



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Aloysia citriodora* EM ANIMAIS SUBMETIDOS A
ESTRESSE NA INFÂNCIA.**

**CHAPECÓ
2023**

SILVIO JOSÉ BATISTA SOARES

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Aloysia citriodora* EM ANIMAIS SUBMETIDOS A
ESTRESSE NA INFÂNCIA.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas sob a orientação da Prof^a Dra. Zuleide Maria Ignácio e Coorientação do Prof^o Dr. Walter Antônio Roman Junior

CHAPECÓ

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rodovia SC 484 – Km 02
Fronteira Sul, Chapecó, SC - Brasil
Caixa Postal 181
CEP 89815-899

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Silvio José Batista Soares
EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Aloysia citriodora* EM ANIMAIS
SUBMETIDOS A ESTRESSE NA INFÂNCIA E NA VIDA ADULTA. /
Silvio José Batista Soares . -- 2023.
f.

Orientadora: Dra. Zuleide Maria Ignácio

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.

I. , Zuleide Maria Ignácio, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SILVIO JOSÉ BATISTA SOARES

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Aloysia citriodora* EM ANIMAIS SUBMETIDOS A
ESTRESSE NA INFÂNCIA.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, defendido em banca examinadora em 24/08/2023

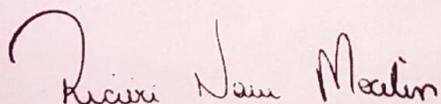
Aprovado em: 24/08/2023

BANCA EXAMINADORA



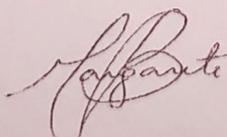
Prof.a. Dr^a. ZULEIDE MARIA IGNÁCIO – UFFS

Presidente da banca/orientador



Prof. Dr. RICIERI NAUE MOCELIN - UFFS (PASSO FUNDO)

Membro titular externo



Prof.a. Dr^a. MARGARETE DULCE BAGATINI – UFFS

Membro titular interno

Prof. Dr^a. ADRIANA REMIÃO LUZARDO - UFFS

Membro suplente

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, sobretudo, a minha família, por sempre acreditar em mim e renovar minhas energias a cada dia e a cada ligação. Agradeço também a todos que colaboraram para a realização desse trabalho, em especial, minha orientadora, por ter confiado em mim e dado suporte e tranquilidade durante esse processo.

“Sorte é o que acontece quando a
preparação encontra a oportunidade”.

Sêneca.

RESUMO

Pesquisas científicas trazem evidências de que o estresse na infância é responsável por prejuízos no desenvolvimento cerebral, induzindo disfunções biológicas e sistêmicas, que juntamente com fatores genéticos podem culminar em transtorno depressivo maior (TDM) na vida adulta. A terapêutica do TDM é complexa e os fármacos disponíveis na clínica, além de necessitarem de um longo tempo para o início do efeito antidepressivo, não conseguem exercer efeito terapêutico em um percentual significativo de pacientes. Por essas razões, a busca por agentes mais efetivos para o TDM vem incluindo as plantas medicinais como estratégias terapêuticas que possam interferir em mecanismos biológicos relevantes na depressão resistente a tratamentos (DRT). Portanto, o principal objetivo desta proposta foi avaliar o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EHA) da espécie medicinal *Aloysia citriodora* Palau em comportamentos tipo depressivos de ratos submetidos a estresse crônico na infância e em mecanismos envolvidos na neuroproteção, através da avaliação de marcadores de neuroinflamação e de estresse oxidativo. Foi investigado se houve relação entre o estresse de privação materna (PM), o surgimento de comportamentos tipo depressivos e possíveis efeitos dos tratamentos sobre alterações comportamentais e biológicas. A *A. citriodora* apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, entre outras relevantes propriedades farmacológicas. Ainda, há evidências científicas sobre a interferência de compostos da espécie medicinal em alguns mecanismos subjacentes ao estresse oxidativo, inflamação e neuroinflamação. Como resultado da técnica de espectrometria de massas (EM-ESI), foi observado 10 compostos polifenólicos, entre eles estão ácidos orgânicos e flavonoides livre e glicosilados, característicos de *A. citriodora*. Foi esperado que o EHA da planta fosse capaz de reverter ou reduzir os prejuízos comportamentais e biológicos, sendo, portanto, potenciais estratégias terapêuticas no tratamento do TDM e DRT. A partir dos resultados obtidos, observou-se que o estresse causado pelo protocolo de PM em roedores culminou em um aumento significativo de comportamentos tipo depressivos na vida adulta e aumento na expressão de substâncias inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo dos animais e aumento da atividade de parâmetros de estresse oxidativo, como a Mieloperoxidase e TBARS, tanto no soro quanto no hipocampo. O tratamento realizado com o extrato hidroalcoólico de *A. citriodora* reverteu os comportamentos depressivos de forma similar ao grupo tratado com escitalopram. Sobre os marcadores de inflamação no tecido nervoso, observou-se que os animais tratados com *A. citriodora* tiveram níveis inferiores àqueles tratados com escitalopram e ao grupo controle, e ainda de modo mais significativo quando comparado ao grupo PM tratado com salina. Os tratamentos reduziram a atividade da MPO no soro dos animais que passaram pelo protocolo PM. Já o TBARS foi reduzido no soro e completamente revertido em hipocampo.

Palavras-chave: Transtorno Depressivo Maior. Privação Materna. *Aloysia citriodora*. Neuroinflamação. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Scientific research provides evidence that stress in childhood is responsible for impaired brain development, inducing biological and systemic dysfunctions, which together with genetic factors can culminate in major depressive disorder (MDD) in adult life. MDD therapy is complex and the available drugs require a long time for the onset of the antidepressant effect, and fail to have a therapeutic effect in a significant percentage of patients. For these reasons, the search for more effective agents for MDD has included medicinal plants as therapeutic strategies that may interfere with relevant biological mechanisms in treatment-resistant depression (TRD). Therefore, the main objective of this study was to evaluate the treatment with the hydroalcoholic extract (HAE) of the medicinal species *Aloysia citriodora* Palau in depressive-like behaviors of rats submitted to chronic stress in childhood and in mechanisms involved in neuroprotection, through the evaluation of neuroinflammation markers and oxidative stress. It was investigated whether there was a relationship between the stress of maternal deprivation (MD), the emergence of depressive-like behaviors and possible effects of treatments on behavioral and biological changes. It is known that *A. citriodora* has antioxidant and anti-inflammatory properties, among other relevant pharmacological properties. Furthermore, there is scientific evidence about the interference of medicinal compounds in some mechanisms underlying oxidative stress, inflammation and neuroinflammation. As a result of the mass spectrometry technique (ESI-MS), 10 polyphenolic compounds were observed, including organic acids and different types of flavonoids, characteristic of *A. citriodora*. It was expected that HAE would be able to reverse or reduce behavioral and biological damage, thus being potential therapeutic strategies in the treatment of MDD and TRD. With the results obtained, it was observed that the stress caused by the MD protocol in rodents culminated in a significant increase in depressive-like behaviors in adult life and an increase in the expression of inflammatory substances IL-1 β and IL-6 in the hippocampus and increased activity of oxidative stress parameters such as Myeloperoxidase and TBARS in serum and also in the hippocampus. The treatment performed with the HAE reversed the depressive behaviors in a similar way to the group treated with escitalopram. Regarding inflammation markers in nervous tissue, it was observed that animals treated with *A. citriodora* had lower levels than those treated with escitalopram and the control group, and even more significantly when compared to the MD group treated with saline. The treatments reduced the MPO's activity in the serum of animals that underwent the PM protocol. TBARS was reduced in serum and completely reversed in hippocampus.

Keywords: Major Depressive Disorder. Maternal Deprivation. *Aloysia citriodora*. Neuroinflammation. Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho Experimental.....	29
Figura 2 - Composto 1 - Ácido quínico.....	34
Figura 3 - Composto 2 - Baicaleína.....	34
Figura 4 - Composto 3 - Diosmetina.....	34
Figura 5 - Composto 4 - Cafeoil-glicosídeo	35
Figura 6 - Composto 5 - Ácido cafeoilquínico.....	35
Figura 7 - Composto 6 - Canferol-3-O-glicosídeo	36
Figura 8 - Composto 7 - Quercetina-3-O-glicosídeo.....	36
Figura 9 - Composto 8 - Quercetina-3-O-glucuronídeo	36
Figura 10 - Composto 9 - Rafinose	37
Figura 11 - Composto 10 - Ácido dicafeoilquínico.....	37
Figura 12 - Teste de Natação Forçada	39
Figura 13 - Atividade Locomotora no Campo Aberto	40
Figura 14 - Atividade da IL-1 β e IL-6 no Hipocampo.....	41
Figura 15 - Efeito da PM e tratamentos sobre MPO em soro e Hipocampo.....	42
Figura 16 - Efeito da PM e tratamentos sobre TBARS em soro e Hipocampo.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos polifenólicos apontados em espectrometria de massas (ESI-IT-MS/MS) do Extrato hidroalcoólico de <i>A. citriodora</i>	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	4-aminoantipirina
<i>A. citriodora</i>	<i>Aloysia citriodora</i>
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de Variância
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CID	Decomposição Induzida por Colisão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alto Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida em Coluna
CPF	Córtex Pré Frontal
CBI	Centro de Bioterismo
CIUCA	Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DRT	Depressão Resistente ao Tratamento
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Esc	Escitalopram
ESI-IT-MS/MS	Espectrometria de Massas
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
EHA	Extrato Hidroalcoólico
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
FAST	Functioning Assessment Short Test
GPx	Glutathione Peroxidase
IDO	Indoleamina 2,3 Dioxigenase
IL	Interleucina
IS	Isolamento Social
ISRSs	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
MAO	Monoamina Oxidases
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos

mm	Milímetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM	Privação maternal
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	Sem estresse
SOD	Super Óxido Dismutase
TBARs	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TNF	Teste de Natação Forçada
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF	Teste de Natação Forçada
TCA	Teste de Campo Aberto
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNOCHAPECÓ	Universidade Comunitária da Região de Chapecó
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV/Vis	Ultravioleta e Visível
μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
%	porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Aspectos gerais da <i>A. citriodora</i>	21
3.2 Usos populares da <i>A. citriodora</i>	21
3.3 Constituintes químicos da <i>A. citriodora</i>.....	22
3.4 Atividades farmacológicas da <i>A. citriodora</i>.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Materiais, equipamentos e solventes	26
4.2 Desenvolvimento dos métodos	26
4.3 Coleta, identificação botânica e preparação dos materiais vegetais	27
4.4 Preparação do extrato.....	27
4.5 Análise química de EHAc por espectroscopia de massas	28
4.6 Aquisição do composto de Oxalato de Escitalopram.....	28
4.7 Protocolo de Privação Maternal.....	28
4.8 Testes comportamentais	29
4.9 Parâmetros Neuroimunes e Inflamatórios	30
4.10 Atividade da Mieloperoxidase - MPO.....	30
4.11 Análise de peroxidação Lipídica - TBARS	31
4.12 Análise estatística	31
5. ASPECTOS ÉTICOS	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Análise química.....	33
6.2 Efeitos da PM e dos tratamentos no teste de natação forçada.....	38
6.3 Efeitos da PM e dos tratamentos no teste de campo aberto	39
6.4 Níveis de IL-1B E IL-6 no hipocampo.....	40
6.5 Atividade de MPO e TBARS no soro e hipocampo	41
7. DISCUSSÃO	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52

9. REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO A - Carta de aprovação da pesquisa pelo CEUA da UNOCHAPECÓ	66

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno grave que causa enormes prejuízos à qualidade de vida das pessoas, sendo uma das formas mais prevalentes de doença mental (LARSEN *et al.*, 2010). O TDM está envolvido com uma heterogeneidade de processos biológicos, os quais, juntamente com as expressões comportamentais, são alvos de estudos em uma variedade de protocolos, tanto em humanos quanto em animais. Possivelmente, como consequência da heterogeneidade de fatores, as respostas aos tratamentos ainda são bastante inconsistentes (BELMAKER; AGAM, 2008). A depressão apresenta comorbidade com vários transtornos psiquiátricos, e algumas das comorbidades parecem estar envolvidas na pobre resposta aos tratamentos com antidepressivos clássicos (DE CARLO *et al.*, 2016).

Estudos recentes têm observado que o estresse na infância é um dos fenômenos mais potentes na precipitação da expressão de um genótipo predisponente ao TDM (DASKALAKIS *et al.*, 2013; IGNÁCIO *et al.*, 2014). O modelo de privação maternal (PM) é um protocolo animal validado para as pesquisas sobre a fisiopatologia e investigação de estratégias terapêuticas para o TDM. Uma característica relevante do protocolo de PM é o fato de mimetizar uma situação grave, envolvendo violência, perda e negligência do cuidado em crianças humanas, sendo considerado um dos estressores naturais mais poderosos durante o desenvolvimento (IGNÁCIO *et al.*, 2017). O estresse no início da vida parece estar envolvido na gravidade do transtorno e na pobre resposta aos tratamentos antidepressivos tanto em humanos (WILLIAMS *et al.*, 2016) quanto em animais submetidos ao protocolo de PM (ZHANG *et al.*, 2015).

Roedores que foram submetidos a protocolos de PM nos primeiros dias de vida apresentaram níveis elevados de comportamentos tipo depressivo em testes de natação forçada (RÉUS *et al.*, 2015; IGNÁCIO *et al.*, 2017). Estudos recentes com ratos também observaram que o estresse de privação maternal aumentou os riscos de comprometimento metabólico, comportamentos depressivos e a reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (VARGAS *et al.*, 2016).

Dentro da variedade de mecanismos biológicos, podem ser destacados a redução da expressão e função do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (KIMPTON, 2012), a via de sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos

(mTOR) (IGNÁCIO *et al.*, 2016) além da desregulação no balanço oxidativo e da função imune e inflamatória (ORTMANN *et al.*, 2017). Um número significativo de pesquisas vem observando o envolvimento do BDNF na patogênese do TDM (KIMPTON, 2012; IGNÁCIO *et al.*, 2014). Um fator relevante é a observação de estudos sobre alterações nesses mecanismos em indivíduos com depressão resistente a tratamentos (DRT) (IGNÁCIO *et al.*, 2016).

Com relação ao registro dos compostos farmacológicos já consolidados na terapia como antidepressivos, o escitalopram (Esc) é um antidepressivo clássico pertencente ao grupo dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs). Entre os mecanismos biológicos mais estudados atualmente, estão a função positiva no complexo proteico intracelular denominado alvo mamífero da rapamicina (mammalian target of rapamicin - mTOR) (SEO *et al.*, 2017), fator neurotrófico derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor - BDNF) (WOLKOWITZ *et al.*, 2011), balanço oxidativo (MATCHKOV *et al.*, 2015) e função imune (MUNZER *et al.*, 2013). Embora, como todas as terapias farmacológicas existentes, o Esc também não seja eficaz para uma parte importante dos pacientes, estudos mostram que o Esc atua em mecanismos neurofisiológicos, exercendo efeitos neuroprotetores. Portanto, o Esc é um importante controle positivo em pesquisas sobre o possível efeito antidepressivo de compostos bioativos de plantas medicinais.

O uso de plantas de forma terapêutica já vem da antiguidade, estando intimamente ligado à nossa própria evolução. Para usar plantas como remédios, os antigos fizeram uso de suas próprias experiências e observação do uso de plantas por animais (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece as plantas medicinais e seus constituintes químicos como importantes instrumentos de assistência farmacológica, de modo que, dentre as estratégias para a Medicina Tradicional e Complementar 2014-2023, tem incentivado a regulação desses produtos, a fim de garantir a segurança, qualidade e eficácia (WHO, 2013). Ainda, de acordo com o levantamento de novos agentes terapêuticos aprovados entre 1981 e 2014, estima-se que 47% provenham direta ou indiretamente de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A atividade antioxidante de compostos extraídos de várias partes de plantas, especialmente folhas e frutos, tem sido destacada em pesquisas focadas em diversos mecanismos fisiopatológicos (FARIAS *et al.*, 2013). A função antioxidante dos flavonóides é amplamente distribuída em plantas medicinais que apresentam

atividade antioxidante e anti-inflamatória (ZUCOLOTTO *et al.*, 2009; PACHECO *et al.*, 2014) e, possivelmente, a função antioxidante é um mecanismo chave associado com o efeito terapêutico em vários processos patológicos (ORTMANN *et al.*, 2017) e vem aumentando o interesse dos pesquisadores em relação ao efeito neuroprotetor (AREIZA-MAZO *et al.*, 2018).

Entre muitas espécies já estudadas com relação aos efeitos ansiolítico e antidepressivo, encontra-se a espécie *Aloysia citriodora*, pertencente à família Verbenaceae (ERAM *et al.*, 2012). Estudos acerca de atividades comportamentais e biológicas da espécie, principalmente em animais e protocolos *in vitro*, trazem evidências de que a *A. citriodora* promove efeitos sedativos, ansiolíticos, antidepressivos, anestésicos, antioxidantes, neuroprotetores, além de efeitos antimicrobianos e antineoplásicos (MIRZAIE *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2017; BHARAMSOLTANI *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar o efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico (EHA) da espécie *A. citriodora* sobre comportamentos tipo depressivos, balanço oxidativo, mecanismos inflamatórios e neuroprotetores, em ratos submetidos a estresse de PM nos primeiros dias de vida.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito farmacológico do EHA da espécie *A. citriodora* sobre comportamentos tipo depressivos em ratos submetidos ao protocolo de PM no início da vida.

- Investigar o efeito farmacológico do EHA da espécie *A. citriodora* sobre mecanismos de neuroinflamação e neuroproteção em ratos submetidos ao protocolo de PM no início da vida.

- Investigar o efeito farmacológico do EHA da espécie *A. citriodora* sobre mecanismos de estresse oxidativo em ratos submetidos ao protocolo de PM no início da vida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Muitos parâmetros indicativos de estresse oxidativo estão alterados em pacientes com TDM (RAWDIN *et al.*, 2013), bem como em animais submetidos a estresse e manifestando comportamentos semelhantes à depressão (SHAHZAD *et al.*, 2014; EKEANYANWU; NJOKU, 2015). Além disso, o estresse da PM também causa desregulação nos parâmetros do balanço oxidativo, induzindo o estresse oxidativo nas regiões cerebrais envolvidas com a depressão (RÉUS *et al.*, 2015). Também é importante enfatizar que o estresse oxidativo está relacionado à gravidade do TDM e à depressão resistente a tratamento (DRT) (MOKOENA *et al.*, 2015). Entre os vários mecanismos nos quais o estresse oxidativo pode exercer influência, estão modificações em uma variedade de moléculas biológicas, ativação de diferentes fatores de transcrição e consequente aumento de citocinas anti e pró-inflamatórias (BIRBEN *et al.*, 2012). Por outro lado, através da ativação de células inflamatórias, os pacientes com TDM apresentam aumento dos marcadores de estresse oxidativo (BAKUNINA *et al.*, 2015).

As funções do eixo HPA fazem parte dos mecanismos mais estudados da relação de estresse no início da vida com o TDM e outros transtornos psiquiátricos. Digno de nota foi o fato de que animais submetidos à PM tiveram uma reação comportamental alterada e um aumento nos níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, bem como redução na expressão de BDNF no hipocampo e estriado após um estressor agudo na idade adulta (LIPPMANN *et al.*, 2007).

Estudos clínicos e experimentais indicam que o estresse e a depressão estão associados ao aumento da atividade do sistema imune na inflamação, incluindo a função de alguns leucócitos e o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (DINAN, 2009). As citocinas também interagem com as vias relacionadas ao TDM, incluindo o metabolismo dos neurotransmissores, funções neuroendócrinas e plasticidade neural (DANTZER *et al.*, 2008). Pacientes com depressão apresentam níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, como interleucinas (IL) (IL-1, IL-2 e IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DOWLATI *et al.*, 2010).

Uma pesquisa recente apontou que a função da microglia é um dos mecanismos importantes que podem estar envolvidos com a depressão (PRINZ; PRILLER, 2014). Ocorreu um aumento das moléculas sinalizadoras de ativação da

microglia no córtex pré frontal (CPF), ínsula e córtex cingulado em um estudo *in vivo* em pacientes com TDM e uma correlação positiva com a gravidade da depressão (SETIAWAN *et al.*, 2015). Entre os mediadores e mecanismos de ativação microglial, tanto periféricos quanto centrais, estão as citocinas, vários outros marcadores e processos biológicos, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, neurotransmissores e hormônios liberados durante o estresse crônico. O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias pode aumentar a atividade da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), responsável pela degradação do triptofano, o precursor da serotonina. Por sua vez, a IDO ativa genes pró-inflamatórios, que podem potencializar a neuroinflamação (RÉUS *et al.*, 2015).

3.1 Aspectos gerais de *A. citriodora*

A espécie *A. citriodora* Palau (Verbanaceae) apresenta diversas sinonímias científicas sendo as mais importantes: *A. triphylla* (L Hér), *A. triphylla* (L'Hér.) Britton, *Lippia citriodora* Kunth, *L. citrodora* Kunth e *L. triphylla* (L'Hér.) (BHARAMSOLTANI *et al.*, 2018).

A *A. citriodora* é nativa da América do Sul (Argentina, Paraguai, Brasil, Uruguai, Chile, Bolívia e Peru), com ampla distribuição no Norte da África e no Sul da Europa. Foi introduzida no velho continente pelos espanhóis e portugueses no século XVII. No Algarve é denominada de bela-luísia e em outras regiões de Portugal tem como nome comum, limonete. No Brasil, dependendo da região, é popularmente conhecida como cidró, falsa-erva-cidreira, lúcia-lima, limão-verbena e erva luísia (LORENZI; MATOS, 2002; BAHRAMSOLTANI *et al.*, 2018).

3.2 Usos populares de *A. citriodora*

O uso tradicional desta espécie remonta ao século XVII, revelando sua importância etnofarmacológica como planta medicinal usada pela cultura inca (ELECHEOSA, 2017). Os "Kallawayas", um grupo itinerante de curandeiros tradicionais nos Andes, costumavam chamar a planta como "quechua" ou "wari pankara", usada como digestiva, antiespasmódica e remédio para bronquite e problemas cardíacos (GIRAULT, 1987).

Infusões foliares de *A. citriodora* são utilizadas como refrescantes. Na indústria

é empregada na preparação de perfumes, como aromatizante de licores. No Peru é componente do refrigerante “Inka Cola”. No Egito é tradicionalmente utilizada devido às suas propriedades medicinais, sendo também comercializada na perfumaria devido as suas folhas possuírem forte composição de citral e limoneno (IBRAHIM; MOHAMED; KHALID, 2014).

A planta é popularmente utilizada para o tratamento da insônia e ansiedade nos países Latino-Americanos (PASCUAL *et al.*, 2001; GOMES; FERREIRA; VICENTE, 2005; PARODI *et al.*, 2013), e na medicina tradicional mexicana é usada para distúrbios do estômago, tristeza e nervosismo (ARGUETA; GALLARDO VÁZQUEZ, 1994). Na Argentina é utilizada como antiespasmódica, diurética, digestiva, cardiotônica e sedativa (DI LEO LIRA *et al.*, 2013). No Brasil é comumente cultivada em jardins e hortas, sendo seu uso principal destinado para fins medicinais e eventualmente para o tempero na culinária, como por exemplo, em saladas (LORENZI; MATOS, 2008). Nas diversas regiões do Brasil, o preparado caseiro a partir de suas folhas é utilizado no tratamento de resfriados, gripe, problemas nervosos, acne, inseticida, bactericida, tônico, antiespasmódico e carminativo (MAIA; FRANCISCO, 2001; RITTER *et al.*, 2002; NEGRELLE *et al.*, 2007; LORENZI; MATOS, 2008; MERÉTIKA; PERONI; HANAZAKI; 2010; SANTOS *et al.*, 2015).

3.3 Constituintes químicos de *A. citriodora*

Diversos compostos químicos foram identificados em diferentes partes de *A. citriodora*. Vários flavonóides foram isolados de extratos metanólicos, etanólicos e aquosos da planta. Além disso, o óleo essencial é composto principalmente de monoterpenos e monoterpenóides, sesquiterpenos e sesquiterpenóides, bem como alguns álcoois graxos (IBRAHIM; MOHAMED, KHALID, 2014; BAHRAMSOLTANI *et al.*, 2018). No óleo essencial também foram observados compostos como o geranial, neral, limoneno e citral (FREDDO, 2016). Frequentemente são encontrados nas folhas jovens o β -pineno, acetato neral e transcalameneno (IBRAHIM; MOHAMED, KHALID, 2014). Ainda, os componentes limoneno, 1,8-cineol, geranial, neral, β -guanina, espesolenol e óxido de cariofileno foram isolados das folhas e flores de *A. citriodora* (SHAHHOSEINI; HOSSEINI; GHORBANPOUR, 2014).

Estudos realizados com a infusão das folhas de *A. citriodora* demonstraram a presença de quantidades significativas de polifenóis, incluindo verbascosídeo

(actosídeo) e luteolina-7-diglucouronídeo. Nos extratos também foi observada a presença de óleos essenciais, com predominância do composto citral (CARNAT, 1995; CARNAT, 1999; LENOIR, 2012; ABDERRAHIM, 2011).

3.4 Atividades Farmacológicas de *A. citriodora*

O óleo essencial de folhas de *A. citriodora*, em concentrações de 2,84 e 8,37 mg/ml, demonstrou efeito antibacteriano contra bactérias gram positivas e negativas e atividade citotóxica contra células tumorais (OUKERROU *et al.*, 2017). Já o extrato etanólico produzido a partir das partes aéreas da planta, apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas, atividade antineoplásica e ação antioxidante (MIRZAIE *et al.*, 2016).

O extrato aquoso de *A. citriodora* demonstrou efeitos sedativos no teste de campo aberto realizado com ratos, e teve sua ação potencializada com o uso do diazepam. As ações sedativas foram sensíveis ao antagonismo por flumazenil, sugerindo que a atividade biológica da *A. citriodora* ocorre através de receptores centrais do sistema gabaérgico. Nos receptores α -adrenérgicos o extrato bloqueou de forma não competitiva a ação da fenilefrina nos vasos deferentes, e no coração induziu ao inotropismo negativo. A sedação do tipo benzodiazepínico, o inotropismo negativo e o efeito antiespasmódico justificam pré-clinicamente seu uso popular nos quadros de cólicas abdominais e como coadjuvante no tratamento da ansiedade (RAGONE, 2010).

A espécie apresenta artemitina e hesperidina, substâncias altamente anti-inflamatórias e antioxidantes que parecem fortemente relacionadas às propriedades antidepressivas (GUPTA; GUPTA; VARSHNEY, 2020). Eram *et al.* (2012) confirmaram o efeito antidepressivo de *A. citriodora* em modelos animais pelos extratos etanólico, clorofórmico e aquoso. O resultado foi observado a partir dos testes de natação forçada e suspensão da cauda. Outro estudo com modelos animais de depressão, utilizando a espécie *Aloysia gratíssima* como tratamento e os mesmos testes para verificar o efeito, indicou efeito antidepressivo da espécie do mesmo gênero (ZENI *et al.*, 2013).

O extrato aquoso da planta em ratos Wistar machos em doses superiores a 10 mg/kg, resultou no aumento de comportamento tipo ansioso observado no teste de labirinto em cruz elevado (EPM) (VEISI *et al.*, 2015). Por outro lado, uma fração do

extrato enriquecida com ácidos graxos e terpenos, revelou redução significativa de comportamentos tipo ansiosos na dose de 500 mg/kg (JIMÉNEZ-FERRER *et al.*, 2017). Neste último trabalho, os autores descrevem que este efeito tipo-ansiolítico parece estar envolvido com a neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica. Os controversos resultados obtidos nos dois estudos podem ser justificados em função da diferença na natureza dos extratos avaliados. Enquanto o primeiro utilizou um extrato aquoso (VEISI *et al.*, 2015), o último avaliou uma fração mais lipofílica (JIMÉNEZ-FERRER *et al.*, 2017), que pode apresentar maior capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Assim, futuras investigações são recomendadas para o melhor entendimento do efeito dos extratos da planta e seus constituintes no comportamento semelhante à ansiedade.

Além disso, o extrato etanólico das folhas de *A. citriodora* apresentou atividade anticonvulsivante em convulsões induzidas por estimulação eletroconvulsiva e quimioconvulsivantes em camundongos. O extrato causou uma redução na duração e aumento da latência das crises no modelo convulsivante induzido por pentilenotetrazol (PTZ), bem como uma diminuição na duração da extensão tônica dos membros posteriores no eletrochoque máximo (RASHIDIAN *et al.*, 2016). Uma vez que o efeito anticonvulsivante do extrato foi revertido pelo flumazenil, um antagonista benzodiazepínico do receptor GABA_A, esse efeito, pelo menos em parte, parece relacionado à interação do extrato com sítio benzodiazepínico dos receptores GABA_A.

Em ratos tratados com extrato de *A. citriodora* (2180 mg/kg, correspondendo 545 mg/kg de verbascosídeo), foi revelada uma potente capacidade antioxidante, evidenciada através de vários marcadores do balanço oxidativo. O extrato aquoso produzido por decocção e infusão das partes aéreas da planta, preservou o organismo contra a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, e a decocção demonstrou resultados mais satisfatórios aos comparados com os preparados por infusão (PORTMANN *et al.*, 2012).

Estudos realizados em camundongos utilizando a infusão das folhas de *A. citriodora* demonstraram que a planta possui elevada quantidade de compostos polifenólicos, incluindo o verbascosídeo e o flavonoide luteolina 7-diglucuronídeo, os quais apresentam elevada atividade antioxidante. O verbascosídeo possui a propriedade de reduzir severamente as lesões pró-inflamatórias através da diminuição de citocinas. Os flavonoides possuem a capacidade de reduzir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade antioxidante na carcinogênese em modelos realizados com

animais (LENOIR *et al.*, 2012). Em outras pesquisas realizadas com extrato aquoso (infusão e decocção) de *A. citriodora* também apresentou propriedades antioxidantes contra a peroxidação lipídica (VITAR, 2013).

Outro estudo também observou propriedades anti-inflamatórias a partir de extratos de folhas da *A. citriodora*. Essas propriedades parecem relacionadas diretamente com os compostos fenólicos, dentre eles o verbascosídeo e luteolina 7-diglicuronídeo (FELGINES, 2014). Outras pesquisas também demonstraram o potencial antioxidante (VITAR *et al.*, 2014), anti-inflamatório (PONCE-MONTER *et al.*, 2010) e antígeno-tóxico (ZAMORANO-PONCE, *et al.*, 2006) do extrato aquoso das folhas de *A. citriodora*. Ainda, o verbascosídeo isolado do extrato hidroalcoólico de *A. citriodora* na dose de 100 mg/kg (intraperitoneal) e 300 mg/kg (via oral) induziu efeito analgésico em modelos de dor neuropática em ratos (ISACCHI *et al.*, 2011). Os efeitos analgésicos do composto verbascosídeo da *A. citriodora* parecem estar associados à inibição da ativação microglial, propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas (AMIN; POURESHAGH; HOSSEINZADEH, 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais, equipamentos e solventes

Nas análises cromatográficas por Cromatografia Líquida de Alto Eficiência (CLAE), foi utilizado o cromatógrafo Varian® Pro-Star com injetor manual (alça de 20 µl), com gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5µm) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm). O padrão analítico utilizado foi o verbascosídeo adquirido da empresa Sigma-Aldrich®, USA.

Para o processo de filtração de amostras e solventes, utilizou-se filtros Micropore® de teflon (0,45 µm). Os solventes grau HPLC (MeOH, EtOH, H₃PO₄, AcOH e HCO₂H) utilizados para as análises em CLAE foram adquiridos da J.T. Baker® (Goiânia, GO, Brasil). A água foi obtida por ultrapurificador de água Milli-Q A10 Gradiente®. Os solventes MeOH, EtOH, AcOEt, n-hexano, DCM, e CHCl₃ utilizados nas análises fitoquímicas foram adquiridos da Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de prótons (400 MHz) e de carbono (100 MHz) foram realizadas em equipamento Bruker® modelo DRX 400 na Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob orientação do Prof. Dr. Andersson Barison. A identificação das substâncias em espectrometria de massas foi realizada por intermédio de análise de infusão direta em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems® modelo API 3200) equipado com uma bomba seringa (Harvard Apparatus®, modelo Harvard 22 Dual) e fonte de ionização por eletrospray (ESI) na Universidade Estadual Paulista (UNESP; Campus Litoral) sob orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas. Os métodos espectrofotométricos de Radiação Ultravioleta e Visível (UV/Vis) foram realizados em fotômetro digital semiautomático (BioSystems®, modelo BTS 310).

4.2 Desenvolvimento dos métodos

Para a realização deste estudo, foi utilizado o tipo de pesquisa quantitativa analítica, de natureza experimental. A preparação do material vegetal, produção dos extratos, frações e o isolamento de substâncias químicas por meio de métodos cromatográficos foram realizados no Laboratório de Farmacognosia, da Universidade

Comunitária de Chapecó (UNOCHAPECÓ).

O experimento com o uso de animais foi realizado no Centro de Bioterismo (CBI) da UNOCHAPECÓ com registro no Conselho Regional de Medicina Veterinária de Santa Catarina (CRMV/SC) n. SC-08771-PJ, sob supervisão da médica veterinária responsável, Natacha Trevisani (CRMV/SC-nº4815SC). O referido centro possui uma infraestrutura de criação e experimentação registrada no Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA) e segue rigorosamente as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

As análises dos tecidos cerebrais foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, SC.

4.3 Coleta, identificação botânica e preparação dos materiais vegetais

A coleta de *A. citriodora* foi realizada em Chapecó (SC) (27° 05' 37" S e 52° 39' 58" O), nos meses de outubro a novembro de 2021. No momento da coleta, uma pequena amostra (em torno de 30 cm) contendo folhas e inflorescências da planta foi reservada para elaboração de exsicata visando a identificação botânica. Posteriormente o material vegetal foi identificado pelo Prof. Adriano Dias de Oliveira, curador do Herbário da Unochapecó, onde uma exsicata foi depositada (n. 3777).

A quantidade restante da planta (aproximadamente 1000 g), foi transferida para o Laboratório de Farmacognosia da Unochapecó. O material vegetal foi reduzido a pequenos fragmentos e submetido à secagem em temperatura ambiente (± 25 °C), protegido da luz direta e umidade. Na sequência, a droga vegetal desidratada foi triturada em moinho de facas (Ciemlab®, CE430), selecionada em tamis 425 μ m (35 Tyler/Mesh), identificada e armazenada ao abrigo da luz.

4.4 Preparação do extrato

O Extrato Hidroalcoólico de *A. citriodora* (EHA) foi produzido por maceração (3 dias) com o material vegetal dessecado (400 g), utilizando etanol como solvente (70% v/v; 3 l) (AZWANIDA, 2015; RASHID *et al.*, 2019). Após a filtração por Büchner, o extrato foi evaporado sob pressão reduzida (40 °C), liofilizado, pesado (149,485 g; 37,37%) e estocado em freezer a -20 °C.

4.5 Análise química de EHAc por espectroscopia de massas

Visando a identificação química dos compostos majoritários de EHA foi realizada a infusão direta da amostra (0,010 g) em um analisador Thermo Scientific LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer, equipado com fonte de ionização por eletropulverização (ESI), em modo negativo, taxa de fluxo de gás de secagem 3,0 l/min, temperatura do gás de secagem 200 °C, tensão de pulverização de - 0,5 kV, tensão capilar de - 4,5 kV, lente ECD de -10 V, amostra de fluxo de 5 µl/h e taxa de fluxo de gás nebulizador de 0,4 bar.

As fragmentações (MS/MS) das amostras foram realizadas usando o método de decomposição induzida por colisão (CID) contra argônio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para obter dados sobre íons na faixa de m/z 154 - 2000. O segundo evento de varredura foi um experimento de MS/MS realizado usando uma varredura dependente de dados nas moléculas $[MH]^-$ de os compostos de interesse a uma taxa de fluxo de gás de colisão de 30%.

4.6 Aquisição do composto de Oxalato de Escitalopram

O oxalato de escitalopram foi adquirido na quantidade de 1000 gramas, através da Laborsan Farmacia de Manipulacao Ltda, sendo fabricado pela empresa Lepuge Insumos Farmaceuticos Ltda, com sede em São Bernardo do Campo, no estado de São Paulo - Brasil. O composto conta com pureza >95%, apresentado em forma sólida, em pó, na quantidade de 1000 gramas.

4.7 Protocolo de Privação Maternal

Os filhotes foram privados da mãe por 3 h/dia nos primeiros 10 dias após o nascimento. A PM constituiu-se na remoção dos filhotes da gaiola da mãe. Os animais não privados (controles) permaneceram imperturbáveis na gaiola original com a mãe. Os animais foram desmamados somente no 21º dia após o nascimento. Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo PM (dividido em três subgrupos), e grupo controle Sem Estresse (SE). Após completar 60 dias de idade, os ratos foram separados em subgrupos (N = 10) e submetidos a tratamento crônico por 14 dias com as substâncias escolhidas para o experimento: Escitalopram como controle positivo

na dose de 10 mg/kg (antidepressivo clássico), EHA de *A. citriodora* na dose de 30 mg/kg. Grupos controles para os tratamentos receberam solução de salina. As doses de escitalopram estão de acordo com trabalhos publicados na literatura científica (IGNÁCIO *et al.*, 2018). O delineamento experimental está ilustrado na figura 1. A administração de extratos e drogas foi realizada oralmente pelo método de gavagem. Os seguintes grupos experimentais foram delineados, considerando o estresse, o tratamento com uma dose de escitalopram e do extrato de *A. citriodora*: Controle + Salina; PM + Salina; PM + escitalopram; PM + *A. citriodora*.

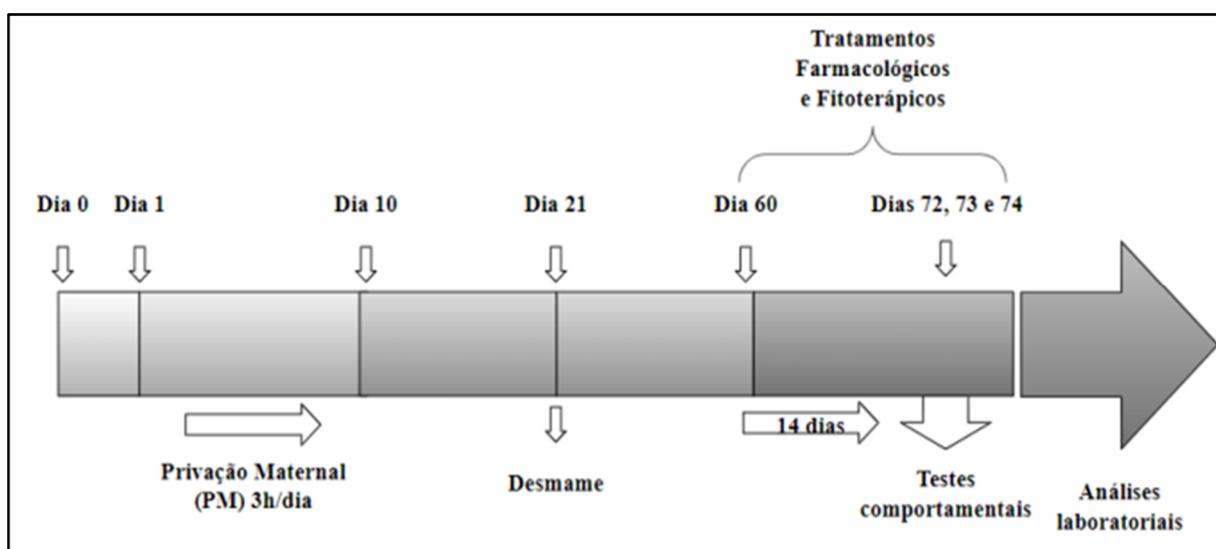


Figura 1 - Desenho experimental do protocolo de PM, tratamentos farmacológicos e testes comportamentais

4.8 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram conduzidos durante um único período do dia, manhã (08h00 - 12h00), conforme definido no início do projeto e foram iniciados 60 minutos após cada tratamento. Todos os testes comportamentais foram realizados por um observador cego aos grupos experimentais.

O comportamento depressivo foi avaliado pelo teste de natação forçada (TNF), conforme descrito por Porsolt *et al.* (1977) (n = 10/grupo) e a atividade motora exploratória avaliada por meio do teste de campo aberto (TCA), como descrito por Réus *et al.* (2013) (n = 10/grupo). Animais submetidos aos parâmetros de estresse oxidativo e marcadores inflamatórios, foram eutanasiados por decapitação e realizada

a coleta de sangue. Após a extração do cérebro, o hipocampo foi separado com base na descrição histológica de Paxinos e Watson (1986).

4.9 Parâmetros Neuro Imunes e Inflamatórios

As análises dos níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo foram realizadas através de kits ELISA seguindo os protocolos dos fabricantes. Para o processo de digestão do hipocampo foi adicionado 1 ml de TRIS HCL 50 mM em cada eppendorf com amostra de hipocampo. Os eppendorfs foram agitados no vortex e mantidos por 2h e 30min em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi coletado para uso nas análises.

Utilizou-se do método de Peterson (Lowry modificado) para a quantificação das proteínas. A curva e as amostras foram analisadas em duplicata (PETERSON, 1977). Os níveis de IL-1 β e IL-6 foram avaliados pelos kits ELISA da Sigma-Aldrich, Brasil, no formato sanduíche. Foi adicionado 100 μ l de cada padrão e amostra nos poços apropriados, coberto os poços e incubadas durante a noite a 4°C com agitação suave. Depois, foi descartada a solução e a placa foi lavada 4 vezes com solução de lavagem 1X (300 μ l por poço). A placa foi invertida e secada contra toalhas de papel limpas. Foi adicionado 100 μ l de anticorpo de detecção preparado 1x a cada poço. Os poços foram cobertos e incubados por 1 hora à temperatura ambiente com agitação suave. Em seguida descartou-se a solução e repetiu-se o procedimento. Foi adicionado 100 μ l de solução de estreptavidina em cada poço, que foram cobertos e incubados por 45 minutos à temperatura ambiente com agitação suave. Novamente, a solução foi descartada e foi repetida a lavagem. Foi adicionado 100 μ l de TMB One-Step Substrate Reagent (Item H) em cada poço, os quais foram cobertos e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, com agitação suave. Adicionou-se 50 μ l de solução de parada (item I) a cada poço e a placa foi lida com a absorbância de 450 nm imediatamente. Os resultados foram calculados considerando a interpolação da equação da curva da absorbância pela concentração e expressos em picogramas por miligramas (pg/mg) de proteína.

4.10 Atividade da Mieloperoxidase - MPO

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima heme produzida por mediadores

inflamatórios e liberada pelos leucócitos no local da lesão, refletindo a ativação de neutrófilos e linfócitos. Ela é responsável por catalisar a reação de íons cloreto com H_2O_2 , gerando ácido hipocloroso (HOCl). Na presença de H_2O_2 , a MPO também catalisa o acoplamento oxidativo do fenol e 4-aminoantipirina (AAP), formando a quinoneimina, que possui absorvância máxima em 492 nm (Suzuki *et al.*, 1983). A atividade de MPO foi avaliada utilizando um sistema de peroxidase modificado, ao qual a amostra de soro foi misturada com AAP e H_2O_2 , incubada a 37 °C por 30 minutos e medida espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos em μM de quinoneimina por mg de proteína produzida em 30 minutos ($\mu Mq/mg/30min$).

4.11 Análise da peroxidação lipídica - TBARS

As lipoperoxidações são reações rápidas resultantes da quebra de ácidos graxos poliinsaturados, geralmente quantificadas por meio de TBARS, sendo o malondialdeído (MDA) seu principal componente, detectado principalmente pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Jentzsch *et al.*, 1996). Para medir o MDA, as amostras de soro foram misturadas com 55 μL de água destilada, 100 μL de ácido ortofosfórico (0,2 M) e 25 μL TBA (0,1 M). Após incubação a 37°C, a leitura espectrofotométrica foi realizada para detectar o produto rosa formado, com absorção medida em 532 nm. Os resultados foram expressos em nM de MDA/mL de soro.

4.12 Análise estatística

As análises foram realizadas por meio do software Statistica 7.0 e os dados foram representados como as médias \pm erro padrão da média. A normalidade foi avaliada de acordo com o teste de Kolgomorov-Smirnov e as diferenças entre as médias foram determinadas por por meio da Análise de Variância (ANOVA, *one-way*), seguido do teste *post hoc* de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa intitulado “Efeito tipo antidepressivo e neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Aloysia citriodora* em animais submetidos a estresse na infância” é um subprojeto que está vinculado a um projeto maior intitulado “Efeito antidepressivo, ansiolítico e neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Aloysia citriodora* em animais submetidos a estresse na infância e na vida adulta” que foi submetido ao CEUA com o seguinte protocolo: nº 005/CEUA/2021 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), em 29/07/2021, local onde as protocolos dos extratos da planta e dos experimentos com os animais foram realizados.

6. RESULTADOS

6.1 Análise química

O espectro de massas (EM-ESI) no modo negativo de EHA forneceu 10 compostos polifenólicos (Tabela 1). Dentre eles, estão os ácidos orgânicos, bem como flavonoides livre e glicosilados, característicos de *Aloysia citriodora*.

Tabela 1 – Compostos polifenólicos apontados em espectrometria de massas (ESI-IT-MS/MS) do Extrato hidroalcoólico de *Aloysia citriodora* (EHA).

Compostos	[M-H] ⁻	MS ₂	Referências
Ácido quínico (1)	191	173, 127, 111, 93, 85	Vidal-Gutiérrez et. al., 2020
Baicaleína (2)	269	251, 241, 225	Han et. al., 2007
Diosmetina (3)	299	284, 256, 227	Justesen, 2021
Cafeoil-glicosídeo (4)	341	179, 119	Bastos et. al., 2007
Ácido cafeoilquínico (5)	353	191, 179, 173, 135	Bastos et. al., 2007
Canferol-3-O-glicosídeo (6)	447	285, 257, 151	Vidal-Gutiérrez et. al., 2020
Quercetina-3-O-glicosídeo (7)	443	301, 300, 271, 161	Goufo et. al., 2020
Quercetina-3-O-glucuronídeo (8)	477	301, 283, 179, 151	Goufo et. al., 2020
Rafinose (9)	503	341, 323, 263, 221, 179, 161, 143	Lisina; Kumar, 2023
Ácido dicafeoilquínico (10)	515	353, 191, 179, 173	Dugo et. al., 2009

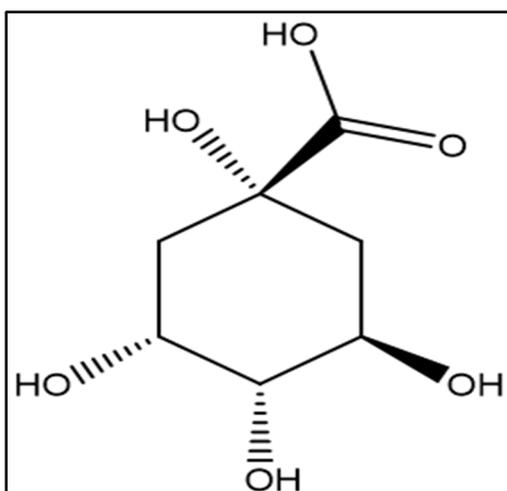


Figura 2: Composto 1 - Ácido Quínico

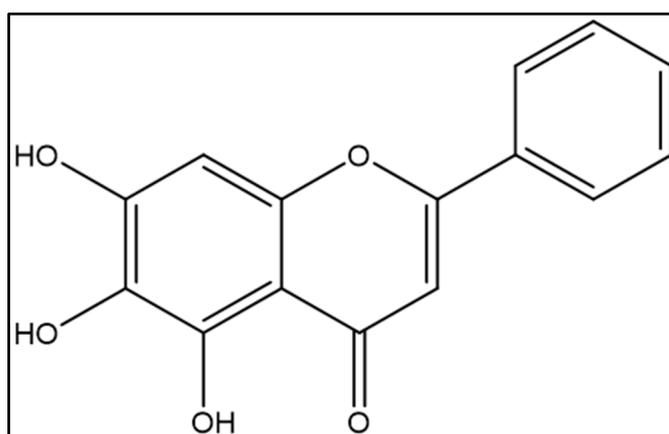


Figura 3: Composto 2 - Baicaleína

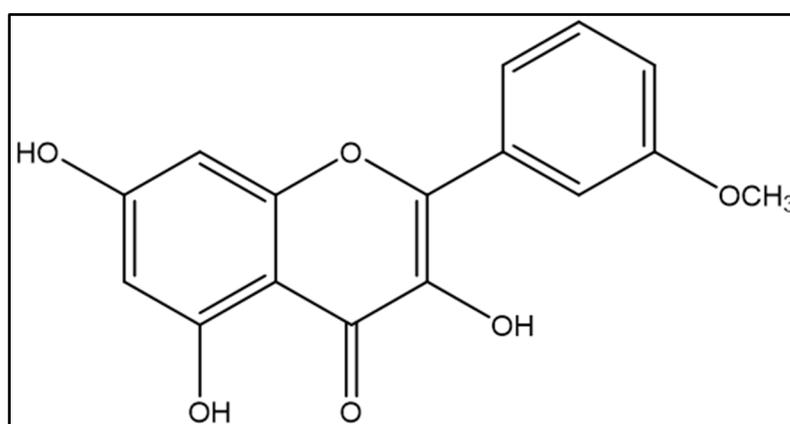


Figura 4: Composto 3 - Diosmetina

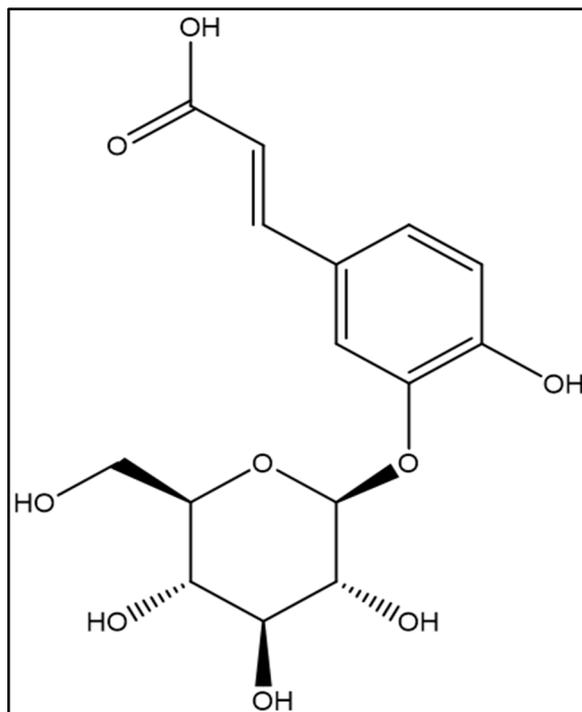


Figura 5: Composto 4 - Cafeoil-glicosídeo

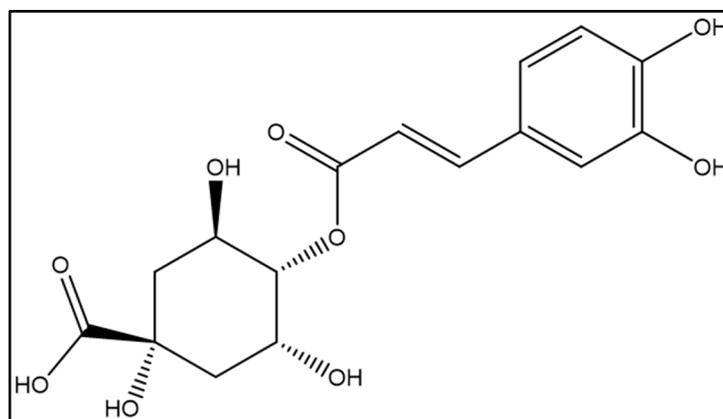


Figura 6: Composto 5 - Ácido Cafeoilquínico

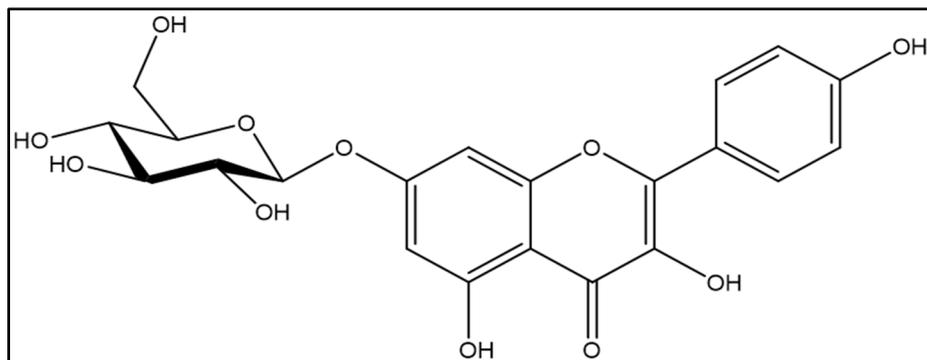


Figura 7: Composto 6 - Canferol-3-O-glicosídeo

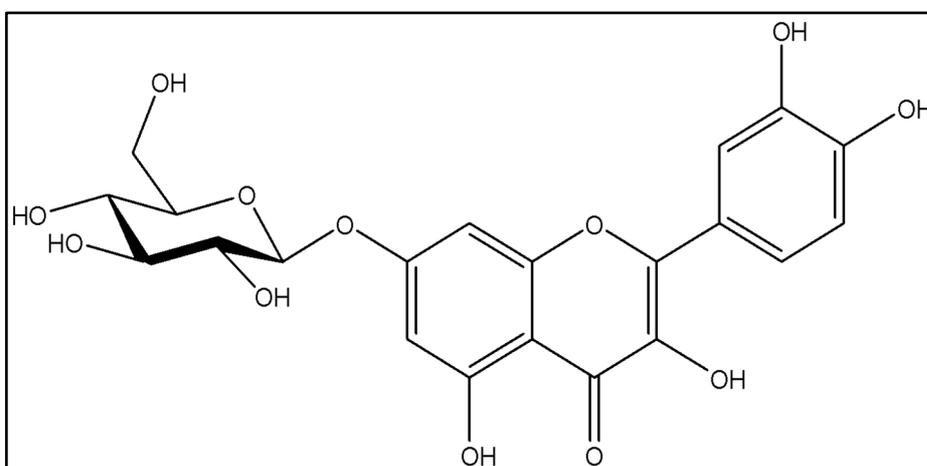


Figura 8: Composto 7 - Quercetina-3-O-glicosídeo

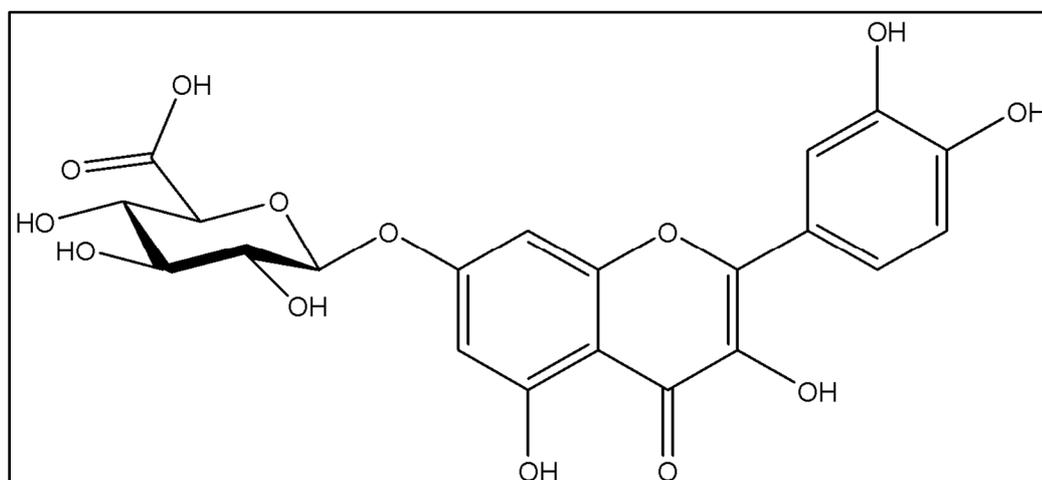


Figura 9: Composto 8 - Quercetina-3-O-glucuronídeo

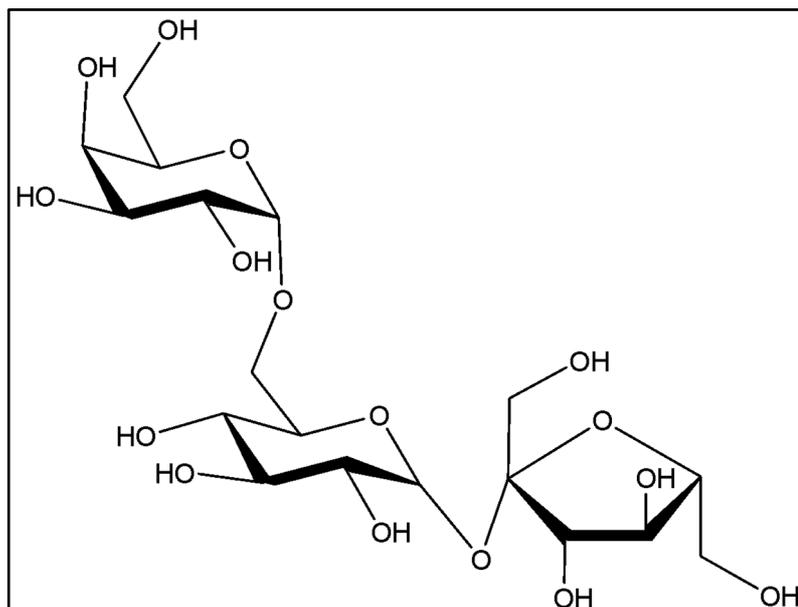


Figura 10: Composto 9 - Rafinose

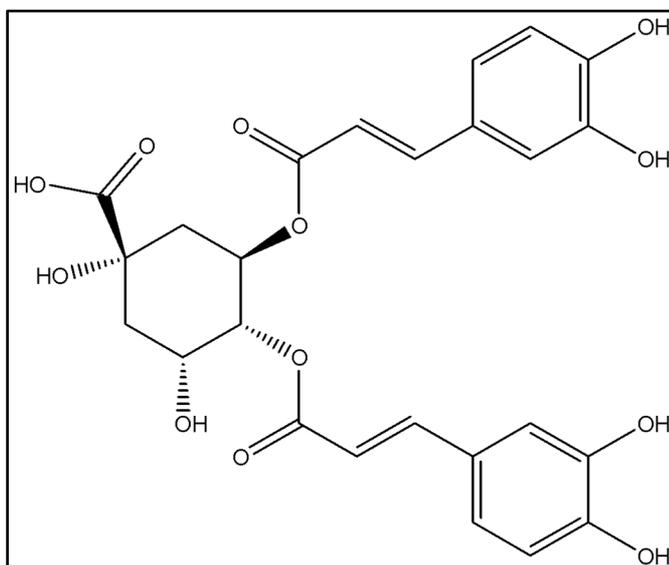


Figura 11: Composto 10 - Ácido Dicafeoilquínico

6.2 Efeitos da PM e dos tratamentos no teste de natação forçada

Os efeitos da PM e dos tratamentos com o EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg), e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada estão ilustrados na figura 12. No protocolo de natação forçada, a ANOVA de uma via mostrou interação significativa no tempo de imobilidade entre os grupos sem estresse e os grupos privados maternalmente e entre os tratamentos ($F= 5,03377$; $P: 0,004727$). O teste Post hoc de Tukey mostrou que a PM elevou significativamente o tempo de imobilidade ($p < 0,02$) no teste de natação forçada. Os tratamentos com *A. citriodora* e Esc reverteram o efeito da PM, ambos com ($p < 0,02$).

No que diz respeito ao tempo de natação, observou-se na ANOVA uma interação significativa entre os grupos ($F= 5,1787$; $P < 0,005471$). O teste de *Post hoc* de Tukey mostrou que o grupo PM apresentou menor tempo de natação em comparação ao grupo tratado com escitalopram ($p < 0,02$); controle salina ($p < 0,02$) e em relação ao grupo tratado com *A. citriodora* ($p < 0,04$). Por fim, no teste de escalada, do nado forçado, não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Teste de Natação Forçada

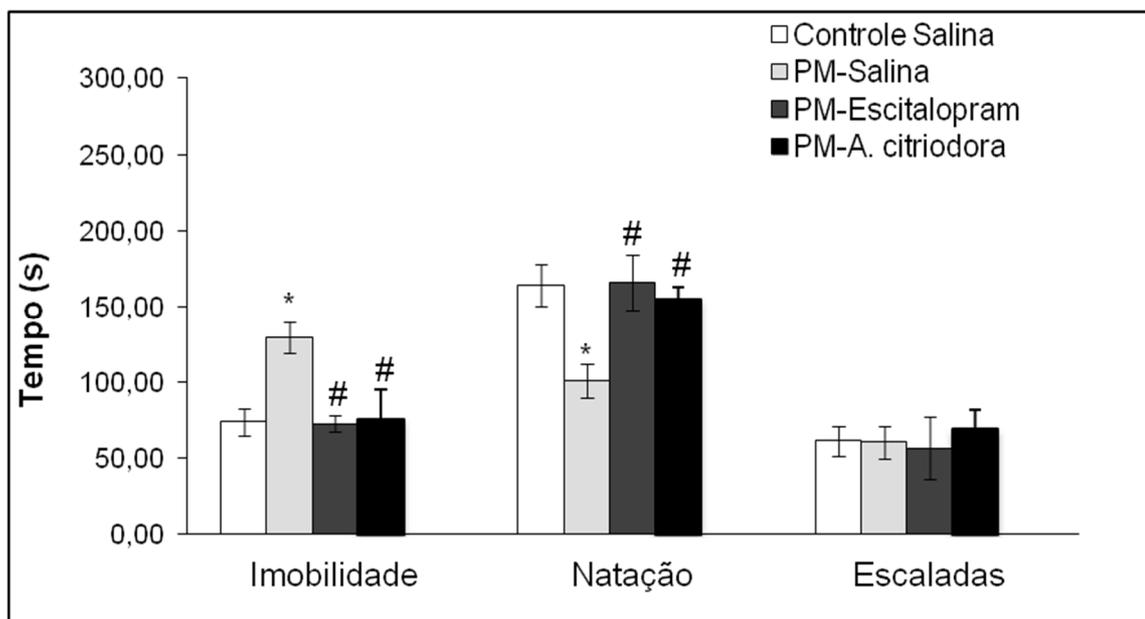


Figura 12 - Efeitos do estresse de PM e dos tratamentos com o EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Sobre o parâmetro de mobilidade: *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$). Sobre o parâmetro de natação: *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$).

6.3 Efeitos da PM e dos tratamentos no teste de campo aberto

Os efeitos da PM e dos tratamentos com o EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg), e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto estão ilustrados na figura 13. No teste de campo aberto a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos de PM. Tanto a PM quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ($F=2,40$; $p > 0,05$) e levantamentos ($F=2,11$; $p > 0,05$) no teste do campo aberto.

Atividade Locomotora no Campo Aberto

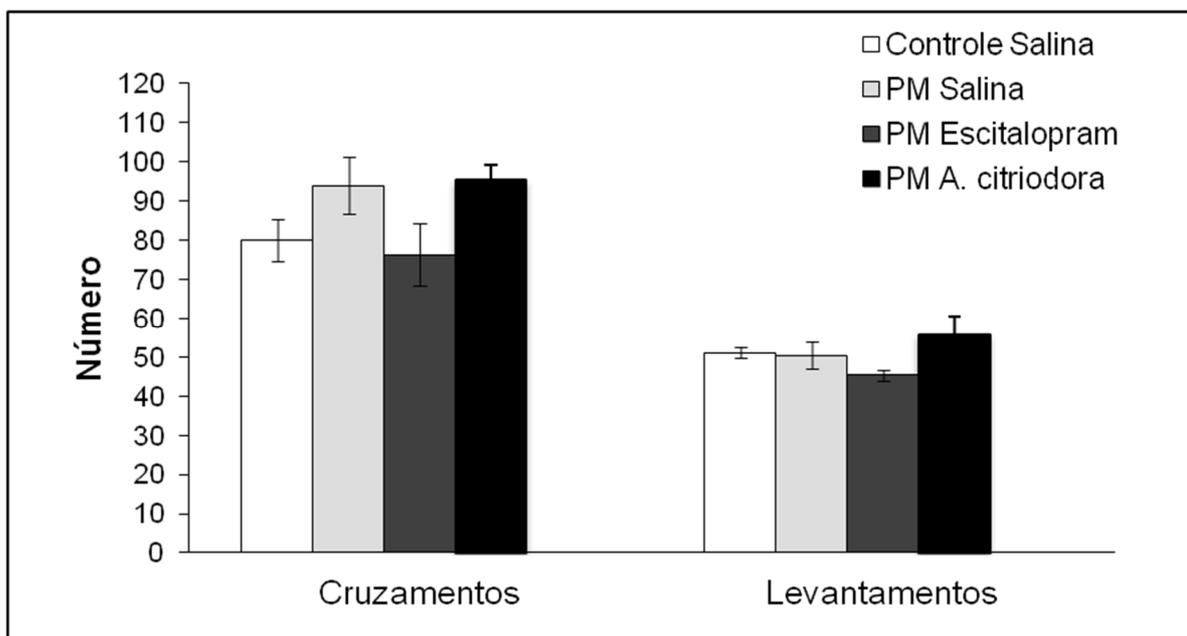


Figura 13 - Efeitos da PM e dos tratamentos com o EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

6.4 Níveis de IL-1 β e IL-6 no Hipocampo

Os efeitos da PM assim como do tratamento com *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo, estão ilustrados da figura 14. A ANOVA de uma via revelou interação significativa de IL-1 β ($F=14,77$ e $p < 0,001$) e IL-6 ($F=12,23$ e $p < 0,001$), entre os grupos. O teste *Post hoc* de Tukey mostrou que a PM induziu aumento significativo dos níveis de IL-1 β ($p < 0,05$). A *A. citriodora* ($p < 0,001$) e o escitalopram ($p < 0,01$) reverteram os níveis elevados de IL-1 β , induzidos pela PM. A PM também aumentou, de modo ainda mais significativo, os níveis de IL-6 ($p < 0,01$). Os tratamentos com *A. citriodora* ($p < 0,001$) e com escitalopram ($p < 0,01$) reverteram os níveis elevados de IL-6, induzidos pela PM.

Atividade da IL-1 β e IL-6 no Hipocampo

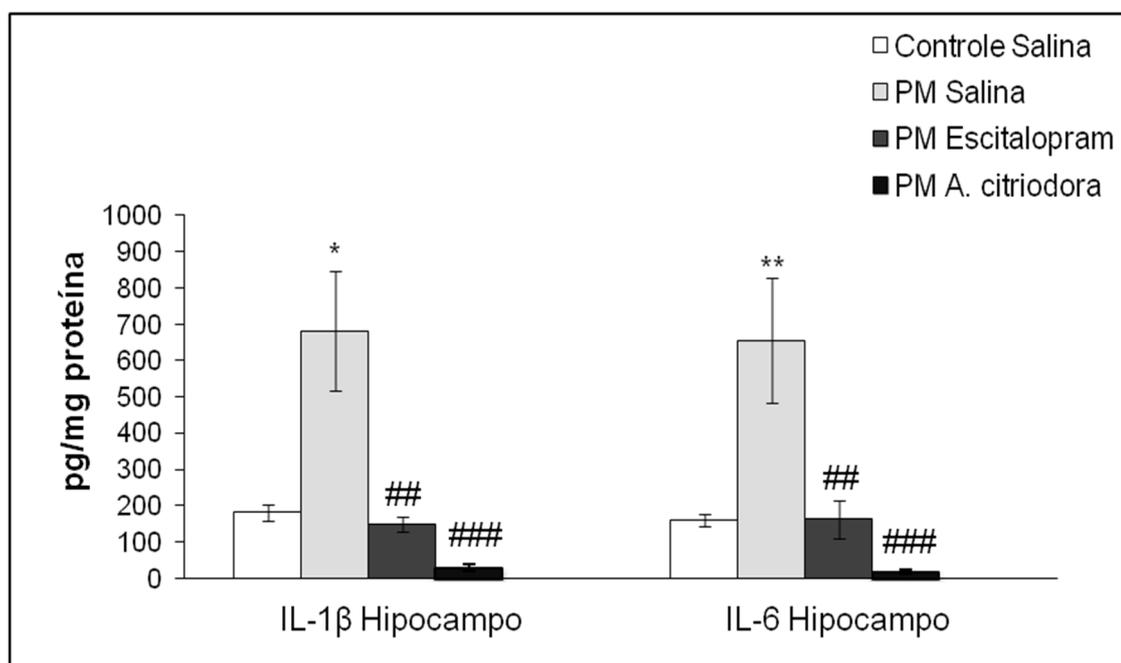


Figura 14 - Efeitos da PM e dos tratamentos com o EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. *diferença estatística entre Controle Salina e PM Salina ($p < 0,05$); **diferença estatística entre Controle Salina e PM Salina ($p < 0,01$); ##diferente do PM salina ($p < 0,01$); ###diferente do PM salina ($p < 0,001$).

6.5 Atividade de MPO e TBARS no Soro e Hipocampo

Os efeitos da PM assim como do tratamento com EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos níveis de MPO e TBARS no hipocampo e soro, estão ilustrados, respectivamente, nas imagens 15 e 16. Na análise, a ANOVA não indicou interação significativa entre os grupos, na avaliação dos níveis de MPO do hipocampo ($F = 0,4689$; $p > 0,05$). Diferentemente, a ANOVA apontou significativa interação entre os grupos privados maternalmente e o grupo sem estresse e entre os tratamentos tanto nos valores de MPO séricos ($F = 29,0810$; $p < 0,0001$), TBARS sérico ($F = 4,2379$; $p < 0,05$) e TBARS no hipocampo ($F = 4,42067$; $p < 0,05$).

O teste *Post hoc* de Tukey mostrou que a PM não induziu aumento significativo dos níveis de MPO ($p > 0,05$) no hipocampo, contudo mostrou aumento no soro com significância estatística ($p < 0,001$). O TBARS aumentou significativamente no

hipocampo e no soro ($p < 0,05$). A *A. citriodora* ($p < 0,05$) e o escitalopram ($p < 0,01$) reverteram os níveis elevados de MPO, induzidos pela PM no soro.

Com relação ao TBARS, a *A. citriodora* ($p < 0,05$) e o escitalopram ($p < 0,05$) reverteram os níveis elevados, induzidos pela PM no hipocampo. Apesar de não apresentar significância estatística, houve redução dos níveis de TBARS no soro nos grupos com tratamentos (escitalopram - 19,36128; *A. citriodora* - 18,63028 [$p = 0,06023$]) com relação ao grupo de PM Salina.

Efeito da PM e tratamentos sobre MPO em Soro e Hipocampo

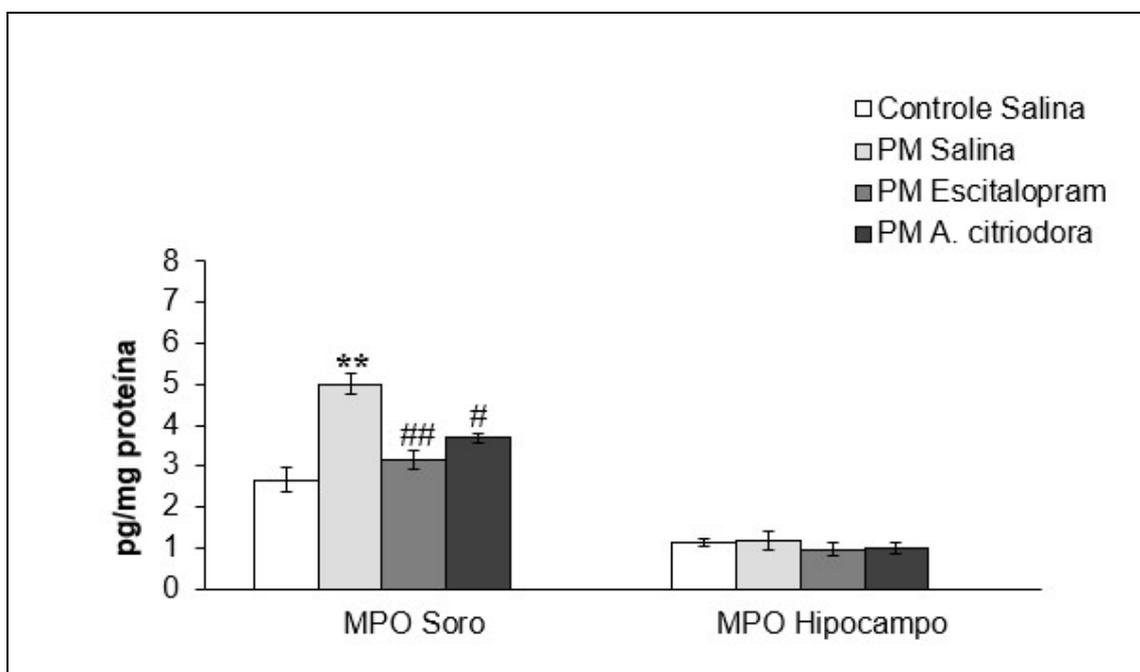


Figura 15 - Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a MPO em soro e hipocampo). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. #diferente do PM Salina ($p < 0,001$); *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); **diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,001$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$); ##diferente do PM Salina ($p < 0,01$).

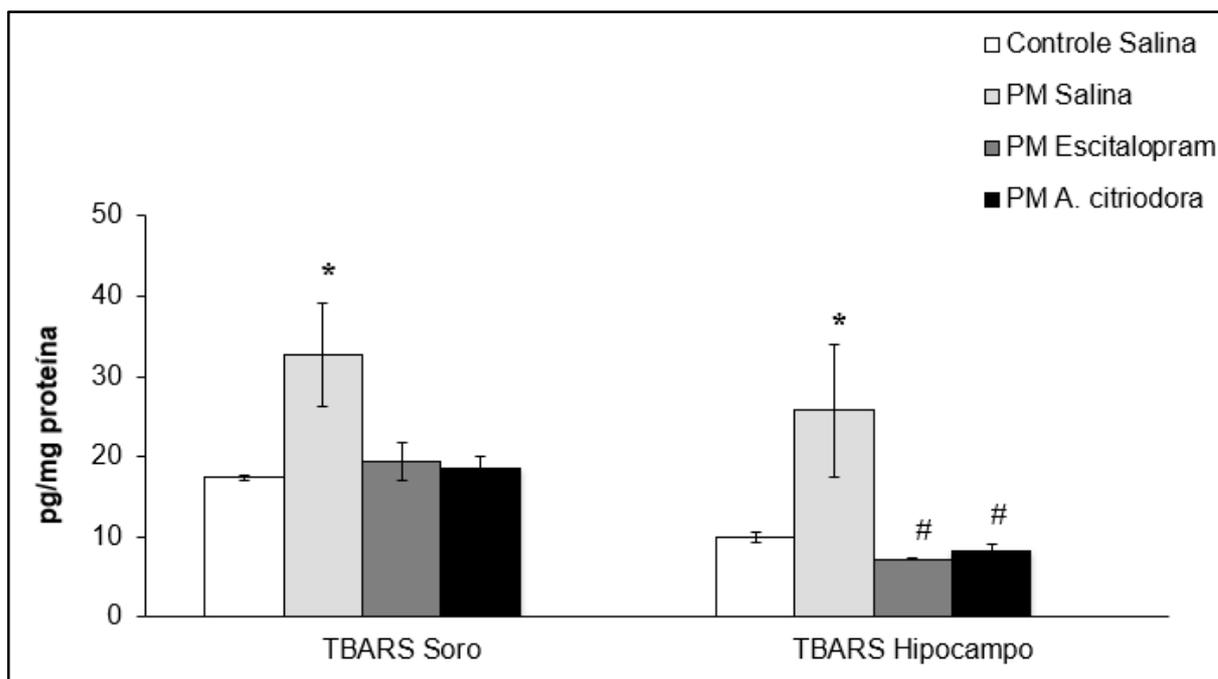
Efeito da PM e tratamentos sobre TBARS em soro e Hipocampo

Figura 16 - Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre TBARS em soro e hipocampo. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

A família Verbenaceae compreende 98 gêneros e conta com 2614 espécies no mundo. No Brasil, em todos os biomas, já foram identificados 47 gêneros distribuídos em 407 espécies que se apresentam desde ervas perenes até subarbustos, encontrados nas regiões tropicais e subtropicais (SANTOS *et al.*, 2015). A espécie *Aloysia citriodora* Palau se destaca, por apresentar amplo uso alimentar e etnofarmacológico (RITTER *et al.*, 2002; LORENZI; MATOS, 2008; SANTOS *et al.*, 2015). Contudo, apesar da larga utilização popular, são escassas as pesquisas que investigam o mecanismo farmacológico da planta ao nível do SNC.

Inicialmente, a análise química de EHAc por meio de espectrometria de UV/Vis, revelou uma quantidade representativa de flavonoides. Este achado, está de acordo com Tammar *et al.* (2021), que determinaram a presença desses compostos nas folhas de *A. citriodora* coletadas em diferentes localizações geográficas. De fato, Skaltsa e Shamma (1988) isolaram diversas flavonas do extrato da planta, e subsequentemente, Carnat *et al.* (1995), Ragone *et al.* (2007) e Quirantes-Piné *et al.* (2009) detectaram também, a presença de glucosídeos de flavonas como a vitexina e isovitexina além da apigenina-7-diglicuronídeo e crisoeriol-7-diglucuronídeo. Estudo recente identificou novos flavonoides para a espécie (jaceosidin, nepetin e nepitrina), porém, todos com estruturas de flavona (ZHANG *et al.*, 2015). Flavonas são bastante ativas no organismo humano e podem desempenhar ações no sistema nervoso central, mais especificamente, nos receptores benzodiazepínicos GABA_A (VIOLA *et al.*, 1995; JÄGER; KRYDSFELDT; RASMUSSEN, 2009) e sobre as enzimas monoamina oxidases (MAO), MAO_A e MAO_B (SLOLEY *et al.*, 2000), revelando consequentemente, efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes bem como, atividades antidepressivas e de combate à doença de Parkinson, pois atua como um inibidor da MAO e naturalmente vai elevar os níveis de dopamina (JAGER; SAABY, 2011).

O presente trabalho estudou o efeito do EHA da *A. citriodora* e do antidepressivo clássico, escitalopram, sobre comportamentos tipo depressivos, no teste de natação forçada, em ratos adultos submetidos a estresse de PM nos primeiros dias de vida. Avaliou-se também, marcadores inflamatórios no hipocampo dos animais através de interleucinas pró inflamatórias (IL-1 β e IL-6). O estresse oxidativo foi avaliado por meio da atividade da MPO e TBARS, tanto no soro quanto no hipocampo dos animais.

Foi escolhido esse modelo experimental, pois é sabido, de acordo com a literatura científica, que o período neonatal é fundamental no processo de desenvolvimento neuronal, principalmente pelo fato de os animais serem dependentes da mãe nessa fase. Estudos mostram que a PM induz mudanças no comportamento e pode alterar marcadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia do TDM (AMINI-KHOEI *et al.*, 2019; IGNÁCIO *et al.*, 2017).

Estudos experimentais encontraram alterações marcantes no córtex e no hipocampo de roedores após neuroinflamação induzida com lipopolissacarídeos. A indução mimetiza comportamento semelhante à ansiedade, exacerba o estresse oxidativo e gera inflamação devido à alta peroxidase lipídica que aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6, além de TNF- α . (NAEEM, *et al.*, 2021). Diversas plantas medicinais têm apresentado ação antidepressiva em modelos animais.

Um dos fármacos tradicionais mais utilizados para o tratamento do TDM, ansiedade, além de outros distúrbios psiquiátricos é o escitalopram, o qual atua como ISRS, mantendo o neurotransmissor por mais tempo na fenda sináptica. O aumento da serotonina na fenda sináptica pode suprir um provável déficit na sinalização celular durante o TDM, e com isso trazer alívio clínico para alguns pacientes. No entanto, há um número significativo de indivíduos resistentes aos ISRSs. Há evidências de que a inflamação desempenha um papel fundamental na variabilidade clínica dos ISRSs (HERSEY, *et al.*, 2021).

Embora a modulação sináptica da serotonina não seja esclarecida, a capacidade do escitalopram em aumentar os níveis de serotonina necessários para eficácia do tratamento no TDM, foi reduzida pela inflamação aguda induzida em roedores (HERSEY, *et al.*, 2021).

Nesse estudo, dois testes comportamentais foram realizados com a finalidade de avaliar os impactos da PM e dos tratamentos, o teste de natação forçada e de campo aberto. Nos resultados encontrados a partir do teste de natação forçada, que é composto pelos parâmetros de tempo de imobilidade, natação e escalada, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sobretudo nos parâmetros de tempo de imobilidade e de natação. O teste do campo aberto, que avalia possíveis efeitos sedativos dos tratamentos, não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Sobre o teste de natação forçada, de acordo com Arauchi *et al.*, (2018); e Haraguchi *et al.*, (2018), é um teste amplamente utilizado em pesquisas experimentais com animais, com a finalidade de avaliar comportamentos tipo depressivos, que podem ser desencadeados através de protocolos animais por meio de estresse crônico, similar ao que ocorre com a PM. A literatura indica que esse teste é capaz de avaliar substâncias com potencial antidepressivo, sobretudo ao considerar que os antidepressivos clássicos, caso do escitalopram utilizado nessa pesquisa, induzem respostas comportamentais tipo antidepressivas em animais submetidos ao teste de natação forçada (ARAUCHI *et al.*, 2018; HARAGUCHI *et al.*, 2018).

A ANOVA revelou que no parâmetro de imobilidade, o grupo PM teve esse indicador aumentado em relação ao grupo controle. Através do *Post Hoc* – Turkey, observou-se que o grupo PM salina apresentou aumento significativo de imobilidade, enquanto o escitalopram e *A. citriodora* reduziram significativamente este parâmetro. Dessa forma, é possível concluir que os grupos tratados apresentaram redução de comportamentos tipo depressivos e se comportaram de forma similar ao grupo controle sem estresse, corroborando com a literatura científica acerca dos efeitos antidepressivos da *A. citriodora* e do escitalopram (ERAM *et al.* 2012; HARAGUCHI *et al.*, 2018).

Sobre o tempo de natação, outro parâmetro do teste de natação forçada, a ANOVA revelou diferença estatística significativa entre o tempo de natação do grupo PM em relação ao grupo controle. No teste de *Post hoc* observou-se, assim como na imobilidade, semelhança estatística entre os grupos controle, escitalopram e *A. citriodora*. Os resultados obtidos no teste de tempo de natação vão ao encontro daqueles vistos no teste de imobilidade, confirmando, mais uma vez, que os tratamentos são eficientes em reverter os comportamentos tipo depressivos.

Como é possível observar, os resultados obtidos no teste de natação forçada, nos grupos estudados, mostraram que o EHA de *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg), apresentaram ação semelhante ao grupo controle. Assim, ambos os tratamentos tiveram uma ação de reduzir comportamentos tipo depressivos induzidos pelo estresse no início da vida. Esses resultados corroboram com as evidências encontradas na literatura, sobretudo quando é observado o grupo escitalopram, que é amplamente utilizado em pesquisas com modelo animal e atuam tanto na redução de comportamentos tipo depressivos, quanto na ação em

mecanismos biológicos importantes para a proteção neuronal e na redução da inflamação (MUNZER *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2017; WOLKOWITZ *et al.*, 2011).

Alguns fármacos e plantas podem induzir efeito sedativo importante e interferir no comportamento de mobilidade em animais. Para avaliar essa possível ação dos fármacos e extratos, realizou-se o teste de campo aberto, que de acordo com Gould *et al* (2009), tem a finalidade de medir a atividade exploratória geral em roedores. Para isso utiliza de medidas de quantidade e qualidade, por meio de diferentes parâmetros, como cruzamentos e levantamentos. A ANOVA não revelou diferença estatística entre os diferentes grupos do estudo, o que indica que tanto a PM, como os tratamentos com escitalopram e com o extrato de *A. citriodora*, não exerceram efeitos sedativos ou estimulantes nos animais. O efeito não sedativo é importante pois mantém os animais ativos e responsivos tanto em relação ao ambiente tranquilo quanto em relação à capacidade de luta e fuga testadas no experimento.

No que diz respeito aos marcadores de inflamação hipocampal, observou-se que a PM elevou os níveis das interleucinas inflamatórias quando comparado ao grupo controle. Ao serem submetidos ao tratamento com escitalopram, os níveis de interleucinas elevados pela PM foram revertidos a níveis semelhantes ao grupo controle. Já o grupo tratado com *A. citriodora*, reduziu os níveis de interleucina a valores ainda menores que as interleucinas do grupo controle salina, o que significa dizer que o extrato da planta apresentou grande poder anti inflamatório neuronal. Vale lembrar a forte relação entre a neuroinflamação e o desenvolvimento de transtornos depressivos (CARVALHO *et al.*, 2014; IGNÁCIO, *et al.*, 2017, MOUIHATE, 2014; STRAWBRIDGE, *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços nos tratamentos farmacológicos sintéticos, apenas 50% dos casos de depressão são passíveis de reversão. Além disso, causam efeitos adversos e, muitas vezes, apresentam custo elevado. Dessa forma, o uso de plantas medicinais, entre elas, a *A. citriodora* vem sendo cada vez mais explorado por pesquisadores com o intuito de melhorar a resposta e adesão ao tratamento (GUPTA, 2020). Algumas dessas plantas apresentam ação antioxidante, regulam o eixo HPA, reduzem mediadores inflamatórios, além de regular moléculas endógenas como noradrenalina, acetilcolina, dopamina (GUPTA, 2020).

Um estudo investigou os efeitos comportamentais do EHA das folhas de *A. citriodora* em ratas fêmeas e demonstrou que as substâncias foram capazes de promover efeito depressor motor, ansiolítico, enquanto em um dos testes mais

utilizados para avaliar depressão, o Functioning Assessment Short Test (FAST), foi possível perceber que a mobilidade do animal foi comparável à observada em animais tratados com antidepressivos de referência como fluoxetina e imipramina (MORA, *et al.*, 2005).

Uma meta-análise, envolvendo 35 estudos, analisou biomarcadores inflamatórios antes e depois do tratamento antidepressivo e mostrou que a falta de resposta ao tratamento estava relacionada à inflamação persistente. No entanto, a boa resposta ao tratamento para TDM, estava relacionada à redução dos níveis dos marcadores inflamatórios. Dessa forma, o estudo sugere que a manutenção dos níveis elevados de inflamação pode favorecer a resistência ao tratamento do TDM (STRAWBRIDGE, *et al.*, 2015). Sendo assim, possivelmente efeito antiinflamatório do extrato da *A. citriodora* poderá contribuir para a redução da inflamação e possivelmente do TDM.

Mecanismos inflamatórios estão diretamente relacionados ao estresse oxidativo e esse está intimamente envolvido com a fisiopatologia de diversas doenças, sobretudo aquelas envolvidas com o SNC. O SNC é especialmente sensível ao dano oxidativo por ter em suas membranas lipídeos poliinsaturados, baixas defesas antioxidantes, extensiva utilização do oxigênio, apresentam células altamente especializadas e pouca capacidade de regeneração. Nesse sentido, a maioria dos danos apresentam caráter quase que permanente e causam importantes comprometimentos ao SNC. (MACHADO, 2014; ANDERSEN, 2004; HIRAI, 2001).

Outro aspecto relevante sobre o SNC é sua alta taxa metabólica, o que leva a um alto consumo de oxigênio (O₂) pelo cérebro. Devido ao grande consumo de ATP pelos neurônios, o cérebro humano é responsável por consumir aproximadamente 25% de todo o O₂ disponível, e nesse contexto destaca-se o importante papel das mitocôndrias. Nesse processo de alto consumo de O₂ e atividade mitocondrial, elétrons escapam da cadeia de transporte e geram espécies reativas de oxigênio (EROs). Os EROs podem causar lesões nas mitocôndrias, o que favorece um aumento no vazamento desses elétrons, gerando um ciclo de desbalanço oxidativo (HALLIWELL, 2002; ANDERSEN, 2004).

É observado em diferentes trabalhos que em quadros de TDM, ocorre esse desbalanço entre as espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante celular, o que gera uma inflamação, lesão tecidual, sinalização neural anormal e até mesmo morte neuronal (MAES *et al.*, 2013; NOBIS; BHATT; NAGAPPA; PATIL,

2020).

De acordo com Shami (2004), algumas enzimas funcionam como sistemas de proteção, pois são responsáveis por impedir ou controlar a produção dos radicais livres. Dentre as enzimas que compõem esse sistema, é possível citar: Superóxido Dismutase (SOD); Catalase (CAT) e por fim, Glutathione Peroxidase (GPx). Vale ressaltar que em muitas situações, a atividade adequada das enzimas depende da participação de cofatores enzimáticos de origem dietética. A SOD, por exemplo, na mitocôndria, necessita do manganês como cofator, já no citoplasma é dependente de zinco e cobre. Com a GPx não é tão diferente, pois em determinadas condições utiliza o selênio como cofator (GREEN, 2004).

A MPO é uma enzima do tipo heme presente em células do tecido nervoso e em neutrófilos. O aumento de sua expressão pode ter relação com uma maior atividade inflamatória e neurodegenerativa (GAŁECKI *et al.*, 2012). Em alguns estudos, encontrou-se aumentada tanto no soro quanto no tecido nervoso de pessoas com transtorno depressivo, podendo correlacionar-se a um transtorno depressivo refratário, o que corroboraria com a reduzida eficácia de fármacos antidepressivos e a casos refratários ao tratamento farmacológico (TALAROWSKA; SZEMRAJ; GAŁECKI, 2015).

Neste presente estudo, verificou-se que a atividade da MPO estava aumentada no soro dos animais que foram submetidos ao protocolo PM e que também apresentavam comportamentos do tipo depressivo em relação ao controle ($p < 0,05$). Tal achado encontra-se em consonância com outros estudos (GAŁECKI *et al.*, 2012; TALAROWSKA; SZEMRAJ; GAŁECKI, 2015; SOMANI *et al.*, 2022).

No estudo de Talarowska *et al.* (2015), percebeu-se um aumento da expressão gênica do gene da MPO, sendo uma possível explicação para quadros tipo depressivos refratários. Esse achado corrobora com outros achados da literatura que correlaciona o estresse oxidativo e o TDM, uma vez que o desbalanço oxidativo leva a um ambiente pró inflamação e de alteração da fisiologia celular.

Quando se observa a atividade da MPO no soro dos grupos tratados, nota-se uma redução dos seus parâmetros com o uso tanto do escitalopram (10mg/kg) ($p < 0,01$) e do EHA da *A. citriodora* (30mg/kg) ($p < 0,05$). Assim, houve uma redução significativa no estresse oxidativo nos grupos que receberam o tratamento. Esses achados vão ao encontro de outros trabalhos em que as intervenções farmacológicas

também reduziram a atividade dessa enzima (IGNÁCIO *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2022; GROLLI *et al.*, 2023).

No estudo de GOMES *et al.* (2022), um ensaio com o uso da *A. citriodora* em ratos com comportamento tipo depressivo evidenciou uma redução nos níveis corticais de MPO. Embora em nosso trabalho as amostras de hipocampo que avaliaram a MPO não apresentarem valores com relevância estatística, a literatura relata um aumento de MPO em diferentes regiões do encéfalo em animais submetidos aos protocolos de PM (IGNÁCIO *et al.*, 2017; ORTMANN *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2022; TUON *et al.*, 2021).

Outra avaliação de estresse oxidativo empregada neste estudo foi o TBARS. O TBARS é um método laboratorial utilizado para medir a quantidade de malonaldeído e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, sendo estes, subprodutos da degradação de lipídios oxidados, sendo um marcador indireto do estresse oxidativo (NOBIS; ZALEWSKI; WASZKIEWICZ, 2020). Embora não seja um tipo de marcador específico, o TBARS geralmente encontra-se elevado em transtornos depressivos (NOBIS; ZALEWSKI; WASZKIEWICZ, 2020).

Em nosso estudo, o TBARS apresentou-se elevado tanto no soro ($p < 0,05$) quanto no hipocampo ($p < 0,05$), se comparado com o grupo controle não estressado, o que mais uma vez corrobora o papel do estresse oxidativo nos quadros de TDM. Em outros trabalhos observou-se achados similares (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2022; MOHAMMED *et al.*, 2021; SOWA-KUĆMA *et al.*, 2018; TUON *et al.*, 2021). De acordo com Jiménez-Fernández *et al.* (2022), em sua metanálise, foi verificado que em 40 estudos os níveis de TBARS se apresentavam elevados no TDM.

No que diz respeito aos tratamentos, observou-se redução dos parâmetros do TBARS em hipocampo ($p < 0,05$) e soro ($p > 0,05$) tanto no tratamento com o escitalopram quanto com a *A. citriodora*. Tal redução demonstra que os tratamentos apresentam efeito terapêutico na melhora do balanço oxidativo. A literatura demonstra padrões semelhantes de redução do estresse oxidativo, tendo em vista o marcador TBARS e sua redução a partir do tratamento (IGNÁCIO *et al.*, 2017).

Como observado, no soro, os tratamentos não apresentaram significância estatística em relação ao TBARS. Tal achado pode estar associado a outros fatores, tendo em vista ser um marcador não específico do estresse oxidativo, já que houve melhora do padrão de MPO no soro. Apesar de não ser observada essa significância

pelo software de estatística, é observado que houve uma tendência de os tratamentos reduzirem os níveis de TBARS no soro.

Por fim, os resultados obtidos nesta pesquisa, utilizando o EHA de *A. citriodora*, podem ser considerados promissores. Os dados obtidos em testes comportamentais, nos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo foram considerados relevantes, pois mostram reversão de comportamentos tipo depressivos nos parâmetros de imobilidade, natação e teste do nado forçado. Além disso, reduziu os níveis das interleucinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo. Sobre o estresse oxidativo, foi capaz de reduzir a atividade da MPO no soro e TBARS, principalmente no hipocampo. Embora os resultados sejam promissores, faz-se necessário novos estudos com compostos ativos isolados da planta, com a finalidade de elucidar os mecanismos biológicos e como se dá essa atividade antiinflamatória e antioxidante induzidos pelo protocolo de privação maternal.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse causado pelo protocolo de privação maternal em roedores culminou em um aumento significativo de comportamentos tipo depressivos na vida adulta, aumento na expressão de substâncias inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo e aumento de marcadores de estresse oxidativo, tanto em hipocampo quanto em soro.

O tratamento realizado com o extrato hidroalcoólico de *A. citriodora* reverteu os comportamentos depressivos de forma similar ao grupo tratado com escitalopram. Sobre os marcadores de inflamação no tecido nervoso, observou-se que os animais tratados com *A. citriodora* tiveram valores inferiores àqueles tratados com escitalopram e ao grupo controle, e ainda de modo mais significativo quando comparado ao grupo PM tratado com salina. Sobre o estresse oxidativo, os tratamentos reduziram a atividade da MPO no soro. Já o TBARS foi reduzido em soro e hipocampo, mas só teve relevância estatística no tecido hipocampal.

Os resultados obtidos através desta pesquisa indicam que substâncias presentes na espécie *A. citriodora* apresentam potencial uso como antidepressivo, uma vez que reduzem os comportamentos tipo depressivos em animais, de forma similar aos antidepressivos clássicos e atuam fortemente na redução da neuroinflamação e em alguns parâmetros de estresse oxidativo, que estão diretamente relacionado com a fisiopatologia dos transtornos depressivos.

Esse estudo vem ao encontro das preocupações da OMS, uma vez que considera o adoecimento mental, sobretudo a depressão, como uma das maiores causas de incapacitação e suicídio no mundo. Além disso, é observado que em diversas situações, por ser uma doença multifatorial, os tratamentos clássicos falham em reverter os quadros dessa doença. Dessa forma, faz-se necessário buscar alternativas terapêuticas e a *A. citriodora* mostrou-se como uma estratégia promissora.

Por fim, vale destacar a importância desse estudo não apenas no contexto da produção de novos conhecimentos, mas também pela valorização da ciência, das universidades do país e das parcerias entre diferentes instituições, que possibilitou, por exemplo, a realização destes experimentos, que evidenciaram resultados promissores.

9. REFERÊNCIAS

ABDERRAHIM, F.; ESTRELLA, S.; SUSI'N, C.; ARRIBAS, S. M.; GONZA'LEZ, M. C.; LUIS CONDEZO-HOYOS, L. The Antioxidant Activity and Thermal Stability of Lemon Verbena (*Aloysia triphylla*) Infusion. **Journal of Medicinal Food**. V. 14, n.5, p. 517-527, 2014.

ADZIC, M.; DJORDJEVIC, J.; DJORDJEVIC, A.; NECIFOROVIC, A.; DEMONACOS, C.; RADOJCIC, M.; DEMONACOS, M. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. **J Endocrinol.**, v. 202, 2009.

AMIN, B.; POURESHAGH, E.; HOSSEINZADEH, H. The Effect of Verbascoside in Neuropathic Pain Induced by Chronic Constriction Injury in Rats. **Phytother Res**. v. 30, n.1, p. 128-135, 2016.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. **Nature medicine**, v. 10, n. 7, p. S18-S25, 2004.

APÁTI, P.; KÉRY, Á.; HOUGHTON, P. J.; STEVENTON, G. B.; KITE, G. Efeito in vitro de flavonóides do extrato de *Solidago canadensis* na glutationa S-transferase. **Jornal de farmácia e farmacologia**, v. 58 (2), p. 251-256, 2006.

ARAUCHI, R.; HASHIOKA, S.; TSUCHIE, K.; MIYAOKA, T.; TSUMORI, T.; LIMOA, E.; AZIS, I. A.; OH-NISHI, A.; MIURA, S.; OTSUKI, K.; KANAYAMA, M.; IZUHARA, M.; NAGAHAMA, M.; KAWANO, K.; ARAKI, T.; LIAURY, K.; ABDULLAH, R. A.; WAKE, R.; HAYASHIDA, M.; INOUE, K.; HORIGUCHI, J. Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test. **Brain and Behavior**, v. 8, n. 8, p. e01028, ago. 2018.

AREIZA-MAZO, N.; ROBLES, J.; JAIRO A. ZAMUDIO-RODRIGUEZ, J. A.; GIRALDEZ, L.; ECHEVERRIA, V.; BARRERA-BAILON, B.; ALIEV, G.; SAHEBKAR, A.; ASHRAF, G. M.; BARRETO, G. E. Extracts of *Physalis peruviana* Protect Astrocytic Cells Under Oxidative Stress With Rotenone. **Front Chem.**, v. 6, 2018.

ARGUETA, L. A.; RODARTE, C. M. **Atlas De Las Plantas De La Medicina Tradicional Mexicana**: Instituto Nacional Indigenista, México, 1994.

AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal and Aromatics Plants Research Journals**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2015.

BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365-373, 2015.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem Anal.**, v. 32, 1987.

BHARAMSOLTANI, R.; ROSTAMIASRABADIC, P.; SHAHPIRIA, Z.; MARQUES, A. M.; RAHIMIA, R.; FARZAEIF, M. H. *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222 p. 34-51, 2018.

Bastos, Deborah H, Luciane A Saldanha, Rodrigo R Catharino, Alexandra Sawaya, Ildenize B Cunha, Patricia O Carvalho, and Marcos N Eberlin.. "Antioxidantes fenólicos identificados por ESI-MS de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e chá verde (*Camelia sinensis*)" **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. **N Engl J Med.**, v. 358, 2008.

BIRBEN, E; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. L. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ.**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BOING, A. F.; MELO, G. R.; BOING, A. C.; MORETTI-PIRES, R. O.; PERES, K. G.; PERES, M. A. Asociación entre depresión y enfermedades crónicas: un estudio poblacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p. 617-623, 2012.

CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; CHAVIGNON, O.; HEITZ, A.; WYLDE, R.; LAMAISON, J. L. Luteolin-7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. **Planta Médica**, v. 61, n. 5, 1995.

CARNAT, A.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 44-49, 1999.

CARVALHO, L. A.; BERGINK, V., SUMASKI, L.; WIJKHUIJS, J.; HOOGENDIJK, W. J.; BIRKENHAGER, T. K.; DREXHAGE, H. A. Inflammatory activation is associated with a reduced glucocorticoid receptor alpha/beta expression ratio in monocytes of inpatients with melancholic major depressive disorder. **Translational psychiatry**, v. 4 n.1, p. e344-e344, 2014.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci.**, v. 9, p. 46-56, 2008.

DAWSON, M. Y.; MICHALAK, E. E.; WARAICH, P.; ANDERSON, J. E.; LAM, R. W. Is remission of depressive symptoms in primary care a realistic goal? A meta-analysis. **BMC Family Practice**, v. 5 n(1), p. 1-6, 2004.

DASKALAKIS, N.; BAGOT, R. C.; PARKER, K. J.; CHRISTIAAN, H. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome, **Psychoneuroendocrinology.**, v. 38, n. 9, p. 1858-1873, 2013.

DE CARLO, V.; CALATI, R.; SERRETTI, A. Socio-demographic and clinical predictors of non-response/non-remission in treatment resistant depressed patients: A systematic review. **Psychiatry Res.**, v. 240, p. 421-430, 2016.

DINAN, T. G. Inflammatory markers in depression. **Curr Opin Psychiatry.**, v. 22, p. 32-36, 2009.

DJORDJEVIC, J.; DJORDJEVIC, A.; MIROSLAV ADZIC, M.; RADOJCIC, M. B. Chronic social isolation compromises the activity of both glutathione peroxidase and catalase in hippocampus of male Wistar rats. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 30, p. 93-700, 2010.

DJORDJEVIC, J.; DJORDJEVIC, A.; MIROSLAV ADZIC, M.; RADOJCIC, M. B. Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. **Neuropsychobiology.**, v. 66, n. 2, p. 112-119, 2012.

DUGO, P.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B.; MONDELLO, L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. **Journal of Chromatography A**, 1216(43), p. 7213-7221, 2009.

DOS SANTOS, A. C.; JUNIOR, G. B.; ZAGO, D. C.; ZEPPEFELD, C. C.; SILVAY, D, T.; HEINZMANNZ, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; CUNHA, M. A. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia e Analgesia**, v. 44, n. 1, p. 106-113, 2017.

DOWLATI, Y.; NATHAN HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E. K.; LANCTÔT, K. L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry.**, v. 67, n. 5, p. 446-457, 2010.

EKEANYANWU, R. C.; NJOKU, O. U. Flavonoid-rich fraction of the *Monodora tenuifolia* seed extract attenuates behavioural alterations and oxidative damage in forced-swim stressed rats. **Chin J Nat Med.**, v. 13, n. 3, p. 183-191, 2015.

ELECHEOSA, M. A. Essential oil chemotypes of *Aloysia citrodora* (Verbenaceae) in Northwestern Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 74, p. 19-29, 2017.

ESTERBAUER, H.; CHEESMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 407-421, 1990.

ERAM, S.; MALEKI, S. A.; MOTAMED, S. M.; MALEKI, M. A.; KHELIANY, H. H. Antidepressant activity of ethanolic extract, chloroform extract and aqueous extract of *Aloysia Triphylla* L. in the FST and in the TST in male mice. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 5, 2012.

FARIAS, K. S. SANTOS, T.S.N.; PAIVA, M.R.A.B.; ALMEIDA, S.M.L.; GUEDES P.T.; VIANNA, A.C.A; FAVARO, S.P.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays. **Rev bras plantas med.**, v. 15, n. 4, p. 520-528, 2013.

- FELGINES, C.; FRAISSE, D.; BESSON, C.; VASSON, M. P.; TEXIER, O. Bioavailability of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) polyphenols in rats: impact of colonic inflammation. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 10, p. 1773-1781, 2014.
- FREDDO, A. R.; MAZARO, S. M.; BORIN, M. S. R.; BUSSO, C.; POSSENTI, J. C.; CECHIN, F. E.; ZORZZI, I. C.; DALACOSTA, N. L. Redução no tombamento *Fusarium* sp. em plântulas de beterraba, pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *Aloysia citriodora* Palau. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 4, p. 453-459, 2016.
- GAŁECKI, P.; GAŁECKA, E.; MAES, M.; CHAMIELEC, M.; ORZECZOWSKA, A.; BOBIŃSKA, K.; SZEMRAJ, J. The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 138, p. 360-366 - 2012.
- GIRAULT, L.; FERREIRA, F.M.; VICENTE, A.M.S. IN: UNICEF - OPS e OMS (Ed.), Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) britton] grown in Portugal. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 73-78, 1987.
- GOMES, P. C. S.; FERREIRA, M. F.; VICENTE, A. M. S. Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain (*Aloysia triphylla* (L' Hérit) Briton) grown in Portugal. **Journal of Essencial Oil Research**, v. 17, n. 1, p. 73-78, 2005.
- GOMES, D. SERPA, PZ, MIORANDO, D., ZANATTA, MED, CARTERI, CS, SOMENSI, LB.; JUNIOR, W. A. INVOLVEMENT OF ANTI-INFLAMMATORY AND STRESS OXIDATIVE MARKERS IN THE Antidepressant-like Activity of *Aloysia citriodora* and Verbascoside on Mice with Bacterial Lipopolysaccharide- (LPS-) Induced Depression. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2022
- GOUFO, P.; SINGH, R. K.; CORTEZ, I. A reference list of phenolic compounds (including stilbenes) in grapevine (*Vitis vinifera* L.) roots, woods, canes, stems, and leaves. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 398, 2020.
- GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The Open Field Test. In T. D. Gould (Ed.), Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests. **Humana Press**. p. 1–20, 2009.
- GONÇALVES, A. M. C.; TEIXEIRA, M. T. B.; GAMA, J. R. D. A.; LOPES, C. S.; SILVA, G. A.; GAMARRA, C. J.; MACHADO, M. L. S. M. Prevalência de depressão e fatores associados em mulheres atendidas pela Estratégia de Saúde da Família. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, 67, p. 101-109, 2018.
- GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. S110-S118, 2004.
- GROLI, R. E; BERTOLLO, A. G.; BEHENCK, J. P.; ARAUJO B. L.; PLISSARI, M. E.; SOARES, S. J. B.; IGNÁCIO, Z. M. Quetiapine effect on depressive-like b

ehaviors, oxidative balance, and inflammation in serum of rats submitted to chronic stress. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, p. 1-11, 2023

GUPTA, J.; GUPTA, R.; VARSHNEY, K. K. Emerging mechanisms and potential antidepressant action of medicinal plants. **IJPSR**, v. 11, p. 1-13 2020.

HAN, J.; YE, M.; XU, M.; SUN, J.; WANG, B.; GUO, D. Caracterização de flavonoides na fitoterapia tradicional chinesa-Huangqin por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por ionização por eletrospray. **Journal of Chromatography B**. v. 848 (2), p. 355-362, 2007.

HARAGUCHI, A.; FUKUZAWA, M.; IWAMI, S.; NISHIMURA, Y.; MOTOHASHI, H.; TAHARA, Y.; SHIBATA, S. Night eating model shows time-specific depression-like behavior in the forced swimming test. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1081, 18 dez. 2018.

HERSEY, M.; SAMARANAYAKE, S.; BERGER, S. N.; TAVAKOLI, N.; MENA, S., NIJHOUT, H. F.; HASHEMI, P. Inflammation-induced histamine impairs the capacity of escitalopram to increase hippocampal extracellular serotonin. **Journal of Neuroscience**, v. 41(30), p 6564-6577, 2021.

HIRAI, K.; ALIEV, G.; NUNOMURA, A.; FUJIOKA, H.; RUSSELL, R. L.; ATWOOD, C. S. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. **J Neurosci**. v. 21, p., 3017–3023, 2001.

IBRAHIM, M. E.; MOHAMED, M. A.; KHALID, K. A. Effect of Growing Locations on the Essential Oil Content and Compositions of *Lemon Verbena* Shrubs under the Conditions of Egypt M.E. **Journal of Essential Oil**, v. 17, n. 2, p. 288-294, 2014.

IGNÁCIO, Z. M.; RE´US, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; QUEVEDO, J. Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: insights in depression. **Neuroscience**., v. 275, p. 455-468, 2014.

IGNÁCIO, Z. M.; RÉUS, G. Z.; ARENT, C. O.; ABELAIRA, H. M.; PITCHER, M. R.; QUEVEDO, J. New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. **Br J Clin Pharmacol**., v. 82, n. 5, p.1280-1290, 2016.

IGNÁCIO, Z. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Maternal Deprivation. In: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, **Elsevier**, 2017.

IGNACIO, Z. M.; CALIXTO, A. V.; DA SILVA, R. H.; QUEVEDO, J.; REUS, G. Z. The use of quetiapine in the treatment of major depressive disorder: Evidence from clinical and experimental studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 86, p. 36-50, 2018.

ISACCHI, B.; IACOPIA, R.; BERGONZIA, M. C.; GHELARDINIB, C.; GALEOTTIB, N.; NORCINIB, M.; VIVOLIB, E.; VINCIERIA, F. F.; BILIA, A. R. Antihyperalgesic

activity of verbascoside in two models of neuropathic pain. **Journal of Pharmaceutical and Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 594-601, 2011.

JÄGER, A. K.; KRYDSFELDT, K.; RASMUSSEN, H. B. Bioassay-guided isolation of apigenin with GABA benzodiazepine activity from *Tanacetum parthenium*. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 11, p. 1642-1644, 2009.

JÄGER, A. K.; SAABY, L. Flavonoids and the CNS. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1471-1485, 2011.

JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Bio Med.**, 1996.

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, S; GURPEGUI, M.; GARROTE-ROJAS, D.; GUTIÉRREZ-ROJAS, L.; CARRETERO, M. D.; CORRELL, C. U. Oxidative stress parameters and antioxidants in adults with unipolar or bipolar depression versus healthy controls: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, 2022.

JIMÉNEZ-FERRER, E.; SANTILLÁN-URQUIZAA, M. A.; ALEGRÍA-HERRERAA, E.; ZAMILPAA, A.; MERINO, C. N.; TORTORIELLO, J.; GARCÍA, V. N.; FLORES, M. A.; MATAB, M. F.; RUIZA, M. H. Anxiolytic effect of fatty acids and terpenes fraction from *Aloysia triphylla*: Serotonergic, GABAergic and glutamatergic implications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 320-327, 2017.

JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 2, p. 169-178, 2001.

KIMPTON, J. The brain derived neurotrophic factor and influences of stress in depression. **Psychiatr Danub.**, v. 24, n. 1, 2012.

KIM, H. Y.; LEE, H. J.; JHON, M.; KIM, J. W.; KANG, H. J.; LEE, J. Y.; KIM, J. M. Predictors of remission in acute and continuation treatment of depressive disorders. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 19(3), p. 490, 2021.

LARSEN, M. H.; MIKKELSEN, J. D.; SCHMIDT, A. H.; SANDI, C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **J Psychiatr Res.**, v. 44. p. 808-816, 2010.

LENOIR, L.; ZAKAYH, J. J.; TEXIER, O.; LAMAISON, J. L.; VASSOND, M. P.; FELGINESA, C. *Aloysia triphylla* infusion protects rats against dextran sulfate sodium-induced colonic damage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 7, p. 1570-1572. 2012.

LIJINA, P.; KUMAR, B. S. Diferenciação de planteose e rafinose usando espectrometria de massa em modo de íon negativo. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 487, p. 117027, 2023.

LIPPMANN, M.; BRESS, A.; NEMEROFF, C. B.; PLOTSKY, P. M.; MONTEGGIAL, L. M. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. **Eur J Neurosci.**, v. 25, n. 10, p. 3091-3098, 2007.

LIRA, P. D. L.; BARENA, C. M. V.; LO´PEZ, S.; MOLINAC, A.; HEIT, C.; VITURROC, C.; LAMPASONAD, M. P.; CATALA´ND, C. A.; BANDONI, A. Northwestern Argentina: A Center of Genetic Diversity of Lemon Verbena (*Aloysia citriodora* Palau, Verbenaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 2, p. 251-261, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, Plantarum: Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512 p., 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544 p., 2008.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 3a. Edição. São Paulo: Atheneu, 2014.

MAIA, E. A.; FRANCISCO, J. O uso de espécies vegetais para fins medicinais por duas comunidades de Serra Catarinense, Santa Catarina, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p. 54-74, 2001.

MAES, M.; KUBERA, M.; MIHAYLOVA, I.; GEFFARD, M.; GALECKI, P.; LEUNIS, J. C.; BERK, M. Increased autoimmune responses against auto-epitopes modified by oxidative and nitrosative damage in depression: Implications for the pathways to chronic depression and neuroprogression. **Journal of Affective Disorders**, v. 149, n. 1-3, p. 23-29, 2013.

MATCHKOV, V. V.; KRAVTSOVA, V. V, WIBORG, O.; AALKJAER, C.; BOUZINOVA, E. V. Chronic selective serotonin reuptake inhibition modulates endothelial dysfunction and oxidative state in rat chronic mild stress model of depression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 309, n. 8, p. 814-823, 2015.

MERÉTIKA, A. H. C.; PERONI, N.; HANAZAKI, N. Local knowledge of medicinal plants in threeartisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 386-394, 2010.

MIRZAIE, A.; HARVEY, B. H.; VILJOEN, F.; ELLIS, S. M.; BRINK, C. B. EVALUATION of chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxic and apoptotic effects of *Aloysia citrodora* extract on colon cancer cell line. **Tehran University of Medical Sciences**, v. 74, n. 3, p. 168-176, 2016.

MOHAMMED, A. M.; KHARDALI, I. A.; ORAIBY, M. E.; HAKAMI, A. F.; SHAHEEN, E. S.; AGEEL, I. M.; ABU-TAWHEEL, G. M. Anxiety, depression-like behaviors and biochemistry disorders induced by cannabis extract in female mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 11, p. 6097-6111, 2021.

MOKOENA, M. L. HARVEY, B. H.; VILJOEN, F.; ELLIS, S. M.; BRINK, C. B. Ozone exposure of Flinders Sensitive Line rats is a rodent translational model of

neurobiological oxidative stress with relevance for depression and antidepressant response. **Psychopharmacology** (Berl.), v. 232, n. 16, p. 2921-2938, 2015.

MOUIHATE, A. TLR4-mediated brain inflammation halts neurogenesis: impact of hormonal replacement therapy. **Frontiers in cellular neuroscience**, 8, 146, 2014.

MORA, S., DÍAZ-VÉLIZ, G., MILLÁN, R., LUNGENSTRASS, H., QUIRÓS, S., COTO-MORALES, T., & HELLIÓN-IBARROLA, M. C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82(2), p. 373-378, 2005.

MUNZER, A.; SACK, U.; MERGL, R.; SCHÖNHERR, J.; PETERSEIN, C.; BARTSCH, S.; KIRKBY, K. C.; BAUER, K.; HIMMERICH, H. Impact of antidepressants on cytokine production of depressed patients *in vitro*. **Toxins** (Basel), v. 5, n. 11, p. 2227-2240, 2013.

NAEEM, K., AL KURY, L. T., NASAR, F., ALATTAR, A., ALSHAMAN, R., SHAH, F. A. LI, S. Natural dietary supplement, carvacrol, alleviates LPS-induced oxidative stress, neurodegeneration, and depressive-like behaviors via the Nrf2/HO-1 pathway. **Journal of Inflammation Research**, v. 14, p. 1313 - 1329, 2021.

NEGRELLE, R. R. B.; TOMAZZONI, M. I.; CECCON, M. F.; VALENTE, T. P. Estudo etnobotânico junto à Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes: subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica de Saúde do Município de Cascavel (Paraná). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9(3), p. 6-22, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod.**, v. 79, 2016.

NOBIS, A.; ZALEWSKI, D.; WASZKIEWICZ, N. Peripheral Markers of Depression. **Journal of Clinical Medicine**, 2020.

OUKERROU, M.; TILAOU, M.; MOUSE, H. A.; LEOUIFOUDI, I.; JAAFARI, A.; ZYAD, A. Chemical Composition and Cytotoxic and Antibacterial Activities of the Essential Oil of *Aloysia citriodora* Palau Grown in Morocco. **Advances in Pharmacology Science**, 2017.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. **A normatização dos fitoterápicos no Brasil**. VISÃO ACADÊMICA., v. 7, n. 2, 2006.

ORTMANN, C. F.; ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; IGNÁCIO, Z. M.; CHAVES, V. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, P.; CARLESSI, A. S.; BRUCHCHEN, L.; DANIELSKI, L. G.; CARDOSO, S. G.; CAMPOS, A. M.; PETRONILHO, F.; REBELO, J.; MORAIS, M. O. S.; VUOLO, F.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. LC/QTOF profile and preliminary stability studies of an enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* Trécul leaves with potential antidepressant-like activity. **Biomed Chromatogr.**, v. 31, n. 11, p. 764-779, 2017.

PACHECO, N. R.; PINTO, N. C. C.; SILVA, J. M.; MENDES, R. F.; COSTA, J. C.; ARAGÃO, D. M. O.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. *Cecropiapachystachya*: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. **BioMed Res Int.**, v. 2014, 2014.

PARODI, T. V.; VARGAS, A. P. C.; KREWER, C.; FLORES, E. M. M.; BALDISSEOTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; OLIVEIRA, J. V.; POPIOLSKI, A. S.; MINOZZO, M. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L' Hérít) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2 p. 283-292, 2013.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, S. S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacognosy: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3 p. 201-214, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain**: stereotaxic coordinates. Academic, San Diego. 1986.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, dez. 1977.

PONCE-MONTER, H.; MARTINEZ, E. F.; ORTIZ, M. I.; MONTIEL, M. L. R.; ELIZALDE, D. C.; HERNANDEZ, N. P.; CORTÉS, R. C. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, n. 6, p. 309-319, 2010.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.**, v. 266(5604), 1977.

POTMANN, E.; NIGRO, M. M. L.; REIDES, C. G.; LESUY, S.; RICCO, R. A.; WAGNER, M. L.; GURNI, A. A.; CARBALLO, M. A. Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. **Int J Toxicol.**, v. 31(2), p. 192-202, 2012.

PRICE, R. B.; DUMAN, R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. **Molecular psychiatry**, v. 25, n. 3, p. 530-543, 2020.

PRINZ, M.; PRILLER, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 15, p. 300-312, 2014.

QUIRANTES-PINÉ, R. FUNES, L.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ, G. A. High performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. **Journal of Chromatography. A**, v. 1216, n. 28, p. 5391-5397, 2009.

RAGONE, M. I. SELLA, M.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M. G.; CONSOLINI, A. E. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedron) is

partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenums. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 258-266, 2007.

RAGONE, M. I. Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora*, Palau on mice and rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 79-86, 2010.

RASHID, H. A.; MAJUMDER, S.; MANDAL, V.; MANDAL, S. C.; THANDAVARAYAN, R. A. In search of suitable extraction technique for large scale commercial production of bioactive fraction for the treatment of diabetes: The case *Diospyros melanoxylon* Roxb. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 9, n. 2, p. 106-118, 2019.

RASHIDIAN, A.; FARHANG, F.; VAHEDI, H.; DEHPOUR, A. R.; MEHR, S. E.; MEHRZADI, S.; REZAYAT, S. M. Anticonvulsant Effects of *Lippia citriodora* (Verbenaceae) Leaves Ethanolic Extract in Mice: Role of GABAergic System. **Int. J. Prev. Med**, v. 7, n. 97, p. 1-7, 2016.

RAWDIN, B. J.; MELLON, S. H.; DHABHAR, F. S.; EPEL, E. S.; PUTERMAN, E.; SU, Y.; BURKE, H. M.; REUS, V. I.; ROSSER, R.; HAMILTON, S. P.; NELSON, J. C.; WOLKOWITZ, O. M. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. **Brain Behav Immun.**, v. 31, p. 143-152, 2013.

REUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; SANTOS, M. A. B.; CARLESSI, A.S.; TOMAZ, D.B.; NEOTTIA, M. V.; LIRANC, J. L. G; GUBERTB, C.; BARTH, M.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO J. Ketamine and imipramine in the 48 nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. **Behav Brain Res.**, v. 256, p. 451-456, 2013.

RÉUS, G. Z.; JANSEN, K.; TITUS, S.; CARVALHO, A. F.; GABBAY, V.; QUEVEDO, J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. **J Psychiatr Res.**, v. 68, p. 316-328, 2015.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

SANTOS, A. C. B. *et al.* Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 980-991, 2015.

SEO, M. K.; CHOI, C. M.; MCINTYRE, R. S.; CHO, H. Y.; LEE, C. H.; MANSUR, R. B.; LEE, Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. H.; PARK, S. W.; LEE1, J. G. Effects of escitalopram and paroxetine on mTORC1 signaling in the rat hippocampus under chronic restraint stress. **BMC Neurosci.**, v. 18, p. 1-10, 2017.

SETIAWAN, E.; WILSON, A. A.; MIZRAHI, R.; RUSJAN, P. M.; MILER, L.; RAJKOWSKA, G.; SURIDJAN, I.; KENNEDY, J. L.; REKKAS, V.; HOULE, S.; MEYER, J. H. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. **JAMA Psychiatry.**, v. 72, n. 3, p. 268-275, 2015.

SHAHZAD, N.; AHMAD, J.; KHAN, W.; AL-GHAMDI, S. S.; AIN, M. R.; IBRAHIM, A, A.; AKHTAR, M.; KHANAM, R. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 117, 2014.

SHAHHOUSEINI, R.; HOSSEINI, N.; GHORBANPOUR, M. Study of Essential Oil Content and Composition of Different Parts of Lemon verbena (*Lippia citriodora*) Grown in Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n.1, p. 120-125, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. R., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic- phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SKAL TSA, H.; SHAMMAS, G. Flavonoids from *Lippia citriodora*. **Plantas Medicinai s**, v. 54, n. 5, p. 465, 1988.

SLAVICH, GEORGE M.; IRWIN, MICHAEL R. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. **Psychological bulletin**, v. 140, n. 3, p. 774, 2014.

SLOLEY, B. D.; URICHUK, L. J.; MORLEY, P.; DURKIN, J.; SHAN, J.J.; P. K. T. PANG, P. K. T.; COUTTS, R. T. Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 451-459, 2000.

SOMANI, A.; SINGH, A. K.; GUPTA, B.; NAGARKOTI, S.; DALAL, P. K.; DIKSHIT, M. Oxidative and Nitrosative Stress in Major Depressive Disorder: A Case Control Study. **Brain Sciences**, 2022.

SOWA-KUĆMA, M.; STYCZEŃ, K.; SIWEK, M.; MISZTAK, P.; NOWAK, R. J.; DUDEK, D.; MAES, M. Lipid Peroxidation and Immune Biomarkers Are Associated with Major Depression and Its Phenotypes, Including Treatment-Resistant Depression and Melancholia. **Neurotoxicity Research**, v. 33, p. 448-460, 2018.

STRAWBRIDGE, R., ARNONE, D., DANESE, A., PAPADOPOULOS, A., VIVES, A. H., & CLEARE, A. J. Inflammation and clinical response to treatment in depression: a meta-analysis. **European Neuropsychopharmacology**, 25(10), p. 1532-1543, 2015.

STRAWBRIDGE, R.; JAMIESON, A.; HODSOLL, J.; FERRIER, I. N.; MCALLISTER-WILLIAMS, R. H.; POWELL, T. R.; WATSON, S. The Role of Inflammatory Proteins in Anti-Glucocorticoid Therapy for Treatment-Resistant Depression. **Journal of clinical medicine**, 10(4), 784, 2021.

SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, 1983.

TALAROWSKA, M.; SZEMRAJ, J.; GAŁECKI, P. Myeloperoxidase gene expression and cognitive functions in depression. **Advances in Medical Sciences**, 2015.

TAMMAR, S.; SALEM, N.; AIDI WANNES, W.; LIMAM, H.; BOURGOU, S.; FARES, N.; MSAADA, K. Chemometric Profiling and Bioactivity of Verbena (*Aloysia citrodora*) Methanolic Extract from Four Localities in Tunisia. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 1-16, 2021.

TUON, T.; MEIRELLES, S. S.; DE MOURA, A. B.; ROSA, T.; BORBA, L. A.; BOTELHO, M. E. M.; REUS, G. Z. Behavior and oxidative stress parameters in rats subjected to the animal's models induced by chronic mild stress and 6-hydroxydopamine. **Behavioural Brain Research**, v. 406, p. 113226, 2021.

VARGAS, J.; JUNCO, M.; GOMEZ, C.; LAJUD, N. Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. **LoS One.**, v. 11, n. 9, 2016.

VEISI, M.; SHAHIDI, S.; KOMAKI, A.; SARIHI, A. Assessment of aqueous extract of Lemon verbena on anxiety-like behavior in rats. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 6, n.1 37-39, 2015.

VIDAL-GUTIÉRREZ, M.; ROBLES-ZEPEDA, R.E; VILEGAS, W.; GONZALEZ-AGUILAR, G.A.; TORRES-MORENO, H.; LÓPEZ-ROMERO, J.C. Composição fenólica e atividade antioxidante de *Bursera microphylla* A. Gray. **Culturas e produtos industriais**, v. 152, p. 112412, 2020.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; DE STEIN, M. L.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; PALADINI, A. C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors ligand with anxiolytic effects. **Plantas Medicinai**s, v. 61, n. 3, p. 213-216, 1995.

VITAR, R. M. L.; REIDES, C. G.; FERREIRAAB, S. M.; LLESUY, S. F. The protective effect of *Aloysia triphylla* aqueous extracts against brain lipid-peroxidation. **Food & Function**, v. 3, n. 1, p. 557-563, 2014.

WAGNER; BLADT. **Plant drug analysis**. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WHO – World Health Organization 2013. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 – 2023**. Geneva: WHO, 2013.

WHO - World Health Organization 2017. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
WHO - World Health Organization 2013. Depressão, Folha Informativa. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao>; Acesso: 18/09/2021.

WILLIAMS, L. M.; DEBATTISTA, C.; DUCHEMIN, A. M.; SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression: data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression. **Transl Psychiatry**, v. 6, n. 5, p. e799-e799, 2016.

WOLKOWITZ, O. M.; WOLF, J.; SHELLY, W.; ROSSER, R.; BURKE, H. M.; LERNER, G. K.; REUS, V. I. R.; NELSON, J. C. N.; EPEL, E. S.; MELLON, S. H. Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1623-1630, 2011.

ZAMORANO-PONCE, E.; MORALES, C.; RAMOS, D.; SEPÚLVEDA, C.; CARES, S.; RIVERA, P.; FERNÁNDEZ, J.; CARBALLO, M. A. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 603, n. 2, p. 145-150, 2006.

ZENI, A. L. B.; ZOMKOWSKI, A. D. E.; MARASCHIN, M.; TASCA, C. I.; RODRIGUES, A. L. S. Evidence of the involvement of the monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Aloysia gratissima*. **Journal of Ethno-Farmacology**, v.148, n. 3, p. 914-920, 2013.

ZHANG, Y.; YUTING WANG, Y.; WANG, L.; BAI, M.; ZHANG, X.; ZHU, X. Dopamine Receptor D2 and Associated microRNAs Are Involved in Stress Susceptibility and Resistance to Escitalopram Treatment. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v. 18, n. 8, 2015.

ZUCOLOTTO, S.; Goulart, S.; Montanher, A. B.; Reginatto, F. H.; Schenkel, E. P.; Fröde, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glycosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Med.**, v. 75, n. 11, p. 1221-1226, 2009.

APÊNDICE A – Carta de aprovação da pesquisa pela CEUA da UNOCHAPECÓ

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “Efeito antidepressivo, ansiolítico e neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Aloysia citriodora* em animais submetidos a estresse na infância e na vida adulta”, protocolo nº005/CEUA/2021, sob a responsabilidade de Walter Antônio Roman Junior , que envolve a produção/ manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrada (exceto homem), para fins de ensino e pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de oito de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), em 29/07/2021.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/02/2022 à 30/09/2022
Espécie/Linhagem/Raça	Espécie: <i>Rattus norvegicus</i> ; Linhagem Wistar; Nome vulgar: Rato
Nº de animais	140
Peso/Idade	1 dia: 4-6 gramas; 50 dias: 200-250 gramas/ 1 e 50 dias

Sexo	Machos
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Comunitária da Região de Chapecó

Lilian C. Bohnen

Prof.ª Lilian Caroline Bohnen
Coordenadora da CEUA