activities, TBA-RS levels and

total sulfhydryl content in the cerebral cortex and hippocampus, mice were treated with CORT (20 mg/Kg) or saline. CORT treatment increased CAT and SOD activities in the cerebral cortex (Fig. 3a) and hippocampus (Fig. 4a) of mice. However, the GSH-Px activity was decreased only in the hippocampus (Fig. 4a) after CORT administration. Figures 3b and 4b show the effects of CORT on TBA-RS levels, which were increased only in the cerebral cortex. CORT treatment did not change the sulfhydryl content in the cerebral structures of mice (Figs. 3c and 4c). These findings can be explained by

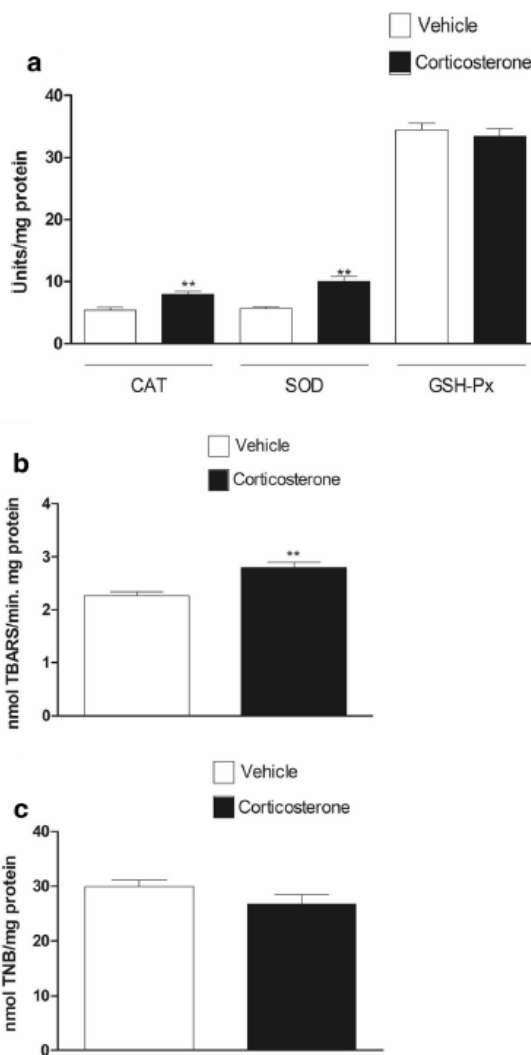


Fig. 3 Effects of corticosterone administration on CAT, SOD and GSH-Px activities (a), TBA-RS levels (b) and total sulfhydryl content (c) in the cerebral cortex of mice. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., ** $p < 0.01$, as compared with vehicle-treated group (control) ($n = 6$)

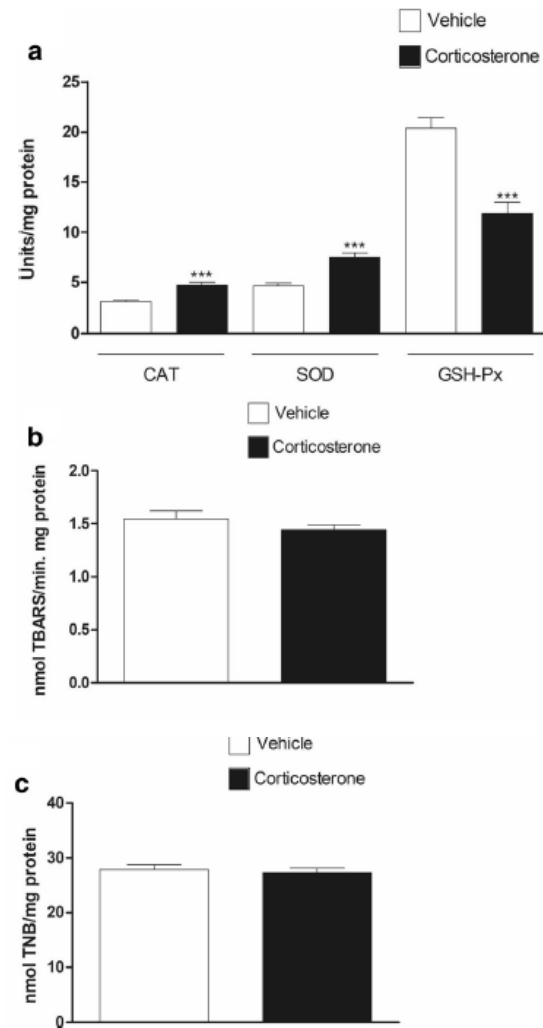
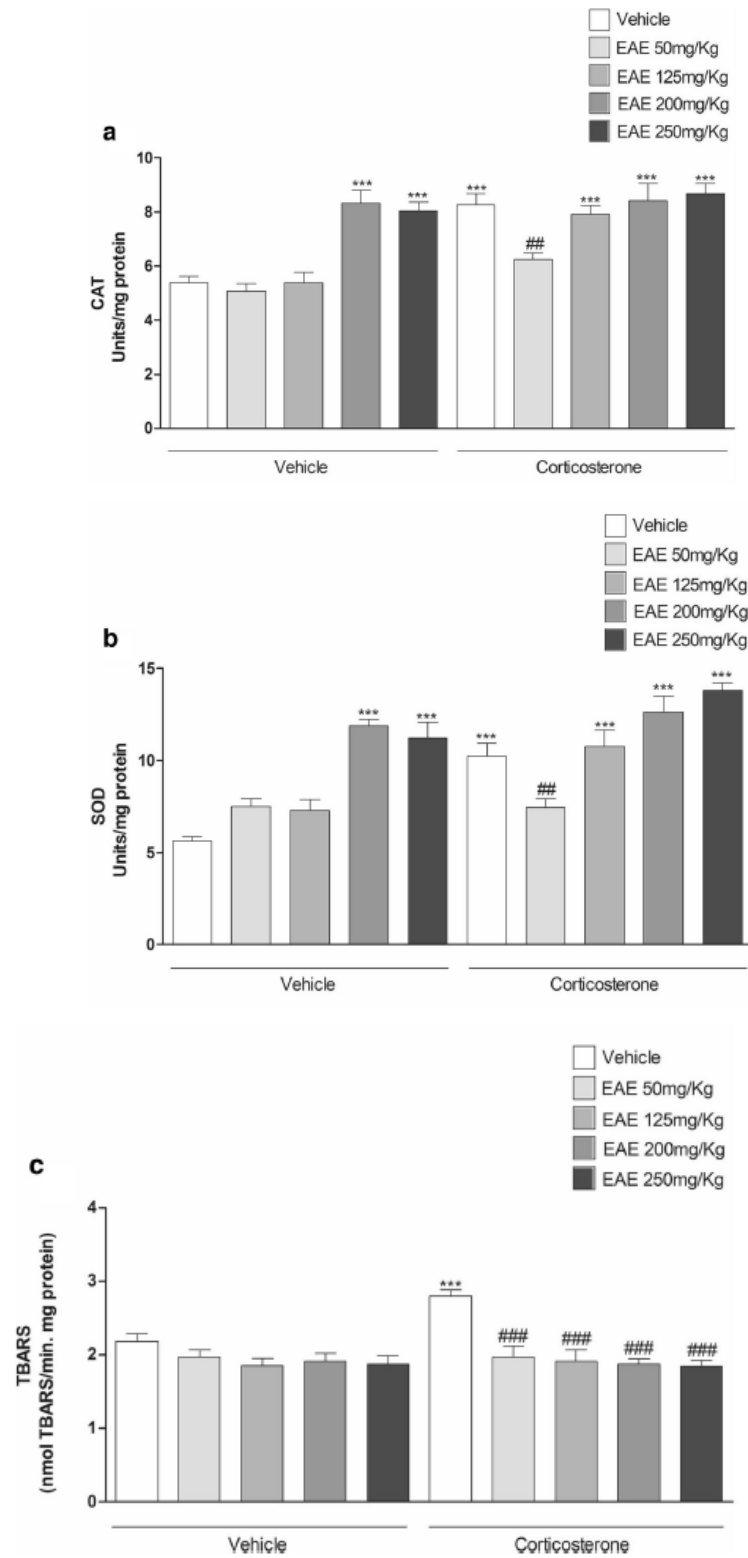
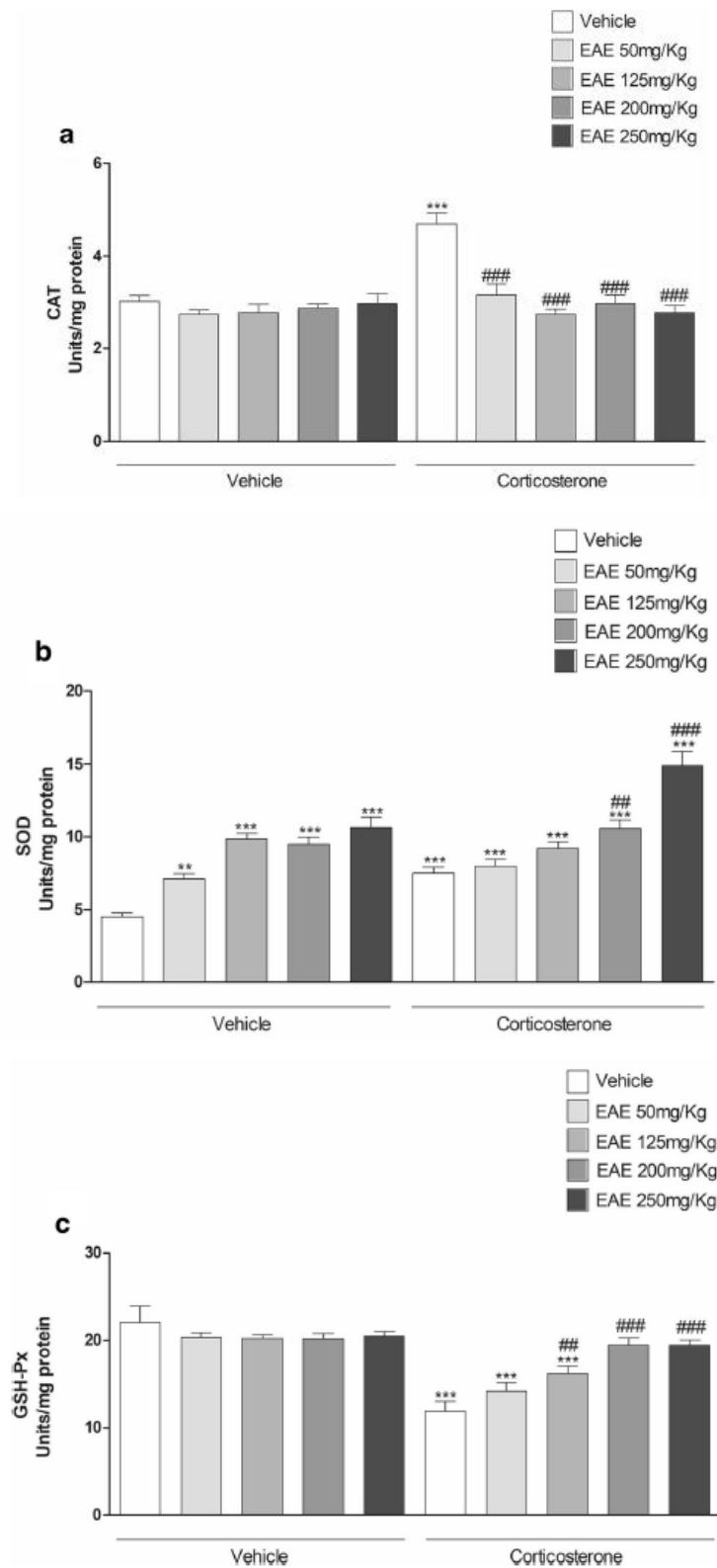


Fig. 4 Effects of corticosterone administration on the CAT, SOD and GSH-Px activities (a), TBA-RS levels (b) and total sulfhydryl content (c) in the hippocampi of mice. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., *** $p < 0.001$, as compared with vehicle-treated group (control) ($n = 6$)

the fact that CORT leads to overproduction of ROS, resulting in an increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation. In animal models of stress, CORT levels appear elevated in the brain, in association with an increase in lipid peroxidation (Thakare et al. 2017). An overproduction of ROS has been

Fig. 5 Effects of EAE administration on corticosterone-induced alterations in the antioxidant enzymes in the cerebral cortex of mice. CAT (a) and SOD (b) activities and TBA-RS (c) levels. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., *** $p < 0.001$, as compared with vehicle-treated group (control); ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, as compared with the same group that was pretreated with CORT ($n = 7$)





reported, as well as an increase in the antioxidant enzyme activities in patients with depression, besides lipid peroxidation (Bilici et al. 2001). Furthermore, our results show that CORT decreased GSH-Px activity in the hippocampi of mice, which may indicate the consumption of this enzyme during removal of excess ROS or a decrease in its co-factor, glutathione (GSH). A study, conducted by Abuelezz and Hendawy (2017), showed a decreased in the GSH levels in the hippocampus of rats submitted to chronic restraint stress (CRS) with the elevation of CORT levels.

Since oxidative stress and depression have been correlated, we evaluated the antioxidant effect of EAE. Based on previous results, we measured only the oxidative stress markers that were altered in the cerebral cortex and hippocampus of mice (Figs. 5 and 6). CORT pre-treatment generated oxidative stress and altered antioxidant enzymes in the cerebral cortex. The administration of EAE for 7 consecutive days, at doses of 200 mg/Kg and 250 mg/Kg, led to significant increases in the CAT and SOD activities and reversed the effect exerted by CORT at the dose of 50 mg/Kg. Two-way ANOVA demonstrated that EAE per se did not alter TBA-RS levels and reversed the effect elicited by CORT pre-treatment (Fig. 5c).

In the hippocampus of mice, the activities of both, CAT and SOD increased, and the activity of GSH-Px decreased, after the CORT administration (Fig. 6). In addition, EAE treatment at doses of 50, 125, 200 and 250 mg/Kg was able to increase SOD activity (Fig. 6b) without altering CAT (Fig. 6a), when compared to the control group. EAE treatment reversed the increased in CAT activity elicited by CORT. However, at doses of 200 and 250 mg/Kg, when administrated in animals that received CORT, EAE enhanced the SOD activity when compared to the CORT-treated group. With regard to GSH-Px, CORT decreased its activity, and the EAE treatment, at doses of 125, 200 and 250 mg/Kg, reversed the effect of CORT on GSH-Px activity (Fig. 6c).

These findings indicate that EAE improves antioxidant defences in the brain areas, since it was able to increase the activities of antioxidant enzymes. Ethyl acetate fractionation from different species of *Eugenia*, such as *E. brasiliensis* and *E. beaurepaireana*, has demonstrated antioxidant potential, due to the high 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical uptake of these extracts (Magina et al. 2010).

There is a well-documented association between the appearance of depressive behaviour and an increase in oxidative stress in specific brain areas, including the hippocampus and cerebral cortex (de Moraes et al. 2014); our data show that

EAE, at all doses tested, can reverse the lipid peroxidation promoted by CORT in the cerebral cortex. In addition, EAE treatment maintained SOD and CAT activities elevated in the cerebral cortex. In the hippocampus, there was a reversal of the effect of CORT on CAT activity after EAE administration, with SOD and GSH-Px activities maintained elevated. Taken together, these data indicate an antioxidant action of EAE. A study conducted by Novack et al. (2013), in which the antidepressant-like effect of *E. uniflora* was observed, demonstrated that this species has an antioxidant effect in vitro in cerebral regions. The antidepressant-like effect elicited by *E. uniflora* seems to be related to its antioxidant effect (Novack et al. 2013). Several antidepressants used in clinical practise, including fluoxetine, possess antioxidant effects. Cilostazol, a potential antidepressant agent, prevents lipid peroxidation and the decrease in GSH levels in the brain (Abuelezz and Hendawy 2017).

Studies have shown that polyphenolic compounds present bioactive substances with antioxidant properties that can be used for therapeutic purposes, in order to avoid oxidative damage induced by free radicals and lipid peroxidation (Magina et al. 2010). The antioxidant and antidepressant-like effects of EAE observed in the present study may be due to the presence of phenols in this extract. At the beginning of the work, extractions of *Eugenia catharinensis* were performed using dichloromethane, hydroalcoholic solution at 70% and ethyl acetate as solvents. The ethyl acetate extract showed major yield, being twice in relation to the other two solvents. In addition, in the assay of phenolic contents, ethyl acetate extract presented the highest content of phenolic compounds, as well greater diversity of them (unpublished data). This fact led us to choose ethyl acetate as extraction solvent, since we were searching for compounds with antioxidant activity. Thus, these results guided the continuation and zooming the studies using the ethyl acetate extract. A number of phenols have been identified in different *Eugenia* species, such as *E. elliptica*, *E. orbiculata* and *E. tinifolia*, and these compounds all exhibited free radical scavenging activity and were able to inhibit microsomal lipid peroxidation (Neergheen et al. 2006). Furthermore, antidepressant-like (Pauleti et al. 2017) and antioxidant (Espinosa et al. 2015) activities have been reported for *p*-coumaric acid.

Conclusion

We, herein, show for the first time that EAE exerts antidepressant-like effects on a depression model induced by chronic CORT treatment, in association with antioxidant effects on CORT-induced oxidative stress. Additionally, we postulate that the effects demonstrated by EAE are dependent on the presence of phenolic compounds in this extract. However, further studies need to be conducted to confirm these data.

Fig. 6 Effects of EAE administration on corticosterone-induced alterations in antioxidant enzymes in the hippocampus of mice. CAT (a), SOD (b) and GSH-Px activities. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with vehicle-treated group (control); ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ as compared with the same group that was pretreated with CORT ($n = 6$)

Acknowledgements This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number 431280/2016-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (grant number 1066/2016), Universidade da Região de Joinville and Universidade Regional de Blumenau.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing financial interest.

References

- Abuelezz SA, Hendawy N (2017) Insights into the potential antidepressant mechanisms of cilostazol in chronically restraint rats: impact on the Nrf2 pathway. *Behav Pharmacol* 1:1–13
- Aebi H (1984) [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145
- Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu A, Bekaroglu M, Deger O (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64(1):43–51
- Colla RS, Machado DG, Bettio LEB, Colla G, Magina MDA, Brighente MC, Lu A (2012) Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *J Ethnopharmacol* 143(2):720–731
- de Moraes H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreolini R, da Cunha JM, Zanoveli JM (2014) Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res* 1(258):52–64
- Delwing-de Lima D, Fröhlich M, Dalmedico L, Gruenewaldt J, Aurélio M, Delwing Dal Magro D, Pereira EM, Wyse ATS (2017) Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants. *Metab Brain Dis* 32:359–368
- Espinosa RR, Inchingolo R, Alencar SM, Rodriguez-Estrada MT, Castro IA (2015) Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food Chem* 1(182):95–104
- Grundmann O, Lv Y, Kelber O, Butterweck V (2010) Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the interrelationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neuropharmacology* 58:767–773
- Levinstein MR, Samuels BA (2014) Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. *Front Behav Neurosci* 27(8):1–12
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265–275
- Magina MA, Gilioli A, Moresco HH, Colla G, Pizzolatti MG, Brighente IMC (2010) Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat Am J Pharm* 29(3):376–382
- Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook for oxygen radical research*. CRC press, Boca Raton Florida, pp 243–247
- Neergheen VS, Soobrattee MA, Bahorun T, Aruoma OI (2006) Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. *J Plant Physiol* 163(8):787–799
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AL (2008) Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11(6):851–876
- Nikfarjam M, Rakhshan R, Ghaderi H (2017) Comparison of effect of *Lavandula officinalis* and venlafaxine in treating depression: a double blind clinical trial. *J Clin Diagn Res* 1(7):KC01–KC04
- Novack F, De Siqueira A, Savegnago L, João E (2013) Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. *Neurosci Lett* 544:105–109
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Pauleti NN, Melo J, Siebert DA, Micke GA, Albuquerque CAC, Alberton MD, Barauna SC (2017) Characterisation of phenolic compounds of the ethyl acetate fraction from *Tabernaemontana catharinensis* and its potential antidepressant-like effect. *Nat Prod Res* 1:1–4
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327–336
- Rainer Q, Xia L, Guilloux J, Gabriel C, Mocaer E, Hen R, Enhamre E, Gardier AM, David DJ (2012) Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol* 15(3):321–335
- Thakare VN, Dhakane VD, Patel BM (2017) Attenuation of acute restraint stress-induced depressive like behavior and hippocampal alterations with protocathechuic acid treatment in mice. *Metab Brain Dis* 32(2):401–413
- Umehara H, Numata S, Watanabe SY, Hatakeyama Y, Kinoshita M, Tomioka Y, Nakahara K, Nakawa T, Ohmori T (2017) Altered KYN/TRP, Gln/Glu, and met/methionine sulfoxide ratios in the blood plasma of medication-free patients with major depressive disorder. *Sci Rep* 7(1):1–8
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–333
- Weng L, Guo X, Li Y, Yang X, Han Y (2016) Apigenin reverses depression-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Eur J Pharmacol* 5(774):50–54
- World Health Organization, 2017. Depression: let's talk. Accessed on 02 September 2017, http://who.int/mental_health/management/depression/en/
- Zafir A, Banu N (2009) Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12(2):167–177
- Zaki MA, Balachandran P, Khan S, Wang M, Mohammed R, Hetta MH, Pasco DS, Muhammad I (2013) Cytotoxicity and modulation of cancer-related signaling by (Z)- and (E)-3,4,3',5'-tetramethoxystilbene isolated from *Eugenia rigida*. *J Nat Prod* 76(4):679–684
- Zanoveli JM, de Moraes H, Dias IC, Schreiber AK, de Souza CP, da Cunha JM (2016) Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment. *Curr Diabetes Rev* 12:165–178
- Zeni ALB, Camargo A, Dalmagro AP (2017) Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Steroids* 125:131–136

ANEXO 3 – ARTIGO 2

***Eugenia catharinensis* D. Legrand Exerts Antioxidant Effects on the Hippocampus and Cerebral Cortex of Mice Treated Chronically with Corticosterone.**

Sara Cristiane Barauna^{†, ‡}, Débora Delwing Dal Magro[‡], Dayse Fabiane Machado de Melo[⊥], Dara Lucas de Albuquerque[§], Heloiza de Castro[§], Taynara Cristiana da Cruz Ferreira[§], Tahyná Patachini Maia[§], Maria Isabela Zago[‡], Tauani dos Santos Cordeiro[‡], Michele Debiasi Alberton[⊥], Diogo Alexandre Siebert^{||}, Luciano Vitali^{||}, Gustavo Amadeu Mücke^{||}, Daniela Delwing de Lima^{†, §*}

[†]Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

[‡]Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89030-203, Blumenau, SC, Brazil.

[§]Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

[⊥]Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

^{||}Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

This study investigated the phenolic profile of the hydroalcoholic (HAE) and dichloromethane (DME) extracts of *Eugenia catharinensis* and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant effects on oxidative stress parameters induced by corticosterone treatment in mice. Swiss mice received saline or corticosterone for 21 days (20mg/Kg) and, during the last 7 days, were co-administered with HAE, or DME (50, 125, 200 or 250mg/Kg) or vehicle. After 24 hours, the cerebral cortex was removed and oxidative stress parameters were analyzed. The phenolic compositions of the extracts were evaluated by HPLC-ESI-MS/MS. A total of 18 phenolic compounds were identified in the HAE and DME extracts. *In vitro* antioxidant activity assays demonstrated that all tested samples had decreased DPPH concentrations, while the HAE extract presented high iron (III) reducing activity. However, this profile was not observed in the lipid peroxidation inhibition assay, where DME was found to inhibit $42.5 \pm 7.3\%$ of lipid peroxidation, while the HAE extract presented lower lipid peroxidation inhibitory activity. Corticosterone generated oxidative stress in mice, altering antioxidant enzymes and TBA-RS levels in the nervous tissue. HAE increased the CAT and SOD activities in the hippocampi and cerebral cortices and decreased TBA-RS levels in cortex, while the DME extract increased only SOD activity in the cortex and CAT activity in the hippocampus. DME reversed the effects of CORT on CAT activity, but HAE and DME reversed the effect of CORT on SOD activity. Both HAE and DME, at all doses tested, reversed the effects of CORT on TBA-RS levels in cerebral cortices. With regard to the hippocampus, HAE treatment was able to reverse the effect caused by CORT on CAT and GSH-Px activities. DME extract treatment reversed the effects of CORT on the SOD and GSH-Px activities. In conclusion, our results indicate that *Eugenia catharinensis* exerts antioxidant effects on corticosterone-induced oxidative stress in the cerebral cortex of mice; these effects appear to be mediated by phenolic compounds in the extracts of this species.

Key-words: Oxidative Stress, Myrtaceae, Corticosterone.

Financial support: FAPESC, CNPq, FURB and UNIVILLE.

INTRODUCTION

Eugenia catharinensis D. Legrand, popularly called Guamirim, is a rare Myrtaceae species, found in the States of Santa Catarina, Paraná and São Paulo. The Myrtaceae family has been used in folk medicine due to its hypoglycemic, antihypertensive, diuretic, and anti-inflammatory properties, amongst other effects (Zaki et al. 2013). *E. uniflora* has also been used by the population for the treatment of mood disorders, such as depression (Colla et al. 2012). We previously demonstrated that *E. catharinensis* ethyl acetate extract has antioxidant and antidepressant-like effects, in a model of depression induced by corticosterone (CORT) (Barauna et al. 2018). Another species of the *Eugenia* genus has demonstrated antioxidant effects, which may be due to the large number of phenolic compounds present in these plants (Magina et al. 2010).

Chronic corticosterone (CORT) treatment alters antioxidant enzyme activities in the brain and increases pro-oxidant markers, such as lipid peroxidation (Zafir and Banu, 2009), resulting in the production of excessive reactive oxygen species (ROS), which generate oxidative stress, an injurious process that causes protein, lipid, carbohydrate and DNA oxidation. ROS are involved in lipid peroxidation, enzyme inhibition and mitochondrial changes. These molecules can be decomposed by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), which produce less toxic compounds (Zanoveli et al. 2016). Due to their high oxygen uptake, brain cells are particularly sensitive to oxidative damage and several disorders have been associated with oxidative stress, such as psychiatric disorders, cardiovascular and autoimmune diseases, diabetes, arthritis, and cancer (Iannitti & Palmier 2009; Maes et al. 2011).

The use of medicinal plants dates from the beginning of humanity, and constitutes a major antioxidant source, due to high secondary metabolite concentrations, such as phenolic compounds, which present reducing properties. These compounds are largely distributed in the *Eugenia* genus (Magina et al. 2010) and are responsible for the antioxidant effects of *Eugenia uniflora* (Tambara et al. 2018), *Eugenia Uvalha* (Lopes et al. 2018) and *Eugenia dysenterica* (Thomaz et al. 2018). Since medicinal plants, such as *Eugenia* genus, are considered to be natural sources of antioxidant compounds and artificial antioxidants products may play roles in development of different types of cancer, understanding the antioxidant effects of *Eugenia catharinensis* is of great importance. The present study aims to investigate the antioxidant

effects of the hydroalcoholic (HAE) and dichloromethane (DME) extracts of *E. catharinensis* leaves in an animal model of oxidative stress induced by chronic CORT administration.

MATERIAL AND METHODS

Animals and reagents

Male Swiss mice (30-40g) obtained from the Central Animal House of the Regional University of Blumenau, Blumenau, Brazil, were used in the experiments. The animals were maintained on a 12h light/dark cycle at a constant temperature ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), with free access to food and water. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85–23, revised 1985) were followed in all the experiments and experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the local Institution (107/2016). All reagents were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Plant material and extract preparation

Leaves from *E. catharinensis* were collected in October 2016 in Blumenau, Santa Catarina, Brazil ($26^{\circ}90'63''$ S, $49^{\circ}08'01''$ W). The botanist, Dr. André Luís de Gasper, identified plants as *E. catharinensis* and a voucher specimen was deposited in the Dr. Roberto Miguel Klein Herbarium (FURB, <http://furb.ibri.gov.br>, Gasper et al., 2014) under registration number 14995. Leaves were dried at room temperature and then ground in a knife mill. To obtain crude extracts, two different solvents were used to macerate the sample (70% ethyl alcohol and dichloromethane). The maceration process was carried out for three days, after which the extract was filtered, and the procedure was repeated once more. The extracts resulting from the two macerations were pooled and concentrated with a rotary evaporator, under reduced pressure until extracts were completely dried, yielding the HAE (19.7 g, 5.5 %) and DME (8.4 g, 2.5 %) extracts.

In vitro antioxidant assays

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) free radical scavenging assay. The assay for the determination of antioxidant activity using the DPPH free radical is based on the method described by Cavin et. al (1998), with slight modifications. Two mL of a DPPH solution (0.004 % in methanol) was added to 1 mL of the test solutions at concentrations ranging from 1.000 to $0.34\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The mixture was shaken and allowed to stand for 30 min in the dark. The

absorbance of the solutions was determined in a UV-Vis spectrophotometer (517 nm). For each sample, a blank solution (1 mL of test solution + 2 mL methanol) was used in order to discount the possible interference of the extract. Butyl hydroxy toluene (BHT) was used as a positive control and a solution of 2 mL of DPPH and 1 mL of methanol was used as the negative control. Inhibition of the DPPH radical was calculated by the following formula: DPPH scavenging effect (%) = $[A_0 - A_1/A_0] \times 100$, Where A_0 and A_1 are the absorbance at 30 minutes of the negative control and the sample, respectively. The antiradical activity was expressed as IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the extract dose required to cause a 50 % decrease in absorbance at 517 nm, where a lower IC_{50} value corresponds to a higher antioxidant activity. The tests were performed in triplicate.

Determination of iron (III) reducing power. Reducing power was determined according to the method of Waterman & Mole (1994). The reducing power assayed is the ability of the extracts to form a colored complex with ferricyanide, which is an electron acceptor. Each extract ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) in methanol (0.1 mL) was mixed with 1.0 mL of 0.1 M FeCl_3 and, after 3 minutes, 1.0 mL of 0.008 M potassium ferricyanide was added. The mixture was incubated in the dark and at room temperature. After 15 minutes, the absorbance was measured at 720 nm against a blank. A higher absorbance indicates a higher reducing power. The iron reducing power was expressed as mg Ascorbic acid/g dry extract (mgAA/g), using the standard curve of Ascorbic acid, determined by linear regression ($R^2 = 0.9951$): $Y = 0.0019X + 0.0698$.

Determination of antioxidant activity using the β -carotene linoleate model system. Antioxidant activity was measured using the methods of Mokbel and Hashinaga (2006) with slight modifications. A 3.0 mg β -carotene solution in chloroform (1 mL), 45 mg of linoleic acid and 215 mg of Tween-80 were mixed well. Chloroform was removed at 40°C under vacuum using a rotary evaporator. The resulting mixture was immediately diluted with 5–10 mL of distilled water and was mixed well. The emulsion was further made up to 100 mL with 0.01 M hydrogen peroxide (H_2O_2). Aliquots (2 mL) of this emulsion were transferred into different test tubes containing 0.1 mL of test samples in methanol ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). In this experiment, BHT was used for comparative purposes. A negative control containing 0.1 mL of methanol and 2 mL of the above emulsion was prepared. The tubes were placed at 50°C in a water bath. Absorbances of all the samples at 470 nm were taken at time zero min and every 30 min until

180 minutes. A blank mixture was prepared as above, but without β -carotene. The antioxidant activity was calculated as follows: $AA\% = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$, where: A_0 and A_t are the absorbances of the sample at time zero and after 180 minutes, respectively, and A_0^0 e A_t^0 are the absorbances of the negative control at time zero and after 180 minutes.

Determination of total phenolic content (TPC)

The Total Phenolic Content (TPC) was determined by the Folin–Ciocalteu method, as described by Anagnostopoulou et al (2006). DPPH solution (2 mL, 0.004% in methanol) was added to 0.25 mL of test samples diluted in methanol ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Subsequently, 5 mL of distilled water and 0.5 mL of the Folin–Ciocalteu's reagent were added. After a period of 3 min, 1 mL of saturated sodium carbonate solution was added and the flasks were shaken and allowed to stand for 1 h. Absorbance was measured at 725 nm; total phenolic content was expressed as mg gallic acid/g dry extract (mgGA/g), using the standard curve of Gallic acid, determined by linear regression ($R^2 = 0.9939$): $Y = 0.0074X - 0.0844$.

Determination of total flavonoid content (TFC)

Total Flavonoid Content (TFC) was determined by the modified AlCl_3 method, as described by Woisky and Salatino (1998). An aliquot of 0.5 mL test solution, diluted in methanol ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), was mixed with 0.5 mL of 2% AlCl_3 in methanol. After 1 h of incubation at room temperature, the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm against the sample blank (methanol). Results are expressed as mg Quercetin/g of dry extract (mg QE/g), using the standard curve of quercetin, determined by linear regression ($R^2 = 0.9967$): $Y = 0.0019X + 0.0698$.

Determination of phenolic compounds in the HAE and DME extracts by HPLC-ESI-MS/MS

The phenolic compounds present in the hydroalcoholic (HAE) and dichloromethane (DME) extracts were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization) at the LABEC (Laboratório de eletroforese capilar) at the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), according to Siebert et al. (2019). Analyses were conducted with a Phenomenex® Synergi 4 μ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm ID, particle size of 4 μm) at a temperature of 30 °C. The eluents were formed by mixing solvents A (MeOH/H₂O in ratio of 95:5, v v⁻¹) and B (H₂O

ultrapure/formic acid (0.1 %) as follows: 1st stage – 10 % solvent A and 90 % B (isocratic mode) for 5 minutes; 2nd stage – linear gradient of solvents A and B (from 10 to 90 % of A) for 2 minutes; 3rd stage – 90 % solvent A and 10 % B (isocratic mode) for 3 minutes; 4th stage – linear gradient of solvents A and B (from 90 to 10 % of A) for 7 minutes with a flow rate of 250 $\mu\text{L min}^{-1}$ for the mobile phase.

For the analysis, aliquots of 50 mg of HAE and DME were resuspended in 5 mL of HCl at pH 2. Solutions were extracted three times, each with 2 mL of ethyl ether, and extracts were then combined. After drying, the combined extracts were stored sealed at -20 °C. To perform analyses, the dried material was dissolved in 1 mL of MeOH and centrifuged at 12,000 rpm for 120 s. Three parts of the supernatant were added to 7 parts of ultrapurified water and the injected volume was 5 μL .

For the identification of compounds, 47 standard phenolic compounds (4-aminobenzoic acid, 4-methyl-umbelliferone, 4-hydroxymethylbenzoic acid, *p*-anisic acid, caffeic acid, cinnamic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, ferulic acid, gallic acid, mandelic acid, methoxyphenylacetic acid, *p*-coumaric acid, rosmarinic acid, salicylic acid, sinapic acid, syringic acid, vanillic acid, apigenin, aromadendrin, carnosol, catechin, chrysin, coniferaldehyde, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin-gallate eriodictyol, scopoletin, fustin, galangin, hispidulin, isoquercetrin, kaempferol, myricetrin, naringenin, naringin, pinocembrin, protocatechuic acid, quercetin, resveratrol, rutin, sinapaldehyde, syringaldehyde, taxifolin, umbelliferone and vanillin) were diluted in methanol (1 mg L⁻¹) and analyzed under the same conditions, as described above. For the quantitative analysis of the identified compounds, the area of each peak was interpolated into calibration curves performed with the identified standards ($r^2 > 0.98$), under the same conditions of analysis; experiments were performed in duplicate.

The liquid chromatograph was coupled to a mass spectrometer with an electrospray ionization source, using a negative ionization mode, with the following source parameters: ion spray interface at 400 °C; ion spray voltage of 4500 V; curtain gas, 10 psi; nebulizer gas, 45 psi; auxiliary gas, 45 psi; collision gas, medium. The Analyst® (version 1.5.1) software was used for recording and processing the data. Pairs of ions were monitored in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode.

Experimental procedure

Mice were randomly divided into groups as follows: Control 1, control 2, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 and G8. The animals of the control 1, G1, G3, G5 and G7 groups were treated subcutaneously (sc) with saline for 21 days, while the control 2, G2, G4, G6 and G8 groups received CORT (Sigma-Aldrich®) for 21 days at a dose of 20mg/kg (sc). During the last 7 days of treatment, vehicle (distilled water with 2% tween 80) (control 1, control 2 groups) or extracts were administered at doses of 50mg/Kg (G1, G2 groups), 125mg/Kg (G3, G4 groups), 200mg/Kg (G5, G6 groups) or 250mg/Kg (G7, G8 groups). Mice were sacrificed by decapitation 24hs after the last treatment. The hippocampus and cerebral cortex were removed and oxidative stress parameters were analyzed.

Oxidative stress determination

After removal, the hippocampus and cerebral cortex were kept on ice-cold buffered sodium phosphate (20 mM, pH 7.4, 140 mM KCl) and then, according to the technique to be performed, were homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) in ten volumes (1:10 w/v) of appropriate buffer. Homogenates received 5 pulses and were centrifuged at 800g for 10 min at 4°C before discarding the nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for assaying the activity of antioxidant enzymes and damage to lipids (Delwing-de Lima et al., 2017).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS): TBA-RS was determined according to a method, described by Ohkawa et al. (1979), that measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, produced mainly by hydroxyl free radicals. Initially cortex and hippocampus in 1.15% KCl were mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was expressed as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

Catalase Assay (CAT): CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984). The method used is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H₂O₂) at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. One CAT unit is defined as 1 µmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Glutathione Peroxidase (GSH-Px): GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), except for the concentration of NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests performed in our laboratory. The decomposition of NADPH was monitored for 4 minutes in a spectrophotometer at 340 nm. The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15 U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butylhydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is reported as GSH-Px units/mg of protein.

Superoxide Dismutase (SOD): This method for the assay of SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on O₂, which is a substrate for SOD (Marklund, 1985). Fifteen μ L of each sample were added to 215 μ L of a mixture containing 50 μ M Tris buffer, 1 μ M EDTA, pH 8.2, and 30 μ M CAT. Subsequently, 20 μ L of pyrogallol were added and the absorbance was measured every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a spectrophotometer. Inhibition of auto-oxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, the activity of which can be indirectly tested spectrophotometrically. One unit of SOD is defined as the amount of SOD required to inhibit 50% of the auto-oxidation of pyrogallol, and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

Protein determination: Protein was measured by the Lowry et al. (1951) method, using serum bovine albumin as standard.

Statistical Analysis

Results were evaluated through the Kolmogorov-Smirnov normality test and two-way ANOVA was then performed, followed by the Newman-Keuls test when necessary. Results were considered as significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Determination of phenolic compounds in the HAE and DME extracts by HPLC-ESI-MS/MS

In order to establish a profile of phenolic compounds present in HAE and DME, we performed the hyphenated technique of HPLC-ESI-MS/MS - High-performance liquid

chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization. The identification of phenolic compounds was based on their molecular formula, fragmentation pattern and comparison with the retention times of commercially available phenolic acid, hydrolysable tannins and flavonoid standards. This method consists of a liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer with an electrospray ionization source. The advantage of this technique is that the identification/quantification of a particular analyte is performed by monitoring the transition from the precursor ion to the fragment ion, insofar as the probability of two compounds sharing the same m/z ratio between the precursor ion and the Ion fragment is extremely low (Smith, 2004).

The HPLC-ESI-MS/MS technique allowed the establishment of the phenolic compound profile in the HAE and DME extracts. A total of 18 compounds (among the 47 standards) was identified in the extracts of *Eugenia catharinensis* with 15 detected in the DME and 13 in the HAE. Ten of these compounds (caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid, salicylic acid, syringic acid, aromadendrin and isoquercetin) were identified in all samples. The majority of compounds in the HAE were salicylic acid ($103.35 \pm 24.10 \mu\text{g.g}^{-1}$) and syringic acid ($103.06 \pm 59.29 \mu\text{g.g}^{-1}$). In the DME extract, the most concentrated compound was syringic acid ($163.71 \pm 11.90 \mu\text{g.g}^{-1}$). Table 1 shows the phenolic composition of the extracts.

PHENOLIC COMPOUND		
	HAE	DME
Apigenin	< LOD	< LOD
Aromadendrin	42.39 ± 14.18	11.05 ± 3.95
Caffeic acid	2.29 ± 0.53	1.17 ± 0.33
Chlorogenic acid	0.89 ± 0.23	1.17 ± 0.01
Coniferaldehyde	1.19 ± 0.39	5.80 ± 0.27
Coumaric acid	9.07 ± 2.23	8.49 ± 0.43
Ferulic acid	4.17 ± 0.22	4.00 ± 0.47
Galangin	< LOD	< LOD
Gallic acid	88.42 ± 40.81	14.58 ± 15.55
Isoquercetrin	1.11 ± 0.34	0.80 ± 0.05
Protocatechuic acid	3.51 ± 0.20	2.59 ± 0.48
Salicylic acid	103.35 ± 24.10	80.17 ± 16.57
Syringic acid	103.06 ± 59.29	163.71 ± 11.90
Sinapaldehyde	< LOD	3.69 ± 0.75
Syringaldehyde	17.29 ± 6.07	37.92 ± 3.20
Taxifolin	< LOD	< LOD
Vanillic acid	< LOD	52.50 ± 5.41
Vanillin	9.97 ± 6.77	34.07 ± 4.44

LOD: Below detection limit

Table 1. Phenolic compounds identified in *E. catharinensis* extracts by HPLC-ESI-MS/MS.

In vitro antioxidant activity

Table 2 shows the antioxidant activity, the total phenolic content and the total flavonoid content data for extracts from *E. catharinensis*.

ASSAY	HAE	DME	Positive Control**
TPC (mgAG g ⁻¹) ^a	1028.9 ± 13.1 ^a	199.4 ± 2.5 ^b	-
TFC (mgQUE g ⁻¹) ^β	35.5 ± 2.4 ^a	13.8 ± 0.1 ^b	-
DPPH (IC ₅₀ , µg mL ⁻¹) ^γ	16.9 ± 0.5 ^a	31.3 ± 7.1 ^a	17.25 ± 0.21 ^a
Iron III Reducing Power (mgAA g ⁻¹) ^δ	151.1 ± 6.8 ^a	38.3 ± 2.0 ^b	-
Inhibition of lipid peroxidation (%) ^μ	34.3 ± 6.2 ^a	42.5 ± 7.3 ^a	100.0 ± 0.36 ^d

Results are expressed as means ± standard deviations (n=3).

HAE = Hydroalcoholic extract; DME = dichloromethane extract

**Positive control: BHT

^β TFC= Total flavonoid content. mg QUE g⁻¹ : milligrams of quercetin/ gram of dry extract or fraction

^a TPC = Total phenolic content. mg AG g⁻¹: milligrams of gallic acid/ gram of dry extract or fraction

^δ IRP = Iron (III) reducing power. mg AA g⁻¹ : milligrams of ascorbic acid/ gram of dry extract or fraction

^γIC₅₀ = 50 % Inhibitory concentration. Concentration of extract or fraction necessary (µg mL⁻¹) to decrease the concentration of DPPH free radicals by 50 %.

The presence of letters in the table indicates no significant difference between samples (*p* > 0.05).

Table 2. *In vitro* antioxidant activities and phenolic and flavonoid contents of the *E. catharinensis* extracts.

HAE presented the highest total phenolic compound content (1028.9 ± 13.1 mg AG g⁻¹), with statistically significant difference between the two extracts ($p < 0.05$). HAE also presented a higher total flavonoid content (35.5 ± 2.4 mg QUE g⁻¹) ($p < 0.05$). In the DPPH free radical assay, the tested samples presented decreased DPPH concentrations, with no significant differences between them ($p > 0.05$). The HAE extract ($IC_{50} = 16.9 \pm 0.5$ µg mL⁻¹) presented superior antioxidant activity than BHT, the positive control used in this assay. The HAE extract also presented higher iron (III) reducing power (151.1 ± 6.8 mg AA g⁻¹), when compared to DME extract ($p < 0.05$). In contrast, in the lipid peroxidation inhibition assay, DME inhibited $42.5 \pm 7.3\%$ of lipid peroxidation, and presented better lipid peroxidation inhibition than the HAE extract, although statistical analysis showed no significant difference between the samples ($p > 0.05$).

***In vivo* antioxidant activity**

We previously demonstrated that CORT treatment causes oxidative stress (Barauna et al., 2018) in mice. Thus, in order to verify the antioxidant properties of *E. catharinensis* in the hippocampus and cerebral cortex, we administered different extracts from *E. catharinensis* leaves to mice treated with CORT. As shown in Figures 1 and 2, CORT increased CAT and SOD activities and TBA-RS levels in the cerebral cortex of mice, when compared to vehicle-treated groups. HAE, at doses of 200 and 250mg/Kg, increased the CAT (Figure 1A) and SOD (Figure 1B) activities, while DME increased just SOD activity (125, 200 and 250mg/Kg) (Figure 2A). Both extracts decreased TBA-RS levels when administered at doses of 200 and 250mg/Kg (figures 1C and 2C). However, when administered in animals treated with CORT, only DME reversed the effect of CORT on CAT activity (50, 125, 200 and 250mg/Kg) (Figure. 2A), while both HAE and DME, when administered at the dose of 50mg/Kg, reversed the effect of CORT on SOD activity (Figures 1B and 2B). Both HAE and DME, at all doses tested (50, 125, 200 and 250mg/Kg) reversed the effects of CORT on TBA-RS levels (Figures 1C and 2C).

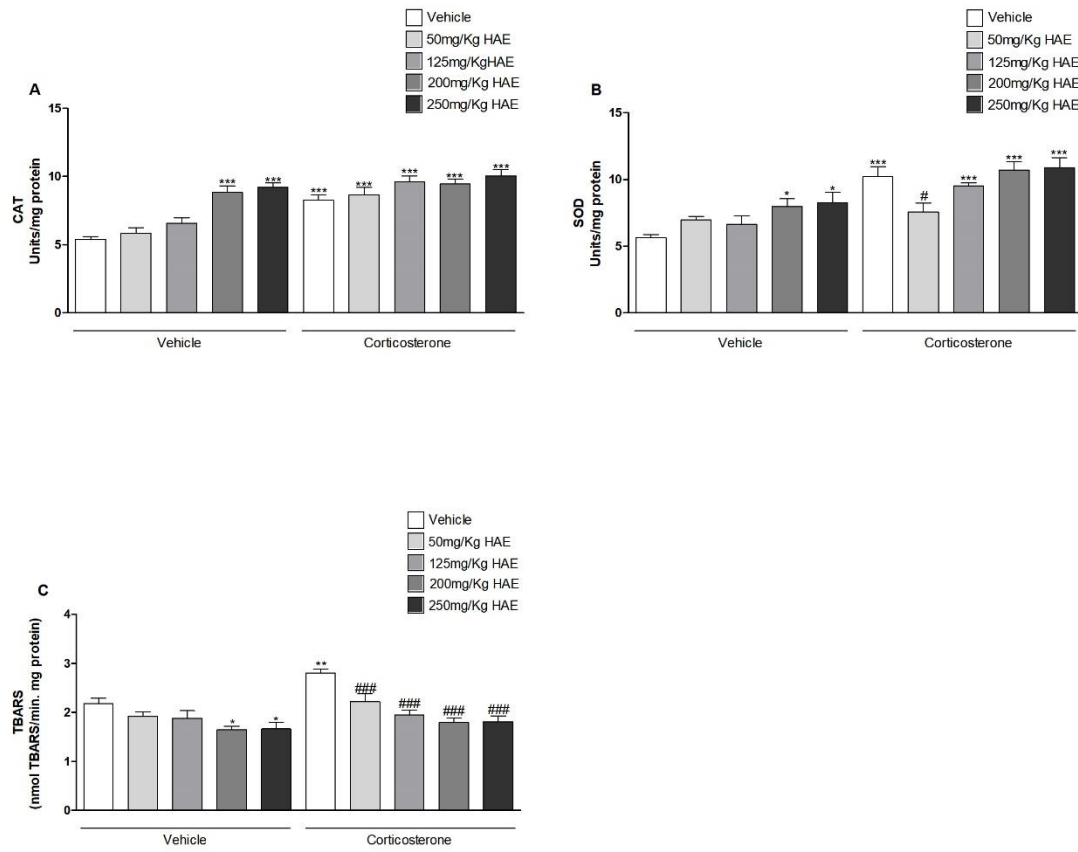


Figure 1. Effects of HAE administration on corticosterone-induced alterations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the cerebral cortex of mice. CAT (A) and SOD (B) activities and TBA-RS (C) levels. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, as compared with vehicle-treated group (control); # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$, as compared with the same group that was pretreated with CORT ($n = 7$).

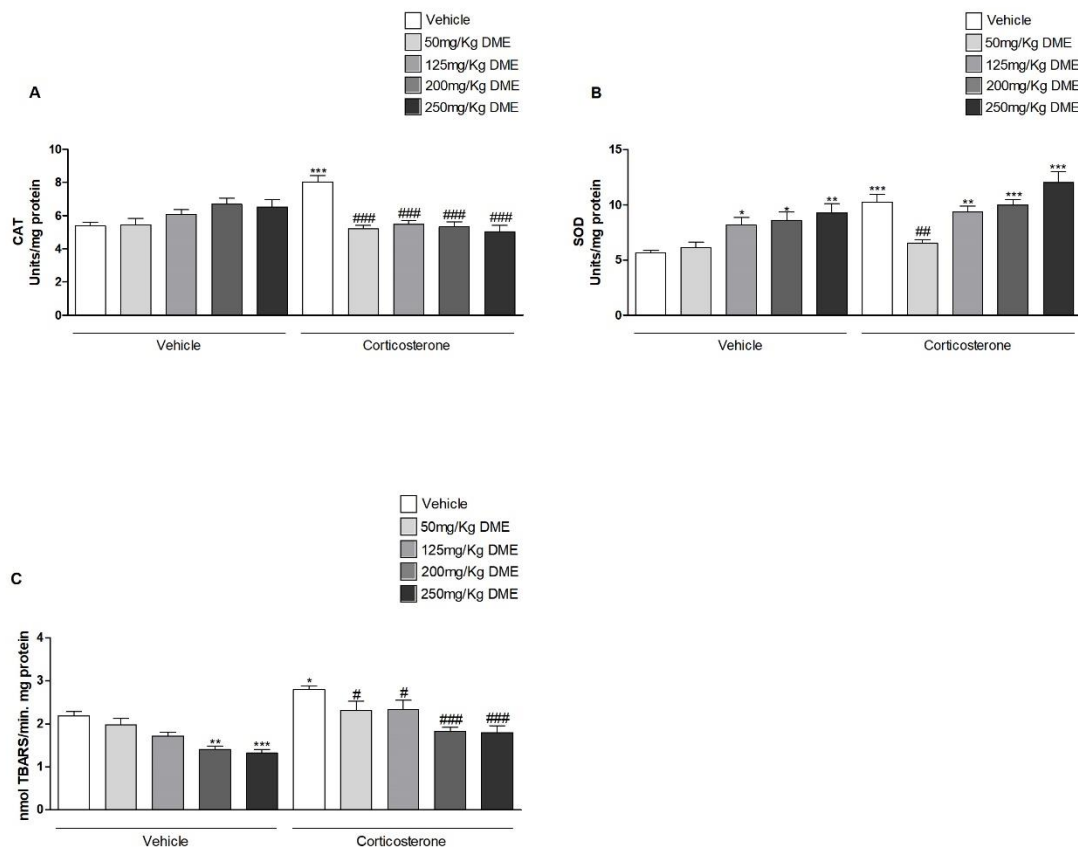


Figure 2. Effects of DME administration on corticosterone-induced alterations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the cerebral cortex of mice. CAT (A) and SOD (B) activities and TBA-RS (C) levels. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, as compared with vehicle-treated group (control); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, as compared with the same group that was pretreated with CORT ($n = 7$).

With regard to the hippocampus, CORT increased CAT and SOD activities and decreased GSH-Px (Figures 3 and 4). HAE treatment was able to reverse the effect induced by CORT on CAT (250mg/Kg) and GSH-Px levels (125, 200 and 250mg/Kg) (Figures 3A and 3C). HAE extract increased SOD activity at all doses tested (Figure 3B). In contrast, DME treatment increased CAT activity (125, 200 and 250mg/Kg) (Figure 4A) and reversed the effect of CORT on SOD and GSH-Px activities (50, 125, 200 and 250mg/Kg) (Figures 4B and 4C).

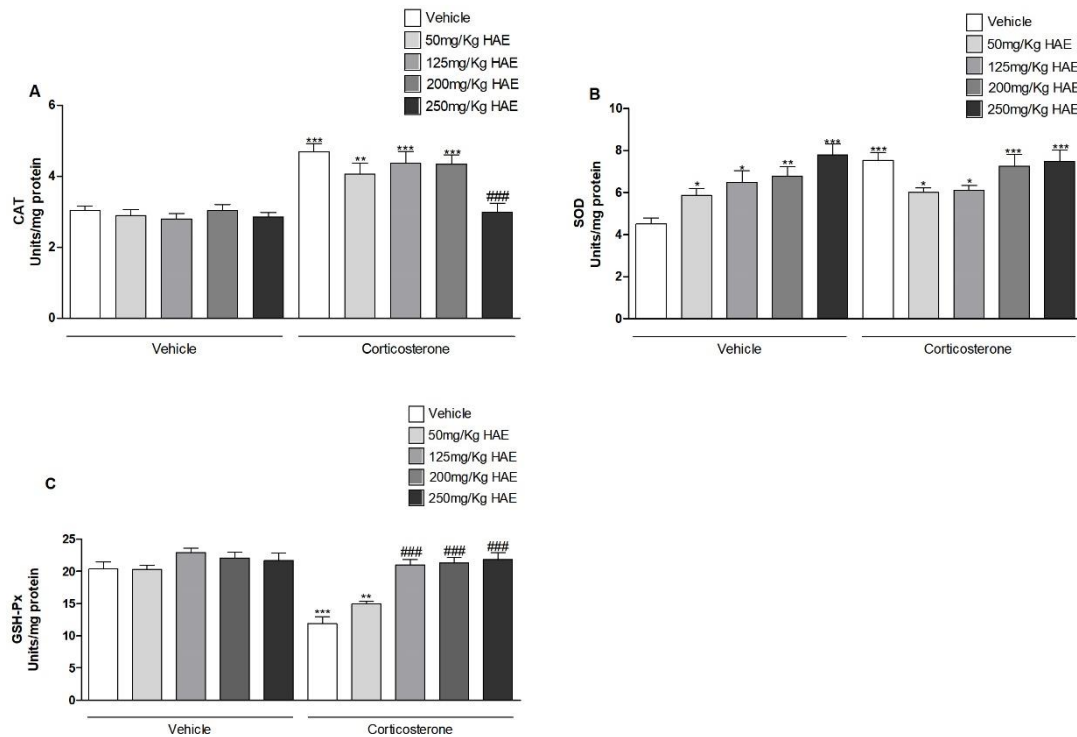


Figure 3. Effects of HAE administration on corticosterone-induced alterations in antioxidant enzymes in the hippocampus of mice. CAT (A), SOD (B) and GSH-Px (C) activities. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared with vehicle-treated group (control); ### $p < 0.001$, as compared with the same group that was pretreated with CORT (n = 6-7).

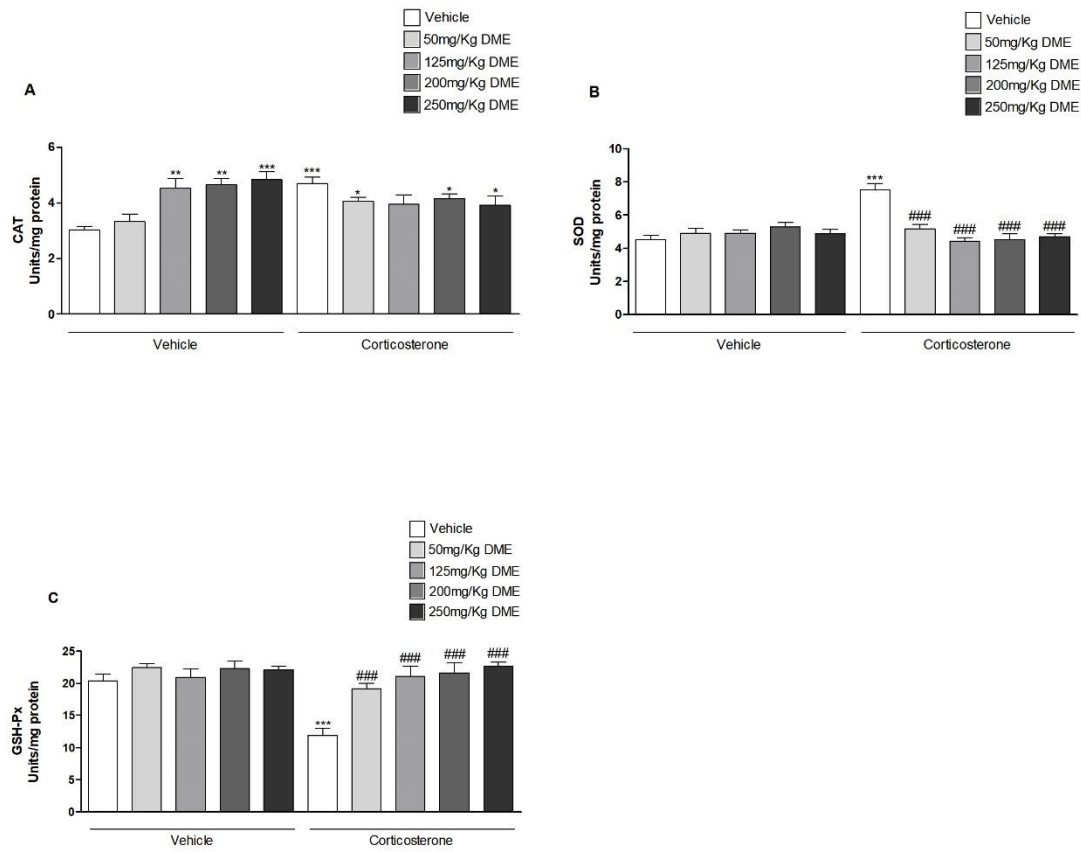


Figure 4. Effects of DME administration on corticosterone-induced alterations in antioxidant enzymes in the hippocampus of mice. CAT (A), SOD (B) and GSH-Px (C) activities. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared with vehicle-treated group (control); ### $p < 0.001$, as compared with the same group that was pretreated with CORT (n= 7).

DISCUSSION

Energy metabolism, responsible for producing ATP, plays a fundamental role in oxidative stress. A small fraction of the oxygen (O_2) consumed for ATP production is not completely reduced, causing the deviation of electrons that react with unreduced O_2 (Cleveland & Kastan, 2000) that generate oxygen free radical species (ROS) (Poprac et al., 2017). The functions of macromolecules and organelles can be altered by excessive ROS production, since these molecules irreversibly react with lipids, proteins and DNA present in the cells. Multiple diseases can manifest or progress due to the interaction of ROS with cellular structures (Luo et al., 2019). Due to increased oxygen uptake, high lipid rate and decreased antioxidant defenses, the nervous system becomes highly susceptible to free radical damage (Madani, Malaisse & Ait-Yahia 2015). Excessive free radical generation within neurons can lead to the development

of depression and neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's disease (Hassan et al., 2019).

Substances with the potential to reduce oxidative stress (antioxidants) have been widely studied, especially for the treatment and / or prevention of diseases. Plants produce a variety of high antioxidant by-products, such as phenolic compounds, which contain one or more hydroxyl groups in their structure (Cheynier et al., 2013). The genus *Eugenia*, one of the largest in the family Myrtaceae, has been widely studied due to its antioxidant potential (Magina et al., 2010). We showed that HAE and DME extracts from *E. catharinensis* presented antioxidant activities in *in vitro* and *in vivo* models, where extracts were able to decrease DPPH concentrations, presented iron (III) reducing power and reduced lipid peroxidation *in vitro*.

Our study shows, for the first time, the TPC and TFC in the HAE and DME extracts of *E. catharinensis*. Phenolic acid, coumarins, curcuminoids, flavonoids, tannins, quinones and lignins are classified as phenolic compounds, which are the main components present in plants. Studies have shown that phenolic compounds and flavonoids are associated with antioxidant activity (Wong, Leong & William, 2006; Qader *et al.*, 2011; Othman *et al.*, 2014). The HAE extract presented higher concentrations of phenolic and flavonoid compounds in relation to the DME extract, and these contents were positively correlated with the extracts' capacity to decrease DPPH, their iron (III) reducing power and their capacity to reduce lipid peroxidation. A study conducted by Ismail *et al.* (2017) demonstrated that *Eugenia polyantha* presents higher concentrations of flavonoids and phenolic compounds, and these components are associated with the plant's ability to scavenge DPPH activity.

In order to evaluate the antioxidant capacities of the HAE and DME extracts of *E. catharinensis* *in vivo*, we quantified CAT, SOD and GSH-Px activities and TBA-RS levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice treated with CORT. A previous study conducted by our group showed that CORT treatment generates oxidative stress in nervous tissue (Barauna *et al.*, 2018). The HAE and DME extracts reversed the effects of CORT on SOD activity and TBA-RS levels, however only the DME extract reversed the effect caused by CORT on CAT activity in the cerebral cortex of mice. With regard to the hippocampus, HAE treatment reversed the effect of CORT on CAT and GSH-Px activities and this extract increased SOD activity at all doses. On the other hand, treatment with DME extract reversed the effects of CORT on SOD and GSH-Px activities. These data indicate that the HAE and DME extracts improve antioxidant defences in the brain areas, since they were able to reverse the effects of CORT on antioxidant enzymes and TBA-RS levels. Nervous tissue is known to present elevated ATP consumption

and, as consequence, a high rate of free radical production. Furthermore, antioxidant defenses in the nervous tissue are decreased compared to other tissues, resulting in susceptibility to oxidative stress-induced damage (Madani, Malaisse & Ait-Yahia 2015). Data show that plants from the Myrtaceae family possess neuroprotective effects due to their antioxidant properties (Kich *et al.*, 2016). Phenolic compounds have significant effects on oxidative stress, since they neutralize free radicals and, thus, prevent the damage caused by oxidative stress (Kade *et al.*, 2008). The protective effect elicited by phenolic compounds seems to be due to their ability to scavenging free radicals (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Of the phenolic compounds identified in the HAE and DME extracts of *E. catharinensis*, some are already known to have antioxidant activities. Cafeic acid, for example, exerts antioxidant activity on neuronal cells *in vitro* (Jeong *et al.*, 2011) and reverses the SOD activity induced by lung exposure to phosgene (Wang *et al.*, 2013). Sakamula & Thongasa (2018) demonstrated that *p*-coumaric acid exerts a protective effect during cerebral ischemia-reperfusion in mice. Ferulic acid is also known to attenuate the oxidative stress promoted by CORT treatment in the mouse brain (Zeni, Camargo & Dal Magro, 2017). Studies have demonstrated that gallic acid can increase the brain's antioxidant capacity (Mansouri *et al.*, 2013; Korani *et al.*, 2014) and nanoparticles of gallic acid reduce inflammation and enhance antioxidant defences in a model of ischemic stroke (Yongmei *et al.*, 2019). Salicylic and syringic acids were identified as being the most abundant in our samples, and both of these compounds have proven antioxidant activity. Haydari *et al.* (2019) demonstrated the antioxidant effects of salicylic acid on heat-stressed plants, whereby the activities of antioxidant enzymes were increased. Syringic acid has neuroprotective effects against neurotoxicity and oxidative damage in pyramidal neurons (Ogut *et al.*, 2019).

Taken together, our data demonstrate, for the first time, that HAE and DME extracts of *E. catharinensis* present antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* models. The *E. catharinensis* extracts were able to reverse the effects of CORT treatment on antioxidant enzyme activities in the cerebral cortex and hippocampus of mice treated orally for 7 days. The antioxidant capacity of *E. catharinensis* was also demonstrated by the extracts' abilities to decrease DPPH and lipid peroxidation *in vitro*, as well as their iron (III) reducing properties. The identification of components of the extracts, by HPLC, indicates that the antioxidant properties of *E. catharinensis* are mediated by their phenolic compound composition.

REFERENCES

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Method Enzym**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ANAGNOSTOPOULOU, M.A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V.P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel *Citrus sinensis*. **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.
- BARAUNA, S.C.; DELWING-DAL MAGRO, D.; BRUECKHEIMER, M.B.; MAIA, T.P.; SALA, G.A.B.N.; DÖHLER, A.W.; HARGER, M.C.; MELO, D.F.M.; GASPER, A.L.; ALBERTON, M.D.; SIEBERT, D.A.; MICKE, G.A.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; DELWING DE LIMA, D. Antioxidant and antidepressant-like effects of *Eugenia catharinensis* D. Legrand in an animal model of depression induced by corticosterone. **Metab Brain Dis**, v. 33, p. 1985-1994, 2018.
- CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and Lipophilic Constituents of *Tinospora crispa*. **Planta medica**, v. 64, n. 05, p. 393-396, 1998.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K.M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiol. Biochem**, v. 72, p. 1–20, 2013.
- CLEVELAND, J.L.; KASTAN, M.B. A radical approach to treatment. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 309–311, 2000.
- COLLA, R.S.; MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; COLLA, G.; MAGINA, M.D.A.; BRIGHENTE, M.C.; LU, A. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 2, p. 720–731, 2012.
- DE GASPER, A.; VIBRANS, A.C.; FUNEZ, L.A.; RIGON-JR, M.J.; BITTENCOURT, F.; VIEIRA, C. Dr. Roberto Miguel Klein Herbarium (FURB), Blumenau, Southern Brazil. **PhytoKeys**, p. 21–37, 2014.
- DELWING-DE LIMA, D.; FRÖHLICH, M.; DALMEDICO, L.; GRUENWALDT, J.; AURÉLIO, M.; DELWING-DAL MAGRO, D.; PEREIRA, E.M.; WYSE, A.T.S. Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants. **Metab Brain Dis**, v. 32, p. 359–368, 2017.
- HASSAN, E.; KAHILO, K.; KAMAL, T.; EL-NEWESHY, M.; HASSAN M. Protective effect of diallyl sulfide against lead-mediated oxidative damage, apoptosis and down-regulation of CYP19 gene expression in rat testes. **Life Sci**, v. 26, p. 193–201, 2019.
- HAYDARI, M.; MARESCA, V.; RIGANO, D.; TALEEI, A.; SHAHNEJAT-BUSHEHRI, A.A.; HADIAN, J.; SORBO, S.; GUIDA, M.; MANNA, C.; PISCOPO, M.; NOTARIALE, R.; DE RUBERTO, F.; FUSARO, L.; BASILE, A. Salicylic Acid and Melatonin Alleviate the Effects of Heat Stress on Essential Oil Composition and Antioxidant Enzyme Activity in *Mentha × piperita* and *Mentha arvensis* L. **Antioxidants**, v. 8, p. 547, 2019.
- IANNITTI, T.; PALMIER, B. Antioxidant therapy effectiveness: an up to Date. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 3, p. 245–278, 2009.
- ISMAIL, H.F.; HASHIM, Z.; SOON, W.T.; RAHMAN, N.S.A.; ZAINUDIN, A.N.; MAJID, F.A.A. Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. **J Tradit Complement Med**, v. 7. n. 4, p. 452–465, 2017.

- JEONG, C.H.; JEONG, H.R.; CHOI, G.N.; KIM, D.O.; LEE, U.; HEO, H.J. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chin Med**, v. 6, n. 1, p. 25, 2011.
- KADE, I.J.; IBUKUN, E.O.; NOGUEIRAB, C.W.; DA ROCHA, J.B.T. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 60, p. 365–371, 2008.
- KICH, D.M.; BITENCOURT, S.; ALVES, C.; SILVA, J.; PINTEUS, S.; PEDROSA, R.; LAUFER, S.; DE SOUZA, C.F.V.; GOETTERT, M.I. Neuromodulatory effects of *Calyptranthes grandifolia* extracts against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 382–386, 2016.
- KORANI, M.S.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; MOGHADDAM, H.F.; MANSOURI, M.T. Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 733, p. 62–67, 2014.
- LIMA, A.B.; LIMA, D.D.; VIEIRA, M.R.; POLETO, M.Z.; DAL MAGRO, D.D.; BARAUNA, S.C.; ALBERTON, M.D.; PEREIRA, E.M.; PEREIRA, N.R.; SALAMAIA, E.M.; SIEBERT, D.A. Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 642–649, 2017.
- LOPES, J.M.M.; LAGE, N.N.; GUERRA, J.F.C.; SILVA, M.; BONOMO, L.F.; PAULINO, A.H.S.; REGIS, A.L.R.S.; PEDROSA, M.L.; SILVA, M.E. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. **Food Res Int.**, v. 105, p. 563–569, 2018.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- LUO, J.; MILLS, K.; LE CESSIE, S.; NOORDAM, R.; VAN HEEMST, D. Ageing, Age-related Diseases and Oxidative Stress: What to Do Next? *Ageing Res Rev*, 2019.
- MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, p. 676–692, 2011.
- MADANI, Z.; MALAISSE, W.J.; AIT-YAHIA, D. A comparison between the impact of two types of dietary protein on brain glucose concentrations and oxidative stress in high fructose-induced metabolic syndrome rats. **Biomed Rep**, v. 3, p. 731–735, 2015.
- MAGINA, M.A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H.H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Lat Am J Pharm**, v. 29, n. 3, p. 376–382, 2010.
- MANSOURI, M.T.; FARBOOD, Y.; SAMERI, M.J.; SARKAKI, A.; NAGHIZADEH, B.; RAFEIRAD, M. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food chem**, v. 138, n. 2–3, p. 1028–1033, 2013.
- MARKLUND, S.L. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (Eds.) *Handbook for oxygen radical research*. Boca Raton. 1985, Florida: CRC press: 243–247.
- MOKBEL, M.S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 529–534, 2006.

- OGUTA, E.; SEKERCIB, R.; AKCAYC, G.; YILDIRIMB, F.B.; DERINC, N.; ASLAND, M.; SATIE, L. Protective effects of syringic acid on neurobehavioral deficits and hippocampal tissue damages induced by sub-chronic deltamethrin exposure. **Neurotoxicol Teratol**, v. 76, 2019.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.
- OTHMAN, A.; MUKHTAR, N.J.; ISMAIL, N.S.; CHANG, S.K. Phenolics, flavonoids content and antioxidant activities of 4 Malaysian herbal plants. **Int Food Res**, v. 21, n. 2, p.18, 2014.
- POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C.J.; VALKO, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.
- QADER, S.W.; ABDULLA, M.A.; CHUA, L.S.; NAJIM, N.; ZAIN, M.M.; HAMDAN, S. Antioxidant, total phenolic content and cytotoxicity evaluation of selected Malaysian plants. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 3433–3443, 2011.
- SAKAMULA, R.; THONG-ASA, W. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. **Metab Brain Dis**, v. 33, n. 3, p. 765–773, 2018.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects—a review. **J. Funct. Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SIEBERT, D.A.; MELLO, F.; ALBERTON, M.D.; VITALI, L.; MICKE, G.A. Determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretically mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L. **Natural Product Research**, v. 8, p. 1 – 6, 2019.
- SMITH, R.M. Understanding Mass Spectra: A Basic Approach. 2 ed. New York: John Wiley & Sons Ltd., 2004. p. 3.
- TAMBARA, A.L.; DE LOS SANTOS, M.L.; DAL FORNO, A.H.; BOLDORI, J.R.; GONÇALVES SOARES, A.T.; DE FREITAS RODRIGUES, C.; MARIUTTI, L.R.B.; MERCADANTE, A.Z.; DE ÁVILA, D.S.; DENARDIN, C.C. Purple pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. **Food Chem Toxicol.**, v. 120, p. 639-650, 2018.
- THOMAZ, D.V.; PEIXOTO, L.F.; OLIVEIRA, T.S.; FAJEMIROYE, J.O.; NERI, H.F.S.; XAVIER, C.H.; COSTA, E.A.; DOS SANTOS, F.C.A.; GIL, E.S.; GHEDINI, P.C. Antioxidant and Neuroprotective Properties of *Eugenia dysenterica* Leaves. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 01-09, 2018.
- WANG, P.; YE, X.L.; LIU, R.; CHEN, H.L.; LIANG, X.; LI, W.L.; ZHANG, X.D.; QIN, X.J.; BAI, H.; ZHANG, W.; WANG, X.; HAI, C.X. Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat. **Exp Toxicol Pathol**, v. 65, n. 3, p. 311-318, 2013.
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific, 238f. 1994.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325–333, 1981.

- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal Apicultural Research**, 1998.
- WONG, S.P.; LEONG, L.P.; WILLIAM KOH, J.H. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chem**, v. 99, n. 4, p. 775–783, 2006.
- YONGMEI, Z.; DUOLU, L; ZHENFENG, Z.; YA, S. Improved neuroprotective effects of gallic acid-loaded chitosan nanoparticles against ischemic stroke. **Rejuvenation Res**, v. 2, 2019.
- ZAFIR, A.; BANU, N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 2, p. 167–177, 2009.
- ZAKI, M.A.; BALACHANDRAN, P.; KHAN, S.; WANG, M.; MOHAMMED, R.; HETTA, M.H.; PASCO, D.S. Cytotoxicity and modulation of cancer-related signaling by (Z)- and (E)-3,4,3',5'-tetramethoxystilbene isolated from *Eugenia rigida*. **J Nat Prod**, v. 76, n. 4, p. 679-84, 2013.
- ZANOVELI, J.M.; DE MORAIS, H.; DIAS, I.C.; SCHREIBER, A.K.; DE SOUZA, C.P.; DA CUNHA, J.M. Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment. **Curr Diabetes Rev**, v. 12, p. 165-178, 2016.

ANEXO 4 – ARTIGO 3

**ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT FROM *p*-COUMARIC ACID IN AN ANIMAL
MODEL OF DEPRESSION INDUCED BY CORTICOSTERONE**

Sara Cristiane Barauna^{a, b}, Débora Delwing-Dal Magro^b, Dayse Fabiane Machado de Melo^b, Caroline Giulia Tobaldini^b, Sahra Gabriela Roedel^b, Caio Maurício Mendes de Córdova^d, Cláudia Almeida Coelho de Albuquerque^b, Daniela Delwing-de Lima^{a, c*}

^a*Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Joinville, SC, Brazil;*

^b*Departamento de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brazil;*

^c*Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Joinville, SC, Brazil;* ^d*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brazil.*

Declaration of interest: none.

*Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing-de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid in an animal model of depression. Male Swiss mice (40g) received corticosterone (20 mg/Kg) or saline for 21 days and *p*-coumaric acid (5, 10, 20 mg/Kg), or fluoxetine (10 mg/Kg). Afterwards, the animals were submitted to behavioral tests (forced swim test, splash test and open field test) and then the hippocampus was removed for analysis of molecular, morphological and oxidative stress parameters. The involvement of monoaminergic system was analyzed by administration of WAY-100635 (0.3 mg/Kg), SCH23390 (0.05 mg/Kg), prazosin (1 mg/Kg) or yohimbine (1 mg/Kg). Results show that corticosterone induces a depressive like behavior in forced swim test, alters the activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes and decreases neuronal density in CA2 and hippocampus dentate gyrus, without altering the expression of BDNF, CREB and Bcl-2. Meanwhile, *p*-coumaric acid exhibits an antidepressant-like effect mediated by regulation of endogenous enzymes, neuron density and gene expression of Bcl-2 in the hippocampus. In addition, we observe the involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid. Altogether, *p*-coumaric acid reverses the depressive like effect caused by the chronic stress induced by the administration of corticosterone in this animal model, an effect that possibly is mediated by its antioxidant properties.

Keywords: Hippocampus; Oxidative stress; Antioxidant; Neuroplasticity.

1. INTRODUCTION

Depression is a serious, recurrent and highly prevalent neuropsychiatric disorder; characterized by profound sadness, loss of interest or pleasure, impaired cognitive function and sleep and appetite disfunctions (Otte *et al.*, 2016). The disorder causes considerable loss of productivity at work or school and affect the quality of life. In its most severe form, the disease is related to a high suicide rate, which accounted for approximately 1.5% of deaths worldwide in 2015 (World Health Organization, 2017).

In depression is observed a decreased in endogenous monoamines, in addition to an increased oxidative stress and morphological and molecular changes. Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) were observed in clinical findings, which has been linked to stress, since it is considered the main environmental risk factor for the development of disease, being closely related to the damage that occurs to the nervous system. Chronic administration of corticosterone in mice is a model that mimics stress conditions in rodents, simulating the effects observed in humans (Shishkina; Bulygina; Dygalo, 2015).

Several factors in specific areas of the nervous system, such as the hippocampus, are affected in depression. However, the mechanisms involved in the pathophysiology of the disease are not yet fully understood, making it difficult to understand and treat the disorder (Hillhouse; Porter, 2015). In this regard, it is known that many classic antidepressants provide low clinical efficacy in at least half of the individuals being treated, in addition to causing several side effects and a long-term therapeutic response (Hamon; Blier, 2013). The greatest interest in studying new treatments for depression is in the discovery of different action mechanisms that seem to offer valuable alternatives to patients whose conventional treatment is ineffective (Brunello *et al.*, 2002).

The study of alternative therapies using phenolic compounds such as *p*-coumaric acid, which are present in a variety of plants and foods, is extremely relevant due to the potent antioxidant effect of these compounds. Many substances used to treat mental disorders have been isolated from plants, demonstrating a variety of pharmacological effects. The importance of phenolic acids research and other compounds from medicinal plants represents a great advance for the treatment of diseases, considering that behavioral studies using them create a unique opportunity for the development of new pharmacotherapies for psychiatric diseases (Zhang, 2004).

Considering the number of people affected by depression and the difficulty in treating the disease, there is an interest to develop complementary therapies or substances that can optimize the clinical effectiveness of treatment for depression. This study investigated the

antioxidant and antidepressant-like effects of *p*-coumaric acid in mice treated with corticosterone.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 *Animals and Treatment*

Male Swiss mice (40g) were used in these experiments, kept in a room at a temperature of 22-27°C with free access to water and food, in a light/dark cycle 12:12hs. All manipulations were performed during the light cycle between 8 am and 2 pm. The procedures on animals were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals with the concern to minimize the suffering of animals; and were approved by the Animal Ethics Committee of the Regional University of Blumenau (CEUA/FURB n°027/2017).

To verify the possible effects of the administration of *p*-coumaric acid, the animals received a chronic treatment with corticosterone in order to mimic a depressive-like behavior in the treated mice. The animals were treated by subcutaneous route (s.c.) for 21 days with corticosterone (20mg/kg) or saline (Oliveira et al., 2017). In the last 7 days, in addition to chronic administration, the mice were treated orally with a vehicle, *p*-coumaric acid (5, 10, 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg). Twenty-four hours after the last treatment, the open field (OFT), the forced swim (FST) and the splash tests were performed. Then, the animals were euthanized and the hippocampus was collected for biochemical, morphological and molecular analyses.

To test the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid, mice were treated for 7 consecutive days with *p*-coumaric acid (10 mg/kg, orally) or vehicle. In the last day animals were treated with WAY-100635 maleate salt (0.3 mg/Kg, subcutaneously, 5-HT_{1A} receptor antagonist), (R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390) (0.05 mg/Kg, subcutaneously, D1 receptor antagonist), prazosin (1 mg/Kg, intraperitoneally, α 1 receptor antagonist), yohimbine (1 mg/Kg, intraperitoneally, α 2 receptor antagonist) or vehicle. Then, 30 min after antagonist's pre-treatment they received *p*-coumaric acid or vehicle and were submitted to the FST after 1h. An animal's group was treated with *p*-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA) (100 mg/Kg, intraperitoneally, an inhibitor of serotonin synthesis) or vehicle for 4 consecutive days and after 24h animals were treated with *p*-coumaric acid or vehicle and were tested in the FST 1h later.

All drugs were obtained from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.).

2.2 Behavioral Tests

2.2.1 Open Field Test

The open field test was performed before the FST, to ensure that changes in immobility time are not influenced by an increase in the animals' locomotor activity, as described by Barauna et al. (2018). Each animal was carefully placed in a wooden box with 40cm x 60cm x 50cm, in which the floor is divided into twelve identical squares. The number of squares each mouse crosses with all four legs was counted for six minutes.

2.2.2 Forced Swimming Test

Based on the method created by Porsolt; Bertin; Jalfre (1977), the test was applied to mice separately, forced to swim in a restricted space from which they cannot escape. The test was carried out in a plastic cylinder 24 cm high, 10 cm in diameter and with a level of 19 cm of water at 25°C, and the immobility time was timed and recorded in six-minute sessions. The animal that floats or makes only the movements necessary for its head to remain above water is considered immobile; while in the absence of immobility escape-oriented behaviors occur, such as swimming, jumping, climbing or diving (Barauna et al., 2018).

2.2.3 Splash Test

The splash test is used to assess the animals' anhedonia behavior, after spraying them with a 10% sucrose solution. The sucrose viscosity triggers a self-cleaning behavior, considered a self-care movement. The test follows the protocol based on the methodology of Amini-khoei et al. (2017), with some modifications.

2.3 Oxidative Stress Parameters

2.3.1 Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS is used as an index of damage to lipids and was determined by the method of Ohkawa (1979). TBA-RS was determined spectrophotometrically at 535 nm. The results are expressed in nmol malondealdehyde per mg of protein.

2.3.2 Catalase Assay (CAT)

CAT activity was determined by the method of Aebi (1984). The decomposition of hydrogen peroxide is monitored in a spectrophotometer at 240 nm for 90 seconds. One unit of enzyme is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity was expressed in units per mg of protein.

2.3.3 Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

GSH-Px activity was determined by the method of Wendel (1981) with some modifications. The tert-butyl hydroperoxide is used as a substrate for the reaction, while the decomposition of NADPH is monitored in a spectrophotometer at 340 nm for 4 minutes. One unit of enzyme is defined as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is expressed in units per mg of protein.

2.3.4 Superoxide Dismutase (SOD)

SOD activity was determined by the pyrogallol auto-oxidation method, as described by Marklund (1985). The auto oxidation of pyrogallol is continuously monitored with a 420nm spectrophotometer. The specific activity is expressed in units per mg of protein.

2.3.4 Protein determination

Protein was measured by the Lowry et al. (1951) method, using serum bovine albumin as standard.

2.4 Morphological Analysis

The morphological aspects of the hippocampus were evaluated using nissl staining by the method of Zhang et al. (2015), with some modifications.

The morphological evaluation is based on the visualization of unrecognizable aspects at the macroscopic level, which can provide more solid bases for the presented study. Considering the importance of the hippocampus in the pathophysiology of depression, mainly due to the neurotrophic hypothesis, a stereological analysis of granular and pyramidal cells was performed. The counting was performed using Weibel graticule n°2 - M42 coupled to the Olympus® optical microscope, in 400x magnification. Three fields were observed in the GD region and one field in CA2, in which only viable cells were counted. The calculation of cell density per area was made using the formula of Weibel, Kistler and Scherle (1966):

$$\text{Cell density} = \frac{\text{number of positive cells}}{\text{area}} \times 45\mu\text{m}$$

36,36

2.5 Quantitative real-time PCR (q-PCR)

The obtained RNA was diluted to a concentration of 500 ng and reverse transcribed to cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche) and the provided oligo(dT)₁₈ primers, according to the manufacturer's instructions in a LighCycler® 96 Instrument. The reaction with the target and endogenous (β-actin) RNA gene products were performed on the same plate. A master mix was prepared using FastStart Essential DNA Green Master (Roche), following the manufacturer's instructions, and used for the amplification of the cDNAs. Gene specific pre-designed primers were obtained from Sigma Aldrich (Merck; KSPQ12012 - KiCqStart® SYBR® Green Primers) and are described in the table 1. The reactions were performed on the Light Cycler 96 instrument (Roche). The amplification program consisted of 1 cycle of 95°C with 60 seconds, followed by 45 cycles of 95°C with 10 seconds, annealing temperature at 54°C with 10s waiting, 72°C with 15 sec. A negative control without cDNA was run with each assay to assess the general specificity and a positive control of cDNA obtained with the mRNA and the primers provided in the kit were tested in every replicate. The relative amount of each gene expression was determined based on the kinetic approach using the Light Cycler Analysis software TM. The gene expression values obtained were normalized using the β-actin gene as a control (Dalmarco *et al.*, 2012).

Table 1. Description of the primers used in this work, gene targets and the amplification conditions.

Primer	Gene (Symbol)	Gene (Name)	Ensembl	Genebank	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
FM1_Actb	ACTB	actin beta	ENSG00000075624	NM_001101	gatgtatgaaggctttggtc	54
RM1_Actb	ACTB				tgtgcacttttattggtctc	
FM2_Bcl2	BCL2	BCL2 apoptosis regulator	ENSG00000171791	NM_000633	aaggcaaggctttaagttac	
RM2_Bcl2	BCL2				ccacattccatacttctg	
FM3_Bdnf	BDNF	brain derived neurotrophic factor	ENSG00000176697	NM_170735	atcaaaactcggcagaatg	
RM3_Bdnf	BDNF				cctgtgttcttgtctcttc	
FM1_Crebbp	CREBBP	CREB binding protein	ENSG00000005339	NM_004380	ccaatccactgatgaatgatg	
RM1_Crebbp	CREBBP				gcttgaacgagttatggac	
FM1_Ephb2	EPHB2	EPH receptor B2	ENSG00000133216	NM_017449	cagcatcaaggaaaagctac	
RM1_Ephb2	EPHB2				ctatatagatcttcatgcctgg	

2.6 Statistical Analysis

Results were evaluated through the Kolmogorov-Smirnov normality test and two-way ANOVA was then performed, followed by the DUNCAN test when necessary. Results were considered as significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

As shown in figure 1A, corticosterone administration for 21 days was able to cause an increase in immobility time in FST, when compared to the control group (vehicle). Treatment with *p*-coumaric acid, at all doses, reversed this type-depressive behavior induced by corticosterone, promoting a decrease in immobility time, as well as fluoxetine. In addition, the use of acid *per se* was able to decrease the immobility time, the same result observed by fluoxetine, which is predictive of an antidepressant-like effect. There were no changes in the number of crossings in the groups treated with *p*-coumaric acid or corticosterone, in relation to the control groups in the OFT (figure 1B).

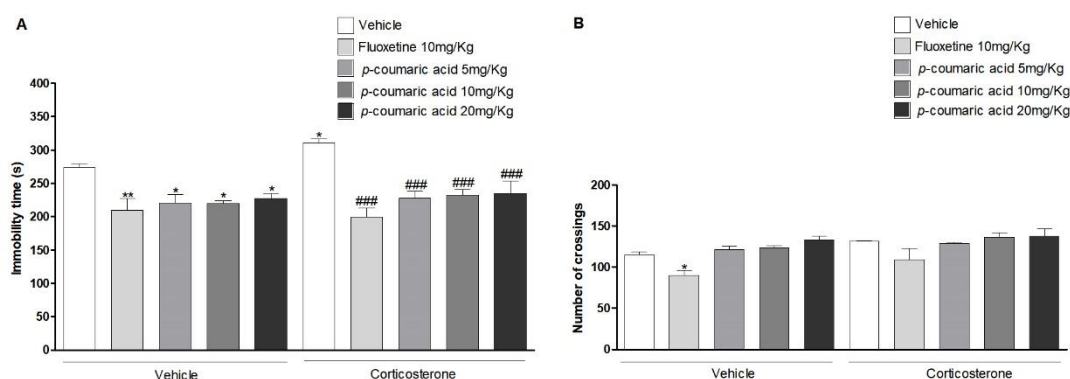


Figure 1. Effect of *p*-coumaric acid (5, 10 and 20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg) in animals treated with vehicle or corticosterone (20 mg/kg) for 21 days, in FST (A) and OFT (B). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the control group; ### $p < 0.001$ when compared to the group treated with corticosterone, $n = 6$.

To investigate the possible mechanisms underlying the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid in the forced swimming test, animals were treated with monoaminergic receptors antagonists. The treatment of mice with antagonist of serotonin 5HT_{1A} receptor, WAY-100635 (0.3 mg/Kg, subcutaneously) (figure 2A) or the inhibitor of 5-HT synthesis, PCPA (100 mg/kg, i.p., once a day by 4 consecutive days) (figure 2B) did not affect the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid (10 mg/kg), but blocked the decrease in the immobility time elicited by acid. Similarly, the treatment with SCH 23390 (figure 2C) and yohimbine (figure 2E) were able to

reverse the effect elicited by *p*-coumaric acid in the FST. However, the $\alpha 1$ receptor antagonist administration was not able to reverse the anti-immobility effect of *p*-coumaric acid in the FST (figure 2D).

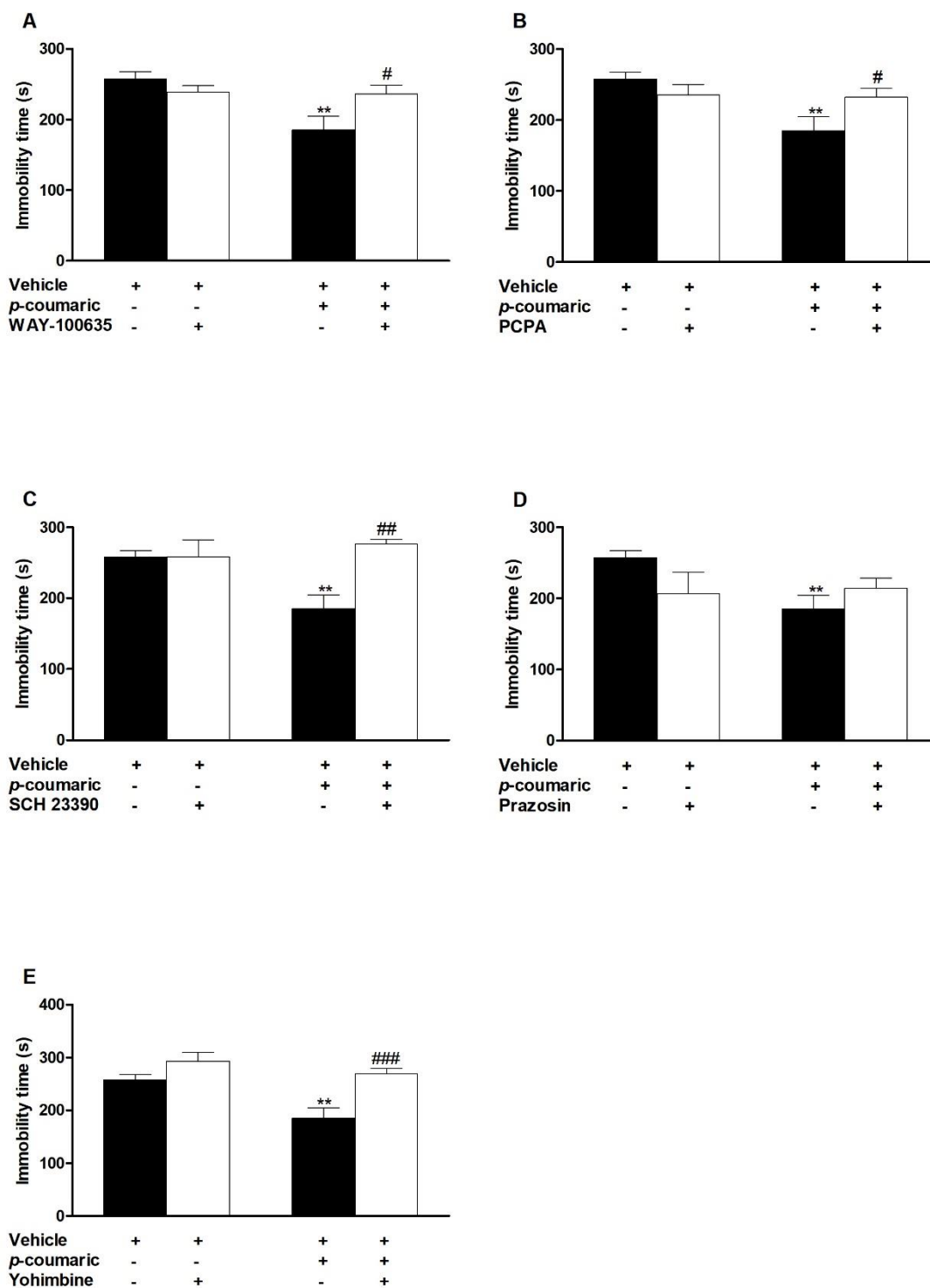


Figure 2. Effect of pretreatment of mice with WAY-100635 (0.3 mg/Kg) (A), PCPA (100 mg/Kg) (B), SCH 23390 (0.05 mg/kg) (C), prazosin (1 mg/kg) (D), yohimbine (1 mg/kg) (E)

or vehicle on the *p*-coumaric acid-induced reduction in immobility time in the FST. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., ** p < 0.01 as compared with vehicle-treated group (control, C); # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 as compared with the same group pretreated with vehicle; (n = 6).

In order to assess the effects of the treatment on the anhedonia, we performed the splash test, in which the parameters analyzed were the latency to initiate the grooming behavior and the total grooming time. Figure 3 indicates that the administration of corticosterone induced an increase in the latency, however it was not able to change the grooming behavior. It is observed that *p*-coumaric acid *per se* causes a decrease in latency (figure 3A) and an increase in grooming time compared to the control group (figure 3B). In addition, treatment with *p*-coumaric acid at doses of 5, 10 and 20mg/kg reverses the increased in the latency time induced by corticosterone, as well as fluoxetine (figure 3A).

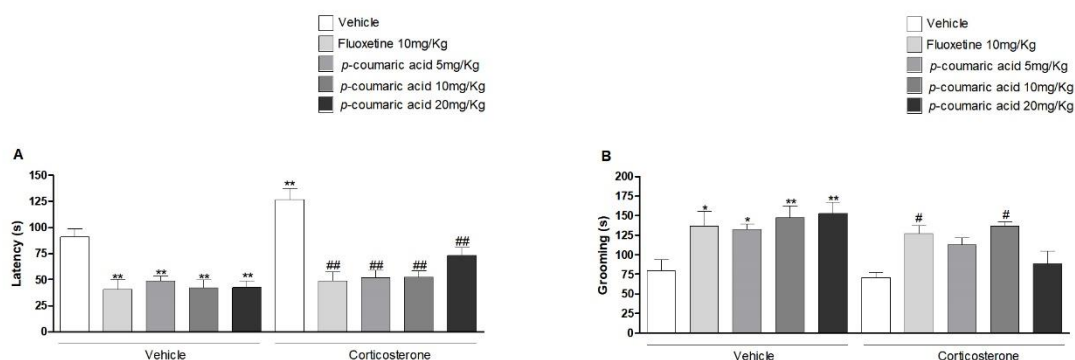


Figure 3. Effects of *p*-coumaric acid (5, 10 and 20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg) in animals treated with vehicle or corticosterone (20 mg/kg) for 21 days, on latency (A) and grooming (B) in the splash test. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., * p < 0.05; ** p < 0.01 compared to the control group; # p < 0.05 ## p < 0.01 when compared to the group treated with corticosterone, n = 6.

To determine the changes in oxidative stress caused by corticosterone in the hippocampus of the animals, the antioxidant enzymes activities and TBA-RS levels were first evaluated in a previous work published by our group (Barauna et al., 2018). As shown previously, the administration of corticosterone alters the activity of CAT, SOD and GSH-Px in the hippocampus. However, the TBA-RS levels remain similar to the control group.

Based on previous results, only markers of oxidative stress that showed changes in relation to corticosterone were measured. *p*-coumaric acid, when administered at doses of 5, 10 and 20mg/Kg decreased CAT activity (Figure 4A) and increased GSH-Px activity (figure 4C), while the dose of 20 mg/kg was able to decrease SOD activity (figure 4B), reversing the effects

caused by corticosterone. Altogether, treatment with *p*-coumaric acid shows results similar to those observed by fluoxetine.

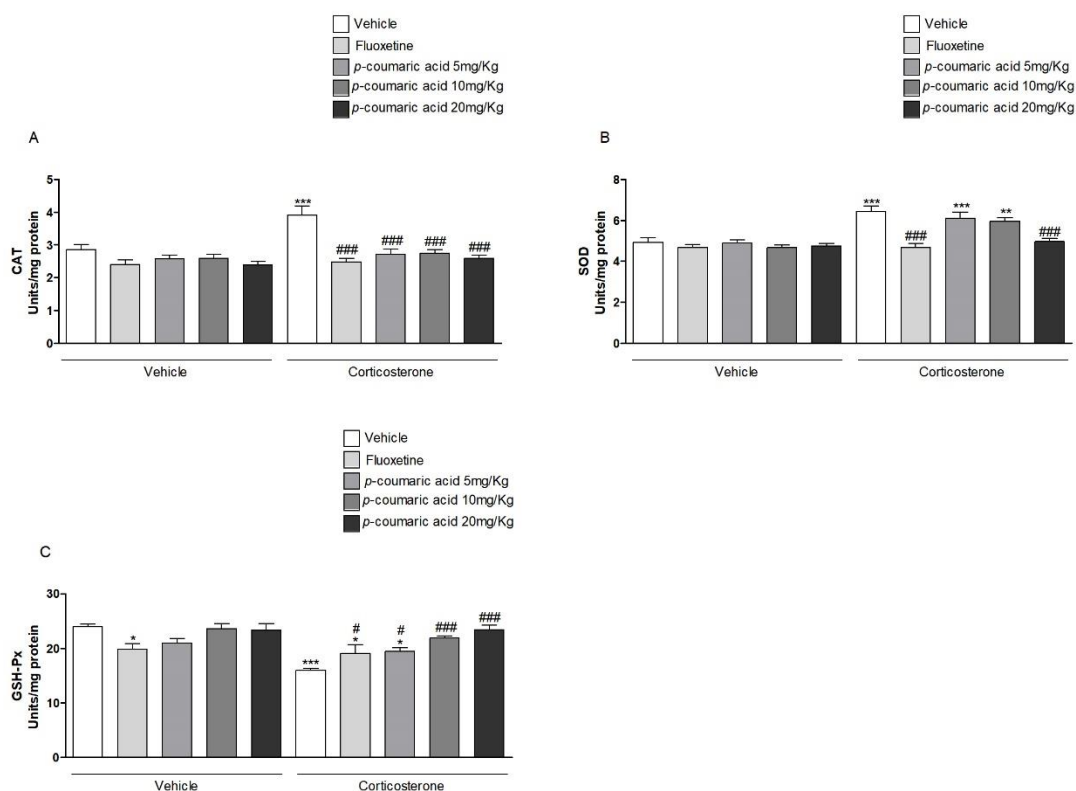


Figure 4. Effects of *p*-coumaric acid (5, 10 and 20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg) after administration of vehicle or corticosterone (20 mg/kg) for 21 days on CAT (A), SOD (B) and GSH-Px (C) activity in the animals' hippocampus. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to the control group; # p <0.05 ### p <0.001 when compared to the group treated with corticosterone, $n = 6$.

The hippocampus histopathological analysis was performed from a sagittal section stained with cresyl violet and the CA2 and dentate gyrus (DG) were analyzed, as shown in figure 5.

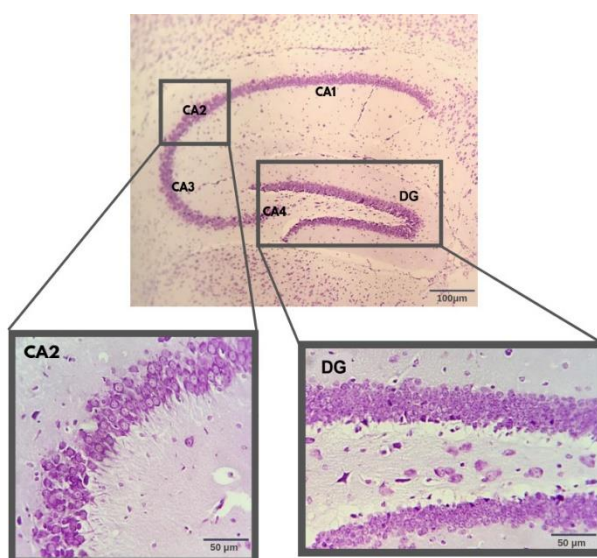


Figure 5. Histological section showing the different areas of the hippocampus stained with cresyl violet, formed by the regions CA1, CA2, CA3, CA4 and dentate gyrus (DG) in the control group. The quadrants mark the regions observed for counting. Scale bar = 100µm and 50µm.

Evaluating the CA2 pyramidal cells in the hippocampus, we observed that there is a decrease in cell density induced by corticosterone, compared to control groups (Figure 6A). We identified cells that present characteristics of degeneration, with condensation of nuclear chromatin, considering these structures as non-viable cells that were not counted (Figure 6B, arrowhead). On the other hand, treatment with *p*-coumaric acid at doses of 10 and 20 mg/kg and fluoxetine (10 mg/kg) caused a reversal of the changes observed, increasing the density of viable cells in CA2.

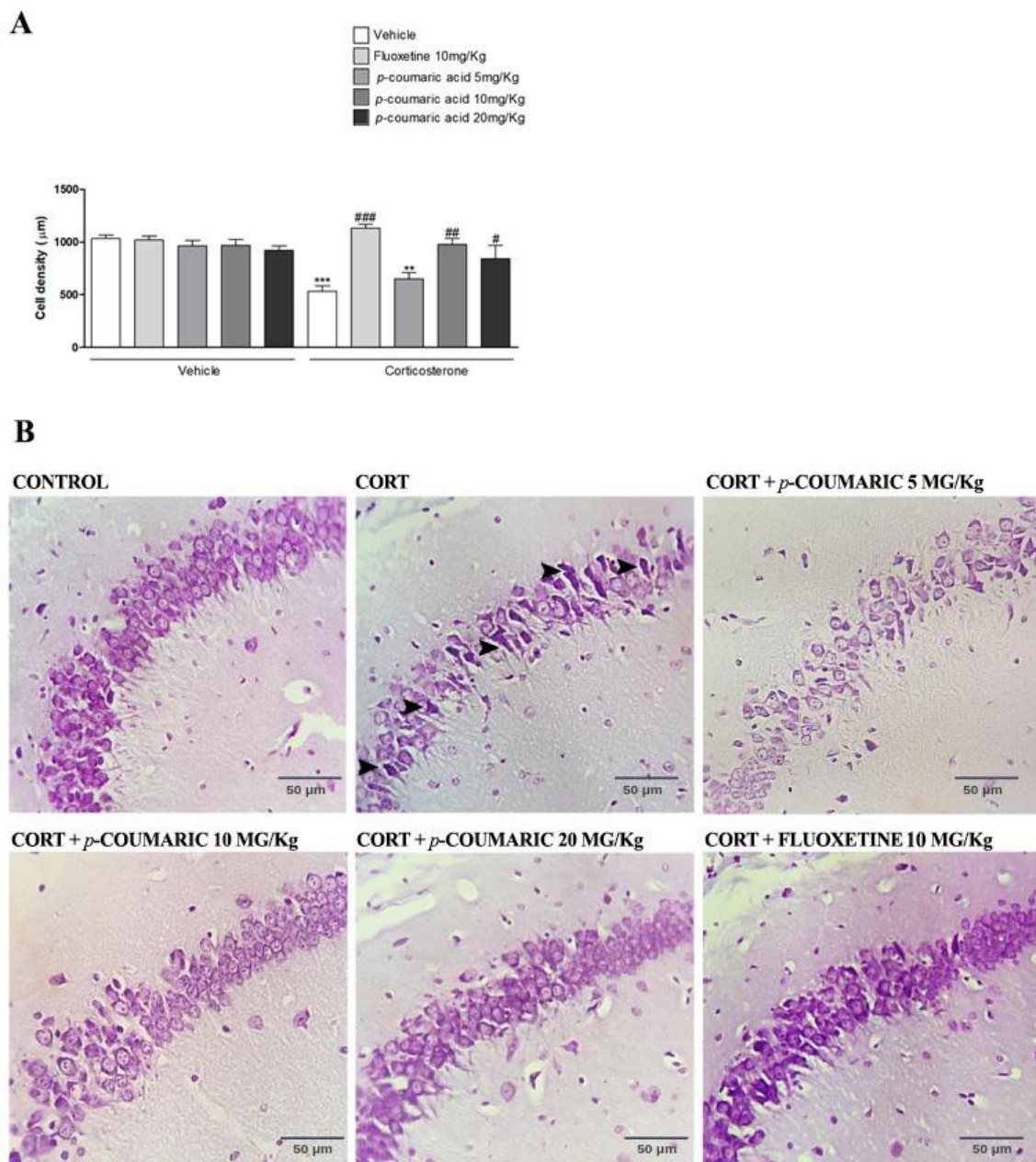


Figure 6. Effects of *p*-coumaric acid (5, 10 and 20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg) after administration of vehicle or corticosterone (20 mg/kg) for 21 days on cell density in hippocampus. Statistical analysis (A) and photos of the histological sections of each group, in which the arrowhead points to non-viable neurons (B). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ when compared to the group treated with corticosterone ($n = 7$). Scale bar = 50 μ m.

Regarding the hippocampus DG, statistical analysis (Figure 7A) also showed that the administration of corticosterone induces a decrease in the density of viable cells (arrows), since the presence of pyknotic nuclei affected an extensive area of the granular layer (Figure 7B). The experimental groups treated with *p*-coumaric acid at doses of 10 and 20 mg/kg and with

fluoxetine (10 mg/kg) showed an increase in cell density. Considering the characteristic nucleus and nucleolus and basophilic cytoplasm, the cells were considered viable (Figure 7A).

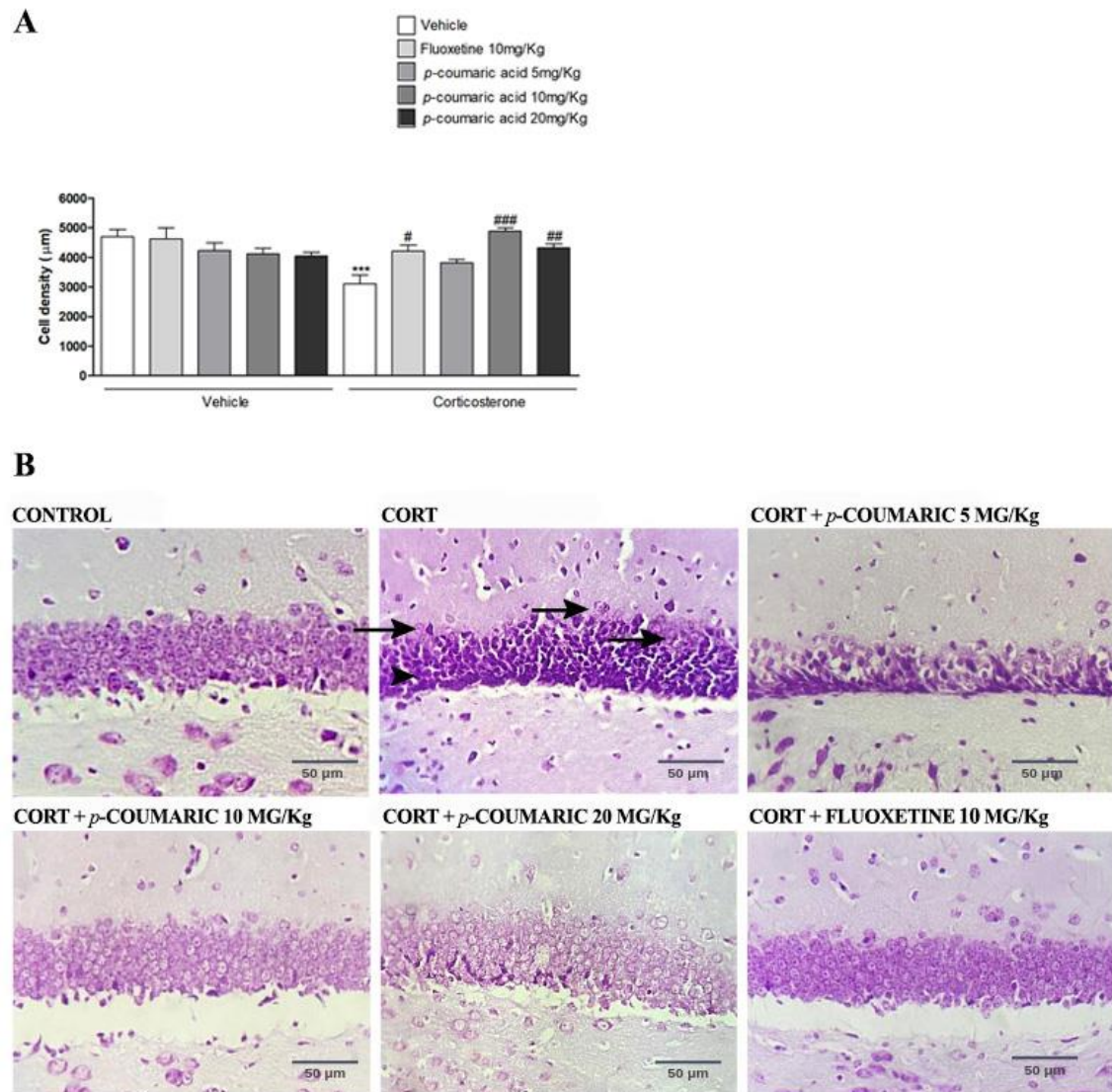


Figure 7. Effect of *p*-coumaric acid (5, 10 and 20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg), after administration of vehicle or corticosterone (20 mg/kg) for 21 days on cell density in DG of the hippocampus. Statistical analysis (A) and photos of the histological sections of each group (B). Arrow points to viable neurons, while arrowhead points to unviable cells. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., *** p <0.001 compared to the control group. # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001 when compared to the group treated with corticosterone (n = 7). Scale bar = 50µm.

The BDNF, CREB and Bcl-2 genes expression was determined relatively to the β -actin gene. It was found that the administration of corticosterone (20 mg/Kg, 21 days) does not alter the expression of BDNF, CREB or Bcl-2 in the animals' hippocampus (Figures 8A, B and C). Simultaneously, treatment with *p*-coumaric acid (20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg)

increased Bcl-2 expression in animals pretreated with corticosterone (Figure 8C); while the expression of the other genes has not been modified.

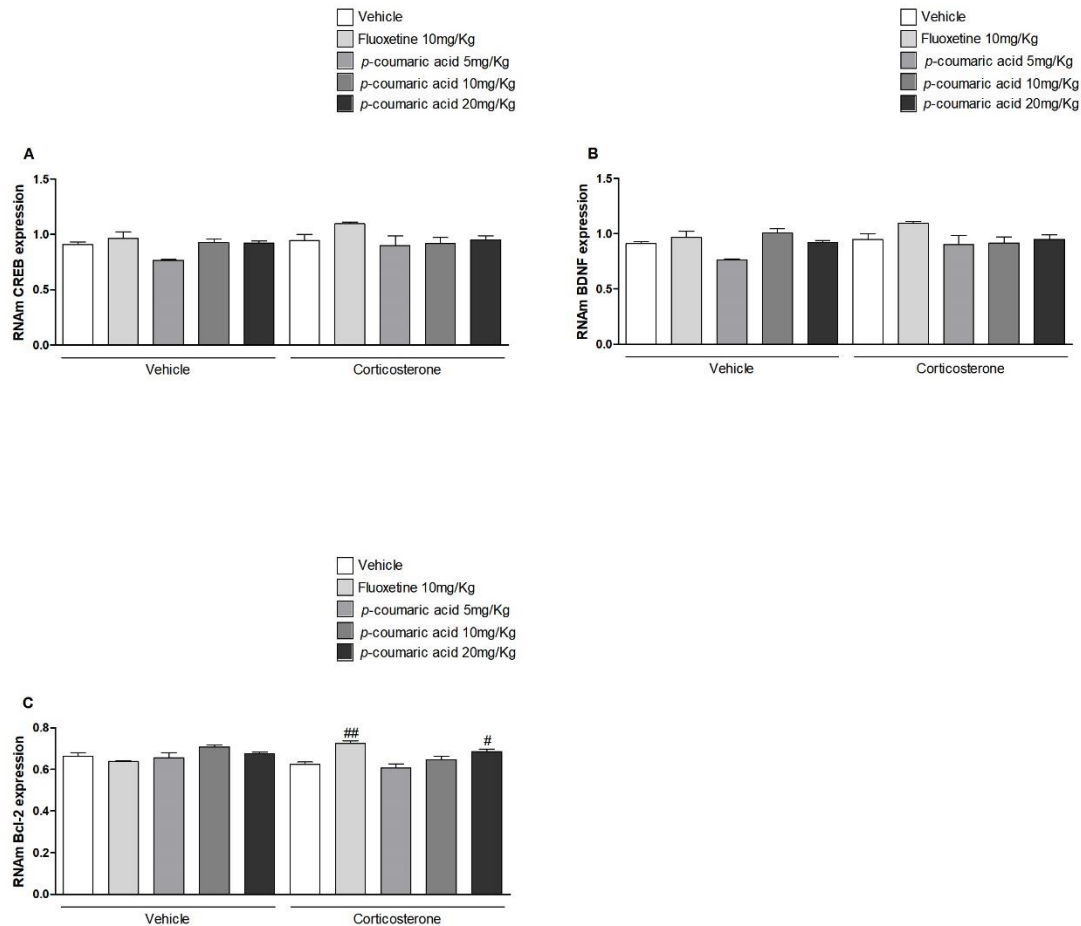


Figure 8. Effect of *p*-coumaric acid (5, 10 and 20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg) after administration of vehicle or corticosterone (20 mg/kg) for 21 days on the BDNF (A), CREB (B) and Bcl-2 (C) gene expression in the hippocampus. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ when compared to the group treated with corticosterone ($n = 6$).

4. DISCUSSION

Since stressful events are important risk factors for the development of depression, animal models that involve repeated exposure to stress are promising to mimic the disorder (Czéh et al., 2016). Based on HPA axis dysfunction, several studies use glucocorticoids to mimic a depressive state in animal models (Pariante; Lightman, 2008). According to the literature, chronic administration of corticosterone induces a variety of behavioral, biochemical and molecular changes similar to those observed in depressive patients, being a model that has face, construct and predictive validity (Bakunina; Pariante; Zunszain, 2015). In this study, we

observed that mice submitted to chronic administration of corticosterone exhibited a posture of immobility for a significantly longer time than the control group in FST, indicating a depressive-like behavior. There are several reports that highlight a change in immobility in the behavioral tests of rodents exposed to chronic stressors (Barauna et al., 2018; Shen et al., 2016b; Teixeira et al., 2017).

For the first time, we demonstrated that *p*-coumaric acid administrated at doses of 5, 10 and 20 mg/kg was able to reverse a behavior induced by corticosterone in the FST, indicating an antidepressant-like effect. A large number of classic antidepressants such as fluoxetine have the same effect on FST. Corroborating with our results, the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid has been demonstrated in an acute treatment using the LPS inflammatory model (Lee et al., 2018). Following the monoaminergic hypothesis of depression, monoamine reuptake inhibitors have been developed as antidepressants. Therefore, we evaluated whether the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid is dependent on the monoaminergic system. Our results showed that the administration of substances acting on the serotonergic (WAY-100635 and PCPA), dopaminergic (SCH23390) and noradrenergic (yohimbine) pathways were able to reverse the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid, demonstrating that the monoaminergic system is an important contributor to the results observed (Castagné et al., 2011). Most of the antidepressants currently used in the clinic act by modulating the monoamine system, such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), including fluoxetine, paroxetine, citalopram; selective noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) like desipramine and dual serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors like venlafaxine (Lopez-Munoz and Alamo, 2009).

In the analysis of the splash test, we verified the involvement of anhedonia, related to the decreased ability to feel pleasure, since it is one of the symptoms involved in the diagnosis of the disease in humans (American Psychiatric Association, 2013). The use of sucrose in this test induces normal self-cleaning behavior, important for the animal's self-care, which even encourages thermoregulation, stress reduction and social interaction. Animal models of chronic stress and anxiety promote a decrease in self-cleaning time, as well as prolonging the time to initiate it, which is characterized as anecdotal behavior (Willner, 2005). We demonstrated that corticosterone induced an increase in latency in the splash test, that is, it caused a delay to start the self-cleaning behavior; without changing your total time. In part, these effects are in line with previous data (Rosa et al., 2014). However, we did not observe the expected decrease in the total self-cleaning time of the animals, a fact already evidenced by other authors who were

unable to reproduce the anecdotal behavior in the same animal model (Olescowicz et al., 2018). Yalcin, Belzung and Surget (2008) observed that different lines of animals do not assume the same pattern of behavior in the splash test, indicating that the Swiss mouse has a lower response sensitivity; which could explain the discrepancy in the data observed in the literature and in our study. We found that *p*-coumaric acid promotes a decrease in latency and an increase in self-cleaning time in the control groups, indicating that the compound alone has a positive effect in relation to the motivational and self-care behavior of the mice. In addition, treatment with *p*-coumaric acid reverses the behavior induced by corticosterone observed in latency, as well as fluoxetine.

The involvement of oxidative stress was evaluated using oxidative damage marker to lipids and measuring the antioxidant capacity of endogenous enzymes in the mice's hippocampus. We found that the administration of corticosterone did not change the levels of TBA-RS. Contradictorily, several authors demonstrate that the use of glucocorticoid increases the levels of TBA-RS in the hippocampus and cortex, proving that the model is capable of causing lipoperoxidation in the brain (Silva et al., 2016; Zeni; Camargo; Dalmagro, 2017; Barauna *et al.*, 2018). It has been reported in a model of moderate chronic stress that the cortex can be affected by lipid oxidation while the hippocampus is not, even with an increase in the formation of superoxide present in both structures (Lucca et al., 2009). Therefore, it is important to highlight that the lipoperoxidation measured by TBA-RS occurs as a result of oxidative stress; but it is not fundamental, since the accumulation of oxygen-reactive species (ROS) is capable of causing cellular damage through other mechanisms, such as protein and DNA oxidation (Halliwell, 2012). The administration of corticosterone increased the antioxidant activity of CAT and SOD, possibly stimulated by the generation of ROS. Scapagnini et al. (2012) observed that the increase in SOD activity occurs as a response of the organism to a high concentration of the superoxide anion, as well as high concentrations of hydrogen peroxide result in an increase in CAT. The data collected from patients with depression, on the other hand, are inconsistent, as there are reports that the activity of SOD and CAT may be increased or decreased (Wigner et al., 2018). Regarding GSH-Px, we observed that its activity is reduced in animals treated with corticosterone; according to clinical data that confirm the same plasma pattern of patients with depression (Gawryluk et al., 2011). Like CAT, GSH-Px reduces hydrogen peroxide; however, it depends on other enzymes of the glutathione family to exert its antioxidant effects (Gutteridge; Halliwell, 2010). This fact may explain, in part, the difference in the response pattern of the two enzymes. GSH-Px is fundamental in protecting against

damage to neurons and DNA and its decrease is related to an accumulation of ROSs (Gawryluk et al., 2011). In contrast, *p*-coumaric acid was able to reverse the enzymatic changes caused by corticosterone, decreasing CAT and SOD activities and increasing GSH-Px activity. Thus, we can suggest that the action of the acid in this model probably depends on the antioxidant activity to fight the free radicals generated by corticosterone.

Considering the importance of the hippocampus in regulating responses to stress (Fanselow; Dong, 2010), we also analyzed its morphology in order to determine neuronal density. We observed that corticosterone decreases the density of viable cells in DG and CA2, affecting granular and pyramidal cells. In both, there is the presence of pycnotic nuclei, characteristic of a process of cell degeneration. Our data agree with other similar findings, such as that of Latt et al. (2018), who demonstrated a reduction in neuronal cells in the hippocampus due to the induction of cell death by corticosterone. In fact, chronic stress mediated by corticosterone can cause damage to the hippocampus in many ways, through changes in dendritic arborization, induction of cell death and decreased cell proliferation, as well as neuronal differentiation in the DG (Bakunina; Pariante; Zunszain, 2015; Czéh et al., 2016). Many authors have linked these damages to an alteration in neurogenesis, a theory that is reinforced by the reduction in the volume of the hippocampus observed in depressed patients (Duman; Nakagawa; Malberg, 2001; Elbejjani et al., 2015). The hippocampus DG has a fundamental role in the formation of new neurons, since it is the place where adult neural stem cells with proliferation and differentiation capacity are found (Schloesser; Martinowich; Manji, 2012). Thus, the decrease in cell density in this structure may be related to an impaired neurogenesis process, which has already been demonstrated by other authors, as one of the mechanisms correlated with the type-depressive behavior shown in animals treated with corticosterone (Olescowicz et al., 2018). Regarding CA area, there are several reports showing a reduction in volume that affects from CA1 to CA4, both in patients with depression and in animal models of stress (Cao et al., 2017; Györfi et al., 2017; Roddy et al., 2019). The CA2 area, in particular, is fundamental for the formation of new memories and interacts with brain structures responsible for emotional processing and cognitive functions, such as the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the amygdala (Chevaleyre; Piskorowski, 2016). In a recent study published by Kohara et al. (2014), showed that there is more important connection between DG and CA2 than the connection between young granular cells with CA3, known for its interaction with behavior. Therefore, the reduction of viable cells in both CA2 and DG may be implicated with the development of depressive behavior. *p*-coumaric acid (10

and 20 mg/Kg) increased the cell density in the DG and CA2 hippocampus areas, inhibiting the effect caused by the administration of corticosterone. The same effect was seen with fluoxetine treatment. It has been shown that the antidepressant effect of fluoxetine is mediated by an increase in neurogenesis in the hippocampus, by increasing the proliferation of progenitor cells, stimulating dendritic branching and facilitating the maturation of differentiated cells (Duman; Nakagawa; Malberg, 2001; Zhou et al., 2016). Following this context, one of the suggested hypotheses is that the antidepressant-like effect elicited by *p*-coumaric acid can be related to the survival of neurons in the hippocampus, which can also be mediated by neuronal plasticity.

Based on the morphological findings of the hippocampus, we evaluated the gene expression of proteins that play a fundamental role in the plasticity through real-time PCR. BDNF has been linked to cell survival due to its direct involvement in the regulation of neuronal apoptosis. This factor stimulates CREB through the activation of the MAPK cascade, while CREB, in turn, regulates the expression of BDNF itself and Bcl-2 (Duman et al., 2016). It was observed in this study that the administration of corticosterone does not alter the BDNF, CREB or Bcl-2 gene expression, discordant data with the study of some chronic stress models (Shen et al., 2016b). Bcl-2 is a neuroprotective protein that regulates mitochondrial function through its anti-apoptotic activity and also protects against damage caused by oxidative stress (Kowaltowski; Fiskum, 2005). Hydrogen peroxide has been shown to act negatively on Bcl-2 levels, causing activation of caspases and cell death by apoptosis (Cai et al., 2008). However, increased expression of Bcl-2 directly affects neurogenesis in the hippocampus. Kuhn et al. (2005) demonstrated that mice with Bcl-2 overexpression show a reduction in cell death due to apoptosis and an increase in the number of new neurons in the DG, which means a higher density of granular cells. Together, these data suggest that, probably, the positive effect on neuronal density in the hippocampus presented by treatment with *p*-coumaric acid can be modulated by the expression of Bcl-2. However, further investigations on the mechanisms of action of *p*-coumaric acid in relation to neurogenesis and cell survival are required.

Regardless of the fact that there is no change in the gene expression of proteins that regulate neuronal plasticity in animals that exhibit a depressive-like behavior, we show that there are changes suggestive of cell death and neuronal damage in this model, which can be mediated by an excess of ROS in animals treated with corticosterone. In determining that *p*-coumaric acid appears to reverse these parameters, we believe that its antioxidant properties are essential to modulate the demonstrated antidepressant effect. According to the literature, the antioxidant effects of various compounds protect mitochondria and reduce damage related to

oxidative stress, providing a level of protection against neurotoxicity at the cellular level in depression (Liu et al., 2017b). In fact, the antioxidant activity observed in some studies has been related to a positive effect on the behavior of different animal models (Chhillar; Dhingra, 2013; Silva et al., 2016). Phenolic compounds in general have a marked antioxidant activity due to the organization of their chemical structure. Other compounds derived from the same family of *p*-coumaric acid, especially caffeic and ferulic acids, have already shown antidepressant-like activity corresponding to their antioxidant properties (Lee et al., 2014; Liu et al., 2017a; Takeda et al., 2002).

5. CONCLUSION

We demonstrated that *p*-coumaric acid promotes behavioral, morphological and molecular changes comparable to those evidenced by treatment with fluoxetine, in a model of depression induced by corticosterone. Our results suggest that the antidepressant-like effect of *p*-coumaric acid can be mediated, at least in part, by a regulation on the neuronal survival in the hippocampus, probably due to the antioxidant properties of the compound. In addition, highlighting the relationship between stress and depression, these results indicate that the hippocampus is an important target for the study and that development of new antidepressant agents that protect this region from damage caused by stress is necessary.

FUNDING

This work was supported by the FAPESC under grant 20162235; and CNPq under grant 431280/2016-9.

REFERENCES

1. Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). 2013.
3. Amini-Khoei, H. *et al.* Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 76, p. 169–178, 2017.
4. Bakunina, N.; Pariante, C. M.; Zunszain, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365–373, 2015.
5. Barauna, S. C. *et al.* Antioxidant and antidepressant-like effects of *Eugenia catharinensis* D. Legrand in an animal model of depression induced by corticosterone. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 6, p. 1985–1994, 2018.
6. Brunello, N. *et al.* The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 5, p. 461–475, 2002.

7. Cai, L. *et al.* Salidroside inhibits H₂O₂-induced apoptosis in PC 12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 9, p. 796–802, 2008.
8. Cao, B. *et al.* Hippocampal subfield volumes in mood disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 9, p. 1352–1358, 24 set. 2017.
9. Castagné, V. *et al.* Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, n. SUPPL.55, p. 1–14, 2011.
10. Chevalleyre, V.; Piskrowski, R. A. Hippocampal Area CA2: An Overlooked but Promising Therapeutic Target. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 8, p. 645–655, 2016.
11. Chhillar, R.; Dhingra, D. Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 409–418, 2013.
12. Czéh, B. *et al.* Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, 2016.
13. Dalmarco, E.M. *et al.* Effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. **Int Immunopharmacol**, v. 13, n. 4, p. 476–82, 2012.
14. Duman, R.; Nakagawa, S.; Malberg, J. Regulation of Adult Neurogenesis by Antidepressant Treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 836–844, 2001.
15. Duman, R. S. *et al.* Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nature Medicine**, v. 22, n. 3, p. 238–249, 2016.
16. Elbejjani, M. *et al.* Depression, depressive symptoms, and rate of hippocampal atrophy in a longitudinal cohort of older men and women. **Psychological Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1931–1944, 2015.
17. Fanselow, M. S.; Dong, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.
18. Gawryluk, J. W. *et al.* Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 01, p. 123–130, 2011.
19. Gutteridge, J. M. C.; Halliwell, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.
20. Györfi, O. *et al.* Reduced CA2–CA3 Hippocampal Subfield Volume Is Related to Depression and Normalized by L-DOPA in Newly Diagnosed Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 8, p. 84, 2017.
21. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.
22. Hamon, M.; Blier, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 54–63, 2013.
23. Hillhouse, T. M.; Porter, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental and clinical psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1–21, 2015.
24. Kohara, K. *et al.* Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 269–279, 2014.
25. Kowaltowski, A. J.; Fiskum, G. Redox Mechanisms of Cytoprotection by Bcl-2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 3–4, p. 508–514, 2005.

26. Kuhn, H. G. *et al.* Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 1907–1915, 2005.
27. Latt, H. M. *et al.* Oxytocin Inhibits Corticosterone-induced Apoptosis in Primary Hippocampal Neurons. **Neuroscience**, v. 379, p. 383–389, 2018.
28. Lee, M.-S. *et al.* Novel Antidepressant-Like Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester Is Mediated by Enhanced Glucocorticoid Receptor Function in the Hippocampus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
29. Lee, S. *et al.* Antidepressant-like Effects of p-Coumaric Acid on LPS-induced Depressive and Inflammatory Changes in Rats. **Experimental Neurobiology**, v. 27, n. 3, p. 189, 2018.
30. Liu, Y.-M. *et al.* Elevation of synaptic protein is associated with the antidepressant-like effects of ferulic acid in a chronic model of depression. **Physiology & Behavior**, v. 169, p. 184–188, 2017a.
31. Liu, Z. *et al.* Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 2525967, 2017b.
32. Lopez-Munoz, F.; Alamo, C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 2009.
33. Lowry, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265–75, 1951.
34. Lucca, G. *et al.* Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, n. 9, p. 864–869, 2009.
35. Marklund, S.-I. H. OF METHODS FOR OXYGEN; 1985, F. Pyrogallol autoxidation. **CRC Press Boca Raton, Florida**, [s.d.].
36. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.
37. Olescowicz, G. *et al.* Antidepressant and pro-neurogenic effects of agmatine in a mouse model of stress induced by chronic exposure to corticosterone. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, n. August, p. 395–407, 2018.
38. Oliveira, T. De Q. *et al.* Brain antioxidant effect of mirtazapine and reversal of sedation by its combination with alpha-lipoic acid in a model of depression induced by corticosterone. **Journal of Affective Disorders**, v. 219, p. 49–57, 2017.
39. Otte, C. *et al.* Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. Mdd, p. 1–21, 2016.
40. Pariante, C. M.; Lightman, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 9, p. 464–468, 2008.
41. Porsolt, R. D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 229, n. 2, p. 327–36, 1977.
42. Roddy, D. W. *et al.* The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 6, p. 487–497, 2019.

43. Rosa, P. B. *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 1–6, 2014.
44. SCAPAGNINI, G. *et al.* Antioxidants as Antidepressants. **CNS Drugs**, v. 26, n. 6, p. 477–490, 2012.
45. Schloesser, R. J.; Martinowich, K.; Manji, H. K. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 36–46, 2012.
46. Shen, J. *et al.* Berberine up-regulates the BDNF expression in hippocampus and attenuates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience Letters**, v. 614, p. 77–82, 2016.
47. Shishkina, G. T.; Bulygina, V. V.; Dygalo, N. N. Behavioral effects of glucocorticoids during the first exposures to the forced swim stress. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 5, p. 851–860, 2015.
48. Silva, M. C. C. *et al.* Evidence for protective effect of lipoic acid and desvenlafaxine on oxidative stress in a model depression in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 142–148, 2016.
49. Takeda, H. *et al.* Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European journal of pharmacology**, v. 449, n. 3, p. 261–7, 2002.
50. Teixeira, R. R. *et al.* Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats. **Neuroscience Letters**, v. 655, p. 179–185, 2017.
51. Weibel, E. R.; Kistler, G. S.; Scherle, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of cell biology**, v. 30, n. 1, p. 23–38, 1966.
52. Wendel, A. [44] Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.
53. Wigner, P. *et al.* Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression. **European Psychiatry**, v. 48, p. 38–48, 2018.
54. Willner, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.
55. World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, p. 1–24, 2017.
56. Yalcin, I.; Belzung, C.; Surget, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 1, p. 140–143, 2008.
57. Zeni, A. L. B.; Camargo, A.; Dalmagro, A. P. Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Steroids**, v. 125, n. May, p. 131–136, 2017.
58. Zhang, Z.-J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, v. 75, n. 14, p. 1659–1699, 2004.
59. Zhang, Z. *et al.* Amentoflavone protects hippocampal neurons : antiapoptotic effects. v. 10, n. 7, p. 1125–1133, 2015.
60. Zhou, Q.-G. *et al.* Regional-specific effect of fluoxetine on rapidly dividing progenitors along the dorsoventral axis of the hippocampus. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35572, 2016.

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Sara Cristiane Barauna

RG: 3.819.726

Título da Tese: “EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E ANTIOXIDANTE DE *Eugenia catharinensis* EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA.”

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da tese de minha autoria.

Joinville, 22 de outubro de 2020.



Assinatura do aluno