

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Benefícios da *Eugenia uniflora* em modelo de estresse crônico  
imprevisível**

Natália Porto Flores

Pelotas, 2014

**Natália Porto Flores**

**Benefícios da *Eugenia uniflora* em modelo de estresse crônico imprevisível**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2014

**Natália Porto Flores**

**Benefícios da *Eugenia uniflora* em modelo de estresse crônico imprevisível**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia em Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

10.12.2014

Banca examinadora:

Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello (orientadora)  
Doutora em Ciências Biológicas-Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marta Gazal  
Doutora em Saúde e Comportamento pela Universidade Católica de Pelotas

Profa. Dra. Gabriele Cordenonzi Ghisleni  
Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F634b Flores, Natália Porto  
Benefícios da *Eugenia uniflora* em modelo de estresse crônico  
imprevisível / Natália Porto Flores. – 43f. : il. – Trabalho de conclusão de  
curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas.  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientadora  
Francieli Moro Stefanello.

1.Biotecnologia. 2.*Eugenia uniflora*. 3.Pitanga. 4.Depressão. 5.Estresse  
oxidativo. I.Stefanello, Francieli Moro. II.Título.

CDD: 634.42

**Dedico esse trabalho a minha mãe e  
minha irmã pelo apoio**

## **Agradecimentos**

A Deus, pela oportunidade de concluir uma faculdade.

A minha vó, que onde está sei que sempre esteve torcendo por mim.

Aos meus queridos, Ninja e Mosinho, companheiros de noites acordadas e trazer alegria nos momentos mais difíceis.

A minha mãe, pelo amor, carinho, amizade, incentivo e sobre tudo pela paciência nesse e em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã, pela parceria, incentivo, amizade, risadas, noites acordadas e pela companhia de estudos e de barriga e de vida.

Ao meu cunhado, por me levar para “passear” para desopilar um pouco.

Aos meus amigos, em especial Vanessa, Stefano, Daniela e Julie que me ajudaram a descontraír um pouco nesse período tenso, compartilhando bons momentos, boas risadas e boas histórias.

Aos meus familiares, em especial aos meus padrinhos que sempre me apoiaram e sempre acreditaram em mim.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Francieli Moro Stefanello, pela orientação, amizade, paciência, dedicação e conhecimento transmitido. Agradeço principalmente, pela ótima recepção e oportunidade, e principalmente, a parceria.

Aos colegas do Laboratório de Biomarcadores, pela ajuda, amizade e momentos de descontração, e em especial à Pathise, pela amizade, risadas, caronas, companhia no R.U. e principalmente pelo apoio.

A professora Marta pela ajuda e dedicação nos experimentos.

A Universidade Federal de Pelotas, em especial ao departamento de bioquímica, seus professores e funcionários pela dedicação.

Ao Biotério Central da UFPel, por cuidar dos animais, permitindo assim a realização de nossos experimentos, em especial a Fabi pelo comprometimento e apoio.

## Resumo

FLORES, Natália Porto. **Benefícios da *Eugenia uniflora* em modelo de estresse crônico imprevisível**. 2014. 43f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

A depressão é um transtorno psiquiátrico relativamente comum, associado com significativa morbidade e mortalidade. Apesar do grande número de tratamentos farmacológicos para a depressão, a taxa de sucesso dos antidepressivos não é maior que 50-60%. Dessa forma, é de grande interesse a busca por novas terapias que possam auxiliar no tratamento dessa doença, dentre essas se destacam os produtos naturais devido ao alto teor de compostos bioativos. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antidepressivo e antioxidante de extratos dos frutos de *Eugenia uniflora* (pitanga) em modelo animal de estresse crônico imprevisível (ECI). Nossos resultados mostraram que o tratamento com pitanga preveniu o efeito tipo depressivo induzido pelo ECI avaliado através do teste do nado forçado, sem alterações significativas na locomoção e ansiedade dos animais. Adicionalmente, o extrato de *E. uniflora* reduziu significativamente a lipoperoxidação observada nos animais submetidos ao modelo experimental de depressão induzido pelo ECI tanto em córtex pré-frontal quanto em hipocampo. Entretanto, nenhuma alteração foi observada no conteúdo total de grupamentos tiólicos. Em conjunto, nossos achados sugerem um efeito neuroprotetor da pitanga por prevenir o comportamento tipo depressivo e o dano oxidativo induzido pelo ECI. Sendo assim, esse fruto pode ser considerado um promissor agente terapêutico auxiliar para pacientes acometidos pela depressão.

Palavras-chaves: *Eugenia uniflora*, depressão, estresse oxidativo.

## Abstract

FLORES, Natalia Porto. **Benefits of *Eugenia uniflora* in chronic unpredictable stress model**. 2014. 43f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Depression is a common disorder associated with significant morbidity and mortality. Despite the large number of pharmacological treatments, the success rate of the antidepressant is not higher than 50-60%. Thus, it is of great interest to search for new therapies that can help in the treatment of this disorder, among these natural products stand out due to the high content of bioactive compounds. Considering the above, the objective of this study was to evaluate the antidepressant and antioxidant effect of extracts of the fruits of *Eugenia uniflora* (Brazilian cherry) in an animal model of chronic unpredictable stress (CUS). Our results showed that treatment with Brazilian cherry prevented like-depressant effect induced by CUS measured in the forced swimming test, but no significant change was observed in locomotion and anxiety behavior of the animals. Additionally, *E. uniflora* extract significantly reduced lipid peroxidation observed in the animals subjected to the experimental model of depression induced by CUS in both prefrontal cortex and in the hippocampus. However, no changes were observed in the total content of thiol group. Taken together, our findings suggest a neuroprotective effect of Brazilian cherry by preventing like-depressive behavior and oxidative damage induced by CUS. Thus, this fruit could play an attractive tool for the treatment of depressive disorders.

Keywords: *Eugenia uniflora*, depression, oxidative stress.



## Lista de Figuras

**Figura 1:** Fontes intracelulares de espécies reativas .....19

**Figura 2.** Efeito do estresse crônico imprevisível (ECI) e do extrato de *Eugenia uniflora* (200 mg/kg, v.o.) sobre o teste do nado forçado (TNF, A), a locomoção no campo aberto (B) e ansiedade no campo aberto (C). Resultados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (n =7-10 por grupo). (\*\*)  $P < 0,01$  em comparação com o grupo veículo/controle. (#)  $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/ECI.....29

**Figura 3:** Efeito do estresse crônico imprevisível (ECI) e do extrato de *Eugenia uniflora* (200 mg/kg, v.o.) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e conteúdo tiólico total (B) em córtex pré-frontal de camundongos Resultados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (n =4-5 por grupo). (\*\*)  $P < 0,01$  em comparação com o grupo veículo/controle. (#)  $P < 0,05$  em comparação com o grupo veículo/ECI.....30

**Figura 4:** Efeito do estresse crônico imprevisível (ECI) e extrato de *Eugenia uniflora* (200 mg/kg, v.o.) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e conteúdo tiólico total (B) em hipocampo de camundongos. Resultados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (n =4-5 por grupo). (\*\*)  $P < 0,01$  em comparação com o grupo veículo/controle. (#)  $P < 0,05$  em comparação com o grupo veículo/ECI.....31

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Estressores utilizados para indução do ECI.....	25
--	----

## **Lista de Abreviaturas**

**CAT** – Catalase

**ECI** – Estresse crônico imprevisível

**ER** – Espécies reativas

**ERN** – Espécies reativas de nitrogênio

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**GABA** – Ácido gama- aminobutírico

**GPX** – Glutaciona peroxidase

**GR** – Glutaciona redutase

**GSH** – Glutaciona

**MDA** – Malondialdeído

**SNC** – Sistema nervoso central

**SOD** – Superóxido dismutase

**TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TH** – Transtornos de humor

**TNF** – Teste do nado forçado

## Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	14
3. Revisão de Literatura.....	15
3.1. Depressão.....	15
3.2. Modelo Animal de Depressão .....	17
3.3. Estresse Oxidativo e Depressão.....	18
3.4. Pitanga ( <i>Eugenia uniflora</i> ).....	22
4. Metodologia .....	24
4.1. Animais .....	24
4.2. Preparação do extrato e via de administração .....	24
4.3. Modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) .....	24
4.4. Testes Comportamentais.....	26
4.4.1. Teste do Nado Forçado.....	26
4.4.2. Teste do Campo Aberto.....	26
4.5. Parâmetros de Estresse Oxidativo .....	26
4.5.1. Preparação do Tecido.....	26
4.5.2. Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	27
4.5.3. Medida do Conteúdo Tiólico Total.....	27
4.5.4. Determinação Proteica.....	27
4.6. Análise Estatística.....	27
5. Resultados.....	28
6. Discussão .....	32
7. Conclusão.....	34
Referências.....	35

## 1. Introdução

Transtornos mentais são prevalentes em todas as regiões do mundo e os principais contribuintes de morbidade e mortalidade prematura (WHO, 2008). Dentre os mais comuns estão os transtornos humor (TH), os quais afetam grupos de diferentes idades, gêneros e classes sociais. Estima-se que 14% da população mundial doente, seja devido a esses transtornos e a maioria das pessoas atingidas, são de baixa renda e não têm acesso ao tratamento adequado (WHO, 2014). Os TH são caracterizados por manifestações afetivas das quais as mais comuns são os transtornos unipolares (depressivos) e transtornos bipolares (episódios maníacos, hipomaníacos, depressivos, ou mistos) conforme Manual Estatístico para Transtornos Mentais (5th ed.; DSM-V).

A depressão tem sido tratada farmacologicamente por três décadas. Apesar disso, com o passar do tempo não houve uma melhora notável nas terapias disponíveis. Uma explicação para a falta de avanços é que a etiologia exata desses transtornos mentais permanece indefinida. Dessa forma, torna-se difícil identificar os principais mecanismos envolvidos e conseqüentemente desenvolver terapias mais eficazes (KENDLER et al., 2011). No entanto, algumas explicações são propostas, dentre elas, o estresse oxidativo. É sabido que o estresse oxidativo leva a danos de proteínas celulares, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, contribuindo para a neurodegeneração, uma vez que o encéfalo possui uma capacidade antioxidante limitada, sendo altamente susceptível ao dano oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007, SIWEK et al., 2013).

Estudos têm revelado que compostos antioxidantes apresentam atividade antidepressiva (EREN et al., 2007, ZAFIR et al., 2009) e dessa maneira, é razoável propor o uso de antioxidantes exógenos como auxiliar no tratamento da depressão. Nesse sentido, terapias à base de plantas podem ser interessantes alternativas ao tratamento dos TH, visto que, algumas espécies são ricas em compostos bioativos com função antioxidante.

A *Eugenia uniflora* (pitanga) apresenta diversas atividades biológicas com hipotensora, antigota, hipoglicemiante, antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (ADEBAJO et al., 1989; ALMEIDA et al., 1995; SOUZA et al., 2004; AURICCHIO; BACCHI, 2003; VICTORIA et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado o papel hepatoprotetor e antidepressivo do óleo essencial de suas folhas (VICTORIA et al.,

2013a,b). Dessa forma, torna-se interessante investigar o papel da *Eugenia uniflora* para o tratamento da depressão, visto que é rica em compostos com ação antioxidante os quais podem apresentar efeitos benéficos nessa doença (FIGUEIROA et al., 2013).

Considerando que a depressão é uma das doenças de maior prevalência e acarreta importantes prejuízos pessoais, sociais e econômicos, quando não tratada, é relevante o desenvolvimento de estratégias inovadoras para auxiliar no tratamento desse transtorno.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos de extrato de frutos de *Eugenia uniflora* sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em modelo animal de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI).

### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1** Avaliar o efeito da administração de *Eugenia uniflora* em parâmetros comportamentais como os testes do campo aberto e nado forçado em modelo animal de ECI.

**2.2.2** Determinar o efeito da administração de *Eugenia uniflora* sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo como as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo total de grupamentos sulfidrilas no córtex pré-frontal de animais submetidos ao modelo de ECI.

**2.2.3** Determinar o efeito da administração de *Eugenia uniflora* sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo como TBARS e conteúdo total de grupamentos sulfidrilas no hipocampo de animais submetidos ao modelo de ECI.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1 Depressão

A depressão é uma condição médica frequente, considerada um dos transtornos mais incapacitantes (ABRATA, 2014). Geralmente ocorre no início da vida adulta, podendo seguir um curso crônico, afetando negativamente o prognóstico de outras doenças, tais como doença coronariana vascular, diabetes e osteoporose (CHARNEY; MANJI, 2004). Dentre os sintomas pode-se destacar tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa ou baixa autoestima, distúrbios do sono ou do apetite, sensação de cansaço e falta de concentração. Além disso, sem um tratamento adequado pode prejudicar substancialmente a capacidade do indivíduo de desempenhar suas tarefas diárias. Na sua forma mais grave, a depressão pode levar ao suicídio (WHO, 2014).

Tem se comparado a depressão a um estado de "envelhecimento acelerado", onde há comprometimento dos sistemas cardiovascular, cerebrovascular, neuroendócrino, metabólico e imune (HEUSER, 2002; BAUER, 2008; WOLKOWITZ et al., 2010). Dessa forma, indivíduos que sofrem de transtorno depressivo possuem maior risco de desenvolver doenças, as quais são frequentemente associadas com o envelhecimento, tais como a diabetes tipo II, síndrome metabólica, osteoporose, doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e envelhecimento cognitivo patológico, inclusive a doença de Alzheimer e outras demências (SPECK; KUKULL, 1995; EVANS, 2005; MCLNTYRE, 2007; WOLKOWITZ et al., 2010).

Os mecanismos neuroquímicos da depressão não são completamente compreendidos. No entanto, sugere-se a ocorrência de alterações nos sistemas de neurotransmissores e nas projeções neurais das regiões límbicas e corticais do cérebro (DUMAN, 2013). Hipóteses iniciais se concentravam nas monoaminas como serotonina, norepinefrina, e dopamina. A hipótese das monoaminas inicialmente postulou que os indivíduos deprimidos são propensos a ter baixos níveis desses neurotransmissores e várias drogas antidepressivas aumentam seus níveis (HIRSCHFELD, 2000). Nos últimos tempos, o foco está nos neurotransmissores glutamato e GABA (BRAMBILLA et al., 2003).



A hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal também está relacionada com a depressão (MELLO et al., 2007). Ainda, evidências apontam o envolvimento do sistema imune nesse transtorno, uma vez que pesquisas demonstram a existência de relações entre esse sistema e o sistema nervoso central (SNC) (SCHIEPERS et al., 2005; MILLER et al., 2009; ZUNSZAIN et al., 2011). Nesse contexto, pesquisadores demonstraram a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com depressão (SCHIEPERS et al., 2005).

Outra teoria que vem ganhando força é a do estresse oxidativo. Sabendo do seu papel na patogênese de diversas neuropatologias, ultimamente é crescente o corpo de pesquisa que aponta seu envolvimento também na fisiopatologia da depressão (PALTA et al., 2014). Nesse sentido, recentemente foi observada uma associação significativa entre depressão e estresse oxidativo através de estudos de marcadores de dano oxidativo. Pesquisadores demonstraram níveis mais elevados desses marcadores em pacientes com depressão em relação aos controles (YANIK et al., 2004; MICHEL et al., 2007; CHUNG et al., 2013).

Alguns autores demonstraram a coexistência do aumento do estresse oxidativo e sintomas de depressão em alguns pacientes, evidenciado pela deficiência de defesas antioxidantes no plasma, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), e também, pelo aumento da lipoperoxidação, evidenciada pela elevação na concentração de produtos da peroxidação lipídica (MAES et al., 2000; TRABER et al., 2008). O tratamento com antidepressivos tem a capacidade de normalizar os níveis de marcadores do estresse oxidativo (HERKEN et al., 2007).

O estresse oxidativo leva a danos em organelas celulares e biomoléculas, contribuindo para a neurodegeneração (VALKO et al., 2007). A vulnerabilidade do sistema nervoso ao ataque oxidativo e sua correlação com distúrbios neurológicos, como a depressão, desperta para o desenvolvimento de novas terapias baseadas em compostos antioxidantes (BERK et al., 2008).

### 3.2. Modelo Animal de Depressão

Os modelos animais são ferramentas de grande importância tanto na pesquisa básica, quanto na aplicada para o estudo da biologia humana e das doenças, além do desenvolvimento de medicamentos e vacinas, no intuito de melhorar e promover a saúde humana. Para praticamente todas as doenças humanas conhecidas, os cientistas tentam induzir aspectos semelhantes nos animais, no intuito de criar um bom “modelo”. Supostamente com valor preditivo, os animais são usados com o objetivo de descobrir e quantificar o impacto de um tratamento, cura e toxicidade (GREEK, 2009).

Os estudos de transtornos mentais utilizando modelos animais apesar de apresentarem limitações, permitem a compreensão de um fator em determinado transtorno, controlando-se as outras variáveis. Esses modelos possibilitam também estudar a interação entre as múltiplas variáveis, visto que, os distúrbios mentais são doenças complexas e multifatoriais. Entre as principais limitações dos modelos animais, está o fato de nos limitarmos à observação de alterações comportamentais ou fisiológicas em virtude da característica subjetiva e introspectiva desses transtornos (ANDREATINI, 2002). Apesar disso, os modelos animais são muito importantes na compreensão dos transtornos mentais, visto que, os mesmos são responsáveis, em grande parte, pelo desenvolvimento das hipóteses que relacionam as possíveis bases neurobiológicas dessas doenças e, pelo que se sabe atualmente, sobre as ações dos psicofármacos (ANDREATINI, 2002, VALVASSORI et al., 2013).

Embora seja impossível recriar fielmente todos os aspectos de uma determinada doença, principalmente, transtornos psiquiátricos, modelos experimentais mimetizam um ou alguns dos sintomas associados à doença ou são sensíveis aos fármacos utilizados clinicamente (KATO et al., 2007, VALVASSORI et al., 2013).

Nesse contexto, o estresse crônico imprevisível (ECI) é um dos modelos que melhor reproduz as principais causas da depressão em humanos. Esse modelo baseia-se na exposição crônica de roedores a diferentes agentes estressores, tanto físicos quanto psicológicos, induzindo diversas alterações fisiológicas e comportamentais tais como anedonia, elevação de corticosterona, redução da neurogênese, o que confere ao modelo alta validade preditiva e fenomenológica (WILLNER, et al., 1992, D'AQUILA, 1994, WILLNER, et al., 1997).

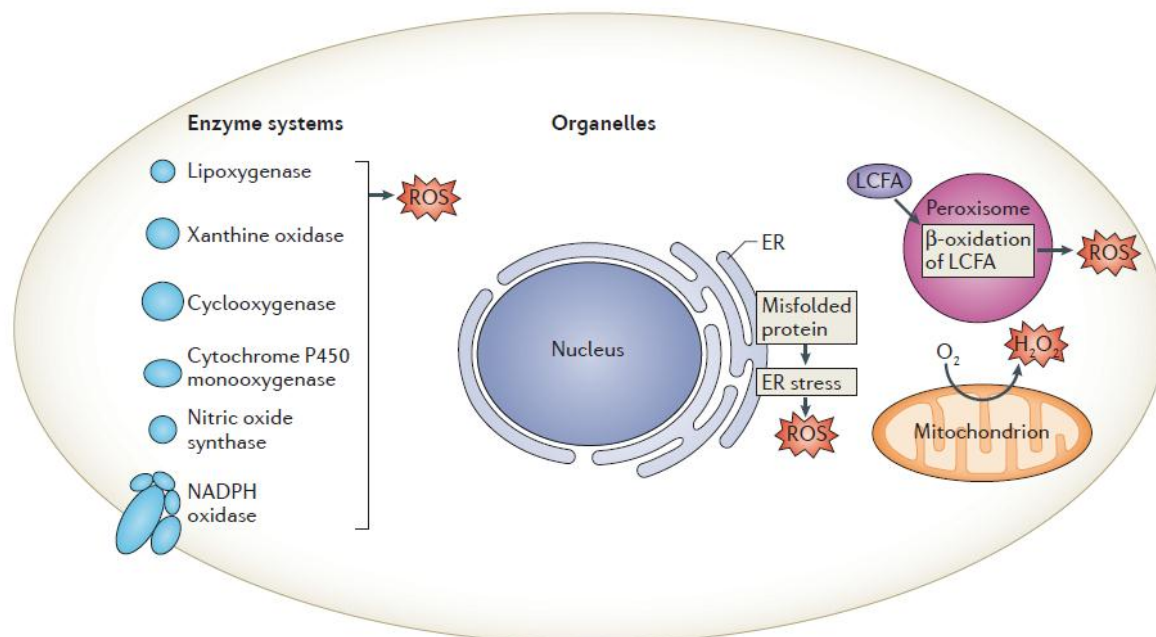
### 3.3 Estresse Oxidativo e Depressão

O estresse oxidativo foi descrito por Sies (1991) como um desequilíbrio no balanço entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes. Quando as espécies pró-oxidantes superam os níveis de antioxidantes, podem ocorrer danos às biomoléculas. O aumento desses danos oxidativos implica na incapacidade de reparar ou repor biomoléculas oxidadas.

A instalação do estresse oxidativo pode ser promovida em detrimento da velocidade de remoção de espécies reativas (ER), sendo pela diminuição das defesas antioxidantes ou pela geração excessiva dessas espécies. As ER podem ser de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), de enxofre e de carbono, sendo as principais, as ERO. As ER podem ainda ser didaticamente divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Isso permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas. Alguns exemplos são:  $\text{OH}^\bullet$  (radical hidroxila),  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (ânion superóxido),  $\text{NO}$  (óxido nítrico). Os radicais livres podem agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Os compostos não radicalares, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio) e  $\text{HOCl}$  (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sendo portanto menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas na sua redondeza (MARTELLI; NUNES, 2014).

As ER podem ser geradas por fontes endógenas e exógenas. Endogenamente, a principal fonte dessas espécies é o processo de respiração celular que acontece no interior da mitocôndria, onde o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Figura 1). As mitocôndrias, através de uma sequência de reações de oxidação e redução reduzem praticamente todo o  $\text{O}_2$  (NELSON; COX, 2011). No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outras vias metabólicas, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (SCHNEIDER, 2004). Outras fontes importantes são os peroxissomos e retículo endoplasmático (Figura 1) (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).



**Figura 1:** Fontes intracelulares de espécies reativas (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).

A formação de ER constitui um processo contínuo e fisiológico, desempenhando funções relevantes. Essas espécies atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas, no processo fagocitário, de sinalização celular, de regulação de proteínas e resposta imunológica, no entanto, uma completa inibição de sua formação ou sua produção em excesso pode ser extremamente perigosa ao organismo, já que, por serem altamente reativas, podem provocar reações em cadeia e oxidar moléculas como lipídeos, proteínas e DNA. Adicionalmente, estão associadas a diversas patologias como, disfunção hepática, inflamações, comprometimento imunológico, carcinogênese, podendo ainda causar dano ou morte celular (SHAMI; MOREIRA, 2004; ZOU et al., 2010; ELLAH, 2011; BUTTERFIELD; SULTANA, 2011; SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011).

As membranas biológicas são vulneráveis aos ataques das espécies reativas, pois são compostas de lipídeos e proteínas. A peroxidação lipídica dessas membranas altera a arquitetura celular, o que interfere na sua permeabilidade e altera a seletividade nas trocas iônicas favorecendo a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos das células, podendo levar a ruptura e lise celular (TIMBRELL, 2000). Consequentemente, ocorre a liberação e formação de produtos

citotóxicos. Esses produtos são utilizados para monitorar o processo de peroxidação lipídica em condições fisiológicas, sendo o malonaldeído (MDA) o principal produto, uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), comumente dosado. Os produtos da peroxidação lipídica ainda podem reagir com macromoléculas como proteínas e bases nitrogenadas do DNA (MARNETT, 2002; NAIR et al., 2007).

A oxidação de proteínas decorre da ação dos radicais livres sobre os grupos tióis, causando também agregação e fragmentação de aminoácidos. Isso leva a mudanças estruturais e mau funcionamento catalítico podendo levar a inativação da proteína (SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011). Adicionalmente, as ER podem danificar proteínas transmembrana, como enzimas, receptores e canais iônicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Devido à produção contínua de ER nos processos metabólicos surgiram os mecanismos de defesa antioxidante. Desse modo, o organismo conta com um sistema de defesa endógeno enzimático, composto pelas enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx, e não enzimático a exemplo de glutathiona reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido lipóico e coenzima Q. Além dos antioxidantes endógenos, o organismo utiliza aqueles antioxidantes exógenos provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), betacaroteno, ácido ascórbico, e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e polifenóis (BARREIROS et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A GSH é o principal antioxidante endógeno, desempenhando um papel importante na biologia e medicina. Esse tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos (HUBER et al., 2008). A maioria das células contém altas concentrações de GSH e uma quantidade muito menor de glutathiona oxidada. Esse antioxidante é importante para várias funções celulares, como por exemplo, a proteção do estresse oxidativo, mediação de reações enzimáticas, a regulação dos eventos metabólicos, o transporte de aminoácidos através das membranas celulares, a eliminação de compostos estranhos e a liberação de substâncias neurotransmissoras (BENOHR; WALLER, 1975; MORRIS et al., 2014). Alterações no metabolismo da GSH estão envolvidas na patogênese de algumas doenças que afetam o SNC (GU et al., 2014; MORRIS et al., 2014). Nesse contexto, dados recentes relatam que a depleção de

GSH e concomitante dano oxidativo e nitrosativo estão relacionados à fisiopatologia de doenças neuroimunes incluindo depressão, encefalomielite, doença de Parkinson, entre outras (MORRIS et al., 2014).

Pode-se definir estresse oxidativo quando a produção de ER causada por presença de toxinas ou ainda por ativação excessiva do metabolismo como em casos de inflamações crônicas – possui um balanço positivo em relação às defesas antioxidantes, ou ainda, quando essas defesas encontram-se com níveis diminuídos, por mutações enzimáticas ou ainda por deficiência de antioxidantes provenientes da dieta, apresentando o mesmo balanço negativo em relação às ER (ZOU et al., 2010, BUTTERFIELD; SULTANA, 2011, ELLAH, 2011).

Desse modo, o desequilíbrio entre agentes antioxidantes e pró-oxidantes favorece a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os marcadores do dano oxidativo, que podem ser identificados e quantificados. Esses marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (BARBOSA et al., 2010).

Sabe-se que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas incluindo a depressão (CUMURCU et al., 2009; SIWEK et al., 2013). A vulnerabilidade do sistema nervoso é decorrente de suas características estruturais e metabólicas como alto consumo de oxigênio, grandes quantidades de cadeias lipídicas insaturadas, abundância de íons metálicos e baixa disponibilidade de enzimas antioxidantes (GU et al., 2008). É importante ressaltar que áreas cerebrais como o córtex cerebral, hipocampo e cerebelo são altamente vulneráveis aos danos causados pelas ERO (WANG et al., 2009).

Muitos estudos entendem que o desequilíbrio da sinalização redox é crucial na fisiopatologia e natureza neuroprogressiva da depressão (MAES et al., 2011). O estresse oxidativo e nitrosativo pode causar danos aos componentes celulares, induzir respostas autoimunes prejudiciais, e facilitar a falha dos processos normais da célula (MOYLAN et al., 2014).

Estudos utilizando modelos animais e clínicos demonstraram associação da depressão com níveis elevados de produtos de reações redox, tais como o MDA, marcador de peroxidação lipídica, e 8-iso-prostaglandina F2 (8-iso) (marcador de peroxidação do ácido araquidônico) (DIMOPULOS et al., 2008; FORLENZA; MILLER, 2006; GALECKI et al., 2009; YAGER et al., 2010). Além disso, outros estudos relataram danos oxidativos ao DNA (FORLENZA; MILLER, 2006) e ao RNA

(CHE et al., 2010). A desregulação de sistemas antioxidantes contribui para o desenvolvimento da depressão através da redução da proteção, resultando num risco aumentado de sofrer danos por ER (FORLENZA; MILLER, 2006, MAES et al., 2011, MOYLAN, 2014).

Além da depressão, existem diversas outras doenças neurológicas nas quais o estresse oxidativo parece estar envolvido. Desse modo, a descoberta do envolvimento das ER nessas patologias tem levado ao desenvolvimento de terapias antioxidantes (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Nos últimos anos, tem crescido o interesse na identificação de novos antioxidantes, principalmente de fontes naturais (GULÇIN, 2012).

### **3.4 Pitanga (*Eugenia uniflora*)**

O gênero *Eugenia* é considerado um dos maiores pertencentes à família Myrtaceae (subfamília Myrtaceae), com cerca de 500 espécies de árvores e arbustos na América tropical e subtropical. A maioria das espécies está distribuída no Brasil, assumindo uma importância na medicina popular devido as suas variadas propriedades terapêuticas (FAQUETI et al., 2013).

Uma dessas espécies é a *Eugenia uniflora* L comumente conhecida como pitanga. Essa planta é cultivada em muitos países e é adequada para a produção de sumo, polpas congeladas e chá (RATTMAN et al., 2012). É muito utilizada na medicina popular para tratar inflamações, dores reumáticas, febre, também como hipoglicemiante, diurético e tem sido amplamente utilizada na indústria de cosméticos (AMORIM et al., 2009). Muitos estudos experimentais têm demonstrado o potencial biológico dos extratos, óleos essenciais ou de frações obtidas de diferentes plantas desta família, como *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Eugenia punicifolia* (cereja do cerrado), *Eugenia singampattiana* (Kattukorandi), *Eugenia jambolana* Lam (jambolão) entre outras (PRADO et al., 2014, BASTING et al., 2014, LOPES et al., 2014, JOHN et al., 2014, CHINNI et al., 2014).

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) tem origem na região que se estende desde o Brasil Central até o norte da Argentina, estando distribuída por quase todo o território brasileiro, e em outras partes do mundo (BEZERRA et al., 2000; DONADIO et al., 2002). É cultivada na América Central, Antilhas, Flórida, Califórnia, Havaí, China Meridional, Ceilão, Argélia, Tunísia, Sul da França, tendo em vista sua grande

capacidade de adaptação. No Brasil ocorre desde o Estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (SANCHOTENE, 1985). Apresenta-se como um arbusto ou árvore semidecídua, de 4 a 10 m de altura, copa estreita, de tronco liso de cor pardo clara. As folhas são simples, cartáceas, de 3 a 7 cm de comprimento, com aroma característico. As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas e nas extremidades dos ramos. Os frutos são do tipo drupa, globosos e sulcados, brilhantes e com colorações que variam de laranja-claro a roxo-escuro, apresentam polpa carnosa e agridoce, contendo de 1 a 2 sementes (LORENZI; MATOS, 2002).

*Eugenia uniflora* é uma planta de frutos comestíveis muito conhecida e apreciada no Brasil. Seus frutos maduros são bem característicos, arredondados e relativamente pequenos (ALMEIDA et al., 1995, AURICCHIO; BACCHI, 2003). A pitanga foi introduzida na medicina empírica pelos índios guaranis no século XV (FIUZA et al., 2008). O chá de suas folhas tem aplicação, principalmente como hipotensor, antigota e hipoglicemiante (ALMEIDA et al., 1995, AURICCHIO; BACCHI, 2003).

Segundo pesquisadores o óleo essencial das folhas de pitanga apresenta ação antifúngica e antimicrobiana (ADEBAJO et al., 1989, SOUZA et al., 2004, VICTORIA et al., 2012). Também foi comprovada a atividade antioxidante do óleo essencial de *E. uniflora*, através da capacidade de sequestrar radicais livres sintéticos e capacidade redutora do íon férrico (VICTORIA et al., 2012). Além disso, foi demonstrando papel hepatoprotetor devido à restauração de dano oxidativo no fígado de animais com injúria hepática (VICTORIA et al., 2013).

O extrato alcoólico da folha de pitanga (*Eugenia uniflora*) apresentou efeito antioxidante através da sua capacidade de inibir de forma significativa a formação de TBARS induzida por agentes pró-oxidantes (VICTORIA et al., 2012). Adicionalmente, BAGETTI e colaboradores (2011) demonstraram ação antioxidante nos extratos de frutas de pitanga roxa, provavelmente devido ao alto conteúdo fenólico e de antocianinas. Também foi demonstrado efeito antidepressivo do óleo essencial das folhas de pitanga (VICTORIA et al., 2013). No entanto, não há relatos do efeito antidepressivo do extrato dos frutos.



## **4. Metodologia**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados 48 camundongos machos Swiss de 60 dias de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram colocados em condições experimentais controladas, a uma temperatura de 24°C, água e comida ad libitum, ciclo claro/escuro de 12h). A manipulação e os cuidados com os animais foram conduzidos de acordo com o Guia de Uso e Cuidados com animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel sob número 9194.

### **4.2. Preparação do extrato e via de administração**

O extrato hidroalcoólico de frutos de *Eugenia uniflora* foi preparado de acordo com BORDIGNON et al. (2009), com modificações. Os frutos foram cortados em pequenos pedaços e pesados. Posteriormente, foram sonicados com etanol 70° GL acidificado (pH 1,0) por 30 min. Após a extração, filtrou-se o extrato e o procedimento foi repetido mais três vezes. Então, o extrato foi neutralizado, evaporado e concentrado em evaporador rotativo e por fim liofilizado até *secura total*.

A dose de extrato utilizada neste estudo foi de 200 mg/kg de peso corporal, escolhida com base em dados prévios do nosso grupo de pesquisa. O extrato e o veículo (água) foram administrados por via oral (p.o.), uma vez ao dia, durante os 14 dias de tratamento.

### **4.3. Modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI)**

Foi utilizado o modelo de ECI, pois é um dos modelos que melhor mimetiza os principais fatores que desencadeiam a depressão em humanos. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle/água, controle/extrato, ECI/água e ECI/extrato. O protocolo do ECI que foi aplicado é uma versão modificada daquele utilizado por LU et al. (2006) e consiste na aplicação de diferentes tipos de agentes estressores, físicos e psicológicos, diariamente, por um período total de 14 dias. Os estressores

utilizados foram, banho frio (15°C) por 10 min, 1,5 h de retenção, maravalha molhada/caixa inclinada (45°) por 16h, prendedor na cauda por 10 min, suspensão pela cauda por 6 min, deprivação de água e comida 16 h, estímulo do cheiro, 3 borrifadas de ácido acético em cada caixa por 16h conforme a tabela abaixo (Tabela 1). Os parâmetros comportamentais foram avaliados 24 h após a última exposição ao agente estressor com o teste do nado forçado e teste do campo aberto.

**Tabela 1. Estressores utilizados para indução do ECI**

Dia	Estressores	Duração
1	Retenção	1.5h
2	Banho frio (15°C)	10 min
3	Molhar a maravalha/inclinar a caixa (45°)	16h
4	Prendedor na cauda	10min
5	Suspensão pela Cauda	6min
6	Deprivação de água e comida	16h
7	Estímulo do cheiro, 3 borrifadas de ácido acético em cada caixa	16h
8	Retenção	1.5h
9	Banho frio (15°C)	10 min
10	Molhar a maravalha/inclinar a caixa (45°)	16h
11	Prendedor na cauda	10min
12	Deprivação de água e comida	16h
13	Suspensão pela Cauda	6min
14	Retenção	1.5h

## **4.4. Testes Comportamentais**

### **4.4.1. Teste do Nado Forçado (TNF)**

Um dos testes comportamentais utilizados foi o TNF, pois é um dos modelos comportamentais mais utilizados para detectar atividade antidepressiva de fármacos. O método original foi descrito por PORSOLT et al. (1977) e baseia-se na observação do tempo de imobilidade do animal em uma situação onde não há possibilidade de escape. O animal é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. O aparato consiste em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os animais são colocados um por vez e o tempo de imobilidade é cronometrado durante 6 minutos.

### **4.4.2. Teste do Campo Aberto**

Para avaliar os possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* sobre a atividade locomotora e perfil ansiolítico, os animais foram avaliados no paradigma de campo aberto, como proposto por KASTER et al. (2004). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais. O teste é feito em uma sala acusticamente isolada e com baixa luminosidade. Os animais são colocados individualmente no quadrante esquerdo da parte traseira da caixa. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas em um período de 6 min é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. O piso do aparato do campo aberto é limpo com etanol a 40% entre os testes.

## **4.5. Parâmetros de Estresse Oxidativo**

### **4.5.1 Preparação do Tecido**

Os animais foram decapitados imediatamente após o teste comportamental e tiveram o córtex pré-frontal e hipocampo dissecados manualmente, congelados em gelo seco e armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$  até análise. No momento das análises bioquímicas, as estruturas foram descongeladas e homogeneizadas em tampão

fosfato de sódio. Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 3500 rpm por 10 min à 4°C e o sobrenadante foi utilizado, sendo descartado o precipitado.

#### **4.5.2 Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

O efeito antioxidante do extrato de pitanga sobre a lipoperoxidação foi avaliado utilizando a medida do TBARS segundo o método de OHKAWA et al. (1979). Os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg proteína.

#### **4.5.3 Medida do Conteúdo Tiólico Total**

A determinação do conteúdo tiólico total foi realizada segundo o método de AKSENOV e MARKESBERY (2001), sendo um parâmetro de avaliação de dano oxidativo a proteínas presentes na amostra. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

#### **4.5.4 Determinação Proteica**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

#### **4.6 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. A comparação de dados entre os grupos foi efetuada utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni, quando apropriado. Um valor de  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM®5.

## 5. Resultados

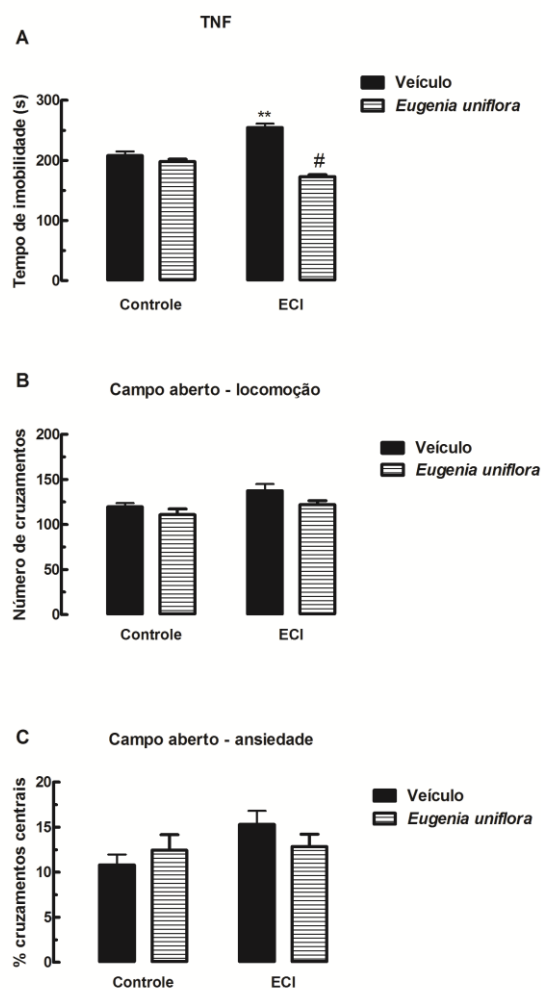
Nossos resultados demonstraram que os animais submetidos aos estressores exibiram um aumento significativo no tempo de imobilidade na tarefa do nado forçado quando comparados aos animais controle. Ainda, a administração crônica de *E. uniflora* preveniu o aumento no tempo de imobilidade ( $P < 0,05$ ) (Figura 2A).

A fim de excluir efeitos motores inespecíficos que poderiam influenciar no desempenho dos animais no teste do nado forçado, esses foram submetidos ao teste do campo aberto. O modelo de ECI e o tratamento com *E. uniflora* não alteraram a locomoção dos animais nessa tarefa comportamental. Dessa forma, sugere-se que o efeito da *E. uniflora* não está relacionado com alterações na atividade locomotora ( $P > 0,05$ ) (Figura 2B).

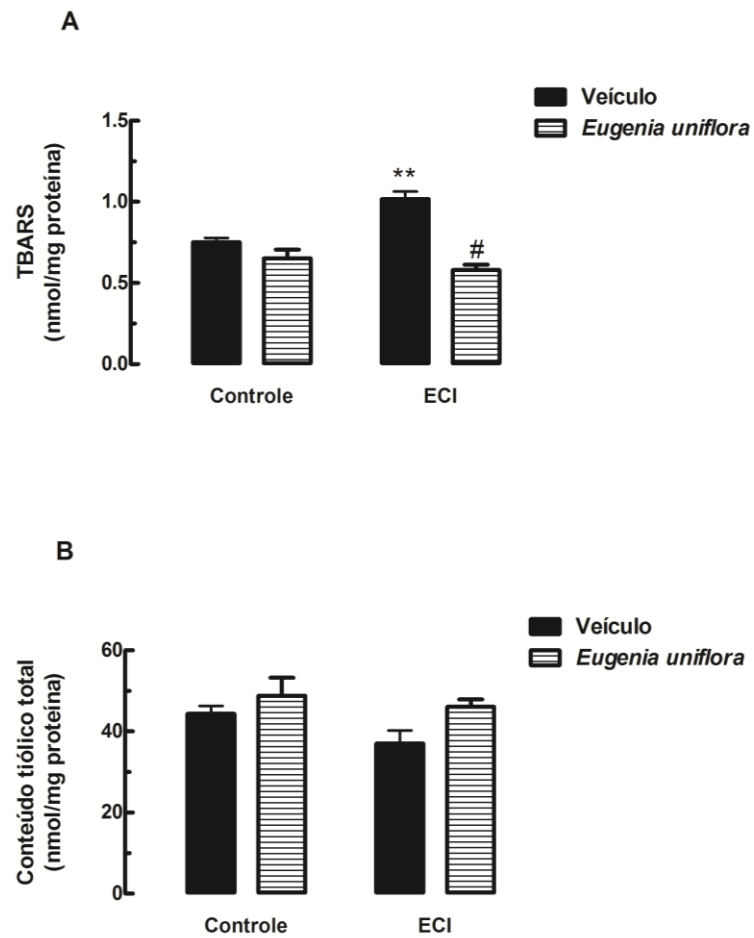
Através do campo aberto também foi possível observar o perfil ansiolítico dos camundongos submetidos ao ECI e tratados com extrato de *E. uniflora*. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas no perfil ansiolítico desses animais ( $P > 0,05$ ) (Figura 2C).

No presente estudo os animais submetidos ao ECI apresentaram um aumento significativo dos níveis de TBARS no córtex pré-frontal. No entanto, administração de extrato de *E. uniflora* foi capaz de impedir o aumento dos níveis de TBARS ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nos níveis de tióis totais ( $P > 0,05$ ) (Figura 3).

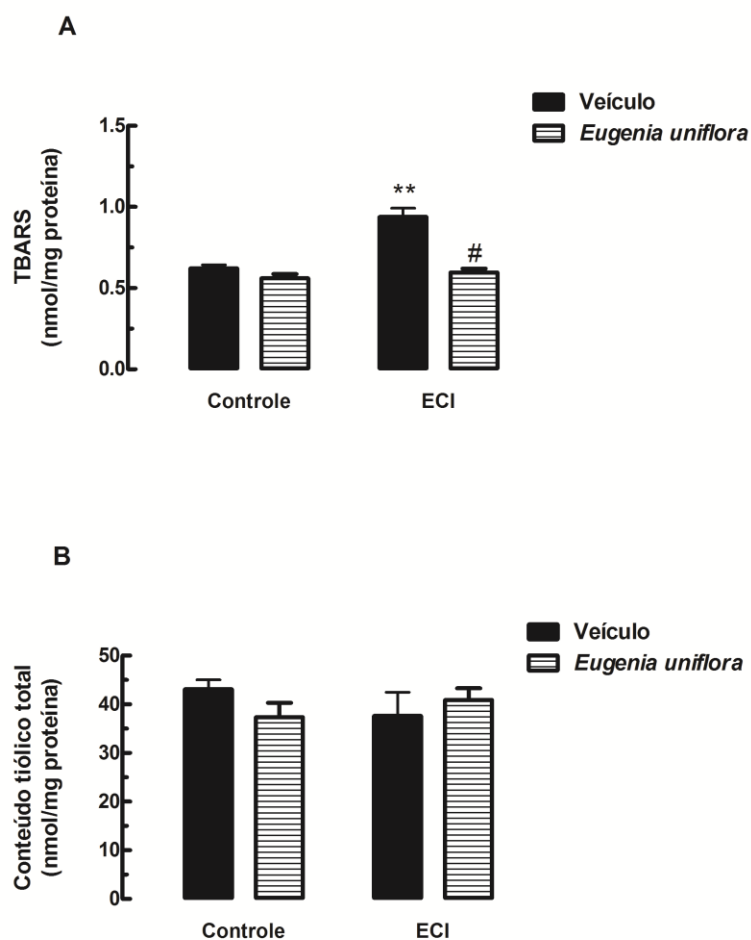
Similarmente ao córtex pré-frontal, observou-se um aumento significativo dos níveis de TBARS em hipocampo de animais submetidos ao modelo experimental de depressão e a administração de extrato de *E. uniflora* foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica nessa estrutura cerebral ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, o conteúdo de sulfidrilas não foi alterado em nenhum dos grupos analisados ( $P > 0,05$ ) (Figura 4).



**Figura 2:** Efeito do estresse crônico imprevisível (ECI) e extrato de *Eugenia uniflora* (200 mg/kg, v.o.) sobre o teste do nado forçado (TNF, A), a locomoção no campo aberto (B) e ansiedade no campo aberto (C). Resultados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (n =7-10 por grupo). (\*\*)  $P < 0,01$  em comparação com o grupo veículo/controle. (#)  $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/ECI.



**Figura 3:** Efeito do estresse crônico imprevisível (ECI) e extrato de *Eugenia uniflora* (200 mg/kg, v.o.) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e conteúdo tiólico total (B) em córtex pré-frontal de camundongos. Resultados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (n =4-5 por grupo). (\*\*)  $P < 0,01$  em comparação com o grupo veículo/controle. (#)  $P < 0,05$  em comparação com o grupo veículo/ECI.



**Figura 4:** Efeito do estresse crônico imprevisível (ECI) e extrato de *Eugenia uniflora* (200 mg/kg, v.o.) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e conteúdo tiólico total (B) em hipocampo de camundongos. Resultados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (n =4-5 por grupo). (\*\*)  $P < 0,01$  em comparação com o grupo veículo/controle. (#)  $P < 0,05$  em comparação com o grupo veículo/ECI.



## 6. Discussão

A depressão é considerada um dos transtornos médicos mais incapacitantes, que geralmente ocorre no início da vida adulta, podendo seguir um curso crônico, afetando negativamente o prognóstico de outras doenças (CHARNEY; MANJI, 2004). Apesar do grande número de tratamentos farmacológicos para a depressão, cerca de 40% dos pacientes não respondem ao tratamento inicial (NESTLER et al., 2002).

No presente trabalho utilizamos o modelo animal de ECI, pois é um dos modelos que melhor reproduz os principais sintomas da depressão em humanos. Esse modelo baseia-se na exposição crônica de roedores a diferentes agentes estressores possibilitando a avaliação de parâmetros bioquímicos e comportamentais em animais e possíveis intervenções farmacológicas (WILLNER, et al., 1997; MCGONIGLE, 2013).

Inicialmente avaliamos o efeito do tratamento com *E. uniflora* sobre parâmetros comportamentais em animais submetidos ao modelo de ECI. Nossos resultados demonstraram que os animais submetidos aos estressores exibiram um aumento significativo no tempo de imobilidade nessa tarefa comportamental quando comparados com os animais controle, sendo a administração de pitanga efetiva em prevenir o aumento no tempo de imobilidade, sugerindo uma ação tipo antidepressiva desse fruto. Entretanto, nenhuma alteração foi observada na ansiedade e também na atividade locomotora dos animais avaliados através do teste do campo aberto. Corroborando com nossos achados, Victoria e colaboradores (2013) demonstraram o efeito antidepressivo de óleos essenciais extraídos de folhas de *E. uniflora*, bem como o envolvimento dos sistemas serotoninérgicos e adrenérgicos nesse efeito.

Evidências clínicas recentes têm demonstrado a coexistência do estresse oxidativo e doenças neuropsiquiátricas como a depressão (SIWEK et al., 2013). Dessa forma, considerando que frutos de *E. uniflora* apresentaram ação antidepressiva, nós estendemos nossos estudos avaliando o efeito antioxidante desse fruto sobre parâmetros de estresse oxidativo em modelo animal de depressão, visto que há um grande interesse do corpo científico na identificação de antioxidantes naturais com grande potencial terapêutico.

Nossos resultados demonstraram um aumento nos níveis de TBARS tanto em córtex pré-frontal quanto em hipocampo de animais estressados. Sabe-se que a peroxidação lipídica induz alterações nas propriedades das membranas biológicas tais como, distúrbios na estrutura, perda de função, e modificações na permeabilidade, que podem resultar em neurodegeneração (MISOEK et al., 2007; NIKI, 2008). Os produtos da peroxidação lipídica podem reagir com biomoléculas como proteínas e bases nitrogenadas do DNA (MARNETT, 2002; NAIR, et al., 2007). Nesse contexto, pesquisadores demonstraram recentemente que o estresse crônico induz dano oxidativo por aumentar a lipoperoxidação e alterar a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e CAT em sangue de ratos (TAGLIARI et al., 2010). Ademais, nesse estudo demonstramos que a administração de extratos de frutos de *E. uniflora* foi capaz de reduzir o dano a lipídeos observado em animais submetidos ao modelo de ECI não tratados, sugerindo uma ação antioxidante desses frutos.

As ER podem oxidar aminoácidos presentes em proteínas tornando-as inativas ou não funcionais, como resultado de mudanças estruturais e mau funcionamento catalítico (SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011). O dano ocasionado por essas espécies envolve também alterações na GSH, as quais estão relacionados à patogênese de doenças que afetam o SNC como a depressão (MORRIS et al., 2014). Considerando o exposto, avaliamos o papel protetor dos frutos de *E. uniflora* sobre possíveis alterações no conteúdo tiólico total, proteico e não proteico, em hipocampo e córtex de animais estressados. No entanto, não observamos diferenças significativas nesse parâmetro oxidativo em nenhum dos grupos testados, demonstrando não haver influência do fruto e do modelo sobre tióis totais.

## 7. Conclusão

Nosso estudo demonstrou que o extrato de fruto de *Eugenia uniflora* foi capaz de prevenir alterações comportamentais e neuroquímicas produzidas em modelos animais de ECI, demonstrando a potencialidade do extrato utilizado na prevenção de danos provenientes da depressão. De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que o extrato de *E. uniflora* foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica e ainda, preveniu o aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sugerindo uma potencial ação antioxidante e antidepressiva do extrato. Os nossos achados apontam a *E. uniflora* como um promissor agente terapêutico auxiliar para pacientes com depressão. Dentro desse contexto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos benéficos desse fruto e maior compreensão da fisiopatologia da doença.

## Referências

ALMEIDA, E.C.; KARNIKOWSKI, M.G.O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saúde Pública.** v.29, p. 428-433, 1995.

ALICE, C. B.; VARGAS, V.M.; SILVA, G.A. DE SIQUEIRA, N.C.; SCHAPOVAL, E.E.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J.A.;HENRIQUE, A.T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology.** v.35, p.165–171, 1991.

ADEBAJO, A. C.; OLOKI, K.J.; ALADESANMI, A. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. **Journal Phytotherapy Resource.** v.3, p.258-259,1989.

AKSENOV, M. Y., MARKESBERY, E W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters.** p.141-145, 2001.

AMORIM, A. C.; LIMA, C.K.; HOVELL, A.M.; ,Miranda, A.L.; Rezende, C.M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine.** v.16, n.10, p.923-928, 2009.

ANDREATINI,R. A importância dos modelos animais em psiquiatria **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.24, n.4, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FAMILIARES, AMIGOS E PORTADORES DE TRANSTORNOS AFETIVOS – ABRATA. Disponível em: <[www.abrata.org.br/new/artigo/impactoDepressao.aspx](http://www.abrata.org.br/new/artigo/impactoDepressao.aspx)> Acesso em: 25.5.14

AURICCHIO, M. T., BACCHI, E. Folha de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz,** v. 62.p. 55 – 61, 2003.

BAGETTI, M., FACCO, E. M. P., PICCOLOI, J. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 31, p. 147 – 154, 2011.

BANDONI, A. L.; MENDIONDO , M.E.; RONDINA, R.V. COUSSIO, JD. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. **Lloydia.** v. 35, p. 69–80, 1972.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G. DE PAULA, S. O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN,J. stress: concept, implications and modulating factors **Rev. Nutr.** v.23, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L. B. S., DAVID, J.M.; DAVID, J. P. **Quím. Nova** v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BASTING, R.T.; NISHIJIMA, C.M.; LOPES, J.A.; SANTOS, R.C.; LUCENA PÉRICO, L.; LAUFER, S.; BAUER, S.; COSTA, M.F.; SANTOS, L.C.; ROCHA, L.R.; VILEGAS, W.; SANTOS, A.R.; DOS SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **J Ethnopharmacol.** v.157, p.257–267, 2014.

BAUER, M.E. Chronic stress and immunosenescence: a review. **Neuroimmunomodulation** v.15, p.241–250, 2008.

BRAMBILLA, P.; PEREZ, J.; BARALE, F.; SCHETTINI, G.; SOARES, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. **Mol Psychiatry** v.8, p.721–37, 2003.

BENÖHR, H.C.; WALLER, H.D. Glutathione (author's transl) **Klin Wochenschr.** v.53,n.17, p.789-802, 1975.

BERK, M., COPOLOV, D. L., DEAN. O. LU, K.; JEAUVONS, S.; SCHAPKAITZ, I.; ANDERSON-HUNT, M.; BUSH, A.I. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder—a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Biological Psychiatry**, v. 64, p. 468 – 475, 2008.

BEZERRA, J.E.F.; SILVA JUNIOR, J.F. DA.; LEDERMAN, I.E. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Jaboticabal: FUNEP, Série Frutas Nativas**, n.1, p.30, 2000.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**v.12, n.12, p.123-30, 1999.

BORDIGNON JR, C.L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A.A.; CAVVETE, E.; REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p.183-188, 2009.

BUTTERFIELD, D.A.; SULTANA, R. Methionine-35 of a $\beta$ (1-42): importance for oxidative stress in Alzheimer disease. **J Amino Acids**, v.2011, 2011.

CHARNEY, D.S.; AND MANJI, H.K. Life Stress, Genes, and Depression: Multiple Pathways Lead to Increased Risk and New Opportunities for Intervention, **Sci. STKE**, v.225, p.1-11, 2004.

CHE, Y., WANG, J.F., SHAO, L., YOUNG, T. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. **J. Psychiatry Neurosci.** V.35, p.296–302, 2010.

CHEW, C.E. The effect of dialectical behavioral therapy on moderately depressed adults: A multiple baseline design. Ph.D. Dissertation. USA: **University of Denver**, College of psychology, 2006.

CHINNI, S.; DUBALA, A.; KOSARAJU, J. KHATWAL, R.B.; SATISHKUMAR, M.N.; KANNAN, E. Effect of Crude Extract of *Eugenia jambolana* Lam. on Human Cytochrome P450 Enzymes. **Phytother Res.** v. 28 n.11, p.1731-1734, 2014.

CHUNG, C.P.; SCHMIDT,D.; STEIN,C.M.; Morrow,J.D.; Salomon, R.M. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment **Psychiatry Res** v.206, p.213–16, 2013.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL /COBEA. Princípios Éticos na Experimentação Animal (1991), Disponível em: <[www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)> Acesso em: 25.5.14

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat' heart. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p. 57-63, 2002.

CUMURCU, B.E., OZYURT, H., ETIKAN, I. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**.v.63, p.639–645, 2009.

D'AQUILA, P.S., BRAIN, P., WILLNER, P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiology & Behavior**, p.861-7, 1994.

DONADIO, L.C.; MORO, F.V.; SERVIDONE, A.A. Frutas Brasileiras. **Jaboticabal: Novos Talentos**, p.288, 2002.

DUMAN, R.S. Molecular and cellular pathogenesis of depression and mechanisms for treatment response. In: Charney DS, Sklar P, Buxbaum JD, et al, **Neurobiology of Mental Illness** New York: Oxford University Press; v.4, p.425–37, 2013.

DIMOPOULOS, N., PIPERI, C., PSARRA, V., LEA, R.W., KALOFOUTIS, A. Increased plasma levels of 8-iso-PGF<sub>2</sub>α and IL-6 in an elderly population with depression. **Psychiatry Res**. V.161, p.59–66, 2008.

ELLAH, M. R. A. The Role of Liver Biopsy in Detection of Hepatic Oxidative Stress. **Veterinary Medicine International**, p.1-7, 2011.

EREN, I., NAZIROGLU, M., DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochemical Research**, v. 32, p. 1188 – 1195, 2007.

EVANS, D.L.;CHARNEY, D.S.; LEWIS, L. et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. **Biol Psychiatry** v.58, p.175–189, 2005.

FAQUETI, L.G.; PETRY, C.M.; MEYRE-SILVA, C.; MACHADO, K.E. MACHADO, K.E.; CRUZ, A.B.; GARCIA, P.A.; CECHINEL-FILHO, V.; SAN FELICIANO, A.; MONACHE, F.D. Euglobulin-like compounds from the genus *Eugenia*. **Nat Prod Res**. v27, p. 28-31, 2013.

FIGUEIRÔA, E.O.; DA SILVA, L.C.N.; DE MELO, C.M.L. LEMOINE NEVES, J.K.A.; NICÁCIO HENRIQUE DA SILVA, PEREIRA, V.R.A.; CORREIA, M.T.D. Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of Fractions from *Eugenia uniflora* L. and

*Eugenia malaccensis*L.: Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content. **The Scientific World Journal**, 2013

FIUZA, T. S. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 5, p. 21 – 31, 2008.

GALECKI, P., SZEMRAJ, J., BIENKIEWICZ, M., FLORKOWSKI, A., GALECKA, E., 2009. Lipidperoxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. **Pharmacol. Rep.** v.61, p. 436–447,2009.

GALHIANE, M.S.; RISSATO, S.R.; CHIERICE, G.O.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, L.C. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**. v.70, n.2, p.286-292, 2006.

FORLENZA, M.J., MILLER, G.E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. **Psychosom. Med.** V.68, p.1–7, 2006.

GREEK, R.; SHANKS, S. Animal Models in Light of Evolution. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.24, n.4 ,2002.

GU, F.; CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Glutathione redox imbalance in brain disorders **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**.2014.

GU, F.; ZHU, M.; SHI, J.; HU, Y.; ZHAO, Z. Enhanced oxidative stress is an early event during development of Alzheimer-like pathologies in presenilin conditional knock-out mice. **Neuroscience Letters**, v.440, p.44-48, 2008.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives in Toxicology**, v. 86, p. 345 – 391, 2012.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** v.142, p. 231-55, 2004.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 4 ed, 2007.

HERKEN, H., GUREL, A., SELEK, S. ARMUTCU, F.; OZEN, M.E.; BULUT, M.,; KAP, O.; YUMRU, M.; SAVAS, H.A.; AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Archives of Medical Research**, v. 38, p. 247 - 252, 2007.

HEUSER,I. Depression, endocrinologically a syndrome of premature aging? **Maturitas** v.41, p.S19–S23, 2002.

HIRSCHFELD, R.M.A. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J Clin Psychiatry**, v. 61, n.6, p. 4-6, 2000.

HOLMSTRÖM, K.M., FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, p. 411–421, 2014.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p.1170-1179, 2008.

JOHN, K.M.; AYYANAR, M.; JEEVA, S. Metabolic variations, antioxidant potential, and antiviral activity of different extracts of *Eugenia singampattiana* (an endangered medicinal plant used by Kanitribals, Tamil Nadu, India) leaf. **Biomed Research International** 2014.

KASTER, M.P.; ROSA, A.O.; ROSSO, M.M.; GOULART, E.C.; SANTOS, A.R.; RODRIGUES AL. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. **Neurosci Lett**. v. 355, p. 21-24, 2004.

KATO, T., KUBOTA, M., KASAHARA, T. Animal models of bipolar disorder. **Neuroscience Bio Behavior Review**, p.832-42, 2007.

KENDLER, K.S.ZACHAR, P.; CRAVER, C. What kinds of things are psychiatric disorders? **Psychological Medicine** v.1, p.1143–1150, 2011.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**. 2003; v.16, n.4, p.433-41, 2003.

LOPES GALENO, D.M.; CARVALHO, R.P.; BOLETI, A.P.; LIMA, A.S.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, P.D.; PACHECO, C.C.; PEREIRA DE SOUZA, T.; LIMA, E.S. Extract from *Eugenia punicifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. **Appl Biochem Biotechnol**.v.172, n.1, p.311-24, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda**, 2002.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemical**, p.265-75, 1951.

LU, X.Y., KIM, C.S., Frazer, A., Zhang, W. Leptin: a potential novel antidepressant. **Proceedings of National Academic Science U S A**, p.1593-8, 2006.

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. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**.V.35, p.676-692, 2011.

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. **Journal of Affective Disorders**, v. 58, p. 241 – 246, 2000.

MARNETT, L.J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. **Toxicology**. v.181-182:219-222, 2002.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cienc. Cult.** v.66, n.3, 2014.

MCGONIGLE, P. Animal Models of CNS Disorders. **Biochemical Pharmacology**. *In Press*. 2013.

MELLO, A.F.; JURUENA, M.F., PARIANTE, C.M.; TYRKA, A.R.; PRIVE, L.H.; CARPENTER, L.L.; DEL PORTO, J.A. Depressão e estresse: existe um endofenótipo? **Revista Brasileira de Psiquiatria** 29(SI):S13-18, 2007.

MICHEL, T.M.; FRANGOU, S.; THIEMEYER, D.; CAMARA, S.; JECHEL, J.; NARA, K.; BRUNKLAUS, A.; ZOECHLING, R.; RIEDERER, P. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder: a postmortem study. **Psychiatry Res** v.151, p.145–50, 2007.

MILLER AH, MALETIC V, RAISON CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**. v. 65, p. 732-741, 2009.

MISOEK, E.S.; MCLAUCHLIN, B.; MORROW, J.D. Electrophilic cyclopentenoneisoprostanes in neurodegeneration. **Journal of Molecular Neuroscience**. v.33, p.80-86, 2007.

MORRIS, G.; ANDERSON, G.; DEAN, O.; BERK, M.; GALECKI, P.; MARTINSUBERO, M.; MAES, M. The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. **Mol Neurobiol**. v. 50, p.1059-1084, 2014.

MOYLAN, S.; L BERK, M.; DEAN, O.M. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.45 p.46–62, 2014.

NAIR, U.; BARTSCH, H.; NAIR, J. Lipidic peroxidation- induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. **Free Radical Biology and Medicine**. v.43, p.1109-1120, 2007.

NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 5 ed., Porto Alegre, ARTMED, 2011.

NIKI, E. Lipidic peroxidation products as oxidative stress biomarkers. **Bio Factors**. v.34, p.171-180, 2008.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** v.95, n.2, p.351-8, 1979.

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

PORSOLT, R.D., BERTIN, A., JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales Pharmacodynamie Therapy**, p.327-36, 1977.

PRADO, L.C.; SILVA, D.B.; DE OLIVEIRA-SILVA, G.L. HIRAKI, K.R.; CANABRAVA, H.A.; BISPO-DA-SILVA, L.B. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. **Biol Pharm Bull.** V.37, n.5, p.722-30, 2014.

RATTMANN, Y.D.; DE SOUZA, L.M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S.M. DARTORA, N.,; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2012.

SAKI, K.; BAHMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review. **Asian Pac J Trop Med.** v.7 n.S1, p.S34-42 2014

SANCHONETE, M. C.C. Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana. Porto Alegre. **FEPLAM**, p.311,1985.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.** v.17, n.2, p.227-236, 2004.

SCHIEPERS OJ, WICHERS MC, MAES M. Cytokines and major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 29, p. 201-217, 2005.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME.** v.10, n.10, p.308-13, 2004.

SIES, H. **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants.** Academic Press, New York, 1991.

SIWEK, M.; SOWA-KUCMA, M.; DUDEK, D. STYCZEŃ, K.; SZEWCZYK, B.; KOTARSKA, K.; MISZTAK, P.; PILC, A.; WOLAK,M.G.; NOWAK, G. Oxidative stress markers in affective disorders .**Pharmacol Rep.**v.65, p.1558–71, 2013.

SOLEIMANI, L; LAPIDUS, K. A.B.; IOSIFESCU, D. V. Diagnosis and Treatment of Major Depressive Disorder. **Neurol Clin** v.29, p. 177–193, 2011.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread-making products. **Ciênc Agrotecnol** v.28, p.685-90,2004.

SPECK, C.E.;KUKULL, W.A.; BRENNER, D.E. BOWEN, J.D.; MCCORMICK, W.C.; TERI, L.; PFANSCHMIDT, M.L.; THOMPSON, J.D.; LARSON ,E.B. History of depression as a risk factor for Alzheimer's disease. **Epidemiology** v. 6, p.366–369,1995.

TAGLIARI, B.;NOSCHANG, C.G.; FERREIRA, A.G.K. FERRARI, O.A.; FEKSA, L.R.; WANNMACHER, C.M.; DALMAZ, C.; WYSE, A.T. Chronic variable stress impairs energy metabolism in brain of rats. **Metab Brain Dis** v.25, n.2, p. 169-176, 2010.

TIMBRELL, J. Principles of biochemical toxicology. 3 ed., Londres: Taylor & Francis, 2000.

TRABER, M. G., FREI, B., BECKM, J. S. Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention? **Current Opinion in Lipidology**, v.19, p. 30 – 38, 2008.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44 – 84, 2007.

VALVASSORI, S.S., BUDNI, J., VARELA, R.B., QUEVEDO, J., Contributions of animal models to the study of mood disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, p.S121-131. 2013.

VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L. GELSON PERIN,G.; R.G.; ALVES, D.; DA SILVA, W.P.; MOTTA, A.D.S.; NASCENTE, P.D.S. Eugenia uniflora L. Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**. v.50, p.2668–2674, 2012.

VICTORIA, F.N.; BRAHM, A.D.S.; 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. **Neuroscience Letters**. v. 544, p.105-109, 2013.

VICTORIA, F.N.; ANVERSA, R.G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E.J. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. **Food Bioscience**, p. 450 – 457, 2013.

WANG, X.; ZAIDI, A.; PAL, R; GARRETT, A.S. Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. **BMC Neurosci**, v.10, p.12, 2009

WICHERS, M. The dynamic nature of depression: a new micro-level perspective of mental disorder that meets current challenges **Psychological Medicine**. v. 44, p.1349–1360, 2014.

WILLNERI, P., MUSCAT, R., PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neuroscience Biobehavior Review**.p.525-34, 1992.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**.p.319-29, 1997.

World Health Organization, Depression Disponível em:<[www.who.int/topics/depression/en/](http://www.who.int/topics/depression/en/)> Acesso em: 24.05.2014

World Health Organization. Mental Health Gap Action Programme: Scaling up care for mental neurological, and substance use disorders, **World Health Organization**. 2008.

WOLKOWITZ, O.M.; EPEL, E.S.; REUS,V.I.; MELLON, S.H. Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? **Depression anxiety** v. 27, n.4, p.327–338, 2010

YAGER, S., FORLENZA, M.J., MILLER, G.E. Depression and oxidative damage to lipids. **Psychoneuroendocrinology** v.35, p.1356–1362,2010

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M.The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression.**Acta Neuropsychiatr** v.16, p.200–203, 2004.

YOUNG, I. S., WOODSIDE, J. V. Antioxidant in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 176 – 186, 2001.

ZAFIR, A.; BANU, N.Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. **Indian J Biochem Biophys**. v.46, p.53-58, 2009.

ZOU, W.; ROTH, R. A.; YOUNIS, H. S.; BURGOON, L. D.; GANEY, P. E. Oxidative stress is important in the pathogenesis of liver injury induced by sulindac and lipopolysaccharide cotreatment. **Toxicology**, v.272, p.32-38, 2010.

ZUNSZAIN PA, ANACKER C, CATTANEO A, CARVALHO LA, PARIANTE CM. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 35, p. 722-729, 2011.