

ODAIAS PEREIRA DE ALMEIDA FILHO

**Impacto do tratamento com óleo polpa de *Acromia aculeata* (bocaiúva) em camundongos submetidos a derrota social aguda: a modulação dos comportamentos relacionados à extinção da memória aversiva, comportamento do tipo ansioso e anedonia**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo  
2023

ODAIAS PEREIRA DE ALMEIDA FILHO

**Impacto do Tratamento com Óleo Polpa de *Acromia aculeata* (Bocaiúva) em Camundongos submetidos a derrota social aguda: A Modulação dos Comportamentos Relacionados à Extinção da Memória Aversiva, Comportamento do Tipo Ansioso e Anedonia**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Farmacologia  
Orientadora: Prof. Dra. Carolina Demarchi Munhoz  
Coorientadora: Dra. Susana Elisa Moreno

Versão Original

São Paulo  
2023



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do estresse agudo ou crônico por derrota social sobre o prejuízo de extinção de memória aversiva, ansiedade e neuroplasticidade no neurocircuito BLA-mPFC-hipocampo em camundongos.", protocolada sob o CEUA nº 3979091121, sob a responsabilidade de **Carolina Demarchi Munhoz** e equipe: **Guilomar Wiesel; Leonardo Santana Novaes; Letícia Morais Bueno de Camargo; Amadeu Shigueu de Almeida; Vitor Augusto Laurino Juliano; Lucas Luzia Sampaio; Luiza Helena Haías Covre; Cibele Canal Castro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 09/02/2022.

We certify that the proposal "Effects of acute or chronic social defeat stress on the impairment of aversive memory extinction, anxiety, and neuroplasticity in the BLA-mPFC-hippocampus neurocircuitry in mice.", utilizing 1678 isogenics mice (1588 males and 90 females), protocol number CEUA 3979091121, under the responsibility of **Carolina Demarchi Munhoz** and team: **Guilomar Wiesel; Leonardo Santana Novaes; Letícia Morais Bueno de Camargo; Amadeu Shigueu de Almeida; Vitor Augusto Laurino Juliano; Lucas Luzia Sampaio; Luiza Helena Haías Covre; Cibele Canal Castro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/09/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: 48 meses

Depto/Setor: Farmacologia

Origem: Biotério Central FMUSP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

Idade ou peso: 6 a 8 semanas

Linhagem: C57BL/6

N amostral: 1188

Origem: Biotério Central FMUSP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

Idade ou peso: 8 a 12 semanas

Linhagem: Swiss

N amostral: 400

Origem: Biotério Central FMUSP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Fêmeas

Idade ou peso: 6 a 8 semanas

Linhagem: C57BL/6

N amostral: 90

São Paulo, 10 de fevereiro de 2022

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira de Almeida Filho, Odaias

Impacto do tratamento com óleo polpa de *Acromia aculeata* (bocaiúva) em camundongos submetidos a derrota social aguda: a modulação dos comportamentos relacionados à extinção da memória aversiva, comportamento do tipo ansioso e anedonia / Odaias Pereira de Almeida Filho; orientadora Prof (a). Dra. Carolina Demarchi Munhoz; coorientadora Prof (a). Susana Elisa Moreno. -- São Paulo, 2023.

69 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Fitoterapia. 2. Comportamento. 3. Neurociência. I. Demarchi Munhoz, Prof (a). Dra. Carolina, orientadora. II. Elisa Moreno, Prof (a). Susana, coorientadora. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, a minha mãe, Mariluce Leão, que com certeza é meu exemplo de força, garra e dedicação. Ao meu pai, Odaias Almeida, que além de seu nome me deu amor, carinho e apoio para todos os planejamentos na minha vida. Sem vocês eu com certeza não teria psicológico o suficiente para insistir em continuar na pós graduação, obrigado por me apoiar em tudo e mesmo em meio a algumas dificuldades me fazerem acreditar que é possível e que eu não precisaria desistir.

Agradeço a minha maior confidente, Larissa Leão, minha irmã e porto seguro para todas as horas difíceis. Você me mostra que a vida pode ser levada com leveza e que paciência é fundamental.

A minha namorada, Isabelli Rocha, sem você não conseguiria me sustentar em meio ao caos que é minha mente, com você aprendi que amar é fácil e que eu posso alcançar tudo que eu almejo pois com você ao lado creio que a vida é alegre e feliz.

As matriarcas da família Luzia Goes e Ana Albuquerque, vocês são e foram mulheres incríveis, é uma honra fazer parte da família e ver nosso crescimento. Vó Ana, nossa senhora continua abrindo meus caminhos como a senhora prometeu. Continue olhando por mim. Vó Luzia, minha inspiração por entrar na neurociência, saiba que seu neto está dando os primeiros passos eu sei que a senhora sente orgulha.

Ao meu padrasto, Francisco Gomes, muito obrigado por me respeitar, me ajudar e incentivar. Olhar a sua alegria em me ver feliz e fazer a pessoa que eu mais amo feliz é muito bom.

A minha orientadora, Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz, muito obrigado por me acolher em seu grupo na fase que foi a mais difícil dentro dessa jornada, eu não acreditaria que conseguiria continuar dentro da pós graduação e a senhora me mostrou que a ciência não precisaria ser tão pesada. Obrigado por me ensinar que ciência pode ser leve e expandir meus conhecimentos dentro de uma área que eu gosto muito.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Susana Elisa Moreno, a senhora foi a primeira pessoa que me incentivou para o caminho da ciência quando eu ainda era um graduando, a insistência em me manter nos projetos, abrir o caminho para estudar neurociência durante meu trabalho de conclusão de curso foi um fator que me fez acreditar que viver de ciência era possível, o destino me fez voltar para a sua sala e novamente a senhora me ajudou, muito obrigado eu sou grato.

Ao laboratório de neuroendocrinofarmacologia e imunomodulação (LANEFI), muito obrigado Amadeu, Kairo, Robert, Laura, Thaynara, Lucas, Luiza, Guiomar, Vitor, João, Érica, Paloma, Leonardo sem vocês eu não conseguiria executar meu projeto, obrigado pela paciência que vocês tiveram comigo, obrigado pela amizade e pelo apoio, sou grato a cada um de vocês que me ajudaram direta ou indiretamente.

Ao laboratório de Farmacologia e Mutagênese, muito obrigado Mariana, Georges, Renata, Daniele, João, Ana Marcia. Gabriel, Ester, Juliana, Sarah por mais uma vez me abrigar e realizarem os experimentos comigo, em meio a correria e a preocupação eu encontrei um ambiente ameno com velhos amigos e soube que tudo daria certo.

A todos meus amigos que São Paulo me proporcionou, a ciência me fez conhecer não somente profissionais incríveis, mas também pessoas incríveis. Obrigado por todas as abstrações possíveis e imagináveis, eu saio dessa universidade uma pessoa completamente diferente que entrei e vocês foram fundamentais para esse processo. Obrigado Marti, Thiago, Geovana, Bianca, Isabela, Ísis, Victoria, Solon, Marcia, Branwdon

A todos meus antigos amigos, cada um de vocês me mantém alegre e positivo sobre a vida, a muito tempo eu ando instável e mesmo assim vocês se mantiveram ao meu lado, mesmos nas horas mais difíceis, fizeram eu acreditar nos meus sonhos e pensar que há muito para se viver. Muito obrigado Isabelle, Bianca, Gabriel, Paulo, João, Raul, Orlando, Juarez, Marla, Suellen, Mileny, Lincoln, Natlhália, Pedroca, Sofia, Daniele

As minhas companheiras de apê Natacha e Fernanda, vocês conseguiram fazer com que São Paulo fosse uma casa pra mim, me abrigaram e até hoje são responsáveis por tornar dias ruins em dias divertidos.

A toda minha família por mesmo distante me apoiarem e acreditarem em mim, apoio nunca é demais e hoje vejo isso na prática.

A minha psicóloga, Karine Gomes, em meios a turbulências no decorrer do mestrado me mostrou que posso conseguir os meus objetivos, que devo ser mais paciente e que com tratamento e apoio eu consigo viver uma boa vida.

Agradeço a todos o quadro de funcionário do ICB-USP. Um agradecimento especial a todo o quadro técnico dos laboratórios, vocês sempre me ajudaram e me explicaram minhas dúvidas com muita atenção, eu com certeza aprendi muito. Obrigado pela atenção e supervisão de todos os professores pelas matérias ministradas, e teço um agradecimento especial a secretária do departamento Mônica Nunes que sempre auxiliou

desde o início quando realizei a inscrição até os últimos passos para depósito da dissertação.

A FAPESP, pelo apoio financeiro, essencial para realização dessa pesquisa. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Por fim reitero que agradeço a todos que passaram na minha vida, viver de ciência era um sonho, hoje é a realidade, eu sei que é apenas o começo e desejo que essa realidade permaneça na minha vida por muito tempo, os planejamentos não foram como eu esperava, mas no final das contas foram melhores que poderia prever.

## RESUMO

Durante o cotidiano, estímulos estressantes podem levar a consequências como transtornos de humor e comportamento, como ansiedade e depressão. A organização mundial da saúde incentiva pesquisas sobre mecanismos neurobiológicos e intervenções farmacológicas para resolver a problemática. A fitoterapia, especialmente no Brasil, é uma opção promissora de estudo devido ao seu bioma rico e pouco explorado, bem como pela acessibilidade e baixo custo dos compostos derivados. Um exemplo de potencial fitoterápico é a *Acromia aculeata* devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Dessa forma, o trabalho possui como objetivo principal avaliar o efeito da administração aguda do óleo da polpa da bocaiuva (OPB) na modulação do comportamento do tipo ansioso, déficit de extinção de memória e anedonia, bem como alterações sobre o sistema antioxidante induzidos pelo estresse agudo de derrota social em camundongos C57bBl/6 machos. Para isso camundongos machos C57Bl/6 (n=40) foram alocados igualmente em quatro grupos distintos: um grupo não tratado, um grupo submetido a um protocolo de estresse agudo, um grupo tratado com óleo de polpa de *Acromia aculeata* (OPB) e um grupo exposto a tratamento e estresse com OPB. Os camundongos foram tratados durante três dias consecutivos com OPB (15mg/kg), via gavagem, e submetidos a um estresse agudo por derrota social (SD). 72 horas após a SD, os animais foram submetidos, nesta ordem, ao labirinto em cruz elevado, para medir o comportamento do tipo ansioso, condicionamento ao som e ao contexto para medir a aquisição, consolidação e extinção de memória aversiva e teste de respingo a sacarose (splash test) para medir anedonia. Amostras de sangue periférico foram obtidas em três momentos diferentes (basal, pós-tratamento e conclusão do protocolo – após os testes comportamentais) para analisar as populações de leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Além disso, foi avaliada a capacidade antioxidante do extrato no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais pelas metodologias de DPPH e ABTS, e verificação sobre o sistema antioxidante por meio da quantificação de glutathiona reduzida e peróxido de hidrogênio. Os dados coletados foram avaliados estatisticamente por meio do teste ANOVA de duas ou três vias, com um limite de significância definido em  $P < 0,05$ . A aprovação do projeto foi obtida junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (3979091121). Não foram observadas diferença estatística entre os grupos experimentais analisados em todos os testes comportamentais realizados, não foi observada diferença estatística sobre o sistema antioxidante in vitro. Além de não ser detectada toxicidade do tratamento quando avaliada os resultados sobre o sistema hematopoiético dos camundongos. Portanto é possível avaliar que o protocolo de estresse agudo de derrota social, o tratamento com o OPB e a interação dos fatores não é capaz de induzir comportamento do tipo ansioso, déficit da extinção de memória e anedonia e modulação do sistema antioxidante in vivo.

**Palavras chaves:** Fitoterapia, comportamento, neurociência

## ABSTRACT

During daily life, stressful stimuli can lead to consequences such as mood and behavior disorders, such as anxiety and depression. The World Health Organization encourages research on neurobiological mechanisms and pharmacological interventions to address this issue. Phytotherapy, especially in Brazil, is a promising option for study due to its rich and underexplored biome, as well as the accessibility and low cost of derived compounds. An example of potential phytotherapy is *Acromia aculeata* due to its anti-inflammatory and antioxidant properties. Thus, the main objective of this work is to evaluate the effect of acute administration of bocaiuva pulp oil (BPO) on the modulation of anxious behavior, memory extinction deficit, anhedonia, and changes in the antioxidant system induced by acute social defeat stress in male C57Bl/6 mice. For this purpose, male C57Bl/6 mice (n=40) were equally allocated into four distinct groups: an untreated group, a group subjected to acute stress protocol, a group treated with *Acromia aculeata* pulp oil (BPO), and a group exposed to both treatment and stress with BPO. The mice were treated for three consecutive days with BPO (15mg/kg), via gavage, and subjected to acute social defeat stress (SD). 72 hours after SD, the animals were subjected, in this order, to the elevated plus maze to measure anxious behavior, sound and context conditioning to measure the acquisition, consolidation, and extinction of aversive memory, and the splash test to measure anhedonia. Peripheral blood samples were obtained at three different times (baseline, post-treatment, and conclusion of the protocol – after behavioral tests) to analyze the populations of leukocytes, erythrocytes, and platelets. In addition, the antioxidant capacity of the extract in the hippocampus and prefrontal cortex of the animals was evaluated using the DPPH and ABTS methodologies, and the antioxidant system was assessed by quantifying reduced glutathione and hydrogen peroxide. The collected data were statistically evaluated using two- or three-way ANOVA, with a significance level set at  $P < 0.05$ . Project approval was obtained from the Animal Ethics Committee (3979091121). No statistically significant differences were observed among the experimental groups in all behavioral tests conducted, and no statistically significant differences were observed in the antioxidant system *in vitro*. Furthermore, no toxicity of the treatment was detected when evaluating the results on the hematopoietic system of the mice. Therefore, it is possible to conclude that the acute social defeat stress protocol, BPO treatment, and the interaction of these factors are not capable of inducing anxious behavior, memory extinction deficit, anhedonia, and modulation of the antioxidant system *in vivo*.

**Keywords:** Phytotherapy, behavior, neuroscience

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BLA	Complexo basolateral
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase 2
CRF	Hormônio liberador de corticotrofina
DS	Derrota social
DPPH	2,2-difenil-1picril-hidrazil
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
EO	Estresse oxidativo
GCs	Glicocorticoides
GluR1	Receptor do glutamato 1
GR	Receptores de glicocorticoides
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona reduzida
GPx	Glutathiona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPA	Eixo hipotálamo- hipófise- adrenal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IL-1	Interleucina 1
LCE	Labirinto em cruz elevado
Na/K ATPase	Bomba de sódio potássio ATPase
NLRP6	Receptores do tipo NOD contendo o domínio 6
NO	Óxido nítrico
PFC	Córtex pré-frontal
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OPB	Óleo polpa de bocaiuva
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
Splash	Teste de respingo a sacarose
TEPT	Transtorno de estresse pós traumático
TNB-GS	5-tio-2-nitrobenzoato de glutathiona
TrKB	Tirosina quinase B

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisão dos grupos experimentais a serem utilizados .....	29
Figura 2: Cronograma dos experimentos .....	30
Figura 3: Delineamento experimental.....	30
Tabela 1: Extinção específica no OPB.....	40
Tabela 2: Avaliação do ensaio fito químico utilizando o óleo polpa de bocaiuva ( <i>Acromia aculeata</i> ) .....	40
Figura 4: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação ao número de leucócitos, hemácias e plaquetas	42
Figura 5: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação ao número de leucócitos, hemácias e plaquetas. ....	44
Figura 6: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação a porcentagem de linfócitos, porcentagem de monócitos e porcentagem de granulócitos .....	46
Figura 9: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação ao comportamento de anedonia avaliado pelo teste comportamental de teste de respingo a sacarose (Splash), demonstrado pelo tempo de autolimpeza.....	52
Figura 10: Avaliação do efeito antioxidante do OPB por meio da análise da porcentagem de inibição do radical DPPH em relação ao controle positivo (trolox) e o OPB .....	53
Figura 11: Avaliação do efeito antioxidante do OPB por meio da análise da porcentagem de inibição do radical ABTS em relação ao controle positivo (trolox) e o OPB .....	54
Figura 12: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação à quantificação de peróxido de hidrogênio no hipocampo, no córtex pré frontal e a quantificação de glutathiona reduzida no hipocampo e no córtex pré-frontal.....	57

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/ REFERÊNCIAL TEÓRICO .....	12
1.1 Estresse .....	12
1.2 Implicações do estresse.....	14
1.3 Combate ao estresse.....	19
1.4 Fitoterapia .....	21
1.5 <i>Acromia aculeata</i> .....	24
2. Objetivo .....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27
3. METODOLOGIA .....	28
3.1 animais .....	28
3.2 Delineamento experimental .....	28
3.3 Estresse por derrota social (DS) .....	30
3.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE).....	31
3.3.2 Condicionamento de memória aversiva.....	32
3.3.3 Extinção de memória aversiva .....	32
3.3.4 Teste de respingo de sacarose (splash) .....	33
3.4 Eutanásia dos animais.....	33
3.5 Obtenção dos frutos de <i>a. aculeata</i> .....	33
3.6 Obtenção do óleo da polpa da bocaiuva (OPB) .....	34
3.7 Qualidade do óleo.....	34
3.7.1 Quantificação de Dienos e Trienos.....	34
3.8 Avaliação fitoquímica qualitativa.....	34
3.8.1 Ensaio para a identificação de terpenoides e esteroides .....	34
3.8.2 Ensaio para a identificação de flavonoides .....	35
3.8.3 Ensaio para a identificação de taninos .....	35
3.8.4 Ensaio para a identificação de cumarina.....	35
3.8.5 Ensaio para a identificação de saponinas .....	35
3.7.6 Ensaio para a identificação de glicosídeos.....	35
3.8 Hemograma .....	36
3.9 Ensaio antioxidantes.....	36
3.9.1 Sequestro do radical ABTS.....	36

3.9.2 Sequestro do radical DPPH .....	37
3.9.3 Extração proteica .....	37
3.9.4 Determinação da concentração de proteínas .....	38
3.9.5 Determinação de glutathiona reduzida (GSH) .....	38
3.9.6 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	39
3.12 Análise estatística .....	39
4 RESULTADOS .....	40
4.1 Análise da qualidade físico-química do OPB .....	40
4.2 Avaliação qualitativa de compostos existentes no óleo polpa de bocaiuva (Acromia aculeata) .....	40
4.3 O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiúva não são capazes de provocar mudanças sobre analitos hematopoiéticos .....	41
4.4 O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiuva não são capazes de modular o comportamento do tipo ansioso.....	47
4.5 O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiúva não são capazes de provocar mudanças sobre a extinção de memória aversiva.....	50
4.6 O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiúva não são capazes de provocar anedonia .....	52
4.7 Avaliação do efeito antioxidante .....	53
4.7.1 Sequestro do radical DPPH .....	53
4.7.2 Sequestro do radical ABTS .....	54
4.7.4 Correlação entre os ensaios antioxidantes de DDPH e ABTS .....	55
4.8 Derrota social e o tratamento com OPB não modulam o sistema oxidante no hipocampo e cortex pré-frontal .....	55
5. DISCUSSÃO .....	57
6. CONCLUSÃO .....	65
REFERÊNCIAS .....	66

## 1. INTRODUÇÃO/ REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 1.1 Estresse

Durante o cotidiano, os seres humanos são expostos a diversos estímulos que podem estar relacionados a diferentes contextos. Esses estímulos podem ser táteis, visuais, sonoros, olfativos e gustativos. É correto afirmar que ao ser apresentados a um ou a uma série de estímulos, o ser humano irá manifestar uma reação (Valenti et al., 2012).

A depender da intensidade, periodicidade e aplicação do estímulo, é possível gerar uma resposta danosa ao corpo humano. Quando isso ocorre, comumente o fator causal desse fenômeno é chamado estímulo estressor. O estresse pode ser entendido como qualquer alteração que leve a um quadro de desgaste físico, psicológico ou emocional, podendo ser compreendido também como a resposta do corpo frente a qualquer interferente que exija atenção ou ação (Monroe & Cummins, 2015a). O estresse também pode ser definido como uma desarmonia (cacostase ou alostase), contrabalanceado por respostas fisiológicas e comportamentais que visam manter e/ou reestabelecer a homeostase que foi ameaçada. Esse evento é chamado de resposta adaptativa ao estresse (Chrousos, 2009).

Durante a vida, todos os seres humanos vão ser expostos a estímulos que causem estresse. A ciência por meio do método científico busca entender os processos moleculares, celulares, teciduais, sistêmicos e comportamentais que ocorrem quando acontece a apresentação a um desses estímulos (Attia et al., 2022; Yun-Zi Liu, 2017).

Indivíduos que são expostos a ruídos com alta intensidade podem ter maior probabilidade ao desenvolvimento de quadros patológicos (K.-H. Chen et al., 2020; Hahad et al., 2019). Até mesmo a postura corporal incorreta ou que cause desconforto muscular no ambiente de trabalho está correlacionada ao aparecimento de certas doenças (BRATTIG et al., 2014). Dessa forma, é visível que o estresse pode modular radicalmente a vida dos seres humanos e nesse sentido podem modular o comportamento dos indivíduos (Cannizzaro et al., 2019).

O ser humano é um animal social e por esse motivo relações interpessoais ruins podem gerar estresse. Nesse cenário, diversos protocolos são desenvolvidos tentando mimetizar essas situações. A partir dessas metodologias é possível analisar o desenvolvimento de síndromes cognitivas e comportamentais, buscar compreender as modificações fisiológicas em um indivíduo exposto a essa situação, e, conseqüentemente, buscar intervenções para levar à melhoria de qualidade de vida para essa pessoa e promover a saúde (Cohen et al., 2016; Yu et al., 2007).

Os processos cognitivos envolvendo memória e transtornos como ansiedade e anedonia podem ser modulados por situações em que o indivíduo enfrentará durante a vida. Caso o ser humano seja exposto a situações que causem um impacto positivo ou negativo, irão acontecer modificações fisiológicas que podem gerar mudanças comportamentais, interferindo, dessa maneira, no estilo de vida do indivíduo (Lukasik et al., 2019).

Quando ocorre a apresentação de um estímulo estressor como um trauma, o corpo pode agir imediatamente realizando a liberação de monoaminas. Nesse cenário, os neurônios pertencentes aos núcleos hipotalâmicos ativam o sistema simpático, liberando assim adrenalina e noradrenalina pela medula da glândula suprarrenal (adrenal) (Eto et al., 2014). Ao mesmo tempo, ocorre estimulação do eixo hipotálamo- hipófise- adrenal (HPA) (Herman et al., 2016) . Os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o fator liberador de corticotrofina (CRF), que quando age na hipófise anterior promove a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH, por via porta-hipofisária, atua no córtex da glândula suprarrenal, promovendo, em alguns minutos, a secreção de corticosteroides (cortisol em seres humanos e corticosterona em murinos) (Aguilera, 1994; A. R. Ramos et al., 2016).

Os glicocorticoides são um grupo de moléculas utilizados amplamente na clínica como anti-inflamatórios clássicos; isso significa que a utilização dessa classe farmacêutica leva a uma diminuição do quadro inflamatório (Reul et al., 2015). Entretanto, em algumas áreas do sistema nervoso central (SNC) como o córtex frontal e o hipocampo, os glicocorticoides agem de maneira pró inflamatória (Munhoz et al., 2006, 2010). Por exemplo, o tratamento com glicocorticoide pode levar a uma superregulação de receptores do tipo NOD contendo o domínio 6 (NLRP6), receptores do tipo NOD, além de modular a expressão de quimiocinas e receptores de células T, que são moléculas que podem estar associadas ao processo pró inflamatório (Sun et al., 2013).

Além disso, o estresse crônico pode modular negativamente a ativação da Na/K ATPase, levando a um aumento do estresse oxidativo sem induzir morte neuronal. Ademais, foi demonstrado que a inibição de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) ou de ciclooxigenase 2 (COX-2) foi responsável por prevenir a peroxidação lipídica e a perda da atividade da bomba de sódio potássio ATPase (Na/K ATPase) (Gamble-George et al., 2016; Hovatta et al., 2005; Novaes, dos Santos, Dragunas, et al., 2018; Novaes, dos Santos, Perfetto, et al., 2018). Além disso, o aumento da liberação dos glicocorticoides

também está associado ao desenvolvimento de ansiedade e do déficit de extinção da memória aversiva em humanos e roedores (Maren, 2022).

Como já mencionado, ao presenciar um estímulo estressor, o animal (murino ou humano) tem ativação em ondas de marcadores de estresse ligados aos sistemas monoamiérgicos e a secreção de corticosteroides (de Quervain et al., 2019). Esses eventos podem ser correlacionados à ativação de vias que geram inflamação e estresse oxidativo, que pode ter início após ativação de células pertencentes ao sistema nervoso como as micróglias (Naim et al., 2015). Esse tipo celular, que atuam defendendo o SNC frente a estímulo danosos, pode expressar receptores para glicocorticoides e mineralocorticoide e dessa forma podem modular a regulação do eixo HPA. Podem também alterar expressão de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1). Além disso, as micróglias são capazes de sintetizar cisteína, precursor da glutathione (GSH), importante agente antioxidante. Assim, o estresse pode estar relacionado a quadros inflamatórios e oxidantes que podem modular negativamente processos cognitivos como memória, ansiedade e anedonia (Vilhardt et al., 2016; Xu et al., 2016).

## 1.2 Implicações do estresse

A vida moderna expõe diariamente os seres humanos a uma quantidade imensurável de informações e estímulos. Essa exposição exacerbada, considerada um agente estressor para alguns indivíduos, provoca alterações neuroendócrinas e comportamentais, como já pontuado. Entretanto, não são todos os estímulos que podem ser considerados um estímulo estressor; para isso, ele precisa exceder a capacidade do indivíduo de mudar e se adaptar (Mariotti, 2015a).

Como visto, o estresse pode atuar de diversas maneiras no corpo humano e a resposta biológica frente a ele varia de acordo com o tipo de estímulo, sua intensidade e periodicidade. O estímulo estressor pode ser aplicado de maneira única ou com uma quantidade pequena de apresentações. Quando isso ocorre, é dito que ocorreu um estresse agudo. Quando esse estímulo é repetido por um grande período, é dito que ocorreu um estresse prolongado ou crônico (Yaribeygi et al., 2017).

Os estresses agudo e crônico podem desencadear diversas alterações de caráter fisiológico que podem se transformar em patologias, síndromes e conseqüentemente impactar negativamente a vida dos indivíduos (Mariotti, 2015b). Os estímulos estressores e suas respectivas respostas podem estar associados a alterações do sistema imunológico,

levando ao seu comprometimento e a promoção da síntese de células imunológicas disfuncionais (Bains & Sharkey, 2022). Podem também estar associados ao comprometimento da função cognitiva, modulando positivamente comportamentos relacionados à ansiedade, levando à piora do sono, aumentando a distração e prejudicando os sistemas de memória (Han et al., 2020; Kasimay Cakir et al., 2017; Naim et al., 2015; Narita-Ohtaki et al., 2018). Além disso, podem modular a nocicepção e também vias inflamatórias, dessa forma auxiliando o prognóstico negativo de doenças como dor crônica e doenças com caráter inflamatório como o lúpus eritematoso (Jolly & Katz, 2022; Lindfors et al., 2017; Timmers et al., 2019).

No SNC, o estresse age de maneira diferente em diferentes estruturas. Por exemplo, no hipocampo e regiões do córtex frontal, o estresse pode gerar atrofia dendrítica, reduzir estruturas celulares e diminuir a densidade neuronal, levando a uma redução do volume da estrutura (Lucassen et al., 2014). Já em núcleos amigdalares, como o complexo basolateral (BLA), o estresse tem ações contrárias, gerando uma hipertrofia dendrítica e hiperatividade desta região (Mitra et al., 2005; Novaes, dos Santos, Perfetto, et al., 2018). O estresse ocupacional de longo prazo pode levar à atrofia dos glânglios da base e reduzir a massa cinzenta no córtex pré-frontal (PFC). Esses efeitos são observados tanto em roedores quanto em humanos. Ao examinar o cérebro de pessoas submetidas a estresse crônico foi possível notar que as alterações morfológicas observadas são equiparadas a pacientes portadores de transtorno depressivos, associando dessa forma o estresse à patogênese desses transtornos (Blix et al., 2013).

O estresse psicológico pode induzir a resposta imunológica que está comumente relacionada a resposta frente a patógenos e a danos teciduais, levando aumento das concentrações de citocinas circundantes e de células de defesa como linfócitos (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005). De fato, existe uma interligação da resposta estressora e o sistema imunológico a partir da perspectiva evolutiva. O cérebro decodifica o estímulo estressor como um perigo iminente e por isso ativa mecanismos fisiológicos que permitem a proteção de danos e conseqüentemente restauração da homeostase (Maier & Watkins, 1998).

A resposta neuroimunológica frente ao estresse é bidirecional, uma vez que ativação do sistema imune e a produção de citocinas leva o corpo a liberar hormônios envolvidos na resposta ao estresse, como os glicocorticoides (GCs). Concentrações permanentes e anormais de citocinas e mediadores químicos relacionados ao estresse no cérebro podem levar dano ao parênquima, que pode evoluir para a morte de neurônios e

células da glia, contribuindo dessa maneira para mudanças estruturais no cérebro, predispondo ao aparecimento ou piora de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, além dos transtornos de humor, como a depressão e transtornos de ansiedade e de estresse, como o de estresse pós-traumático (Gu et al., 2012; Mariotti, 2015c).

O estresse pode, ainda, levar à modulação de células hematopoiéticas pela liberação da noradrenalina pelas fibras neuronais simpáticas que atuam nos vasos sanguíneos localizados na medula óssea. Essa catecolamina atua sobre as células tronco mesenquimais, levando a diminuição da quimiocina CXCL12, aumentando a proliferação de células tronco hematopoiéticas e mobilização de leucócitos na corrente sanguínea (Heidt et al., 2014). Vem sendo observado que o estresse ocupacional em seres humanos gera aumento dos leucócitos circundantes, levando assim a sustentação do argumento que o estresse provoca a manutenção da reação inflamatória mediada por alterações neuroimunológicas (Mariotti, 2015b).

O estresse pode ainda modular processos mnemônicos, podendo ter efeitos diversos na memória humana, prejudicando os processos de evocação e consolidação de memória, principalmente aversivas. Crianças em idade escolar expostas a estresse crônico demonstraram prejuízo no aprendizado de novas tarefas e relataram sintomas de ansiedade e anedonia (Valizadeh et al., 2012; Vanaelst et al., 2012).

Em termos moleculares, o estresse pode contribuir positivamente para o aumento do estresse oxidativo, uma vez que aumenta a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS). É bem estabelecido que a ativação dos receptores de glicocorticoides (GR) por seus ligantes leva ao dano oxidativo neuronal, aumentando a concentração de glutamato e cálcio e diminuindo a concentração de enzimas com caráter antioxidante (Joergensen et al., 2011; McIntosh & Sapolsky, 1996).

A exposição ao estresse também é associada a uma piora do sono. Pacientes portadores de estresse pós traumático relatam piora da qualidade do sono, presença de pesadelos e dificuldade da manutenção do sono. Durante o sono, a atividade neuronal e processos como o metabolismo da glicose são reduzidos para que ocorra um efeito antioxidante no corpo. Com esse processo prejudicado, existe a possibilidade de um maior estresse oxidativo no indivíduo e, conseqüentemente, o aparecimento de doenças (Al Jowf et al., 2022). Finalmente, é possível que ao modular sistema de oxidação, o estresse esteja ligado indiretamente à genotoxicidade, podendo dessa maneira interferir em

processos de expressão proteica e de reparo a danos do DNA e, conseqüentemente, envolvido na patogênese de doenças (García-Medina et al., 2017).

Como já mencionado, o estresse agudo ou crônico pode interferir em diversos processos bioquímicos e metabólicos, sendo um deles a modulação negativa do sistema antioxidante, levando ao estresse oxidativo (EO), que pode aumentar a peroxidação lipídica no cérebro. Esse evento pode estar ligado à morte de células neuronais e ao comprometimento de diversas funções cognitivas (Méndez-Armenta et al., 2014; Poh Loh et al., 2006)

O EO pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorre nas células e/ou tecidos, e a capacidade de um sistema biológico desintoxicar os produtos reativos. Esse mecanismo pode levar à interrupção da sinalização redox e de controle a dano molecular (Sies, 2020).

As ROS são geradas a partir de subprodutos do metabolismo do oxigênio e desempenham diversas funções nos sistemas biológicos como fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição, processos de diferenciação celular. Fatores estressores ambientais (radiação ultravioleta, ionizantes, poluentes) e xenobióticos (compostos químicos exógenos a um sistema biológico) podem levar ao aumento da produção de ROS, gerando um dano (estresse oxidativo) (Pizzino et al., 2017).

AS ROS são classificadas como uma classe de moléculas altamente reativas que derivam do oxigênio e podem se expressar em radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $HO^-$ ), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), e espécies não radicais, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Filomeni et al., 2015a; Jones, 2008a; Teleanu et al., 2022a)

O processo de geração de ROS pode causar efeitos nocivos a estruturas celulares importantes como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e está envolvido na patogênese ou progressão de diversas doenças, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e que afetam o SNC como Alzheimer e esquizofrenia (Taniyama & Griendling, 2003; Wu et al., 2013).

Devido à alta intensidade do metabolismo oxidativo, o cérebro é um tecido associado a uma alta taxa de estresse oxidativo. Estima-se que 90% das necessidades energéticas do cérebro são fornecidas por processos aeróbicos. A participação de radicais livres na neuro regulação, a capacidade de mediadores e hormônios gerarem ROS, e o importante teor de lipídios insaturados no tecido neural são fatores que colaboram para

maior estresse oxidativo (Bourre et al., 1993; Ermakov et al., 2021; Lohr & Browning, 1995; Shibuki & Okada, 1991).

Animais que tem maior ativação de glutathione redutase 1 e glioxalase 1 apresentam maior fenótipo relacionados ao comportamento do tipo ansioso (Hovatta et al., 2005). Além disso, o EO gerado pela quinurenina, metabólico do aminoácido triptofano, pode estar relacionado à diminuição da síntese do neurotransmissor serotonina e esse mecanismo pode estar correlacionado ao comportamento de anedonia (Stanton et al., 2019).

O EO pode também estar envolvido em processos de memória. Camundongos idosos apresentam dano oxidativo em lipídeos e DNA no hipocampo e no córtex cerebral e apresentam déficit cognitivo quando submetidos ao protocolo de reconhecimento objetos e memória associada ao medo (NAGAI et al., 2003). O EO aumenta com o decorrer da vida e camundongos idosos apresentam retenção de memória prejudicada devido à apoptose induzido pelo EO na região CA1 do hipocampo (Fukui et al., 2006).

A alteração nos sistemas oxidantes pode afetar a expressão gênica, conformação proteica e a sinalização celular. Esses eventos podem levar à modificação da neurotransmissão e da função neuronal associadas a patologias e síndromes que afetam o comportamento (Delattre, 2005; Lebel & Bondy, 1991; Valko et al., 2007).

Para combater os danos oxidativos, as células possuem um sistema de defesa composto por dois sistemas: um sistema enzimático e um sistema não enzimático. O sistema enzimático é predominantemente constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). Por sua vez, o sistema não enzimático é composto por substâncias como a vitamina C, glutathione reduzida (GSH), vitamina E, entre outras (Filomeni et al., 2015b; Islam, 2016; Teleanu et al., 2022b).

A GPx é uma enzima dependente de selênio e sua ação antioxidante está intrinsicamente relacionada com as vias de EO. Essa molécula é pertencente a família das peroxidases e utiliza a glutathione reduzida (GSH) como cofator para catalisar a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos em água. A GSH, nessa reação catalisada pela GPX, serve como doador de elétrons para reduzir  $H_2O_2$  à oxigênio e água. A enzima GPx é regulada pelo estado redox da glutathione. A glutathione redutase faz o processo de regeneração da GSH que é um processo essencial para manter a atividade da GPx.

Tendo em sua constituição os aminoácidos cisteína, glicina e ácido glutâmico, sendo classificado como um tripeptídeo, o GSH é uma molécula cuja principal função é doar elétrons aos EROS com intuito de neutralizá-los e dessa maneira impedir os danos celulares. Essa molécula desempenha um papel como cofator essencial para enzimas envolvidas no metabolismo de desintoxicação celular e na regeneração de agentes antioxidantes como o ácido ascórbico (vitamina C) e o tocoferol (vitamina E). Ao observar pacientes portadores de doenças neurodegenerativas e em modelos animais de neuroinflamação, foi possível verificar uma redução da concentração de GSH, mostrando que essa molécula exerce importante papel na ação de antioxidante no cérebro (Ballatori et al., 2009; Filomeni et al., 2015b; Islam, 2016; Teleanu et al., 2022b).

A catalase é uma enzima que exerce função essencial no processo antioxidante. Essa molécula é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Ela desempenha função importante em tecidos que a produzem e níveis elevados de peróxido como o fígado (Nelson & Porter, 2023). A catalase está localizada principalmente nos peroxissomos, mas também pode ser encontrada em mitocôndrias e membrana plasmática.

A GPx e catalase atuam de maneira a garantir a eliminação ou redução de peróxido a concentrações baixas para que essas não causem EO e conseqüentemente danos celulares (Jones, 2008a; Teleanu et al., 2022b) (Jones, 2008b; Teleanu et al., 2022b).

### 1.3 Combate ao estresse

Existem diversas maneiras de diminuir os efeitos gerados pelo estresse e essas intervenções são importantes para promover a saúde e impedir a progressão ou aparecimento de doenças relacionadas a ele. Como visto anteriormente, o estresse é natural e ocorre de maneira cotidiana nos seres humanos, entretanto alguns estímulos podem gerar o aparecimento ou progressão de certos quadros patológicos, demandando, assim, intervenções terapêuticas, farmacológicas ou não (Smyth et al., 2020; Worthen & Cash, 2021).

A depender do estímulo estressor e da resposta do indivíduo, é preciso uma intervenção terapêutica para que a homeostase seja reestabelecida, os comportamentos restaurados e, conseqüentemente, a saúde do indivíduo. Isso pode ser feito de diversas maneiras (Worthen & Cash, 2021).

A primeira intervenção a ser realizada é a não-farmacológica, sem a utilização de medicamentos, onde se busca a mudança no estilo de vida, modificações na dieta, realizações de atividades físicas regulares (Smyth et al., 2020). Entretanto, em certos casos, é preciso lançar mão da farmacologia para reestabelecer a saúde do indivíduo e isso pode ser feito utilizando medicamentos, como os fitoterápicos (Esch & Stefano, 2010). Neste sentido, diversos grupos de pesquisa buscam descobrir moléculas e compostos eficazes a promover saúde em indivíduos que foram submetidos a estímulos estressores. A fitoterapia, por meio do tratamento com compostos naturais advindos de plantas, pode reestabelecer comportamentos prejudicados e fazer com que indivíduos estressados possam seguir normalmente com suas respectivas vidas (Can et al., 2020).

A depender da geolocalização e do tempo, nas plantas é possível encontrar diversos compostos que possuem diferentes atividades biológicas, sendo alguns deles capazes de modular vias de sinalização relacionadas a processos oxidativos e inflamatórios, que estão alteradas quando um indivíduo é apresentado a um estímulo estressor. Assim, o tratamento fitoterápico apresenta-se como uma terapia eficaz frente ao estresse (Kure et al., 2017; Rodríguez-Yoldi, 2021).

Diversas classes químicas que compõem os extratos vegetais podem ser eficazes frente ao estresse. Uma delas são os compostos fenólicos, que possuem atividade biológica e são amplamente utilizados nas pesquisas científicas que visam, além de entender seu mecanismo de ação, desenvolver intervenções terapêuticas para tratar e melhorar prognósticos de quadros patológicos (Albuquerque et al., 2021). Nas plantas, os compostos fenólicos estão relacionados à defesa frente a agentes bacterianos e fúngicos, entretanto eles podem incorporar substâncias atrativas para acelerar a polinização, coloração para camuflagem e defesas contra herbívoros (Acamovic & Brooker, 2005; Alasalvar et al., 2001; Edreva et al., 2007). Esses compostos possuem em sua composição um anel aromático e carregam um ou mais radical hidroxila (Velderrain-Rodríguez et al., 2014a). Outros compostos como os polifenóis (por exemplo, os flavonoides), taninos e ácidos fenólicos (por exemplo, o ácido gálico) podem estar envolvidos em mecanismo antioxidantes, diminuindo o risco de síndrome metabólica e até mesmo melhorando quadros patológicos, como a diabetes e quadros inflamatórios nos rins e no cérebro (Iwai et al., 2006; Velderrain-Rodríguez et al., 2014b).

A ingestão de alimentos e insumos que possuem flavonoides está relacionada à diminuição de biomarcadores associados à inflamação, como as citocinas IL-6, IL-1b e TNF $\alpha$ , e a enzima ciclooxigenase-2. Esse grupo de moléculas parece inibir a ativação de

vias inflamatórias como as da MAPK, AP-1 e ativação do fator de transcrição NFκB (Al-Khayri et al., 2022). Os flavonoides podem ainda estabilizar a concentração do fator de transcrição Nrf-2 (fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2), reduzindo o estresse oxidativo e melhorando a disfunção mitocondrial. Eles podem, também, se ligar ao sítio de ação da adenosina trifosfato (ATP) da enzima PI3K (fosfatidil-inositol 3-quinase), inibindo sua atividade, ativando assim vias de sobrevivência celular. Por fim, esses compostos podem ativar a enzima AKT/ proteína quinase B, modulando positivamente a sobrevivência celular em neurônios corticais (Uddin et al., 2020).

Visto as vias bioquímicas que podem ser moduladas perante o tratamento com compostos derivados de plantas, essa área de conhecimento merece ser amplamente estudada, sendo necessário investigar os seus efeitos em diversos quadros patológicos. O estresse, como visto anteriormente, é capaz de gerar alteração em vias inflamatórias, oxidativas e proliferativas e, conseqüentemente, são necessárias pesquisas para entender seus efeitos, visando intervenções terapêuticas que melhorem a qualidade de vida do indivíduo. Assim a fitoterapia se mostra uma excelente opção nesse cenário.

#### 1.4 Fitoterapia

Produtos naturais referem-se a um amplo e diversificado grupo de substâncias de origem animal ou vegetal que incluem desde extratos a compostos isolados. Atualmente, vem crescendo o interesse para investigar os efeitos que esses compostos possuem e uma vasta gama de linhas científicas se abre com intuito de compreender mais sobre a dinâmica desses produtos (Harvey et al., 2015).

A utilização de plantas ou parte delas (flor, folha, caule, raiz), conhecida como fitoterapia, ganha destaque no cenário mundial devido a sua maior acessibilidade e baixo custo.

A fitoterapia pode ser definida como uma disciplina médica que permite o correto uso de plantas e/ou derivados (fitoterápicos ou fitomedicamento) utilizados com o objetivo de prevenção ou cura para tratar ou prevenir doenças humanas e animais (Firenzuoli et al., 2005; Yasmin et al., 2020).

Os fitoterápicos são medicamentos que possuem origem vegetal e apresentam ação terapêutica, gerando, portanto, diversas respostas fisiológicas no organismo. Os componentes responsáveis pelas atividades farmacológicas são as diferentes concentrações e natureza de compostos químicos presente no vegetal, e, como já

mencionado, a depender da geolocalização e estação do ano, os ativos farmacológicos podem se modificar e dessa forma estarem relacionados a diferentes atividades biológicas (Tlili et al., 2019).

A utilização de plantas para fins medicinais é uma das práticas mais antigas do mundo. Formas independentes de cura utilizando plantas foram desenvolvidas em diferentes partes do mundo. São exemplos a *Ayurveda* na Índia, a medicina Kampo no Japão e a medicina tradicional chinesa (MTC) (L. Zhang et al., 2012). Cerca de 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional para combater distúrbios e doenças leves (King & Homsy, 1997). É possível observar uma preocupação maior em se ter uma alimentação adequada e balanceada, incluindo ervas aromáticas e condimentadas, como exemplo o gengibre e o alho, que parecem possuir ação anti-inflamatória e antioxidante (Mashhadi et al., 2013).

O início do século XIX, marcado pela descoberta da morfina, serviu como o começo da busca racional de compostos ativos em plantas (Hamilton & BAskett, 2000; Joo, 2014). Durante a década de 1930 ocorreu a mudança da pesquisa com extratos brutos e produtos naturais parcialmente purificados para compostos puros (Joo, 2014). Entretanto durante os séculos XX e XXI, o campo de pesquisa utilizando a química avançou muito rápido, de forma que os compostos sintéticos ganhassem visibilidade para o desenvolvimento de drogas, ocorrendo, assim, uma perda de interesse nessa área de pesquisa. No entanto, a diversidade química limitada de compostos sintéticos levou a menos aprovações de medicamentos, o que promoveu um retorno a pesquisa de medicamentos baseado em produtos naturais (Joo, 2014; Zhu et al., 2012). Portanto a fitoterapia se desenvolveu principalmente de duas maneiras: a primeira baseada no empirismo transmitido por meio de conhecimento popular por meio da cultura e o segundo, utilizando princípios cientificamente verificáveis (Heidt et al., 2014).

De acordo com Newman e Cragg (2020), um terço dos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), EUA, entre 1981 a 2014 foram baseados em produtos naturais. A utilização do conhecimento popular como fonte para encontrar novos compostos ativos foi essencial para esse processo.

A fitoterapia moderna e racional não é uma medicina alternativa, mas sim utiliza do método científico para encontrar produtos que sejam biologicamente ativos e causem efeitos farmacológicos utilizando metodologias previamente padronizadas (Colalto, 2017; Zimmermann-Klemd et al., 2022).

O tratamento utilizando fitoterápicos usualmente é percebido como natural e consequentemente inofensivo, entretanto a utilização desses compostos pode levar ao aparecimento de efeitos adversos e a interação com terapias convencionais pode gerar riscos, como a diminuição da eficiência da terapia convencional (Zimmermann-Klemd et al., 2022).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos de maneira a comprovar os efeitos biológicos de ativos pertencentes a plantas, como a *Achillea millefolium*, popularmente conhecida como mil-folhas ou erva de carpinteiro e comumente utilizada na medicina tradicional europeia e asiática para o tratamento de úlceras diabéticas, cortes e feridas (Benedek & Kopp, 2007). A *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, pode ser utilizada para doenças de caráter epitelial e cicatrização devida às suas propriedades anti-inflamatórias (Hekmatpou et al., 2019). *Ilex paraguariensis*, a erva-mate, demonstrou atividade imunomoduladora e anti-inflamatória (Vitale et al., 2022).

Além das ações sistêmicas, os fitoterápicos podem atuar sobre o SNC e modificar alguns comportamentos relacionados às doenças neurológicas. Estudos mostraram que o extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* L., o alecrim, modula os comportamentos de aprendizado e memória nos testes de reconhecimento social e esQUIVA INIBITÓRIA (Zanella et al., 2012). O extrato hidroalcoólico *Eryngium planum* L. (eríngio) modula comportamento de memória de longo prazo, além de diminuir as concentrações de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase no cortex pré-frontal e hipocampo, regiões que podem estar relacionados aos comportamentos de memória (Ozarowski et al., 2015).

O extrato hidroalcoólico da flor de *Abelmoschus manihot* (Linn.), o hibisco, age também modulando a memória e aprendizado nos testes de reconhecimento de objeto novo e esQUIVA INIBITÓRIA, aumentando a concentração do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), da enzima tirosina quinase B (TrKB) e do receptor do glutamato 1 (GluR1). (Zhou et al., 2020). Além desses, a camomila, o maracujá e o açafreão são relacionados à mitigação da ansiedade e de sintomas depressivos, apresentando um perfil favorável quando comparados com tratamentos convencionais (Ozarowski et al., 2015).

A partir desses produtos podem também serem utilizados óleos naturais advindos de plantas, e esses são relacionados ao tratamento de ansiedade e de sintomas depressivos devidos aos compostos bioativos presentes em sua composição. Os óleos advindos de *Jasminum sambac* (L.) Ait. (jasmim árabe) e *Citrus aurantium* L. (laranja da terra), são eficazes no tratamento de quadros de ansiedade (Tan et al., 2023; N. Zhang & Yao, 2019).

O Brasil, devido a sua grande extensão territorial e biomas extremamente diversos, possui um potencial grande para abrigar diversas plantas com eficácia farmacológica. A região centro-oeste destaca-se nesse cenário ao abrigar dois biomas e o desenvolvimento intenso de pesquisas utilizando a bioprospecção. Nesse contexto, um vegetal que ganha notoriedade é a *Acromia aculeata*, conhecida popularmente como bocaiuva (Mazzari & Prieto, 2014; Palhares et al., 2021).

### 1.5 *Acromia aculeata*

*Acromia aculeata* pertence a um gênero de palmeiras encontrada nos trópicos. Trata-se de plantas que suportam diversas condições climáticas como baixas temperaturas e escassez temporária de água (Nunes et al., 2018a).

A bocaiuva é uma planta utilizada usualmente para o setor culinário e industrial, entretanto as suas propriedades terapêuticas são pouco conhecidas (Duarte et al., 2022). A *Acromia aculeata* pode oferecer dois tipos de óleo, o óleo polpa de bocaiúva (OPB), que é utilizado para a indústria de cosméticos e como biodiesel e o óleo de amêndoa, considerado mais nobre, que é destinado a culinária (Aristone F. & Leme F.M, 2006; César et al., 2015).

Devido à sua popularidade e às diversas atividades biológicas, o OPB é um composto que vêm sendo alvo de diversos estudos atuais (Raspe et al., 2013). Em sua composição química encontram-se doze ácidos graxos, a maioria insaturados, sendo o ácido oleico o mais abundante (72%), seguido por 16% de ácido palmítico (COSTA et al., 2020; Tilahun et al., 2019). A polpa da bocaiuva possui uma boa qualidade nutricional contendo cerca de 1,7% de minerais totais, 17% de lipídeos, 2% de proteínas, 22,8% de carboidratos totais, 13,76% de fibra e valor energético estimado em 167,67 Kcal/100g de polpa úmida. As amêndoas apresentam alto teor lipídico (51,7%), proteínas em torno de 17,6% e 15,8% de fibras (Hiane et al., 2006). É encontrada uma concentração robusta de carotenoides, como o  $\beta$ -caroteno, além de altos teores de tocoferóis, cobre, zinco e potássio (Coimbra & Jorge, 2011; M. I. L. Ramos et al., 2007).

O OPB atrai interesse biotecnológico uma vez que possui diversas atividades biológicas (Lescano, Oliveira, et al., 2015a). Entretanto é necessária a execução de projetos de pesquisas para analisá-las, uma vez que o produto carece de estudos para verificar a sua correta funcionalidade (Kittang et al., 2014). Além disso, justifica-se a utilização do OPB como alvo de pesquisa pela sua alta composição por compostos

antioxidantes como flavonoides, carotenoides e tocoferois. Dentre os ácidos graxos que compõem o OPB, os ácidos linoleico e oleico ganham destaque (Hiane et al., 2006). Essa composição química é de grande interesse por parte da sociedade que busca a melhora da saúde ao substituir a gordura de origem animal na alimentação (Coimbra & Jorge, 2011).

Dados científicos demonstraram que a utilização do OPB pode ser benéfica para o ser humano e que sua atividade biológica pode agir de maneira positiva sobre órgãos como coração e fígado (Magosso et al., 2016). Foi mostrado que o OPB pode levar a redução de fatores de risco para doença coronariana, uma vez que promove a melhora do perfil lipídico, inibição da oxidação de lipídios e DNA, diminuição da resistência à insulina e inflamação (Calder, 2017; Gillingham et al., 2011). Ainda, a *Acromia aculeata* possui propriedade anti-inflamatória (COSTA et al., 2020a), antimicrobiana, antitumoral (Candida et al., 2014), antígenotóxica (César et al., 2015). Além disso, pode influenciar na microbiota humana e impedir processos infecciosos (Monteiro-Alfredo et al., 2021).

O tratamento com *Acromia aculeata* pode inibir a migração de leucócitos para o foco inflamatório e essa ação é, possivelmente, mediada por compostos fenólicos e ácidos graxos, que são capazes de reduzir mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico (Ventre et al., 2017; Wiktorowska-Owczarek et al., 2015), bem como a produção de radicais livres por macrófagos (Guidoni et al., 2019; Zadeh-Ardabili & Rad, 2019). Também foi demonstrado que o OPB contém altas concentrações de compostos antioxidantes como os carotenoides (Araujo Sousa et al., 2021; Lescano, Oliveira, et al., 2015a; Sanjinez-Argandoña & Chuba, 2011) e  $\alpha$ -tocoferol (Coimbra & Jorge, 2011). O  $\beta$ -caroteno pode ser capaz de suprimir a liberação de citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  pela inibição das vias de sinalização NF $\kappa$ B, JAK2/STAT3 e JNK/p38 MAPK em macrófagos (Li et al., 2019).

Além de seus efeitos anti-inflamatórios, foi demonstrado que o OPB possui efeito antígenotóxico, sendo capaz de prevenir a ocorrência de danos ao DNA (César et al., 2015; COSTA et al., 2020a). A literatura científica demonstra que a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno pode proteger o DNA contra danos oxidativos, sugerindo assim uma ação antimutagênica. Esses projetos apoiam a ideia de que óleos vegetais, ricos nestes antioxidantes podem ter propriedades antimutagênicas (Anter et al., 2010).

O tratamento com *Acromia aculeata* pode ser capaz de aumentar os níveis de sirtuínas 1 (Sirt1), uma família de proteínas envolvidas em ações antioxidantes do organismo e equilíbrio redox. Essa proteína está também localizada no citoplasma, local em que pode interagir com a ERK, uma MAPK, que possui papel importante na

homeostase celular, atuando frente ao estresse oxidativo e a respostas proliferativas (Becatti et al., 2014; Hara et al., 1994; Monteiro-Alfredo et al., 2021; Munck & Náray-Fejes-Tóth, 1994). O tratamento com *Acromia aculeata* pode ativar, ainda, a sinalização Sirt1/Nrf2 garantindo ação antioxidante, pois Nrf2 é um fator de transcrição crucial envolvido nos mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo (Li et al., 2019; Peña-Oyarzun et al., 2018).

Trabalhos científicos demonstram que o extrato aquoso de *Acromia aculeata* é capaz de induzir uma baixa toxicidade, fator importante uma vez que diversos compostos derivados de plantas podem ser tóxicos em concentrações baixas (Monteiro-Alfredo et al., 2021; Zulfiqar et al., 2019). Por isso a baixa toxicidade aliada a um baixo custo e à abundância natural suportam a justificativa do uso desta planta, abrindo caminhos para o estudo de possíveis mecanismo protetores e que garantam uma qualidade de vida aos indivíduos que realizarem o tratamento com esse fitoterápico (Monteiro-Alfredo et al., 2021).

Apesar de muito promissor, existe uma escassez de estudos utilizando a *Acromia aculeata* com finalidade de entender sua ação no sistema nervoso central e como ela se comporta como intervenção terapêutica frente quadros de doenças que afetam a cognição e o comportamento (Baque et al., 2016). Entretanto devido às suas propriedades biológicas, fica evidente que é necessário adentrar nesse caminho desconhecido, uma vez que as atividades terapêuticas da *Acromia aculeata* suportam a ideia de que seu uso como prevenção ou até mesmo tratamento seria eficaz em modular quadros que envolvem transtornos cognitivos e comportamentais (Duarte et al., 2022).

Assim, este trabalho torna-se de extrema importância uma vez que investiga o uso de produtos naturais brasileiros como potenciais fármacos preventivos de transtornos sociais. Para dimensionar o impacto disso, um estudo realizado em 2012, na área metropolitana de São Paulo, observou que 44,8% dos entrevistados apresentavam ao menos um tipo de transtorno psíquico ao longo da sua vida, sendo os transtornos de ansiedade a classe mais prevalente (28,1%), seguida dos transtornos de humor (19,1%), transtornos por uso de substâncias (11,0%) e transtornos de controle de impulso (8,4%). O transtorno de estresse pós traumático (TEPT) representou cerca de 3,2% dos indivíduos (Andrade et al., 2012; Viana & Andrade, 2012). Estima-se, ainda, que no ano de 2020, o transtorno de ansiedade apresentou uma prevalência global de 298 milhões de pessoas, que foi agravado pela pandemia de COVID-19, aumentando para 374 milhões, um acréscimo de 76,2 milhões de indivíduos (aproximadamente 25,6% do total de pessoas)

(Santomauro et al., 2021). Outros estudos também relataram aumento desses transtornos em decorrência da pandemia de COVID-19 causada pelo novo coronavírus (Cénat et al., 2021; R. Chen et al., 2021; Cooke et al., 2020; d’Ettorre et al., 2021; Di Tella et al., 2020) podendo esses transtornos se tornarem um problema ainda mais grave no futuro.

Desta maneira, nossa hipótese é que o tratamento com o óleo polpa de *Acromia aculeata* (bocaiuva) em camundongos C57Bl/6 atenuar os efeitos do estresse por derrota social na indução do déficit de extinção da memória aversiva devido às atividades antioxidantes e anti-inflamatórias do extrato vegetal. Dessa forma, nosso trabalho poderá contribuir não apenas para um maior entendimento do espectro de função do óleo polpa de bocaiuva, mas também poderá fornecer uma alternativa terapêutica de baixo custo e fácil obtenção que pode ser utilizada, inclusive como suplemento alimentar, para a prevenção ou tratamento das consequências aversivas que a exposição ao estresse causa nos indivíduos.

## **2. Objetivo**

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração aguda do óleo da polpa da bocaiuva (OPB) na modulação do comportamento do tipo ansioso, déficit de extinção de memória e anedonia, bem como alterações sobre o sistema antioxidante induzidos pelo estresse agudo de derrota social em camundongos C57bBl/6 machos.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar o perfil fitoquímico qualitativo do OPB;
- 2) Analisar o controle de qualidade do OPB pela quantificação de dienos, trienos e peróxido
- 3) Avaliar o efeito da administração do OPB em camundongos submetidos ao protocolo de derrota social pelos ensaios de comportamento do tipo ansioso, pelo teste comportamental de labirinto em cruz elevado;
- 4) Avaliar o efeito da administração do OPB em camundongos submetidos ao protocolo de derrota social pelos ensaios de extinção de memória aversiva, pelo teste comportamental de condicionamento ao som e contexto;

5) Avaliar o efeito da administração do OPB em camundongos submetidos ao protocolo de derrota social pelo ensaio de anedonia, pelo teste comportamental do respingo de sacarose (*splash test*);

6. Avaliar o potencial antioxidante do OPB, pelas metodologias de DPPH, ABTS, pela mensuração de peróxido de hidrogênio e glutatona reduzida;

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 animais**

Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BL/6 (6 a 8 semanas de idade) (“agredidos”) e 7 camundongos machos da linhagem Swiss (3 a 6 meses de idade) (“agressores”) – provenientes do Biotério de Produção de Camundongos SPF da Faculdade de Medicina - Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo e do biotério do departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), respectivamente. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia – Unidade II e utilizados de acordo com certificado aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA nº 3979091121) e com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Após sua chegada, os C57BL/6 foram acondicionados em grupos de cinco em gaiolas ventiladas de polisulfona/polieterimida (com medidas de 32 cm X 20 cm X 21 cm; Alesco Indústria e Comércio Ltda.) e os Swiss acondicionados um por caixa dada sua agressividade, necessária para o protocolo de derrota social (DS). Ambas as linhagens foram mantidas sob ciclo claro-escuro de 12 horas (luz acesa às 6h30), com controle de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e água e ração ofertadas ad libitum. Os animais ficaram em habituação durante 7 dias antes de serem submetidos aos experimentos esquematizados no delineamento experimental (Figuras 2 e 3). Todos os experimentos foram conduzidos de forma a reduzir ao máximo o sofrimento e o número de animais utilizados e continuarão sendo planejados com o exigido cuidado.

#### **3.2 Delineamento experimental**

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais contendo um mesmo número de indivíduos (n=10) (figura 1). Os grupos foram: CltND- Camundongos não tratados com o OPB foram submetidos ao protocolo de derrota social; CltD- Camundongos não tratados com o OPB submetidos ao protocolo de derrota social; TND-

Camundongos tratados com o OPB não submetidos ao protocolo de derrota social; TD- Camundongos tratados com o OPB submetidos ao protocolo de derrota social. O tratamento dos animais para o projeto em questão foi feito por meio de gavagem utilizando a concentração de 50mg/kg, o tratamento foi feito durante três (3) dias consecutivos.

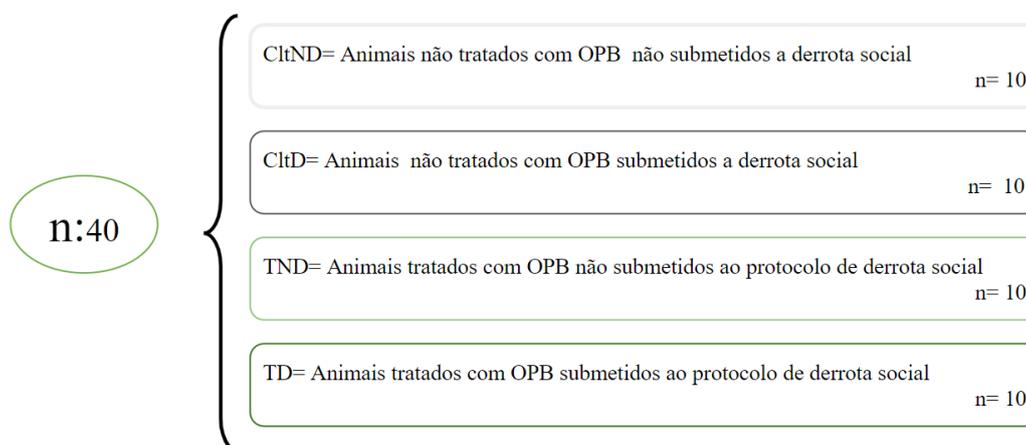


Figura 1: Divisão dos grupos experimentais a serem utilizados. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Todos os testes comportamentais foram conduzidos em salas de experimentação apropriadas (nas dependências do laboratório e no Biotério do Departamento de Farmacologia - Unidade I, ICB/USP) entre 09h e 14h com temperatura entre  $22 \pm 2$  °C. Todos os testes comportamentais foram gravados com o auxílio de uma webcam (Logitech C920 HD Pro) suspensa sobre os aparatos em questão.

Conforme esquematizado na Figura 2 e 3, após sete dias de aclimação, no dia 8 a 10, os animais dos grupos tratados receberam o tratamento de OPB por gavagem. Nos dias 11 a 13, os animais pertencentes ao grupo estressados foram submetidos ao protocolo de derrota social, no dia 14 os animais foram submetidos ao protocolo de labirinto em cruz elevado, após duas horas iniciou o protocolo do teste de extinção de memória realizado até o dia 16, no dia 17 foi executado o protocolo de teste de respingo a sacarose (Splash). Após essa etapa, metade dos animais foram eutanasiados utilizando o anestésico inalatório isoflurano e as regiões encefálicas de interesse (cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal, hipocampo) foram coletadas, e metade dos animais foram perfundidos utilizando formol 9% e o encéfalo foi coletado.

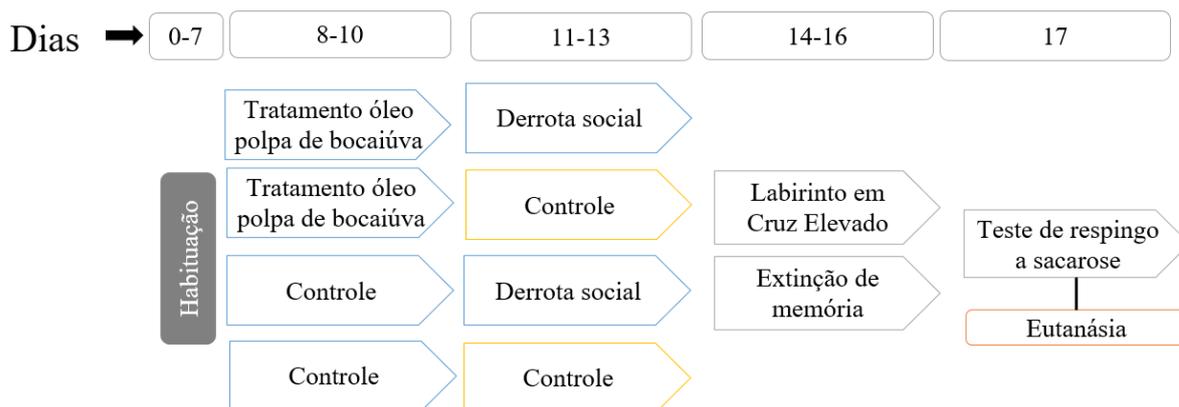


Figura 2: Cronograma dos experimentos. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

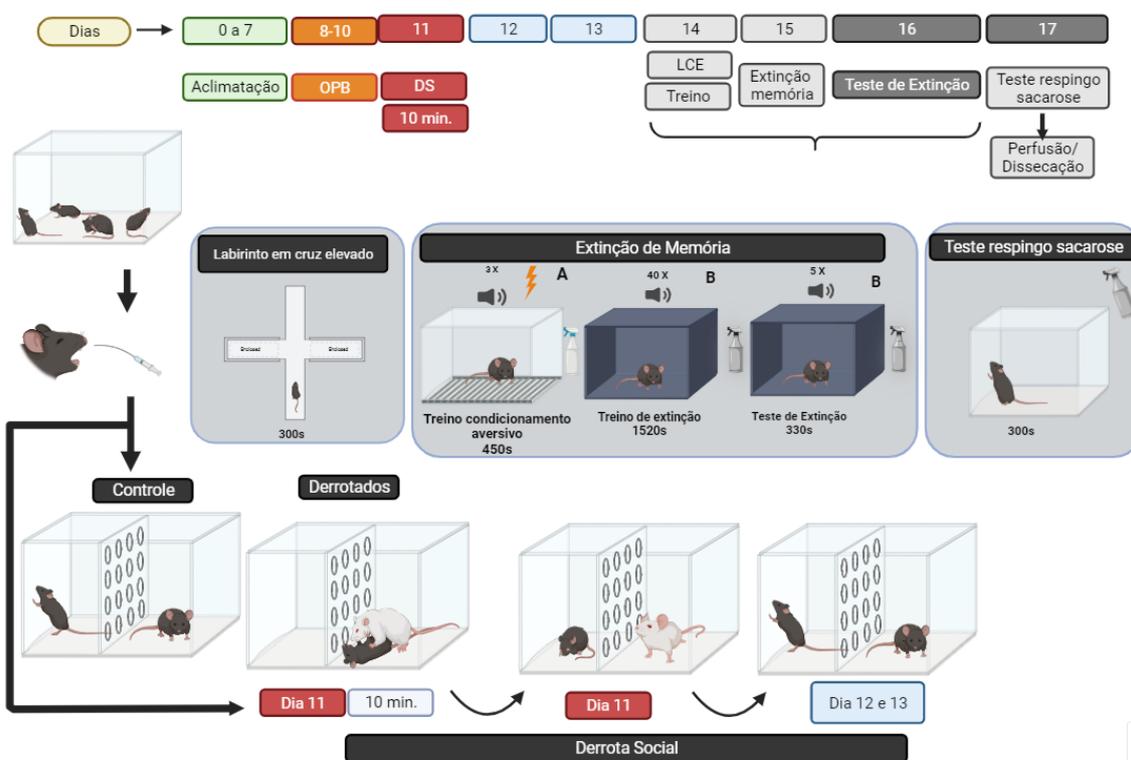


Figura 3: Delineamento experimental. Fonte: Elaborado pelo próprio autor

### 3.3 Estresse por derrota social (DS)

Um dia antes do início do protocolo de derrota social, foram inseridos divisores de acrílico transparente perfurados nas caixas dos agressores (Swiss) de maneira que metade da caixa ficasse vazia e a outra metade ocupada com o agressor residente. Após 24 horas, foi iniciado o protocolo de derrota social descrito a seguir. Em cada sessão, os camundongos C57BL/6, pertencentes ao grupo estressado (1DS: 1 derrota), foram colocados no compartimento do agressor, que esteve presente, por 10 minutos. Em

seguida, os C57BL/6 foram transferidos para a repartição vazia dessa mesma caixa em que o estresse ocorreu, na qual permaneceram por 24 horas. Cada C57BL/6 do grupo foi individualmente exposto a um único agressor. Finalizado o protocolo de estresse, os animais dos grupos estressados foram transferidos para suas caixas moradias originais (2 animais/caixa; as caixas foram divididas por animais pertencentes ao mesmo grupo), também divididas pelo mesmo divisor de acrílico transparente perfurado citado acima (1 camundongo por compartimento), até sua eutanásia. Em cada sessão de derrota, caso o primeiro embate entre agressor e agredido não ocorreu em cinco minutos, a dupla de animais foi trocada. Todos os animais foram observados continuamente durante todo o estresse de forma a garantir a saúde física de ambos.

Embora a ocorrência de ferimentos nesse protocolo seja rara, quando observada, o animal agredido foi isolado e devidamente cuidado. O isolamento físico por meio das divisórias de acrílico após os protocolos de derrota ocorreu a fim de garantir que não houvesse um efeito protetor causado pelo suporte social, o que poderia ocorrer caso os animais retornassem juntos para a mesma caixa. Por fim, os grupos CltND e TND também foram colocados em caixas divididas (2 animais/caixa), onde permaneceram até sua eutanásia. No caso dos grupos CltND e TND, a divisão das caixas foi necessária para garantir que o efeito comportamental observado nos grupos estressados não decorreu do isolamento físico.

### 3.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um aparato de madeira com tinta fosca, composto por dois braços abertos (5 cm x 20 cm, sem paredes) e dois braços fechados (5 cm x 20 cm, com paredes de 20 cm de altura), ambos dispostos em posições opostas em forma de “X”, com um espaço central de (10 cm x 10 cm) e suspenso a 40 cm do chão. A luminosidade utilizada foi de 8 lux nos braços fechados e 22 lux nos braços abertos. Cada animal foi introduzido individualmente no centro do labirinto com total acesso para explorá-lo durante 5 minutos (300s). Os parâmetros analisados foram: número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados. A permanência das quatro patas foi o critério adotado para considerar a presença do animal em cada compartimento. O resultado foi mensurado a partir das filmagens utilizando o software de análise comportamental MABA (<https://github.com/JuarezCulau/MABA/tree/main>).

### 3.3.2 Condicionamento de memória aversiva

Nesta etapa foi realizado o condicionamento de medo/memória aversiva clássico, porém com pareamento de som (adaptado de Izquierdo et al., 2006). Para esta etapa do “treino”, foi utilizada uma caixa de condicionamento (Arena A) (28 cm x 26 cm x 23 cm) (localizada na sala A), composta por quatro paredes brancas, tampa de acrílico transparente e uma base formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica dispostas em orientação linear (diâmetro de 0,4 cm e espaçamento entre elas de 1,05 cm), conectadas a um gerador de choque elétrico (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, SP). Os camundongos permaneceram durante dois (2) minutos (120 segundos) em habituação na caixa de contexto (localizada na sala A), limpa entre cada animal com uma solução 79.5% água/19.5% álcool/1% essência de baunilha (Dr. Oetker). Logo em seguida, receberam 3 pareamentos de som [estímulo condicionado (EC): 3 kHz, 80 dB, 30 segundos cada] com 1 choque nas patas [estímulo incondicionado (EI): 0.6 mA, apresentado nos últimos 2 segundos de cada som]. Esses 3 pareamentos foram intervalados por 60 segundos. Cento e vinte segundos após o último pareamento EC + EI, os animais foram reconduzidos à suas respectivas gaiolas-moradia.

### 3.3.3 Extinção de memória aversiva

Decorridas 24 e 48 horas (dias 15 e 16), os animais foram colocados na arena B (localizada em uma sala B) na qual ocorreu o protocolo de extinção – caixa (22,5 cm x 19,5 cm x 27 cm), com uma parede cônica de coloração preta, assoalho recoberto com papel auto adesivo branco e limpo com álcool 50% antes e após cada animal, de forma que o único padrão presente tanto no “Treino” como na “Extinção” foi o som. Cada uma das duas sessões de extinção foi composta por 120 segundos de habituação, após a qual o EC presente no treino foi apresentado 40 vezes (com intervalos de 5 segundos entre cada um deles), sem a presença do EI. Por fim, após 24 horas (dia 16), foi realizado o teste de extinção [idêntico aos primeiros 4 minutos e 55 segundos (5 tons) dos dois dias anteriores] para confirmar a consolidação da extinção. Caso a porcentagem de freezing apresentada foi maior que se comparada ao do dia anterior, o animal ainda possui um comportamento de aversão ao contexto, significando que a memória aversiva não foi extinta. O resultado foi mensurado a partir das filmagens utilizando o software de análise comportamental MABA (<https://github.com/JuarezCulau/MABA/tree/main>).

### 3.3.4 Teste de respingo de sacarose (splash)

O *Splash* foi realizado para avaliar a anedonia e o comportamento do tipo depressivo de camundongos. O comportamento de aliciamento indica sintomas depressivos medidos pelo tempo em segundos. Quanto menor o tempo de comportamento de limpeza, maior o nível de depressão. O teste foi realizado pulverizando uma solução de sacarose a 10% na superfície dorsal do corpo do roedor, e o comportamento de limpeza foi medido em termos de lambar, morder ou arranhar o pelo para limpar a solução. O tempo de preparação foi filmado por cinco (5) minutos (300 segundos), a análise dos vídeos foi feita de forma manual. O resultado foi mensurado a partir das filmagens utilizando o software de análise comportamental MABA (<https://github.com/JuarezCulau/MABA/tree/main>).

### 3.4 Eutanásia dos animais

Todos os animais foram profundamente anestesiados com isoflurano e, em seguida, a eutanásia foi realizada de acordo com as análises moleculares pretendidas em cada experimento, por perfusão transcardíaca ou decapitação. A perfusão transcardíaca foi realizada com bomba peristáltica (Cole Parmer), com 100 ml de salina 0,9% seguida por 150 ml de para formaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) a 4 °C durante 12 minutos. Os encéfalos foram cuidadosamente removidos da caixa craniana, mantidos em pós-fixação com PFA durante 24 horas e depois em solução de sacarose 30% em tampão fosfato (0,1 M), a 4 °C, por uma semana, quando então foram congelados a -80 °C para processamento. Estes encéfalos foram seccionados, em plano coronal, a 40 µm de espessura no criostato a -25 °C (Leica CM 1850; Leica Biosystems) e armazenados em solução criopreservadora a -20 °C. Este foi o protocolo adotado para os encéfalos utilizados para imuno-histoquímica.

### 3.5 Obtenção dos frutos de *a. aculeata*

Os frutos maduros foram coletados na região de Campo Grande/MS, durante os meses de outubro a dezembro. Após a coleta os frutos foram higienizados e despolpados por processo mecânico. A polpa foi colocada em estufa com circulação de ar a 60°C para secagem por 24 horas, em seguida foi submetida ao processo de extração do óleo.

### 3. 6 Obtenção do óleo da polpa da bocaiuva (OPB)

O óleo da polpa da bocaiuva (OPB) foi extraído em extrator Soxhlet por solvente Hexano. O solvente foi removido em rotaevaporador a 40°C, conforme descrito por Costa e colaboradores (2021).

### 3.7 Qualidade do óleo

#### 3.7.1 Quantificação de Dienos e Trienos

Para controle de qualidade do OPB, foi mensurado a concentração de Dienos e Trienos. A determinação da extinção específica (determinação de dienos e trienos) do óleo polpa de bocaiuva foi realizada pelo método espectrofotométrico dos óleos e gorduras, conforme a metodologia do Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (2008). Pesou-se aproximadamente 0,05g da amostra em um balão volumétrico de 25mL. A amostra foi diluída utilizando ácido metílico. Após isso, colocou-se a amostra em uma cubeta e foi mensurada a absorvância à 270nm e em 232nm. Como controle positivo foi usado apenas o ácido metílico. O resultado foi calculado por meio da equação 1.

$$E = A\lambda / (c \times l)$$

Equação 1: Determinação da concentração de dienos e trienos na amostra.

$E_{1\text{ cm } 1\%}$  (ou  $K$ ) = extinção específica no comprimento de onda  $\lambda$

$A\lambda$  = absorvância medida no comprimento de onda  $\lambda$

$c$  = concentração da solução em g 100 mL<sup>-1</sup>

$l$  = caminho óptico da cubeta em cm

### 3.8 Avaliação fitoquímica qualitativa

As análises visaram a detecção de possíveis metabólitos secundários presentes no extrato aquoso, segundo metodologia descrita por Trease e Evans (1984).

#### 3.8.1 Ensaio para a identificação de terpenoides e esteroides

Utilizando um tubo de ensaio, foi adicionado 10  $\mu$ L de extrato contendo 10 mg. Após esse processo, foram adicionados 1250  $\mu$ L de ácido acético anidro e 1250  $\mu$ L de

clorofórmio. Em seguida, foi adicionado lentamente ácido sulfúrico concentrado no volume de 5000 µL. O aparecimento ou intensificações da cor indicaram a presença de terpenoides (se positivo, a solução torna-se vermelha), e esteroides (se positivo, a solução torna-se verde), (Trease & evans, 1984).

### 3.8.2 Ensaio para a identificação de flavonoides

Utilizando um tubo de ensaio, foi adicionado 10 µL de extrato contendo 10 mg. Posteriormente, adicionou-se ao extrato 1500 µL de metanol 50%. A amostra foi aquecida e foi adicionado magnésio metálico e 5-6 gotas de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento ou intensificações da cor vermelha indicou a presença de flavonoides (Trease & evans, 1984).

### 3.8.3 Ensaio para a identificação de taninos

Utilizando um tubo de ensaio, foi adicionado 500 µL do extrato contendo 10 mg. Em seguida, foi adicionado ao extrato 1-2 gotas de uma solução de cloreto férrico. O aparecimento ou intensificações da cor azul ou preto esverdeado indicou a presença de taninos (Trease & evans, 1984).

### 3.8.4 Ensaio para a identificação de cumarina

Em um tubo de ensaio, foi adicionado 500 µL do extrato aquoso. Em seguida, adicionou-se ao extrato 750 µL de NaOH 10%. O aparecimento ou intensificações da cor amarelo indicou a presença de cumarina (Trease & evans, 1984).

### 3.8.5 Ensaio para a identificação de saponinas

Utilizando um tubo de ensaio, foi adicionado 500 µL do extrato contendo 10 mg. Em seguida, adicionou-se ao extrato 1000 µL de bicarbonato de sódio 1%. O aparecimento ou intensificações de espuma indicou a presença de saponina (Trease & evans, 1984).

### 3.7.6 Ensaio para a identificação de glicosídeos

Utilizando um tubo de ensaio, foi adicionado 10 µL de extrato contendo 10 mg. Posteriormente, adicionou-se ao extrato 2- 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O

aparecimento ou intensificações da cor verde azulada indicou a presença de glicosídeos (Trease & Evans, 1984).

### 3.8 Hemograma

A fim de observar alterações causadas pelo tratamento com extrato vegetal e o estresse, além de observar a interação dessas duas variáveis, foi realizada a punção sanguínea periférica nos animais em três momentos: ao iniciar o protocolo experimental, após o tratamento e ao final dos experimentos. Foram avaliados o número total de leucócitos, plaquetas, eritrócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos, além da porcentagem de granulócitos, linfócitos e monócitos. A contagem foi realizada de maneira automática em analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China).

### 3.9 Ensaio antioxidantes

#### 3.9.1 Sequestro do radical ABTS

O ensaio antioxidante com o uso do radical ABTS (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) foi realizado, de acordo com a metodologia de KUSKOSKI e colaboradores (2005) e adaptado por Rufino et al., (2007). Inicialmente, foram elaboradas soluções estoque de ABTS 7 mM e de persulfato de potássio 140 mM, nas quais necessitaram de ambiente escuro e armazenamento em frasco âmbar, com o período de validade de 1 mês. Para o preparo do radical ABTS, utilizamos 5 mL de solução estoque de ABTS com 88 µL da solução estoque de persulfato de potássio. A nova solução foi mantida em repouso em ambiente escuro por 16 h, no mínimo. No dia seguinte, a solução do radical ABTS foi diluída com metanol na proporção 1:10 e transferiu-se 110 µL para a microplaca, a fim de obter a absorbância entre 0,65 e 0,55 nm, a partir da leitura realizada no leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermofisher) a 734 nm. Para o grupo controle, foi utilizado a solução mãe de trolox 2 mM, com 10 µL de diferentes concentrações (0, 5, 25, 50, 75, 95 e 100 µL) adicionados 100 µL do radical ABTS, para a obtenção da curva padrão. No grupo da amostra, foram utilizadas alíquotas de 8 mL do extrato de *Acromia aculeata* (100 a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>) em diluição seriada, para 100 µL do radical ABTS. As amostras foram homogeneizadas e foram colocadas no leitor de placas por 6 minutos à 734 nm. Os cálculos foram realizados seguindo a equação da reta de cada uma das amostras e a absorbância da solução controle. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição do radical ABTS (equação 2).

$$\text{Taxa de Concentração Inibitória ABTS (\%)} = (B2 - B1)/(B2 - B0) \times 100\%$$

Equação 2: Equação para determinação da taxa de concentração inibitória de ABTS

### 3.9.2 Sequestro do radical DPPH

Foi realizado o ensaio antioxidante, de acordo com a metodologia de Brand-Williams et al., (1995), com adaptação de Rufino et al., (2007), baseada na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515nm. Foi elaborada uma solução mãe de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ), com diluições de diferentes concentrações (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{M}$ ). Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 200 $\mu\text{L}$  de cada uma das concentrações, para a elaboração de uma curva de calibração, que realizou a leitura das absorbâncias em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermofisher) a 515nm. Para cada amostra, elaborou-se uma curva, onde foram utilizadas alíquotas de 4 mL do extrato de *G. paniculata* (8 a 0,50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em diluição seriada, para 180  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ) e, logo após, a amostra foi homogeneizada e deixada em ambiente escuro durante 30 minutos. Os cálculos foram realizados seguindo a equação da reta de cada uma das amostras e a absorbância da solução controle (0,1ml de metanol e 3,9ml de DPPH (60  $\mu\text{M}$ )). O resultado é expresso em porcentagem de inibição do radical DPPH, representada na equação: 3

$$\text{Taxa de Concentração Inibitória DDPH (\%)} = (A2 - A1)/(A2 - A0) \times 100\%$$

Equação 3: Equação para determinação da taxa de concentração inibitória de ABTS

### 3.9.3 Extração proteica

Para o preparo do extrato e do homogenato do tecido (hipocampo e cerebelo), as amostras foram descongeladas e maceradas mecanicamente com auxílio de um macerador mecânico por 20 vezes em 500  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl (Tris-HCl pH 7,4 0,01M; EDTA 0,5 mM;  $\text{MgCl}_2$  1mM). Foi submetido a centrifugação à 10000 g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado para ensaios de quantificação de peróxido e quantificação de glutatona reduzida.

### 3.9.4 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford, descrito por Dr. Marion Bradford em 1976, por meio do reagente de Bradford (Bio-Rad), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas. A ligação entre o corante e as proteínas induzem uma mudança espectral da cor inicial marrom para o azul. As interações hidrofóbicas e iônicas que acontecem entre o corante e a amostra acabam estabilizando o corante em sua forma aniônica e permitindo a subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. Para inferir a concentração de proteínas, fez-se uma curva de concentrações conhecidas da albumina sérica bovina (BSA) variando de 0,25 a 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e a partir das absorbâncias dessas concentrações conhecidas, gerou-se uma equação que permite chegar ao valor de concentração das amostras.

### 3.9.5 Determinação de glutathiona reduzida (GSH)

O princípio da determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente 21 de Ellman (DTNB/ 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) com o tiol livre, originando ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB). O DTNB é um composto que contém um grupo nitrobenzoico ( $\text{NO}_2\text{-Bz}$ ) e o grupo tiol (SH). Enquanto a glutathiona reduzida (GSH) contém um grupo tiol (-SH) em sua estrutura. Quando o DTNB é adicionado à solução contendo GSH, ocorre uma reação de substituição nucleofílica entre o grupo tiol (SH) da GSH e o grupo nitrobenzoico ( $\text{NO}_2\text{-Bz}$ ) do DTNB. Essa reação resulta na formação do denominado 5-tio-2-nitrobenzoato de glutathiona (TNB-GS).

O 5-tio-2-nitrobenzoato de glutathiona (TNB-GS) formado é um complexo de cor amarela, que pode ser quantificado por meio da medição da absorbância em espectrofotômetro. A intensidade da cor amarela está diretamente relacionada à concentração de GSH presente na amostra, permitindo a determinação da concentração de GSH por meio da curva de calibração. Essa reação é específica para a glutathiona reduzida (GSH) e não ocorre com outras formas oxidadas de glutathiona. Portanto, esse método é utilizado para medir especificamente a concentração de GSH, que é uma forma importante de antioxidante presente nas células.

Para este ensaio usou-se uma placa de 96 poços, na qual foram aplicados 20  $\mu\text{L}$  das amostras (homogenato de hipocampo e córtex pré frontal), 250  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl (Tris-HCl 1M pH 8; EDTA 0,1mM) e 5  $\mu\text{L}$  DTNB 10 mM. Para a curva padrão

utilizou-se uma solução estoque de cisteína 10 mM que foi aplicada na placa em diluições que garantem concentrações de 0 a 181  $\mu\text{M}$  de cisteína, posteriormente foi adicionado o tampão e 5  $\mu\text{L}$  de DTNB. O branco recebeu 275  $\mu\text{L}$  de tampão e 5  $\mu\text{L}$  de DTNB. Após 15 minutos em temperatura ambiente a placa foi lida em a 412 nm e os dados expressos em nmol de GSH/mg proteína

### 3.9.6 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Esse protocolo utiliza o princípio da titulação redox para quantificar  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente na amostra. O sulfato ferroso amoniacal é um agente redutor que reage com o peróxido de hidrogênio, oxidando-se no processo.

Para a quantificação da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi adicionado na placa de ELISA 20  $\mu\text{L}$  de homogenato de hipocampo e de córtex pré-frontal, 280  $\mu\text{L}$  de meio de reação 500  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso amoniacal e 200  $\mu\text{M}$  de alaranjado de xilenol diluído em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM). A curva foi feita a partir de uma solução de peróxido de hidrogênio 10 nM, com uma concentração variando de 0 a 2,13 nM. O branco recebeu apenas 280  $\mu\text{L}$  de meio de reação e 20  $\mu\text{L}$  de água destilada. Após incubação por 45 minutos sob proteção da luz, o produto formado foi lido em um espectrofotômetro a 580 nm e os dados expressos em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /mg proteína.

### 3.12 Análise estatística

Todos os experimentos foram analisados de maneira independente pelo programa GraphPad Prism® para Windows versão 9.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Foram feitos diferentes testes estatísticos de acordo com os parâmetros analisados e para todos os testes, adotamos como valores significativos somente os que apresentaram  $p < 0,05$ . Os testes comportamentais foram analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de três vias, quando três fatores estavam presentes (estresse x tratamento x tempo), duas vias, quando dois fatores estavam presentes (estresse x tratamento), de uma via para comparações nos gráficos de coluna ou teste t para comparações entre somente dois grupos, paramétricos ou não-paramétricos. Após a ANOVA, os pós-testes recomendados para cada análise foram utilizados, abrangendo assim os pós-testes de Bonferroni, Dunn, Mann-Whitney Kruskal-Wallis, Sidak e Tukey. A amostragem comportamental mínima utilizada foi de  $n = 5$  animais/grupo e, para análises sorológicas e teciduais, de  $n = 5$  animais/grupo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise da qualidade físico-química do OPB

Como controle de qualidade do óleo, e verificação do estado físico-químico como garantia de que o óleo não estava oxidado foi realizado o teste de extinção específica, que consiste em quantificar a concentração de dienos e trienos na amostra.

Após realizar os cálculos, verificamos que a amostra continha  $1,97 E^{1\%}$  cm para o valor de dienos e  $2,00 E^{1\%}$  cm para trienos (Tabela 1).

Tabela 1: Extinção específica no OPB. Os resultados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média (as análises foram feitas em triplicatas).

<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados</b>
<b>Dienos</b>	$1,97 \pm 0,32$
<b>Trienos</b>	$2,00 \pm 0,32$

### 4.2 Avaliação qualitativa de compostos existentes no óleo polpa de bocaiuva (*Acromia aculeata*)

Com a finalidade de avaliar as classes de metabólitos secundários contidas no OPB, foi realizado o ensaio colorimétrico qualitativo baseado no estudo de Trease e Evans (1984). A partir dos ensaios foi possível identificar a presença ou ausência de terpenos, esteroides, flavonoides, taninos, cumarinas, saponinas e glicosídeos.

Os resultados demonstraram a presença no OPB de terpenos, esteroides, flavonoides, taninos, cumarina, glicosídeos. Por meios da metodologia empregada não foi evidenciada a presença de saponinas (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação do ensaio fito químico utilizando o óleo polpa de bocaiuva (*Acromia aculeata*).

<b>Constituinte</b>	<b>Resultado</b>
<b>Terpenos</b>	Positivo
<b>Esteroides</b>	Positivo
<b>Flavonoides</b>	Positivo
<b>Taninos</b>	Positivo
<b>Cumarina</b>	Positivo
<b>Saponina</b>	Negativo
<b>Glicosídeos</b>	Positivo

4.3do O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiúva não são capazes de provocar mudanças sobre analitos hematopoiéticos

Com a intenção de examinar as diferenças em analitos hematopoiéticos foi realizada a leitura de hemograma utilizando o analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China). Foram analisados o número total de leucócitos, hemácias, plaquetas, linfócitos, monócitos e granulócitos, além da porcentagem de linfócitos, monócitos e granulócitos.

No que diz respeito ao número total de leucócitos (figura 4-A), não foi observado efeito do tempo [F (2, 8) = 0,6729 (p=0,53)], do tratamento [F (1, 4) = 3,9 9p=0,11)], do estresse [F (1, 4) = 5,23 (0,08)], da interação tempo x tratamento [F (2, 8) = 1,4 (0,29)], da interação tempo x estresse [F (2, 8) = 0,07427 (0,9291)], da interação tratamento x estresse [F (1, 4) = 0,92 (0,39)] tampouco quando analisado a interação tempo x tratamento x estresse [F (2, 2) = 3,7 (0,20)].

Referente ao número de hemácias (Figura 4-B), observou-se efeito referente ao tempo [F (2, 8) = 5,357 (0,0334)]. Entretanto não foi encontrado efeito no que diz respeito ao tratamento [F (1, 4) = 5,86 (0,07)], estresse [F (1, 4) = 2,5 (0,18)], interação tempo x tratamento [F (2, 8) = 0,9537 (0,4251)], interação tempo x estresse [F (2, 8) = 2,22 (0,17)], interação tratamento x estresse [F (1, 4) = 4,935 (0,0905)], interação tempo x tratamento x estresse [F (2, 7) = 0,29 (0,75)].

Em relação ao número de plaquetas (Figura 4-C), não foi encontrada diferença estatística em relação ao tempo [ F (2, 8) = 1,723(0,23)], tratamento [F (1, 4) = 1,386 (0,30)], estresse [F (1, 4) = 0,1376 (0,72)], da interação tempo x tratamento [F (2, 8) = 0,9341 (0,4319)], da interação tempo x estresse [F (2, 8) = 3,4 (0,08)], da interação tratamento x estresse [F (1, 4) = 0,18 (0,69)], e da interação tempo x tratamento x estresse [F (2, 7) = 4,70 (0,05)].

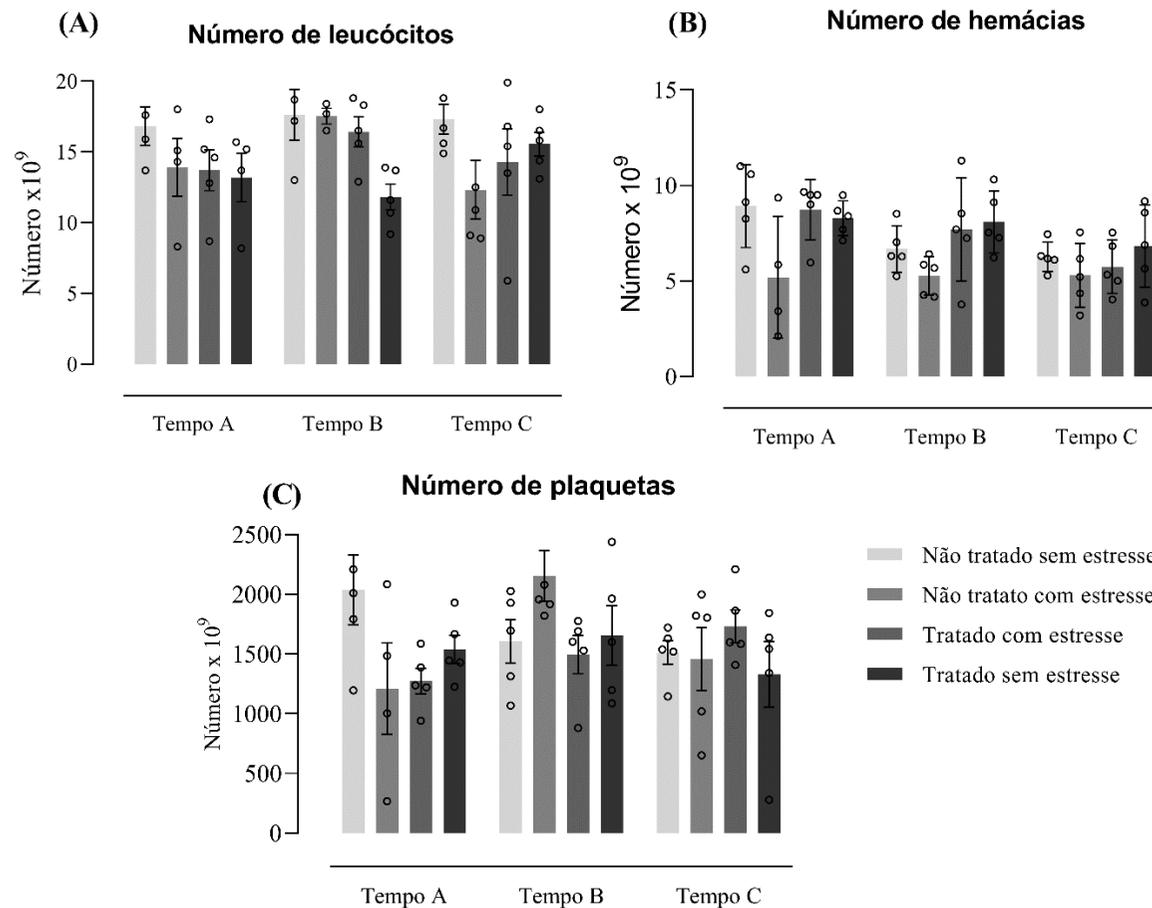


Figura 4: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação ao número de leucócitos (A), hemácias (B) e plaquetas (C). Os analitos foram avaliados em três momentos distintos, no dia 7 do protocolo anteriormente ao início do tratamento (Tempo A), no dia 10 do protocolo, após finalizado o tratamento com o extrato vegetal (Tempo B) e ao final do protocolo experimental (Tempo C). Foi realizado o teste estatístico de a ANOVA de três vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, utilizando 4-5 animais por grupo (n=4-5). As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0.05$ ).

Ao analisar o número total de linfócitos (Figura 5-A), houve diferença entre os grupos experimentais quando observado a interação tempo x estresse [F (2, 8) = 8,70 (p=0,009)] e tratamento x estresse [F (1, 4) = 15,58 (p=0,01)]. Entretanto não foi observada diferença estatística para o tempo [F (2, 8) = 0,40 (p=0,68)], tratamento [F (1, 4) = 0,46 (p=0,53)], estresse [F (1, 4) = 0,59 (p=0,48)], a interação tempo x tratamento [F (2, 8) = 2,8 (p=0,11)] e a interação tempo x tratamento x estresse [F (2, 2) = 2,06 (p=0,32)].

Quando observado o número total de monócitos (Figura 5-B), foi observada diferença estatística para o tratamento [F (1, 4) = 11,53 (p=0,02)]. Entretanto não houve diferença estatística quando observado o tempo [F (2, 8) = 0,08 (p=0,92)], estresse [F (1, 4) = 0,59 (p=0,48)], a interação tempo x tratamento [F (2, 8) = 1,26 (p=0,33)], a interação tempo x estresse [F (2, 8) = 2,39 (p=0,15)], a interação tratamento x estresse [F (1, 4) = 0,12 (p=0,73)], e a interação tempo x tratamento x estresse [F (2, 2) = 2,10 (p=0,32)].

Ao estudar os dados referentes ao número total de granulócitos (Figura 5-C), observou-se diferença estatística para o tratamento [F (1, 4) = 15,15 (p=0,017)]. Entretanto não foi demonstrada diferença estatística para os fatores tempo [F (2, 8) = 1,20 (p=0,34)], estresse [F (1, 4) = 3,12 (p=0,15)], tampouco na interação tempo x tratamento [F (2, 8) = 0,64 (p=0,55)], a interação tempo x estresse [F (2, 8) = 1,15 (p=0,36)], a interação tratamento x estresse [F (1, 4) = 1,43 (p=0,29)], e a interação tempo x tratamento x estresse [F (2, 2) = 0,97 (p=0,50)].

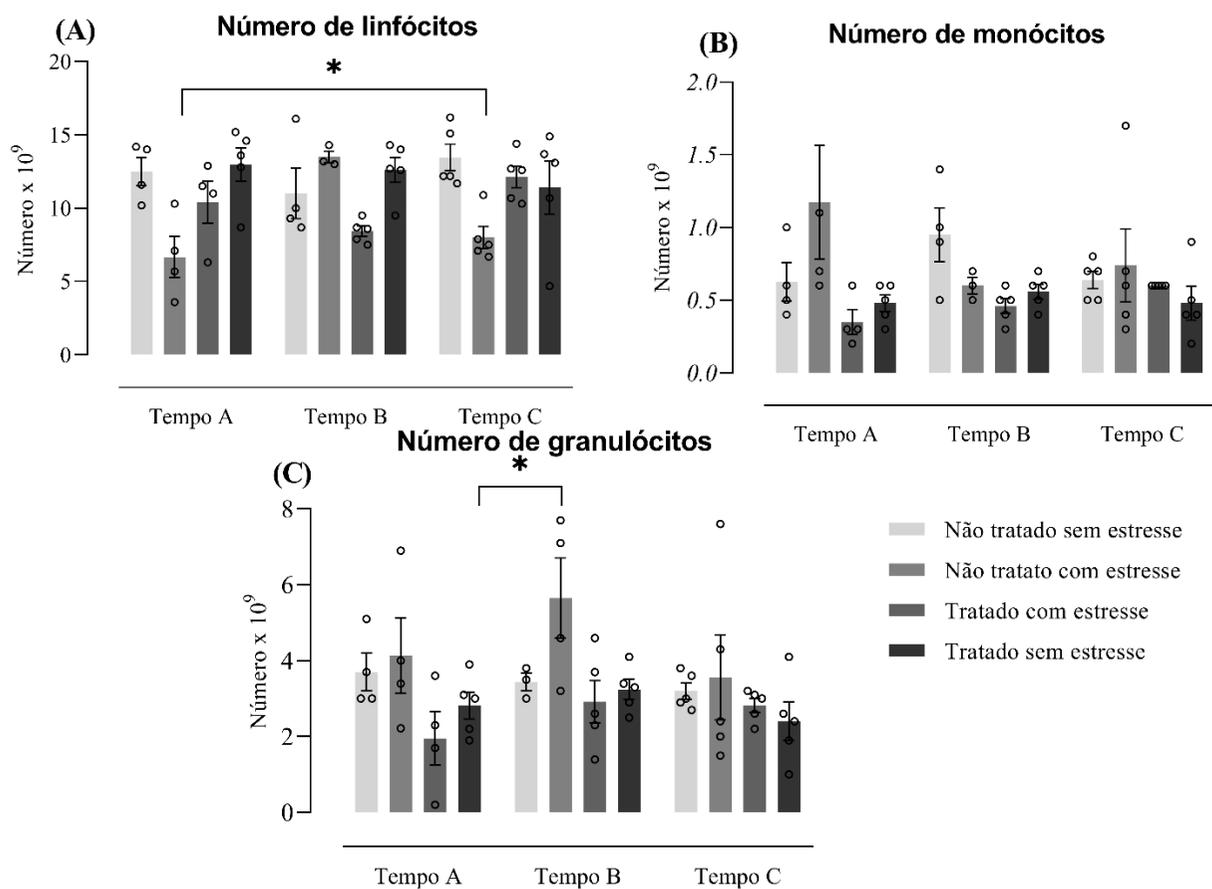


Figura 5: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação ao número de leucócitos (A), hemácias (B) e plaquetas (C). Os analitos foram avaliados em três momentos distintos, no dia 7 do protocolo anteriormente ao início do tratamento (Tempo A), no dia 10 do protocolo, após finalizado o tratamento com o extrato vegetal (Tempo B) e ao final do protocolo experimental (Tempo C). Foi realizado o teste estatístico de a ANOVA de três vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, utilizando 4-5 animais por grupo (n=4-5). As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0.05$ ).

Ao observar os dados provenientes da porcentagem de linfócitos (figura 6-A), houve diferença estatística quando observado o efeito do tratamento [ $F(1, 4) = 27,14$  ( $p=0,0065$ )], tempo x tratamento [ $F(2, 8) = 4,973$  ( $p=0,0395$ )], tempo x estresse [ $F(2, 8) = 7,98$  ( $p=0,012$ )]. Entretanto não foram observadas diferenças estatísticas entre tempo [ $F(2, 8) = 2,39$  ( $p=0,15$ )], estresse [ $F(1, 4) = 1,12$  ( $p=0,34$ )], a interação tratamento x estresse [ $F(1, 4) = 7,07$  ( $p=0,05$ )] e a interação tempo x tratamento x estresse [ $F(2, 2) = 7,98$  ( $p=0,11$ )].

Referente a porcentagem de monócitos (figura 6-B), houve diferença estatística quando observado o efeito do tratamento [ $F(1, 4) = 22,34$  ( $p=0,90$ )] e da interação tempo x estresse [ $F(2, 8) = 7,40$  ( $p=0,01$ )]. Entretanto não foi observada diferença estatística entre o tempo [ $F(2, 8) = 0,099$  ( $p=0,90$ )], o estresse [ $F(1, 4) = 1,39$  ( $p=0,30$ )], a interação tempo x tratamento [ $F(2, 8) = 4,30$  ( $p=0,05$ )], a interação tratamento x estresse [ $F(1, 4) = 5,80$  ( $p=0,07$ )], e a interação tempo x tratamento x estresse [ $F(2, 2) = 6,98$  ( $p=0,12$ )].

Em relação a porcentagem de granulócitos (figura 6-C), houve diferença estatística quando observado o efeito do tratamento [ $F(1, 4) = 27,16$  ( $p=0,006$ )], a interação tempo x tratamento [ $F(2, 8) = 6,22$  ( $p=0,02$ )], a interação tempo x estresse [ $F(2, 8) = 9,74$  ( $p=0,007$ )]. Entretanto não foi observada diferença quando estudados os efeitos do tempo [ $F(2, 8) = 2,24$  ( $p=0,16$ )], do estresse [ $F(1, 4) = 2,06$  ( $p=0,22$ )], da interação tratamento x estresse [ $F(1, 4) = 3,72$  ( $p=0,12$ )] e da interação tempo x tratamento x estresse [ $F(2, 2) = 4,98$  ( $p=0,16$ )].

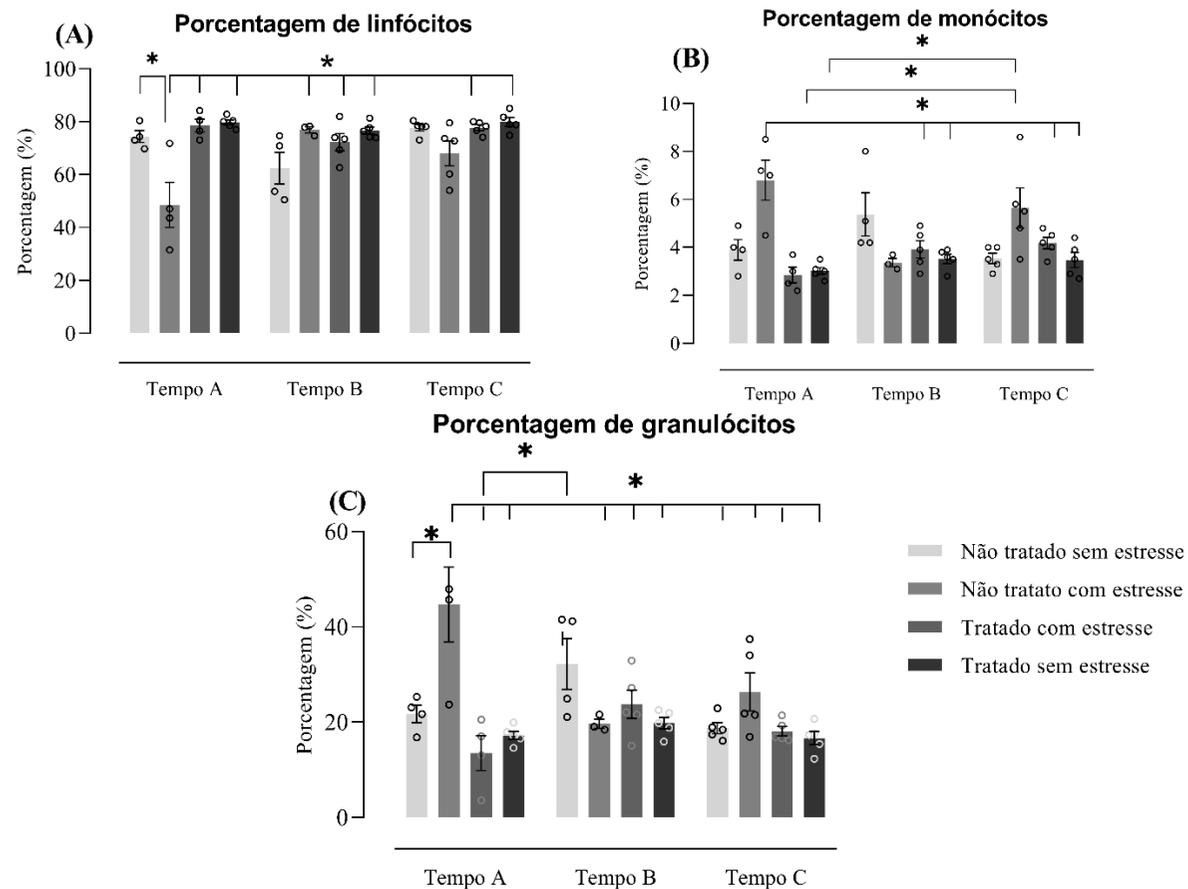


Figura 6: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação a percentagem de linfócitos (A), percentagem de monócitos (B) e percentagem de granulócitos (C). Os analitos foram avaliados em três momentos distintos, no dia 7 do protocolo anteriormente ao início do tratamento (Tempo A), no dia 10 do protocolo, após finalizado o tratamento com o extrato vegetal (Tempo B) e ao final do protocolo experimental (Tempo C). Foi realizado o teste estatístico de a ANOVA de três vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, utilizando 4-5 animais por grupo (n=4-5). As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0.05$ ).

A partir dos dados obtidos pela leitura do hemograma foi possível observar que em todos os animais analisados quando realizado o teste estatístico de Anova de 3 vias (Estresse x Tratamento x Tempo) nos grupos experimentais, tanto o estresse agudo por DS ou o tratamento com OPB, nas nossas condições experimentais, foi capaz de alterar os parâmetros hematopoiéticos dos animais.

#### 4.4 O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiuva não são capazes de modular o comportamento do tipo ansioso

Visando verificar uma possível modulação do estresse e os efeitos do OPB no comportamento do tipo ansioso, foi realizado o experimento de labirinto em cruz elevado (LCE).

Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no que diz respeito ao número de entradas nos braços abertos em relação ao tratamento [F (1, 9) = 2,03 (P=0,18)], estresse [F (1, 9) = 0,40 (P=0,53)] e a interação das variáveis (tratamento x estresse) [F (1, 9) = 2,16 (P=0,17)]. Para número de entrada nos braços fechados, não foi observada diferença estatística relacionada ao tratamento [F (1, 9) = 0,8399 (P=0,3833)], estresse [F (1, 9) = 0,071 (P=0,79)] e a interação das variáveis (tratamento x estresse) [F (1, 9) = 0,28 (p =0,60)]. Para o número de entrada no centro, não foi observada diferença estatística relacionada ao tratamento [F (1, 9) = 1,59 (P=0,23)], estresse [F (1, 9) = 0,005 (F (1, 9) = 0,005 (P=0,94)] e a interação das variáveis (tratamento x estresse) [F (1, 9) = 0,40 (P=0,54)]. Para o número de mergulhos, não foi observada diferença estatística relacionada ao tratamento [F (1, 9) = 4,05 (P=0,07)], estresse [F (1, 9) = 0,0014 (P=0,97)] e a interação das variáveis (tratamento x estresse) [F (1, 9) = 0,96 (P=0,35)]. Para a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (E), não foi observada diferença estatística relacionada ao tratamento [F (1, 9) = 0,13 (P=0,71)], estresse [F (1, 9) = 0,14 (P=0,71)] e a interação das variáveis (tratamento x estresse) [F (1, 9) = 1,76 (P=0,21)]. Para porcentagem do tempo de permanência nos braços fechados, não foi observada diferença estatística relacionada ao tratamento [F (1, 9) = 1,37 (P=0,27)], estresse [F (1, 9) = 1,26 (P=0,28)] e a interação das variáveis (tratamento x estresse) [F (1, 9) = 5,31 (P=0,04)]. Para a porcentagem do tempo de permanência no centro, não foi observada diferença estatística relacionada ao tratamento [F (1, 9) = 0,11 (P=0,74)], estresse [F (1, 9) = 0,048 (P=0,83)] e a interação das variáveis (tratamento x estresse) [F (1, 9) = 4,78 (P=0,05)].

Assim, concluímos que tanto o estresse agudo por DS ou o tratamento com OPB nas nossas condições experimentais não foram capazes de modular o comportamento do tipo ansioso analisado no LCE (figura 7).

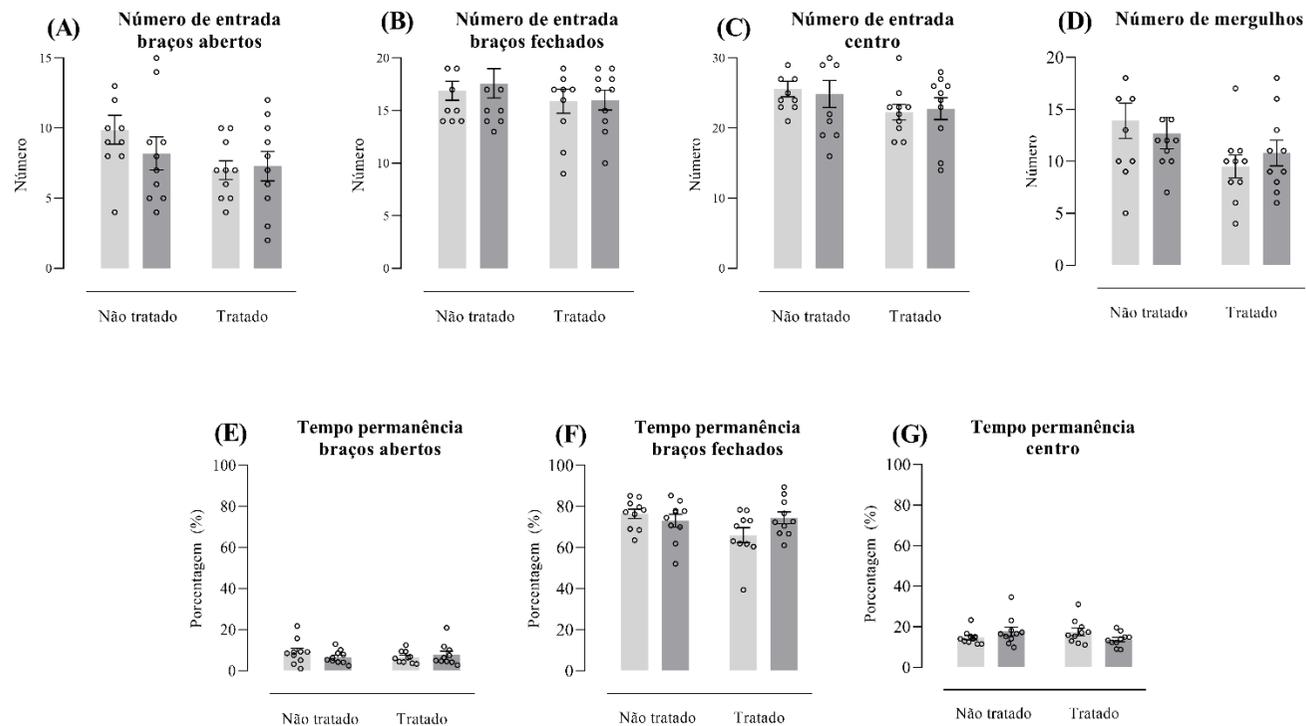


Figura 7: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação ao comportamento do tipo ansioso em animais submetidos ao protocolo de labirinto em cruz elevado em relação ao número de entrada nos braços abertos (A), número de entrada nos braços fechados (B), número de entrada no centro (C), número de mergulhos (D), porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (E), porcentagem do tempo de permanência nos braços fechados (F) e porcentagem do tempo de permanência no centro (G). Foi realizado o teste estatístico de uma ANOVA de duas vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, utilizando 10 animais por grupo (n=10). As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados por meio do software MABA.

4.5 O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiuva não são capazes de provocar mudanças sobre a extinção de memória aversiva

Com a intenção de estudar uma possível modulação pelo estresse agudo por DS e o tratamento com o OPB no comportamento relacionado a extinção de memória aversiva foi realizado o teste de condicionamento ao som e choque.

Relativo ao treino de condicionamento aversivo (figura 8-A), foram observadas diferença estatística para o tempo [F (1, 9) = 287,6 (p=<0,0001)], estresse [F (1, 9) = 14,50 (p=0,004)], tempo x estresse [F (1, 9) = 7,671(p=0,0218)]. Entretanto não foram observadas diferenças estatísticas quando para efeito derrota social [F (1, 9) = 0,3202(p=0,5853)], a interação tempo x derrota social [F (1, 9) = 2,06(p=0,18)], a interação tratamento x derrota social [F (1, 9) = 4,07 (p=0,07)] e a interação entre tempo x estresse x derrota social [F (1, 3) = 0,9514(p=0,40)].

Referente ao treino de extinção (figura 8-B), não foram observadas diferenças estatística para o tempo [F (4, 36) = 1,20 (p=0,32)], estresse [F (1, 9) = 2,040 (p=0,1869)], derrota social [F (1, 9) = 0,073 (p=0,79)], a interação tempo x estresse [F (4, 36) = 1,645(p=0,1842)], a interação tempo x derrota social [F (4, 36) = 0,68 (p=0,60)], a interação estresse x derrota social [F (1, 9) = 0,268 (p=0,61)], e a interação tempo x estresse x derrota social [F (4, 36) = 1,20 (p=0,32)].

Em relação ao teste de extinção (figura 8-C), não foram observadas diferenças estatística para o tempo [F (4, 36) = 1,208(p=0,32)], estresse [F (1, 9) = 2,040(p=0,1869)], derrota social [F (1, 9) = 0,073 (p=0,79)], a interação tempo x estresse [F (4, 36) = 1,64 (p=0,18)], a interação tempo x derrota social [F (4, 36) = 0,68 (p=0,60)], a interação estresse x derrota social [F (1, 9) = 0,26 (p=0,61)], a interação tempo x estresse x derrota social [F (4, 36) = 1,20 (p=0,32)].

Diante desses resultados, é possível concluir que os animais realizam a associação do estímulo condicionado com o estímulo incondicionado na primeira fase de teste (treinamento do condicionamento aversivo), e portanto, adquirem a memória. Damesma maneira, na segunda e terceira fase (treino de extinção e teste de extinção), como não foram observadas diferença estatística no porcentual de freezing dos animais entre os grupos experimentais, podemos concluir que o estresse agudo por DS ou o tratamento com OPB nas nossas condições experimentais não alteram os processos de evocão (treino de extinção) e extinção (teste de extinção) da memória aversiva.

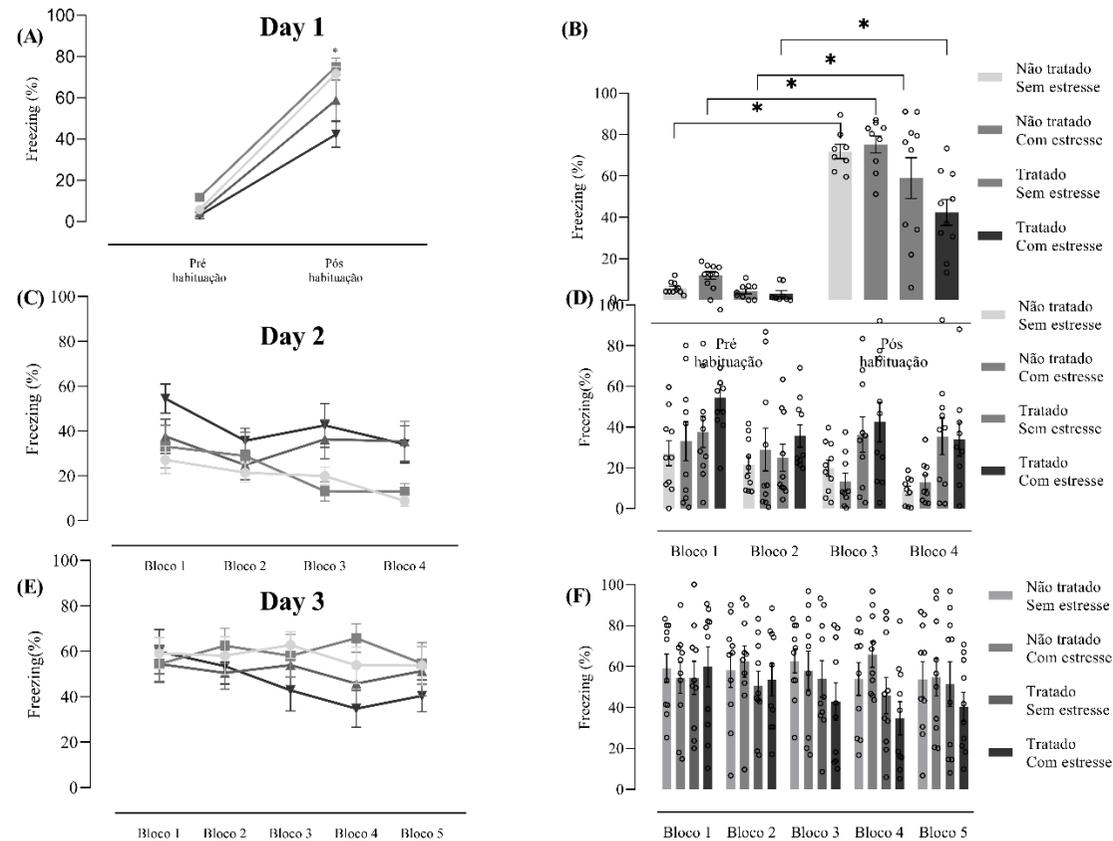


Figura 8: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação a extinção da memória aversiva avaliado pelo teste comportamental de extinção da memória aversiva, demonstrado pelo tempo de freezing. Foi realizado o teste estatístico de a ANOVA de três vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, em relação ao treino de condicionamento aversivo (A-B), ao treino de extinção (C-D) e ao teste de extinção (E-F). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, utilizando 10 animais por grupo (n=10). As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados por meio do software MABA. As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0.05$ ).

#### 4.6 O estresse agudo por derrota social e o tratamento com óleo polpa de bocaiuva não são capazes de provocar anedonia

Com a intenção de verificar uma possível modulação do estresse e os efeitos do OPB no comportamento relacionado a anedonia, foi realizado o experimento de teste de respingo a sacarose (*splash*).

Após realização do teste estatístico de a ANOVA de duas vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, verificamos que os animais não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no que diz respeito ao tratamento [ $F(1, 9) = 0,010$  ( $p = 0,92$ )], ao estresse [ $F(1, 9) = 0,20$  ( $p = 0,65$ )] e ao tratamento x estresse [ $F(1, 7) = 0,06$  ( $p = 0,81$ )]. Assim, concluímos que o estresse agudo por DS ou o tratamento com OPB nas nossas condições experimentais não causam anedonia.

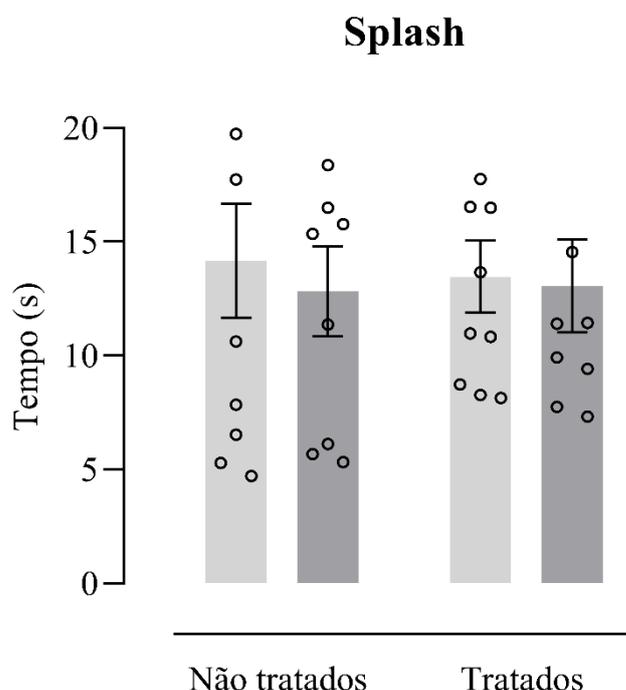


Figura 9: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação ao comportamento de anedonia avaliado pelo teste comportamental de teste de respingo a sacarose (*Splash*), demonstrado pelo tempo de autolimpeza. Foi realizado o teste estatístico de a ANOVA de duas vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, utilizando 10 animais por grupo ( $n=10$ ). As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0,05$ ). Os dados foram analisados por meio do software MABA.

## 4.7 Avaliação do efeito antioxidante

### 4.7.1 Sequestro do radical DPPH

Objetivando investigar o efeito antioxidante do OPB, o ensaio de DPPH foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Rufino e colaboradores (2007).

Os ensaios foram conduzidos empregando as concentrações de 12,5 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$  do OPB e 100 à 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Trolox, utilizado como controle positivo. Os resultados demonstraram a capacidade antioxidante do extrato, uma vez que a porcentagem de inibição do radical DPPH aumenta com o aumento da concentração do extrato (figura 10).

Após realizar o teste estatístico Anova de 1 via, utilizando comparações múltiplas com pós-teste de Tukey, é possível observar que o controle positivo (trolox) apresenta diferença estatística quando comparado à concentração de 100 vs 1500 (diferença entre médias = 60,60%), 100 vs 2000 (diferença entre médias= 91,80%), 500 vs 1500 (diferença entre médias= 45,90%) ,500 vs 2000 (diferença entre médias= 77,10%) e 1000 vs 2000 (diferença entre médias= 58,17%). Ao observar a porcentagem de inibição do radical DPPH exercida pelo extrato, é possível verificar diferença estatística nas concentrações de 12,5 vs 100 (diferença entre médias= 17,45%) e 25 vs 100 (diferença entre médias= 17,45%).

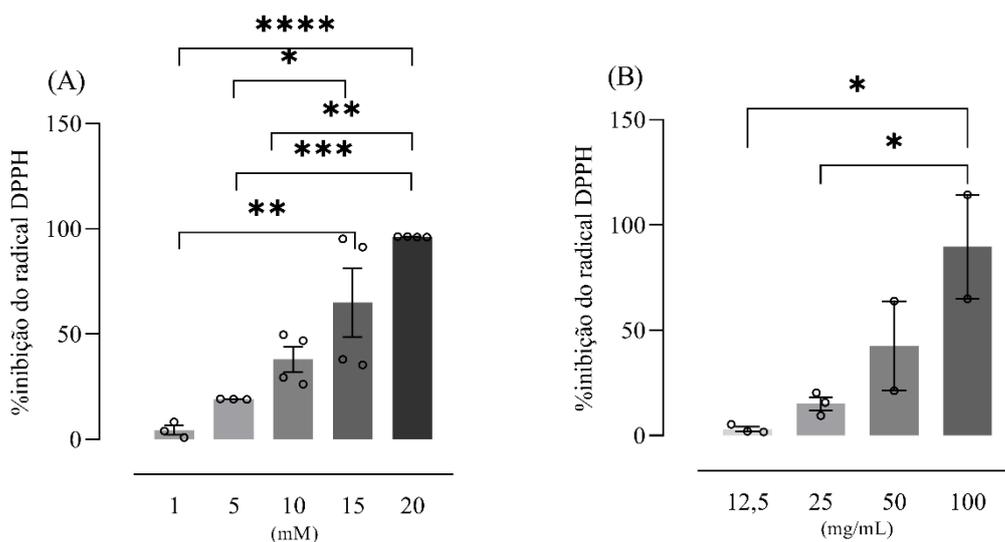


Figura 10: Avaliação do efeito antioxidante do OPB por meio da análise da porcentagem de inibição do radical DPPH em relação ao controle positivo (trolox) (A) e o OPB (B). Foi realizado o teste estatístico de anova de uma via com pós teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados foram exibidos por meio da média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais. \* $p \leq 0,005$ . \*\* $p < 0,001$ . \*\*\* $p = 0,0004$ . \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.7.2 Sequestro do radical ABTS

Para corroborar o efeito antioxidante do OPB, foi realizada a metodologia de ABTS, de acordo com o protocolo adaptado por Rufino e colaboradores (2007).

Para avaliação antioxidante do OPB foram usadas as concentrações de 12,5 a 100 ug.mL do OPB e 1000 à 10000 ug/mL de Trolox utilizado como controle positivo. Os resultados demonstram que foi possível determinar a capacidade antioxidante do extrato, uma vez que a porcentagem de inibição do radical ABTS aumenta com o aumento da concentração do extrato (figura 11).

Após realizar o teste estatístico Anova de 1 via, utilizando comparações múltiplas com pós-teste de Tukey é possível observar que ao comparar o controle positivo (trolox) existe diferença estatística quando analisado as concentrações de 100 vs 5000 (diferença entre médias= 40,99%), 100 vs 5000 (diferença entre médias= 87,30%), 100 vs 5000 (diferença entre médias= 46,37%). Ao analisar os dados obtidos pela inibição de ABTS pelo OPB é possível encontrar diferença estatística entre as concentrações 12,5 vs 50 (diferença entre médias 40,76%), 12,5 vs 100 (diferença entre médias 93,88%), 25 vs 50 (diferença entre médias 31,31%), 25 vs 100 (diferença entre médias 84,43%), 50 vs 100 (diferença entre médias 53,12%).

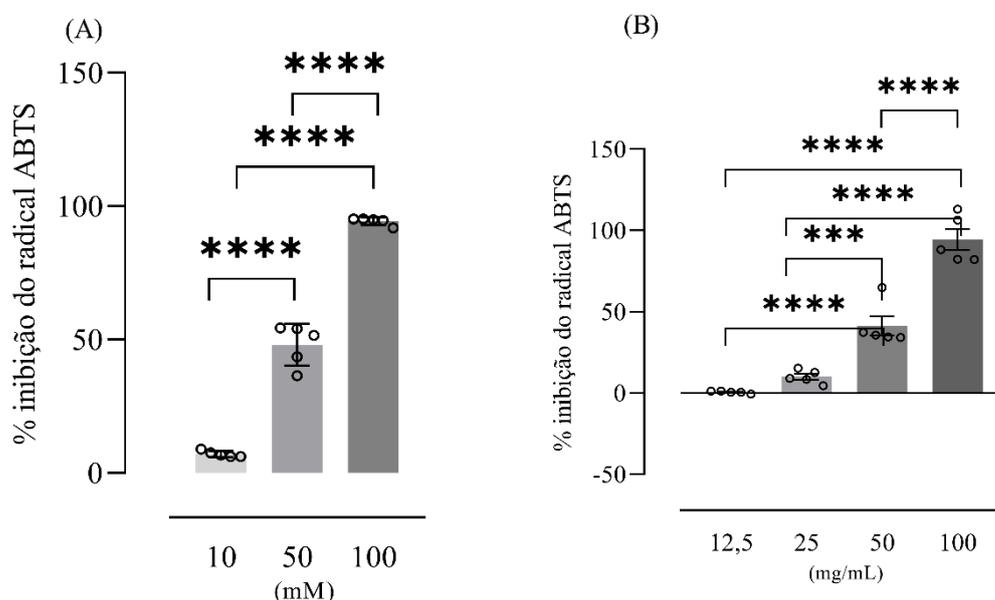


Figura 11: Avaliação do efeito antioxidante do OPB por meio da análise da porcentagem de inibição do radical ABTS em relação ao controle positivo (trolox) (A) e o OPB (B). Foi realizado o teste estatístico de anova de uma via com pós teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados foram exibidos por meio da média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. \*\*\*  $p = 0,0007$ . \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.7.4 Correlação entre os ensaios antioxidantes de DPPH e ABTS

Uma vez realizado as metodologias de sequestro do radical DPPH e ABTS, foi feita a correlação linear entre as porcentagens de inibição dos radicais citados acima (figura 12). O gráfico foi gerado com intuito da visualização do perfil de inibição dos radicais livres em diferentes concentrações do OPB. Observamos que o padrão de inibição dos radicais livres investigados aumenta ao aumentar a concentração do óleo vegetal. Além disso, não existe diferença estatística entre as diferentes concentrações testadas para a porcentagem de inibição do radical DPPH e ABTS, indicadores utilizados para determinação da atividade antioxidante do extrato vegetal.

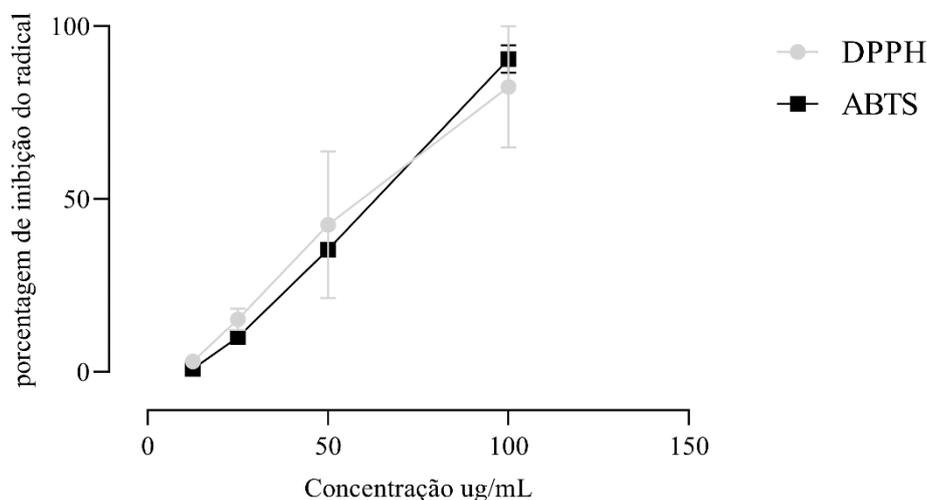


Figura 12: Correlação linear da porcentagem de inibição dos radicais livres DPPH (cinza) e ABTS (preto). Foi realizado o teste estatístico de anova de duas vias com pós teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados foram exibidos por meio da média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais.

#### 4.8 Derrota social e o tratamento com OPB não modulam o sistema oxidante no hipocampo e cortex pré-frontal

Com a intenção de verificar uma possível modulação no sistema relacionado a proteção frente ao estresse oxidativo, foi realizado os testes colorimétricos de quantificação de glutathiona reduzida e peróxido de hidrogênio, nas regiões encefálicas do hipocampo e do córtex pré-frontal, foram escolhidas essas regiões devido a relação com o comportamento do tipo ansioso, memória e também a anedonia.

Após realização teste estatístico de ANOVA de duas vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, os resultados advindos da quantificação de peróxido de hidrogênio no hipocampo indicam que os animais não apresentaram diferenças

estatísticas entre os grupos experimentais no que diz respeito ao tratamento [ $F(1, 4) = 1,995$  ( $p = 0,23$ )], ao estresse [ $F(1, 4) = 3,17$  ( $p = 0,14$ )] e ao tratamento x estresse [ $F(1, 2) = 0,73$  ( $p = 0,48$ )] e no córtex pré-frontal: tratamento [ $F(1, 4) = 1,71$  ( $p = 0,26$ )], estresse [ $F(1, 4) = 0,25$  ( $p = 0,64$ )] e tratamento x estresse [ $F(1, 4) = 2,80$  ( $p = 0,16$ )].

Após realização teste estatístico de ANOVA de duas vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, os resultados da quantificação de glutatona reduzida no hipocampo indicam que os animais não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tratamento [ $F(1, 4) = 6,67$  ( $p = 0,06$ )], ao estresse [ $F(1, 4) = 1,28$  ( $p = 0,32$ )] e ao tratamento x estresse [ $F(1, 3) = 6,50$  ( $p = 0,08$ )]. Ao observar os resultados da quantificação de glutatona reduzida no córtex pré-frontal, verificamos que os animais não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tratamento [ $F(1, 4) = 0,032$  ( $p = 0,86$ )], ao estresse [ $F(1, 4) = 0,051$  ( $p = 0,83$ )] e ao tratamento x estresse [ $F(1, 4) = 0,15$  ( $p = 0,71$ )].

Após realização do protocolo de estresse agudo por derrota social e também do tratamento com o OPB, nas nossas condições experimentais, não foi observada diferença na quantificação de  $H_2O_2$  e GSH, entre os grupos experimentais analisados, tanto na região do hipocampo e do córtex pré-frontal.

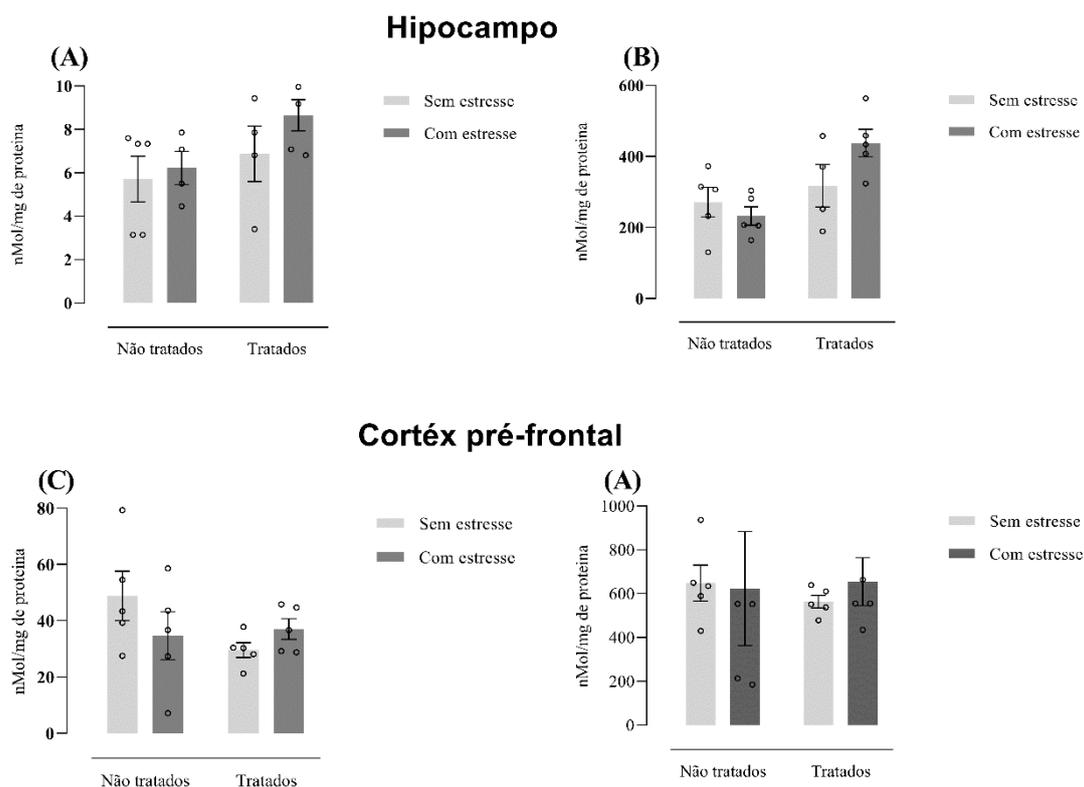


Figura 12: Efeitos da administração aguda do OPB em animais submetidos ao estresse agudo de derrota social em relação à quantificação de peróxido de hidrogênio no hipocampo (A), no córtex pré frontal (C) e a quantificação de glutatona reduzida no hipocampo (B) e no córtex pré-frontal (D). Foi realizado o teste estatístico de a ANOVA de duas vias com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, utilizando 10 animais por grupo (n=4-5). As diferenças estatísticas estão representadas por \* ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados por meio do software MABA.

## 5. DISCUSSÃO

O estresse exerce influências variadas sobre a vida das diversas espécies animais, manifestando-se de múltiplas maneiras. Na atual sociedade, os seres vivos são constantemente submetidos a uma ampla gama de estímulos. A frequência e a intensidade desses estímulos determinam se podem resultar em danos à saúde, conforme apontado por Monroe e Cummins (2015). Quando um estímulo estressante de alta intensidade é enfrentado, mas com baixa frequência, pode resultar em estresse agudo. Infelizmente, esse fenômeno não é exclusivo das espécies animais não-humanas e pode ser observado nos indivíduos, como após a exposição a acidentes de trânsito, incidentes domésticos ou cenários violentos, como assaltos, como destacado por Valenti et al. (2012).

Com o objetivo de aprofundar a compreensão sobre os impactos do estresse, têm sido desenvolvidas abordagens para replicar o estresse agudo em experimentos com animais. Camundongos, por exemplo, podem ser submetidos a metodologias específicas que procuram emular estímulos estressores semelhantes aos encontrados na vida diária, como discutido por Petković e Chaudhury (2022). Metodologias como imobilização, contenção, exposição a choque elétrico, isolamento social e separação materna são exemplos de como a ciência se vale do método científico para induzir estresse em animais, possibilitando a investigação de seus efeitos e a avaliação de potenciais terapias para mitigar as consequências decorrentes dos estímulos estressores (Campos et al., 2013). Quando exposto a um estímulo que induza estresse, o animal experimentará modulações nos processos fisiológicos, potencialmente levando ao desenvolvimento de doenças. O estresse pode resultar em um aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias e na diminuição de citocinas anti-inflamatórias (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005).

Além disso, animais submetidos à combinação de estresse por imobilização e restrição ao frio demonstram modulação no sistema oxidante. Camundongos que foram submetidos a esse tipo de estresse apresentaram um aumento na concentração de catalase, esse resultado pode revelar que o primeiro metabólito das ROS é o  $H_2O_2$  e devido a isso, existe maior concentração da catalase. Por meio desse mecanismo, é possível sustentar a hipótese que metodologias de estresse podem causar modulações no sistema oxidante que pode levar dano à integridade celular e conseqüentemente pode ser associada a agravos de saúde (Popovic et al., 2009).

Além disso, dependendo do tipo de estresse ao qual o animal é submetido, é possível observar diferentes alterações comportamentais. Por exemplo, animais submetidos ao estresse de imobilização demonstraram comportamento ansioso quando avaliados por meio do teste comportamental de campo aberto (Sahin et al., 2022). Já o estresse crônico imprevisível demonstrou causar comportamento de anedonia em animais submetidos ao protocolo de teste de respingo a sacarose (splash) (Hu et al., 2017). Visto isso é preciso criar estratégias que visem reestabelecer a homeostase de indivíduos que foram expostos ao estresse.

Existem diversas maneiras de diminuir as consequências geradas pelo estresse, como, por exemplo, a prática de exercícios físicos, melhora na dieta e psicoterapia. Porém, em alguns quadros, a intervenção farmacológica é imprescindível, como o emprego de fármacos como antidepressivos, ansiolíticos, estabilizadores de humor, dentre outros (Worthen & Cash, 2021).

Por modular vias bioquímicas e sistemas cognitivos, o estresse pode prejudicar a qualidade de vida dos seres humanos e estímulos estressores podem levar a hiperativação do eixo HPA, com conseqüente aumento da concentração de corticosterona, aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL 1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ , aumento na ativação e densidade de microglias, podendo ser verificado pelo aumento da expressão da proteína microglial IBA-1. O estresse pode, ainda, modular a expressão de proteína com caráter pró-inflamatório no sistema central e periférico, estando correlacionado a um aumento da morte celular neuronal e redução da arborização dendrítica, podendo prejudicar comportamentos como a interação social, o aprendizado e a memória. Por esse motivo são realizadas pesquisas científicas que possuem como objetivo procurar moléculas e intervenções que visem manter a homeostase e resgatar a qualidade de vida dos indivíduos (Du Preez et al., 2021; Esch & Stefano, 2010).

Entre as diversas estratégias empregadas para atenuar os efeitos prejudiciais do estresse, uma abordagem que merece destaque é a fitoterapia, que envolve o uso de plantas ou de seus componentes. A fitoterapia tem ganhado reconhecimento global devido à sua acessibilidade e baixo custo. No Brasil, que possui uma vasta biodiversidade, há numerosas opções disponíveis. Uma dessas opções é a *Acrocomia aculeata*, popularmente conhecida como bocaiuva, presente na região Centro-Oeste do país. Esta planta tem se destacado como uma alternativa promissora (Duarte et al., 2022; Palhares et al., 2021). Foram identificadas algumas propriedades farmacológicas da *A. aculeata* (bocaiuva), como ações anti-inflamatória, antioxidante, antígenotóxica, hipoglicemiante e hepatoprotetora (COSTA et al., 2020; Gillingham et al., 2011; Monteiro-Alfredo et al., 2020; Ramos et al., 2007; Raspe et al., 2013; Sant'Ana et al., 2023). No entanto, o seu uso pela população com finalidades medicinais ou nutracêuticas ainda é incipiente. Além disso, não existem estudos conclusivos acerca dos possíveis benefícios dessa planta em relação a alterações comportamentais. Nesse contexto, este projeto avaliou o potencial da *A. aculeata* em animais submetidos ao protocolo de estresse agudo por meio do teste de derrota social em camundongos machos.

A partir da bocaiuva (*Acromia aculeata*), é possível obter dois tipos de óleos vegetais: o primeiro refere-se ao óleo de amêndoas que utiliza como matéria prima as sementes e contém em sua composição majoritariamente de ácidos graxos saturados e ácidos graxos de cadeia longa. Esse óleo possui efeitos hipoglicemiantes, ação adaptogênica e redução da deposição de ácidos graxos de cadeia média (NUNES, 2018; Nunes et al., 2018). O segundo óleo, o OPB, é composto por flavonoides,  $\beta$ - caroteno e

tocoferóis e ácidos graxos monoinsaturados como o ácido oleico e atua sobre o estresse oxidativo, inflamação e danos genotóxicos (COSTA et al., 2020). Frente a isso, o óleo escolhido para este projeto em questão foi o OPB, devido a suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante.

A escolha do OPB se deu devido aos óleos essenciais possuírem atividades biológicas, como antioxidante e anti-inflamatória, que podem estar correlacionada a modulação de comportamentos. Por exemplo, o consumo do óleo de palma não promove eventos pró-inflamatórios, como o aumento de citocinas pró-inflamatórias, e estresse oxidativo em ratos tratados com ração contendo a parte lipídica de óleo de palma. Este óleo possui, em sua composição, flavonoides e tocoferóis, assim como o OPB (Djohan et al., 2021). O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), que possui em sua composição compostos fenólicos e flavonoides como o OPB, é tem ação antioxidante, eliminando ROS e inibindo a síntese de Il- 6, Il-8, Il- B e TNF-alpha, citocinas sabidamente pró-inflamatórias (Pandur et al., 2022).

O tratamento agudo com 50uL do óleo de *S. lavandulaefolia*, uma das espécies de sálvia, constituído exclusivamente por monoterpenos e 1,8-cineol, pertencente aos grupos dos terpenos, também é capaz de inibir a ação da enzima colinesterase, podendo ser correlacionada a sistemas cognitivos de memória (Kennedy et al., 2010).

O tratamento via inalatória em camundongos utilizando o óleo essencial de laranja, que possui em sua composição flavonoides, carotenoides, terpenos e compostos fenólicos, é capaz de gerar efeito ansiolítico mensurados no teste da caixa claro/escuro sem alterar a concentração de melatonina e corticosterona (Saini et al., 2022; Wolffenbüttel et al., 2018).

Por meio de estudos de coorte, meta-análises e evidências epidemiológicas é possível inferir que a ingestão de insumos que possuem em sua composição compostos fenólicos estão relacionadas à melhora da função cognitiva na meia-idade em voluntários saudáveis e à redução do comprometimento cognitivo e declínio cognitivo em populações idosas (Devore et al., 2012; Kesse-Guyot et al., 2011; Kuriyama et al., 2006; Ng et al., 2008; Nurk et al., 2008)

A quantificação de dienos e trienos presentes nas amostras de OPB fornecem informações acerca da qualidade do óleo. A formação desses compostos está relacionada ao processo de oxidação que pode levar a rancidez do óleo e conseqüentemente um decréscimo de sua qualidade. A metodologia utilizada foi feita a partir da quantificação da presença de dienos e trienos por meio da leitura em comprimentos de onda de 232nm

e 270nm (Kotha et al., 2022). Nossos dados demonstraram valores de 1,97 a 232 nm e 2 a 270 nm, valores próximos ao recomendado para o óleo de oliva. Nossos dados demonstram alta qualidade e estabilidade do óleo utilizado neste projeto (Gallardo-Guerrero et al., 2005).

Em nossas condições experimentais, O OPB parece não ser capaz de modular a proliferação de células hematopoiéticas; entretanto o tratamento subagudo aqui utilizado aparentemente não foi tóxico neste contexto (McKim et al., 2018), corroborando o efeito não tóxico do óleo no estudo de Traesel e colaboradores (2015). Nossos dados demonstraram alta qualidade e estabilidade OPB e estudos prévios mostraram concentração de peróxido de 4,26 meq O<sub>2</sub>/kg, valor dentro do recomendado por órgãos regulatórios internacionais, sendo o valor máximo de peróxido permitido de 15meq O<sub>2</sub>/kg. Com isso, podemos concluir que nossa amostra vegetal não possui processo de oxidação (Gallardo-Guerrero et al., 2005; Lescano, Oliveira, et al., 2015; NUNES, 2018; Nunes et al., 2018).

A modulação da ativação ou inibição de receptores de diferentes neurotransmissores, estímulo à síntese de neurotrofinas fundamentais para a plasticidade sináptica e interações com os receptores de membrana da tirosina quinase representam alvos farmacológicos potenciais de metabólitos secundários presentes de plantas. Em decorrência desses mecanismos, esses grupos químicos podem desempenhar um papel expressivo em diferentes tipos de alterações comportamentais, em especial em contextos que envolvem estresse (Kennedy, 2014; Spencer, 2009; Vauzour, 2014; Williams & Spencer, 2012). O estresse social pode ser capaz de modular sistemas cognitivos (Brewin et al., 2000) e podem ser mimetizados na pesquisa científica por meio do protocolo de derrota social (Kudryavtseva, 1994; MICZEK et al., 2008; Shimamoto, 2018). A metodologia é um protocolo clássico para se estudar estresse em camundongos e envolve o paradigma residente- intruso (Golden et al., 2011; Kudryavtseva et al., 1991; MICZEK et al., 2008).

Os animais C57Bl/6, em geral, demonstram resistência a esse tipo de estresse. No entanto, modificações foram introduzidas para alcançar a padronização de modelos eficazes no estudo do estresse social. Esse modelo revela-se intrigante, uma vez que abrange não somente um componente físico, mas também um componente emocional (Dadomo et al., 2011; Razzoli, Carboni, Andreoli, Ballottari, et al., 2011; Razzoli, Carboni, Andreoli, Michielin, et al., 2011).

Uma alteração fundamental no protocolo envolve um confronto físico entre os animais durante um período de 10 minutos, no qual o animal C57Bl/6 é submetido à agressão e derrota social. Para abranger o aspecto psicológico, o animal permanece em contato com o agressor durante 48 horas, ambos separados por uma barreira mecânica, impedindo possíveis agressões subsequentes (Golden et al., 2011).

Outro ponto importante é que o protocolo de derrota social é feito usualmente de maneira crônica, durante 10 dias, sendo utilizado como modelo para a indução de comportamento do tipo depressivo. Entretanto, de acordo com a periodicidade, é possível definir o protocolo como agudo, quando realizado em apenas uma sessão ou diversas sessões em apenas um dia, quando realizada entre 1 à 7 dias com apenas uma sessão ao dia, ou intermitente, utilizando mais de uma sessão, porém utilizando intervalos bem estabelecidos (Kudryavtseva et al., 1991; MICZEK et al., 2008; Rygula et al., 2008; Shimamoto, 2018). Para execução do projeto em questão foi feito apenas uma derrota social.

Para o delineamento experimental utilizado nesse trabalho foi utilizado a dosagem de 15mg/kg do OPB. Traesel e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento de até 2000 mg/kg administrado via gavagem não causou toxicidade nos animais e não alterou os parâmetros de consciência, atividade e coordenação motora, tônus muscular e reflexos. Não foram observadas alterações nos sistemas nervoso central (SNC) e nervoso autônomo (SNA). Além disso, não foram encontradas alterações morfológicas que indicassem toxicidade nos pulmões, fígado, rins e coração (Traesel et al., 2014). Costa e colaboradores (2020), utilizando a mesma dosagem do OPB do nosso estudo observaram ação anti-inflamatória e antimutagênica deste composto.

Em nossas condições experimentais, o estresse agudo por derrota social não induziu comportamentos do tipo ansioso, não alterou processos mnemônicos relacionados à memória aversiva e não causou anedonia. Da mesma maneira, nossos resultados demonstraram que na dose e tempo empregados no pré-tratamento, O OPB não foi capaz de modular o comportamento do tipo ansioso em relação aos animais não tratados.

Animais que apresentam comportamento do tipo ansioso permanecem e entram um maior número de vezes nos braços fechados do EPM, além de não realizar o comportamento de mergulho, que consiste em o animal esticar o corpo e interagir com o ambiente abaixo do aparato. Quando animais não apresentam comportamento do tipo ansioso, é observado um maior tempo de permanência e um maior número de entrada nos braços abertos do aparato (Walf & Frye, 2007). Camundongos C57BL/6 expostos a

metodologia de derrota social repetida apresentaram comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevada, preferência social por camundongos fêmeas no teste comportamental de preferência sexual, além apresentarem prejuízo de atenção, mensurada por meio do teste de mudança do conjunto de atenção (Higashida et al., 2018).

A derrota social aguda pode modular sistemas cognitivos, além de modular o processo de sono. Animais que passaram pelo protocolo de derrota social aguda apresentaram um maior tempo de sono. Além disso animais privados por 1 e 3 horas de sono logo após o protocolo de derrota social apresentam maior comportamento do tipo ansioso nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado (Fujii et al., 2019; Zhang & Yao, 2019). Ainda, camundongos C57BL/6 classificados com baixo comportamento do tipo ansioso mensurado previamente da execução do estresse agudo de exposição ao cheiro do predador demonstraram baixo comportamento ansioso após a metodologia de estresse, sustentando assim que a diferença comportamental entre os animais varia dentro da própria espécie e demonstra que a modulação pode se dar por uma resiliência a metodologias que causam estresse (Jakovcevski et al., 2008).

Quanto ao teste de condicionamento, os dados obtidos demonstraram a derrota social aguda não foi capaz de causar prejuízos na aquisição, evocação e extinção da memória aversiva, uma vez que no primeiro dia do condicionamento houve a associação entre o estímulo condicionado e o estímulo incondicionado, que fica evidente ao observarmos os dados do primeiro dia dos experimentos em que existe um aumento do comportamento de freezing dos animais no experimento de extinção de memória.

Ao analisar os resultados do segundo e terceiro dia dos experimentos não foram demonstradas diferenças estatísticas no comportamento de freezing dos animais, demonstrando assim que a derrota social aplicada aos camundongos não é capaz de gerar um déficit de extinção da memória aversiva. Além disso, é possível dizer que o tratamento com o OPB não foi capaz de modular o sistema cognitivo relacionado a extinção de memória aversiva.

Em um estudo realizado com pacientes diagnosticados com o transtorno de estresse pós-traumático e transtorno do estresse agudo foi levantada a hipótese que o estresse agudo pode causar um déficit na extinção da memória e na aquisição de novas tarefas em que é necessário utilizar o componente mnemônico (Guez et al., 2011). O mesmo grupo demonstrou que pacientes que são expostos a um estresse agudo apresentam déficit na aquisição e formação de novas memória, além de possuir um déficit

de extinção de memória ligado a fatores que o remetem ao estresse apresentado (Guez et al., 2013).

O teste comportamental de teste de respingo a sacarose foi realizado com intuito de verificar o comportamento de anedonia. O protocolo consistiu em ambientar os animais em uma caixa durante duas horas e após este período, aplicar no dorso do animal uma solução de 10% de sacarose e observar o comportamento de autolimpeza (Bouguiyouud et al., 2022; Isingrini et al., 2010). Em nossas condições experimentais, não observamos diferença estatística no comportamento de autolimpeza entre os grupos. Assim, podemos prever que o protocolo de estresse agudo por derrota social e o tratamento com o OPB não foram capazes de alterar o comportamento de anedonia em camundongos C57Bl/6.

Esta ausência de resultados pode ser justificada pelo tempo de exposição ao estresse. Estudos mostram que o protocolo de derrota social crônica utilizando 5 sessões diárias induz o comportamento de anedonia por meio da avaliação do teste de preferência a sacarose (Riga et al., 2015) assim como o estresse crônico imprevisível realizado por 28 dias foi capaz de gerar comportamento de anedonia mensurado nos testes de nado forçado e exploração de objetos (Strekalova et al., 2004).

Quanto aos efeitos celulares do OPB, o óleo utilizado neste estudo demonstrou atividade *in vitro*. Por meio dos ensaios de DPPH e ABTS foi possível observar que a ação oxidante não é comparada ao controle (trolox); entretanto foi possível analisar um perfil de aumento da porcentagem dos radicais livres a medida que existiu aumento da concentração do extrato. O método de ABTS é baseado na captura de compostos ionizantes de hidrogênio (SRIDHAR & CHARLES, 2019), que demonstrará o resultado alto de absorbância, mudando o aspecto arroxeadado para o amarelado. A metodologia do ensaio de DPPH é baseada na transferência de elétrons, reduzindo o radical ABTS •+. Esse ensaio demonstra quantitativamente a ação de compostos secundários e, na prática, observa-se a mudança colorimétrica, variando da cor azulada para o transparente (Kotha et al 2022).

A diferença entre as metodologias sustenta a hipótese da investigação da atividade antioxidante *in vitro* utilizando dois protocolos e, baseados nesses dados, investigamos a modulação do sistema oxidante *in vivo*.

Os dados demonstraram não haver diferença nas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de GSH no hipocampo e no córtex pré-frontal. Esse evento demonstra que o fator estressante não

foi capaz de gerar modulação no sistema antioxidante, e que o tratamento não é capaz de modular as concentrações de tais moléculas.

O córtex pré-frontal foi escolhido por ser a região encefálica relacionada à resolução de problemas, aprendizado e memória, tomada de decisão e modulação do comportamento social (Dafny & Rosenfeld, 2017). O hipocampo foi escolhido por ser uma região cerebral envolvida principalmente nos processos de aprendizado e memória (Opitz, 2014).

Foi demonstrado que camundongos C57Bl/6 machos alimentados com dieta hiperlipídica tiveram diminuição da concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) e diminuição da translocação nuclear do fator nuclear Kappa B (NFkB) quando tratados com dieta incorporada com o OPB, demonstrando assim atividade antioxidante e anti-inflamatória do OPB (Sant'Ana et al., 2023). Lescano e colaboradores (2015) demonstraram que OPB possui efeito anti-inflamatório observado após realização da metodologia de edema de pata e o tratamento com OPB foi eficaz em diminuir o recrutamento de leucócitos, além de diminuir a formação do edema de pata em ratos Wistar (Lescano, Iwamoto, et al., 2015).

Apesar das evidências na literatura já citadas, nossos dados demonstram que a derrota social realizada em um dia não provocou mudanças no comportamento do tipo ansioso e anedonia nos animais. Especulamos que seja possível que a metodologia apresente como limitação a modulação de sistemas de memórias e vias bioquímicas não estudadas no projeto. Indica-se a execução de metodologias para verificar o efeito do estresse sobre a memória, testes diferentes para investigar se a metodologia aplicada no estudo pode modular o comportamento do tipo ansioso e anedonia. Além disso, convém utilizar novos grupos com um maior tempo de tratamento nos animais a fim de encontrar possíveis alterações.

## **6. CONCLUSÃO**

Os dados encontrados pelas metodologias aplicadas sustentam que o tratamento com OPB não é tóxico e não leva modulação de sistema cognitivos em animais saudáveis não submetidos ao protocolo de estresse. É possível salientar que o protocolo de derrota social aguda não modula o comportamento do tipo ansioso e não causa anedonia nos animais. Além disso a interação dessas variáveis não provoca mudança na memória de extinção, comportamento do tipo ansioso, anedonia e no sistema oxidante dos animais.

Assim, torna-se necessário investigar o efeito comportamental por meio de metodologias diferentes, aumentar o número de animais por grupo e investigar vias bioquímicas que possam ter sido alteradas devido ao estímulo estressor e o tratamento com o fitoterápico.

## REFERÊNCIAS

- Bouguiyou, N., Rouillet, F., Bronchti, G., Frasnelli, J., & Al Ain, S. (2022). Anxiety and Depression Assessments in a Mouse Model of Congenital Blindness. *Frontiers in Neuroscience*, *15*.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.807434>
- Brewin, C. R., Andrews, B., & Valentine, J. D. (2000). Meta-analysis of risk factors for posttraumatic stress disorder in trauma-exposed adults. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, *68*, 748–766.  
<https://doi.org/10.1037//0022-006x.68.5.748>
- COSTA, G. L. A., BUCCINI, D. F., ARRUDA, A. L. A., FAVARO, S. P., & MORENO, S. E. (2020). Phytochemical profile, anti-inflammatory, antimutagenic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. pulp oil. *Food Science and Technology*, *40*(4), 963–971.  
<https://doi.org/10.1590/fst.25319>
- Dafny, N., & Rosenfeld, G. C. (2017). *Chapter 33 - Neurobiology of Drugs of Abuse* (P. M. Conn, Ed.; pp. 715–722). Academic Press.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012802381500052X>
- Devore, E. E., Kang, J. H., Breteler, M. M. B., & Grodstein, F. (2012). Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline. *Annals of Neurology*, *72*, 135–143. <https://doi.org/10.1002/ana.23594>
- Djohan, Y. F., Monde, A. A., Camara-Cissé, M., Badia, E., Bonafos, B., Fouret, G., Lauret, C., Dupuy, A., Pinot, E., Koffi, G., Niamké, G., Sutra, T., Gaillet, S., Lambert, K., Raynaud, F., Gayraud, N., Jover, B., Cristol, J. P., Coudray, C., & Feillet-Coudray, C. (2021). Effects of high-fat diets on inflammation and antioxidant status in rats : comparison between palm olein and olive oil. *Acta Biochimica Polonica*.  
[https://doi.org/10.18388/abp.2020\\_5639](https://doi.org/10.18388/abp.2020_5639)
- Du Preez, A., Eum, J., Eiben, I., Eiben, P., Zunszain, P. A., Pariante, C. M., Thuret, S., & Fernandes, C. (2021). Do different types of stress differentially alter behavioural and neurobiological outcomes associated with depression in rodent models? A systematic review. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *61*, 100896.  
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2020.100896>
- Duarte, F. L. M., da Silva, B. P., Grancieri, M., Sant’Ana, C. T., Toledo, R. C. L., de São José, V. P. B., Pacheco, S., Duarte Martino, H. S., & Ribeiro de Barros, F. A. (2022). Macauba (*Acrocomia aculeata*) kernel has good protein quality and improves the lipid profile and short chain fatty acids content in *Wistar* rats. *Food & Function*, *13*(21), 11342–11352. <https://doi.org/10.1039/D2FO02047E>
- Esch, T., & Stefano, G. B. (2010). The neurobiology of stress management. *Neuro Endocrinology Letters*, *31*, 19–39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20150886/>
- Fujii, S., Kaushik, M. K., Zhou, X., Korkutata, M., & Lazarus, M. (2019). Acute Social Defeat Stress Increases Sleep in Mice. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00322>
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2005). Effect of storage on the original pigment profile of spanish virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, *82*, 33. <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1039-8>
- Gillingham, L. G., Harris-Janzen, S., & Jones, P. J. H. (2011). Dietary Monounsaturated Fatty Acids Are Protective Against Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease Risk Factors. *Lipids*, *46*(3), 209–228. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3524-y>
- Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O., & Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols*, *6*, 1183–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>
- Guez, J., Cohen, J., Naveh-Benjamin, M., Shiber, A., Yankovsky, Y., Saar, R., & Shalev, H. (2013). Associative memory impairment in acute stress disorder: Characteristics and time course. *Psychiatry Research*, *209*, 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.12.013>

- Guez, J., Naveh-Benjamin, M., Yankovsky, Y., Cohen, J., Shiber, A., & Shalev, H. (2011). Traumatic stress is linked to a deficit in associative episodic memory. *Journal of Traumatic Stress, 24*, 260–267. <https://doi.org/10.1002/jts.20635>
- Higashida, S., Nagai, H., Nakayama, K., Shinohara, R., Taniguchi, M., Nagai, M., Hikida, T., Yawata, S., Ago, Y., Kitaoka, S., Narumiya, S., & Furuyashiki, T. (2018). Repeated social defeat stress impairs attentional set shifting irrespective of social avoidance and increases female preference associated with heightened anxiety. *Scientific Reports, 8*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28803-1>
- Hu, C., Luo, Y., Wang, H., Kuang, S., Liang, G., Yang, Y., Mai, S., & Yang, J. (2017). Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PLoS ONE, 12*(9), e0185129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185129>
- Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A.-M., Pingaud, M., Devers, S., & Belzung, C. (2010). Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. *PLoS ONE, 5*, e10404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010404>
- Jakovcevski, M., Schachner, M., & Morellini, F. (2008). Individual variability in the stress response of C57BL/6J male mice correlates with trait anxiety. *Genes, Brain and Behavior, 7*, 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2007.00345.x>
- Kennedy, D. O., Dodd, F. L., Robertson, B. C., Okello, E. J., Reay, J. L., Scholey, A. B., & Haskell, C. F. (2010). Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *Journal of Psychopharmacology, 25*, 1088–1100. <https://doi.org/10.1177/0269881110385594>
- Kesse-Guyot, E., Fezeu, L., Andreeva, V. A., Touvier, M., Scalbert, A., Hercberg, S., & Galan, P. (2011). Total and Specific Polyphenol Intakes in Midlife Are Associated with Cognitive Function Measured 13 Years Later. *The Journal of Nutrition, 142*, 76–83. <https://doi.org/10.3945/jn.111.144428>
- Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E., & Luthria, D. L. (2022). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants, 11*(12), 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>
- Kudryavtseva, N. N. (1994). Experience of defeat decreases the behavioural reactivity to conspecifics in the partition test. *Behavioural Processes, 32*, 297–304. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0376-6357(94)90049-3)
- Kudryavtseva, N. N., Bakshtanovskaya, I. V., & Koryakina, L. A. (1991). Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 38*, 315–320. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90284-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90284-9)
- Kuriyama, S., Hozawa, A., Ohmori, K., Shimazu, T., Matsui, T., Ebihara, S., Awata, S., Nagatomi, R., Arai, H., & Tsuji, I. (2006). Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *The American Journal of Clinical Nutrition, 83*, 355–361. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.355>
- Lescano, C. H., Iwamoto, R. D., Sanjinez-Argandoña, E. J., & Kassuya, C. A. L. (2015). Diuretic and Anti-Inflammatory Activities of the Microencapsulated *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) Oil on Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food, 18*, 656–662. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0077>
- Lescano, C. H., Oliveira, I. P., Silva, L. R., Baldivia, D. S., Sanjinez-Argandoña, E. J., Arruda, E. J., Moraes, I. C. F., & Lima, F. F. (2015). Nutrients content, characterization and oil extraction from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. fruits. *African Journal of Food Science, 9*, 113–119. <https://doi.org/10.5897/ajfs2014.1212>
- McKim, D. B., Yin, W., Wang, Y., Cole, S. W., Godbout, J. P., & Sheridan, J. F. (2018). Social Stress Mobilizes Hematopoietic Stem Cells to Establish Persistent Splenic Myelopoiesis. *Cell Reports, 25*, 2552–2562.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.102>
- MICZEK, K., YAP, J., & COVINGTONIII, H. (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology & Therapeutics, 120*, 102–128. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.07.006>
- Monteiro-Alfredo, T., Matafome, P., Iacia, B. P., Antunes, K. Á., dos Santos, J. M., da Silva Melo da Cunha, J., Oliveira, S., Oliveira, A. S., Campos, J. F., Magalhães, M., Cabral, C., Seça, R., Cardoso, C. A. L., de Oliveira, C. F. R., dos Santos, E. L., & de Picoli Souza, K. (2020). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex

- Mart. Leaves Increase SIRT1 Levels and Improve Stress Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2020/5238650>
- Ng, T.-P., Feng, L., Niti, M., Kua, E.-H., & Yap, K.-B. (2008). Tea consumption and cognitive impairment and decline in older Chinese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 224–231. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.1.224>
- NUNES, A. A. (2018). *Ácidos Graxos de Cadeia Média da Macaúba (Acrocomia aculeata ) Em Modelo experimental de Diabetes Mellitus tipo 2: Fonte de Energia e efeitos sobre metabolismos de Glicose e Lipídeos*. [https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/BRCRIS\\_9d50b6ffc7f7917f246ddbcec2e76ab0](https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/BRCRIS_9d50b6ffc7f7917f246ddbcec2e76ab0)
- Nunes, Â. A., Buccini, D. F., Jaques, J. A. S., Portugal, L. C., Guimarães, R. C. A., Favaro, S. P., Caldas, R. A., & Carvalho, C. M. E. (2018). Effect of *Acrocomia aculeata* Kernel Oil on Adiposity in Type 2 Diabetic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 61–67. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0648-8>
- Nurk, E., Refsum, H., Drevon, C. A., Tell, G. S., Nygaard, H. A., Engedal, K., & Smith, A. D. (2008). Intake of Flavonoid-Rich Wine, Tea, and Chocolate by Elderly Men and Women Is Associated with Better Cognitive Test Performance. *The Journal of Nutrition*, 139, 120–127. <https://doi.org/10.3945/jn.108.095182>
- Opitz, B. (2014). Memory function and the hippocampus. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 34, 51–59. <https://doi.org/10.1159/000356422>
- Palhares, R. M., Baratto, L. C., Scopel, M., Mügge, Fernanda. L. B., & Brandão, M. G. L. (2021). Medicinal Plants and Herbal Products From Brazil: How Can We Improve Quality? *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.606623>
- Pandur, E., Micalizzi, G., Mondello, L., Horváth, A., Sipos, K., & Horváth, G. (2022). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oils Prepared at Different Plant Phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Activated THP-1 Macrophages. *Antioxidants*, 11(7), 1330. <https://doi.org/10.3390/antiox11071330>
- Ramos, M. I. L., Siqueira, E. M. A., Isomura, C. C., Barbosa, A. M. J., & Arruda, S. F. (2007). Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) Improved Vitamin A Status in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3186–3190. <https://doi.org/10.1021/jf063305r>
- Raspe, D. T., Cardozo Filho, L., & da Silva, C. (2013). Effect of Additives and Process Variables on Enzymatic Hydrolysis of Macauba Kernel Oil (*Acrocomia aculeata*). *International Journal of Chemical Engineering*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/438270>
- Riga, D., Theijs, J. T., De Vries, T. J., Smit, A. B., & Spijker, S. (2015). Social defeat-induced anhedonia: effects on operant sucrose-seeking behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00195>
- Rygula, R., Abumaria, N., Havemann-Reinecke, U., Rütther, E., Hiemke, C., Zernig, G., Fuchs, E., & Flügge, G. (2008). Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: effects of reboxetine, haloperidol and diazepam. *Behavioural Pharmacology*, 19, 183–196. <https://doi.org/10.1097/fbp.0b013e3282fe8871>
- Saini, R. K., Ranjit, A., Sharma, K., Prasad, P., Shang, X., Gowda, K. G. M., & Keum, Y.-S. (2022). Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. *Antioxidants*, 11(2), 239. <https://doi.org/10.3390/antiox11020239>
- Sant’Ana, C. T., Verediano, T. A., Grancieri, M., Celi, R., Tako, E., Brunoro, M., Verediano, T. A., & Frederico. (2023). *Macauba (Acrocomia aculeata) Pulp Oil Prevents Adipogenesis, Inflammation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet*. 15, 1252. <https://doi.org/10.3390/nu15051252>
- Shimamoto, A. (2018). Social Defeat Stress, Sex, and Addiction-Like Behaviors. *International Review of Neurobiology*, 140, 271–313. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.07.009>
- Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F. A., & Gass, P. (2004). Stress-Induced Anhedonia in Mice is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration. *Neuropsychopharmacology*, 29, 2007–2017. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300532>
- Traesel, G. K., Castro, L. H. A., Silva, P. V. B., Muzzi, R. M., Kassuya, C. a. L., Arena, A. C., & Oesterreich, S. A. (2015). Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and mutagenic potential of *Acrocomia aculeata* in rats. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14, 585–596. <https://doi.org/10.4238/2015.January.26.13>
- Traesel, G. K., de Souza, J. C., de Barros, A. L., Souza, M. A., Schmitz, W. O., Muzzi, R. M., Oesterreich, S. A., & Arena, A. C. (2014). Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted

- from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 320–325.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.10.026>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2, 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wolffenbüttel, A. N., Zamboni, A., Becker, G., dos Santos, M. K., Borille, B. T., de Cássia Mariotti, K., Fagundes, A. C., de Oliveira Salomón, J. L., Coelho, V. R., Ruiz, L. V., de Moura Linck, V., Dallegrave, E., Cano, P., Esquifino, A. I., Leal, M. B., & Limberger, R. P. (2018). Citrus essential oils inhalation by mice: Behavioral testing, GCMS plasma analysis, corticosterone, and melatonin levels evaluation. *Phytotherapy Research*, 32(1), 160–169. <https://doi.org/10.1002/ptr.5964>
- Worthen, M., & Cash, E. (2021). *Stress Management*. StatPearls Publishing.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020672/>
- Zhang, N., & Yao, L. (2019). Anxiolytic Effect of Essential Oils and Their Constituents: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00433>