**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros
neuroquímicos em ratos induzidos a depressão**

Gizele Bruna Barankevicz

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

Gizele Bruna Barankevicz
Bacharela em Nutrição

**Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em
ratos induzidos a depressão**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. **JOCELEM MASTRODI SALGADO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Barankevicz, Gizele Bruna

Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão / Gizele Bruna Barankevicz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2015.

1. Cúrcuma 2. Depressão 3. Atividade antioxidante 4. Alimentos funcionais I. Título

CDD 633.84
B225p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

À minha família: José Barankevicz e Senhorinha Aparecida Correia Barankevicz, meus pais, Bárbara Barankevicz e Maria Fernanda Correia Barankevicz, irmãs e, Maria Elvira Correia, avó, por todo amor, incentivo, confiança e pelos ensinamentos ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Nem um bilhão de palavras lindas e sentimentais surtiriam o efeito do agradecimento que eu desejo a cada um que se tornou parte desse trabalho.

Que seja feita a tua vontade! E, assim foi, agradeço a deus por ter feito a sua vontade de que essa dissertação pudesse ser concluída em meio aos maremotos e turbulências da minha vida.

Família, imprescindível, única, não consigo mensurar o tamanho do amor e agradecimento, Cida, minha mãe, José, meu pai, Bárbara e Maria Fernanda minhas queridas irmãs, a vocês o meu mais gigantesco e gritante Obrigada, amo vocês.

À Dra. Jocelyne Mastrodi Salgado, minha querida orientadora, agradeço pelos brilhantes ensinamentos, pelas palavras de conforto em dias nublados, coisa rara em Piracicaba e na minha vida também, o meu sincero obrigada pelo voto de confiança e pelo conhecimento que pude adquirir ao seu lado.

À Dra. Fernanda Klein Marcondes, minha segunda orientadora, surgiu em um momento em que o desespero de não conseguir realizar o experimento assolava meu pensamento, meu eterno agradecimento pela abertura de portas em seu laboratório, desejo inúmeras felicitações em sua vida.

Aos membros da banca, que contribuíram com suas considerações e conhecimentos, muito obrigada pelo tempo despendido pra correção deste trabalho.

Aos meus queridos (as) amigos e colegas de laboratório que conheci em Piracicaba: Alan, Fúvia, Maressa e a pequena Helena nosso raio de sol do laboratório, Mariana, Marjory, Richtier, Jéssica Loira, Jéssica Morena, Antonio, Mirian. Muito obrigada por estarem ao meu lado durante a realização dessa dissertação. Agradeço a Patrícia Bachiega, que surpreendentemente tornou-se muito especial em minha vida, seus incentivos para eu concluir esta etapa e ajuda em checar os documentos foram essenciais, muito obrigada Paty.

Aos meus amigos do Paraná que acompanharam a trajetória para realização deste sonho, desde o processo seletivo, saibam que essa amizade e todas as conversas durante esses dois anos foram primordiais para eu conseguir superar essa distância, vocês são essenciais em minha vida: Ana Paula (minha companheira de apartamento, minha adaptação aqui foi muito mais fácil contigo, obrigada pela sua amizade) Clóvis, Kélin, Juliana, Emily, Betina, Luciana, Ana Clara, Débora, Thiago (Dalton) e Mariana é isso aí piazzada!

Em especial à Kélin pelo incentivo e por me convencer a prestar o processo seletivo, além de toda ajuda na estatística, tu sabes que és muito especial, por onde passa cativa o coração de cada um com essa sua bondade que poderia contagiar o mundo.

As minhas queridas estagiárias, minhas pupilas que foram além do seu limite, superaram seu medo de realizar experimento com animais, meu muito obrigada aos meus dois pilares que foram essenciais para realização desse trabalho. Muito Obrigada “Jéssica loira e Jéssica morena”.

Aos membros do Grupo de Estudos em Alimentos Funcionais (GEAF), por toda receptividade, pelo companheirismo e apoio, em especial às estagiárias: Jéssica Loira, Jéssica Morena, Alana e Marina, meu sincero agradecimento.

Agradeço ao pessoal da FOP, Maria Fernanda, Talita, Mel. Em especial Andrea, Rafa e Paty, muito obrigada por fazerem parte da minha vida, agradeço a Deus por ter colocado pessoas especiais em meu caminho, agradeço pelo conhecimento adquirido, pela parceria dos almoços, de análises, enfim, por todo o período que convivi com vocês.

Meu sincero agradecimento ao Fernando, que contribuiu com sua amizade, incentivo e apoio durante os dias nublados e dias ensolarados.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, por toda colaboração durante o desenvolvimento desse trabalho, pelas dúvidas sanadas, em especial à Vana, Helo, Fábio, Ana e Débora.

Aos funcionários da FOP por toda a contribuição nesse trabalho: Eliete, Wanderlei, Feliciano, muito obrigada.

Ao pessoal da academia que suportavam meu mal humor ao final do dia.

A CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Meu sincero agradecimento estende-se a todos que direta ou indiretamente presenciaram essa caminhada para a geração desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão Bibliográfica	15
2.1.1 Cúrcuma	15
2.1.2 Metodologia de Superfície de Resposta	17
2.1.3 Depressão	18
2.1.4 Curcuminoides x Depressão	19
2.1.5 Modelos experimentais de depressão	20
2.1.5.1 Estresse crônico moderado e imprevisível	20
2.1.5.2 Teste de natação forçada.....	21
2.1 Material e Métodos.....	22
2.2.1 Matéria prima	22
2.2.2 Experimento de otimização	22
2.2.2.1 Delineamento experimental	22
2.2.2.2 Processo de extração.....	24
2.2.3 Determinação da atividade antioxidante.....	24
2.2.3.1 Ensaio pelo método DPPH	24
2.2.3.2 Ensaio pelo método ABTS	25
2.2.4 Compostos fenólicos	25
2.2.5 Ensaio <i>in vivo</i>	25
2.2.5.1 Animais.....	25
2.2.5.2 Delineamento experimental.....	27
2.2.5.3 Sessão de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI)	28
2.2.5.4 Avaliação de anedonia - teste de preferência à solução de sacarose 1%	28
2.2.5.5 Teste da Natação Forçada (TNF)	29
2.2.5.6 Coleta das amostras	30
2.2.5.7 Citotoxicidade.....	30
2.2.6 Análise estatística	30
2.3 Resultados e Discussão.....	31
2.3.1 Experimento de otimização	31
2.3.1.1 Atividade antioxidante.....	32
2.3.1.1.2 DPPH.....	32
2.3.1.1.3 Método ABTS	34
2.3.1.3 Compostos Fenólicos.....	35
2.3.2 Resultados do experimento <i>in vivo</i>	37
2.3.2.1 Peso dos animais.....	37
2.3.2.2 Peso do cérebro dos animais.....	38
2.3.2.3 Teste de preferência à solução de sacarose 1%	39
2.3.2.4 Teste de Natação Forçada.....	40
2.3.2.5 Transaminase Oxalacética e Transaminase Pirúvica.....	42
3 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	47

RESUMO

Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) sobre os parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão

A cúrcuma tem despertado grande interesse na indústria de alimentos devido as suas propriedades funcionais, dentre elas sua ação antioxidante e antidepressiva. Há vários relatos da atividade antidepressiva de extratos vegetais e suas substâncias ativas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que futuramente, a segunda maior causa de comprometimento funcional serão os transtornos depressivos, perdendo somente para as doenças coronarianas. Pesquisas mostram que o estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) é considerado um modelo preditivo para a depressão e que modelos animais são amplamente utilizados em estudos pré-clínicos para avaliação de antidepressivos. Dessa forma, faz-se necessário a investigação sobre as propriedades funcionais da cúrcuma, dentre elas sua atividade antioxidante e testes in vivo para demonstrar as possíveis propriedades antidepressivas desse alimento. Assim este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante por meio da metodologia de superfície de resposta e a ação antidepressiva da cúrcuma em pó em um modelo animal. Foi constatado que a atividade antioxidante da cúrcuma pelos métodos de DPPH e ABTS, apresentou significativo potencial antioxidante, O tratamento com cúrcuma em animais submetidos ao protocolo de ECMI não ocasionou diminuição do volume cerebral, como ocorreu com os animais submetidos ao ECMI sem tratamento. Além disso foi observada uma possível ação antidepressiva da cúrcuma no teste comportamental de natação forçada, pois os animais do grupo ECMI+ CÚRCUMA, apresentaram menor tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo ECMI+ VEÍCULO. A cúrcuma não apresentou atividade citotóxica como demonstrado por meio das dosagens de transaminases. Conclui-se neste estudo que, o método de quantificação da atividade antioxidante ABTS obteve valores superiores aos encontrados pelo método DPPH e o tratamento com cúrcuma em animais submetidos ao protocolo de ECMI mostrou-se eficaz para alguns parâmetros. Futuros testes devem ser realizados visando evidenciar essa propriedade antidepressiva por meio de experimentos com um período maior de tempo de tratamento com o composto em estudo.

Palavras-chave: Cúrcuma; Depressão; Atividade antioxidante; Alimentos funcionais

ABSTRACT

Antioxidant power of turmeric (*Curcuma longa* L.) on neurochemical parameters in rats induced depression

Turmeric has aroused great interest in the food industry because of their functional properties, among them its antioxidant and antidepressant action. There are several reports of antidepressant activity of plant extracts and their active substances. The World Health Organization (WHO) estimates that in the future, the second leading cause of disability are depressive disorders, second only to coronary heart disease. Research shows that moderate and chronic unpredictable stress (CMS) is considered a predictive model for depression and that animal models are widely used in preclinical studies to evaluate antidepressants. Thus, the research it is necessary on the functional properties of turmeric, among them its antioxidant activity and in vivo to demonstrate the possible antidepressant properties of the feed. So this study was to evaluate the antioxidant activity through the response surface methodology and the antidepressant action of turmeric powder in an animal model. It was found that the antioxidant activity of turmeric by the methods of DPPH and ABTS, showed significant antioxidant potential treatment turmeric in animals submitted to CMS protocol did not cause a decrease in brain volume, as with the animals submitted to CMS without treatment. Also observed was a possible antidepressant action of turmeric in the behavioral test forced swim, because the animals of ECMI + TURMERIC group presented lower immobility time when compared to the animals of ECMI + VEHICLE group. Turmeric showed no cytotoxic activity as demonstrated by means of serum aminotransferase levels. We conclude this study, the method of quantification of antioxidant activity ABTS obtained values higher than those found by the DPPH method and treatment with turmeric in animals submitted to CMS protocol was effective for some parameters. Further tests should be conducted to demonstrate that antidepressant owned by experiments with a greater period of time of treatment with the test compound.

Keywords: Turmeric; Depression; Antioxidant activity; Functional foods

1 INTRODUÇÃO

Sendo utilizada principalmente como corante natural, a cúrcuma, tem seu uso limitado a essa aplicação devido ao desconhecimento de suas funções terapêuticas em algumas doenças. A cúrcuma tem despertado atenções por suas inúmeras atividades funcionais, dentre elas sua atividade antioxidante e antidepressiva (TILAK et al., 2004; BABU et al., 2007).

Antioxidantes, são amplamente utilizados para proporcionar proteção contra a degradação oxidativa de alimentos. Os compostos antioxidantes possuem a capacidade de varrer os radicais livres aumentando a vida de prateleira, retardando a peroxidação lipídica, uma das principais razões para deterioração de produtos alimentares durante o processamento e armazenamento. Assim surge a necessidade de identificar fontes naturais e seguras como alternativas para os antioxidantes alimentares, e a busca por antioxidantes naturais, principalmente de origem vegetal, que podem proteger o corpo humano contra radicais livres e retardar o progresso de algumas doenças crônicas.

Na última década, a incidência de doenças de desordens psiquiátricas cresceu significativamente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2020, a segunda maior causa de comprometimento funcional serão os transtornos depressivos, perdendo somente para as doenças coronarianas. Os tratamentos dos transtornos depressivos usualmente são os medicamentos e psicoterapias, entretanto existem diferentes mecanismos de ação dos medicamentos antidepressivos os quais variam entre os pacientes, além de ocorrer alta frequências de recorrências da doença. Há a necessidade de estudos com alimentos, considerados funcionais, os quais estão relacionados a redução do risco do desenvolvimento de algumas doenças, como a depressão (MICHELON; CORDEIRO; VALLADA, 2008).

Faz-se necessário, estudos que investiguem as propriedades funcionais da cúrcuma, bem como agente oxidante e seu potencial uso no tratamento da depressão.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante por meio da metodologia de superfície de resposta e a ação antidepressiva da cúrcuma em pó em experimento empregando modelo animal.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Cúrcuma

A utilização de alimentos na prevenção de doenças ou até mesmo no seu tratamento é considerada há milhares de anos. Entretanto, apenas no final do século passado ocorreu renovação acentuada no interesse por esse assunto, e o termo "alimento funcional" tornou-se amplamente utilizado. As pesquisas intensificaram-se e o conceito de alimento funcional tornou-se conhecido entre o público leigo e pesquisadores que até então não estavam envolvidos com estudos nesta área (SIRÓ et al., 2008).

Sendo considerado um alimento funcional atualmente, a *Curcuma longa* L., também conhecida como cúrcuma, gengibre dourado ou açafrão da Índia, é uma espécie originária do sudeste asiático, pertencente à família das Zingiberaceae. É uma planta de pequeno porte que mede aproximadamente 1 m e amplamente cultivada nos países asiáticos. Tem sido utilizada há tempos como alimento na forma de especiaria, devido ao seu forte sabor e à sua coloração amarelada marcante (VILELA; ARTUR, 2008).

A cúrcuma é o rizoma em boas condições, seco e moído da *Curcuma longa* L. Seu rizoma pode medir até 10 cm de comprimento e quando cortado possui odor agradável. É a partir da sua raiz que se obtém o pó de cor amarela, utilizado na culinária (PEREIRA; MOREIRA, 2009). É uma das 70 espécies do gênero Cúrcuma sendo cobiçada pelas indústrias química e alimentícia, devido à sua utilização como tempero e possibilidades de aplicação de seu extrato como corante natural (TILAK et al., 2004 ; BABU et al., 2007).

Sua produção ocorre em quase todas as regiões do Brasil sendo os estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás os maiores produtores. A produção do açafrão em Mara Rosa – GO, é realizada por pequenos agricultores familiares, os quais garantem sua renda parcial ou total do cultivo do açafrão (ANDRADE, 2004).

Mara Rosa atualmente possui o maior plantio comercial de açafrão com aproximadamente 300 hectares e uma produtividade média de 6t/ha de açafrão seco por hectare. A maior parte da produção é quase toda destinada às indústrias nacionais de alimentos e corantes. O açafrão produzido em Mara Rosa, já possui o selo de identificação geográfica, o que garante a origem do produto, atribuído há séculos na Europa.

A cúrcuma foi isolada do rizoma da planta *Curcuma longa* L. pela primeira vez em 1815, e obtida em forma cristalina em 1870; é um pó amarelo-laranja, insolúvel em água e éter, mas solúvel em etanol e acetona (GOEL; KUNNUMAKKARA, 2008).

Por possuir flavor característico, a cúrcuma, apresenta sabor amargo e aroma picante, sendo classificada como especiaria na maioria das classificações (AOAC, 1995).

Sua utilização deve-se principalmente a sua cor, sabor e efeito conservante no tradicional curry indiano. Comercialmente, a cúrcuma é utilizada como uma especiaria, corante, e uma fonte de amido industrial. Os componentes químicos da *Curcuma longa* L., possuem atividade antimicrobiana e antioxidante significativa (NAM et al., 2014). Sua alta atividade antioxidante está correlacionada ao número de grupos hidroxilas na estrutura do seu anel aromático (ROSSI et al., 2008; HAMAGUCHI; ONOL; YAMADA, 2010).

Possui em maior proporção o amido, e em menor quantidade proteína, lipídeos e fibras, além dos pigmentos curcuminoides e óleos essenciais. Existem três produtos comerciais da cúrcuma disponíveis, a cúrcuma em pó, a oleoresina e a curcumina purificada, sendo estes utilizados como corante para alimentos e bebidas, como flavorizante e como medicamento (GOVINDARAJAN, 1980; MESA et al., 2000).

Na indústria alimentícia, suas qualidades permitem que sejam empregadas a utilização de seu amido para bolos, corantes de macarrões, mostardas, sorvetes, queijos, ovos, salgadinhos tipo “chips”, margarinas e carnes. Nestes dois últimos alimentos a cúrcuma poderá no futuro ser utilizada com a finalidade de antioxidante (NOGUEIRA, 2010).

Em relação aos pigmentos curcuminoides a planta é considerada rica em curcumina e outros curcuminóides, como a desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, estes compostos são responsáveis pela coloração amarela do rizoma do açafrão. O composto majoritário, entretanto, é a curcumina (ORSOLIN; NEPOMUCENO, 2009; ZHANG et al., 2009).

A curcumina possui múltiplas características relevantes que podem justificar o interesse nesta espécie como alternativa neuroprotetora, incluindo as atividades antioxidante, antiinflamatória e antiproliferativa (AGGARWAL, HARIKUMAR, 2008; BEGUM et al., 2008).

2.1.2 Metodologia de Superfície de Resposta

Determinados alimentos vegetais apresentam sua eficiência antioxidante com base na presença de compostos fenólicos. Esta composição, estrutura química e os efeitos interativos devem ser levados em consideração, como a composição da solução extratora, tempo de extração, temperatura, pH (MOURE et al., 2001; CACACE; MAZZA, 2002).

Com isso, observa-se que com a utilização do planejamento experimental e a análise da superfície de resposta, pode-se investigar quais são as influências das variáveis em um processo e a forma de interação entre elas e, obter o valor das variações que otimizem os resultados.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica de otimização, útil para o desenvolvimento e otimização de processos. Há um crescente aumento na utilização desta metodologia na área de ciência e tecnologia de alimentos, por se apresentar como uma técnica de fácil uso e eficaz (BOX; DRAPER, 1987; KARACABEY; MAZZA, 2010).

Baseada no emprego de planejamentos fatoriais, a MSR é uma técnica que foi introduzida na década de 50, e vem sendo utilizada na modelagem de inúmeros processos industriais (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). Com relação à análise variância de um modelo, parte da variação total em torno da média é escrita pela equação de regressão, já o restante pertence ao resíduo, desta forma, quanto maior a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo aos dados que pretende-se otimizar (BARROS NETO; SCARMINIO, BRUNS, 2001).

O teste F é dado pela razão entre o F calculado e F tabelado, esta relação só é considerada estatisticamente significativa quando é maior que 1. Contudo, para que uma regressão não seja estatisticamente significativa, mas também apresente fins preditivos, o valor dessa razão deve ser maior que 4 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

A economia de tempo e recursos financeiros apresentam-se como principais vantagens do uso da MSR, as quais são proporcionadas pelo delineamento gerando curvas “iso-resposta”, as quais possibilitam a obtenção de um mesmo resultado em diferentes proporções entre as variáveis estudadas, sem a necessidade de repetição dos ensaios experimentais (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

2.1.3 Depressão

No Brasil, a prevalência de transtornos mentais na população é de aproximadamente 3%. Esses números indicam para uma demanda de cerca de cinco milhões de pessoas, que necessitam de cuidados contínuos no âmbito de saúde mental. Além disso, cerca de 10 a 12% da população sofrem com transtornos menos graves, que necessitariam de algum cuidado, na forma de orientação ou consulta médico-psicológica (RIBEIRO; INGLEZ-DIAS, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2020, a segunda maior causa de comprometimento funcional serão os transtornos depressivos, perdendo somente para as doenças coronarianas. Esta projeção está associada à alta prevalência de sintomas depressivos na população, o que ressalta a necessidade da familiarização de equipes da saúde com o diagnóstico e tratamento desta problemática de saúde pública (MICHELON; CORDEIRO VALLADA, 2008).

Atualmente a depressão no Brasil e no mundo está associada à perda de dias de trabalho e afastamento do mesmo, como consequente queda na produtividade, má qualidade de vida e, um grave sofrimento psíquico e físico que pode levar até a morte por suicídio (TENG; CEZAR, 2010). A maioria dos casos depressivos tem seu início entre os 20 e 40 anos, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária (MICHELON; CORDEIRO; VALLADA, 2008).

Segundo o DSM V-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) a depressão é uma desordem psiquiátrica. O indivíduo apresenta obrigatoriamente estado deprimido ou sintomas depressivos relacionados. Definido como sentir-se deprimido a maior parte do tempo, o estado deprimido gera falta de motivação para tarefas cotidianas, pelo período maior que duas semanas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013)

Os principais sintomas da depressão caracterizam-se por humor deprimido, anedonia (perda de prazer), e sentimentos de inutilidade ou culpa. Também incluem sintomas somáticos, como perda de apetite, distúrbio de sono, retardo psicomotor, alteração da expressão facial, alteração de apetite, falta de concentração e memória prejudicada (AARSLAND et al., 2012).

O diagnóstico da depressão apresenta-se como um desafio. Deve-se diferenciar a depressão de sintoma e depressão de síndrome. Esse desafio pode atrapalhar as entrevistas clínicas estruturadas que são utilizadas para diagnosticar o transtorno depressivo maior (FEINSTEIN et al., 2014).

A etiologia da depressão não está bem esclarecida, sendo atribuídos inúmeros fatores, dentre eles, fator hereditário, história familiar e situações estressantes (TENG; CEZAR, 2010).

Algumas evidências indicam que a depressão está relacionada a alterações estruturais decorrentes da plasticidade sináptica em regiões específicas do cérebro. Embora esses mecanismos de sinalização básicos estejam sendo estudado, o seu potencial para aplicação no tratamento clínico da depressão recebe pouca atenção. Neste contexto as investigações voltadas para esta área são extremamente necessárias para identificar quais os agentes eficazes no tratamento da doença (HIDAKA, 2012; LUO et al., 2013).

2.1.4 Curcuminoides x Depressão

A Índia vem sendo privilegiada com inúmeras plantas medicinais e estas estão sendo utilizadas em sua medicina tradicional há alguns anos. Em suma, grande parcela desses produtos vegetais está incluído na alimentação diária, sob a forma de especiarias principalmente e, são conhecidos por possuírem ação antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, anticancerígeno. Porém, os detalhes sobre suas especificidades ainda são desconhecidos, atraindo pesquisadores a explorar mais neste ramo (RAWAL et al., 2014).

Estudos vêm sendo realizados em diversas áreas sobre as propriedades funcionais da cúrcuma. Xia et al. (2007) analisaram os efeitos neuroquímico e neuroendócrino do extrato etanólico de *Curcuma longa* L. em ratos submetidos ao teste da natação forçada e verificaram que o extrato pode ter ação antidepressiva, pois reduziu o tempo de imobilidade dos animais. Xu et al. (2005) também relataram a atividade antidepressiva da curcumina.

A Curcumina um composto fenólico, é o principal curcuminóide encontrado na *Curcuma longa* L., possui propriedades antioxidantes despertando desta forma interesse na indústria de alimentos, como corante, e farmacêutica, além de ser amplamente usado na culinária e na medicina tradicional das culturas chinesa e indiana (AK; GÜLÇİN, 2009).

Esse composto é altamente lipofílico, o que lhe confere a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (ROSSI et al., 2008).

A administração crônica de curcumina reverteu a redução dos níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) induzida pelo estresse crônico em animais de experimentação (XU et al., 2006). Neste contexto, outro estudo realizado em modelo animal, verificou que os curcuminóides presentes na cúrcuma apresentaram ação neuroprotetora,

aumentando os níveis de enzimas antioxidantes, como por exemplo, a glutathiona peroxidase e a superóxido dismutase (AGRAWAL et al., 2012).

2.1.5 Modelos experimentais de depressão

Modelos animais são amplamente utilizados em estudos pré-clínicos para avaliação de antidepressivos (GARCIA, 2002). Um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo a depressão é o estresse crônico. São considerados importantes ferramentas para investigar a etiologia da depressão e seus progressos no desenvolvimento de alvos terapêuticos eficazes em seu tratamento. No entanto, apesar da grande valia em suas contribuições apresentam algumas limitações, pois não se pode observar sentimentos de culpa, pensamentos suicidas nos animais, sintomas restritos aos humanos. O principal desafio é a escassez de modelos animais validados (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010; NESTLER; HYMAN, 2010).

Porém, faz-se necessário a utilização de animais para a pesquisa de doenças humanas, pois o avanço da fisiologia e da fisiopatologia foi permitido por meio da experimentação animal, e muitas inovações em saúde humana foram possíveis devido à utilização de animais. Os resultados obtidos fornecem informações relevantes para a decisão sobre tratamentos que devem ser considerados em ensaios clínicos (SAVLA, 2003; ROBERTS et al., 2002).

2.1.5.1 Estresse crônico moderado e imprevisível

O estresse crônico, considerado um dos principais fatores ambientais que predis põem a depressão, caracteriza 60% dos casos de episódios depressivos que são precedidos por diferentes situações de estresse, especialmente de origem psicossocial (SIEGRIST et al., 2012).

O ECMI envolve a exposição a diferentes estímulos estressores, como imobilização, privação de água e comida, noite em maravalha úmida, ocasionando a elevação mantida dos níveis de corticosterona e estado de anedonia, que pode ser verificado pela diminuição no consumo por solução doce. (MOREAU et al., 1993; MOREAU, 1997; WILLNER, 2005, CHEN; PANDEY; DWIVEDI, 2006). Um dos principais sintomas da depressão em seres humanos é anedonia, que é a redução do interesse ou prazer nas atividades diárias (KATZ; ROTH; CARROLL, 1981; ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013).

Os roedores geralmente adaptam-se a aplicação repetida de estímulos estressores, todavia, isto não ocorre se o estímulo é imprevisível, como no caso no estresse crônico moderado e imprevisível (MOREAU et al., 1993, WILLNER, 2005).

Os protocolos de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) constituem um modelo com validade preditiva para estudos de mecanismos envolvidos na depressão (MOREAU et al., 1993; WILLNER, 2005).

Responsável pelo controle da síntese e liberação dos glicocorticoides, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, realiza um papel fundamental em resposta aos estímulos internos e externos, abrangendo os estressores psicológicos. A liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo e seu transporte para a pituitária anterior corresponde a uma resposta característica ao estresse. O CRH incita a secreção do hormônio adrecorticotrófico (ACTH), que incentiva a síntese e liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea, cortisol em humanos e corticosterona em ratos (GILLESPIE; NEMEROFF, 2005).

A exposição ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico moderado ocasiona a hipertrofia da glândula adrenal (KONARSKA, STEWART, MCCARTY, 1990; HARRO et al., 2001; LUCCA et al., 2008; GARCIA et al., 2009; LUCCA et al., 2009), o que ocasiona um aumento nos níveis de corticosterona (LUCCA et al., 2008, GARCIA et al., 2009).

Em estudo realizado por Neves et al. (2012), os quais realizaram o protocolo de ECMI, verificou que os efeitos do estresse, e a elevação mantida de corticosterona foram observados em até 15 dias após o protocolo, indicando a validade preditiva do modelo para o estresse crônico.

Devido à essas características, muitos investigadores utilizam o ECMI para estudar a neurobiologia da depressão e elucidar novos alvos terapêuticos.

2.1.5.2 Teste de natação forçada

O teste de natação forçada, aceito como um modelo preditivo de depressão verifica a imobilidade dos animais na água, o qual é um fenômeno relativamente específico e reproduz alguns aspectos da depressão em humanos, como a imobilidade e a hipotermia (PORSOLT; LE PICHON, JALFRE, 1977).

O teste foi desenvolvido como um modelo animal de depressão com objetivo de medir os efeitos dos compostos antidepressivos em camundongos, e sugere que a imobilidade reflete um estado depressivo no qual os animais não encontram mais uma saída, e se resignam a tal situação (PORSOLT, LE PICHON, JALFRE, 1977). O tempo de imobilidade corresponde ao

desamparo aprendido, análogo ao estado de depressão humana (PORSOLT; LE PICHON, JALFRE, 1977; CALIL et al., 2002; 2006; LIU et al., 2007).

Neste teste, ocorre uma sessão preliminar com duração de quinze minutos, o animal é colocado em um cilindro cheio de água, sendo incapaz de sair. A priori o animal nada em torno das bordas tentando escapar, mas, após alguns minutos, os movimentos são menores, e o animal passa a boiar, adotando uma postura de imobilidade, que se caracteriza pela ausência de movimentos, nado ativo, exceto movimentos com intuito de manter a cabeça acima do nível da água, esse comportamento corresponde ao desamparo aprendido, análogo ao estado da depressão humana. Após 24 horas da sessão preliminar os animais são submetidos ao teste com duração de cinco minutos (PORSOLT, LE PICHON, JALFRE, 1977; CALIL et al, 2002; CALIL, MARCONDES, 2006; ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013).

. A administração repetida dos antidepressivos eficazes reduz a duração da imobilidade em ratos e em camundongos. Desta forma, o tratamento com antidepressivos em ratos tratamento parece ser mais seletivo, enquanto em camundongos parece ser mais sensível (BORSINI; MELI, 1988).

2.1 Material e Métodos

2.2.1 Matéria prima

A cúrcuma (*Curcuma longa* L) foi adquirida sob a forma de pó, da Cooperativa dos Produtores de Açafrão de Mara Rosa-Goiás e foi mantida em temperatura ambiente a 25°C, em sacos de polietileno ao abrigo da luz.

2.2.2 Experimento de otimização

2.2.2.1 Delineamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial 2 x 2 para estudar o processo de extração dos compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato da cúrcuma em pó, em 12 extratos realizados segundo as faixas de estudo e o delineamento experimental (Tabela 1 e 2). As duas variáveis independentes foram relação etanol: água (% etanol v/v) e agitação (0 a 135 minutos).

Tabela 1 - Faixas de estudo das variáveis explanatórias em análise

Variável explanatória	Nível de variação				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Agitação	0	15	55	95	135
Etanol (%)	0	15	50	85	100

Alfa=1,41, para k=2 variáveis independentes

Utilizou-se metodologia de superfície de resposta, pois é uma técnica para modelagem e análise de um experimento na qual a resposta de interesse pode ser influenciada por diversas variáveis. O objetivo foi definir as condições ótimas de extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante da cúrcuma em pó, por meio do ajuste do modelo matemático de segunda ordem, incluindo termos lineares, quadráticos e as interações entre as variáveis independentes. O modelo obtido foi avaliado com base no coeficiente de determinação (R^2) e o teste F, realizado por meio da análise de variância com auxílio do aplicativo “Statistica 10.0” (StatSoft, Inc. 2010).

Tabela 2 – Delineamento experimental para o estudo das variáveis etanol e agitação sobre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante

Ensaio	Variáveis explanatórias			
	% etanol		Agitação	
	Valor codificado	Valor Real	Valor codificado	Valor Real
1	-1	15	-1	15
2	+1	85	-1	15
3	-1	15	+1	95
4	+1	85	+1	95
5	0	50	0	55
6	0	50	0	55
7	0	50	0	55
8	0	50	0	55
9	-1,41	100	0	55
10	+1,41	0	0	55
11	0	50	-1,41	0
12	0	50	+1,41	135

2.2.2.2 Processo de extração

Para a preparação dos 12 extratos, preparados segundo o delineamento experimental da metodologia de superfície de resposta foram pesados 2,5 g da cúrcuma em pó, em tubos Falcon de 50 mL. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 25 mL da mistura etanol: água (v/v). A extração foi realizada em mesa agitadora (Modelo ET-1401, Tecnal, Brasil), protegida da iluminação a temperatura ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$). A relação etanol: água e o tempo de agitação foram estabelecidos por meio do planejamento experimental (Tabela 2). Posteriormente foram centrifugados a 1956,2 g por 15 minutos em centrífuga (Modelo NT 825 – Nova Técnica, Brasil) e filtrados em papel filtro e os sobrenadantes armazenados em frascos âmbar, protegidos da luz e armazenados à temperatura de -20°C , por 7 dias para posterior realização das análises de atividade antioxidante e compostos fenólicos.

2.2.3 Determinação da atividade antioxidante

Diversos métodos são utilizados para a determinação da atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas, com fundamentos e mecanismos de ação muito diferentes. Existe uma ampla divergência dos resultados de testes com antioxidantes em alimentos e as matrizes alimentares, como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, são constituídas por inúmeros compostos que apresentam polaridades diferentes, tornando difícil a escolha de um único método apropriado. Nesse contexto, o trabalho empregou dois métodos químicos para avaliar o potencial antioxidante: capacidade de sequestro do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical e 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS).

2.2.3.1 Ensaio pelo método DPPH

A medida da capacidade sequestrante determinada pelo método DPPH tem como finalidade a avaliação da atividade antioxidante de extratos ou alimentos e baseia-se na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Para este método uma alíquota de 500 μL da diluição (1:11) reagiu com 300 μL do radical DPPH por 45 minutos. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 517 nm. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μM Trolox 100 g^{-1} amostra e os valores calculados segundo equivalência a curva padrão de Trolox.

2.2.3.2 Ensaio pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizada conforme a metodologia da EMBRAPA (2007). O radical ABTS foi formado por meio da reação da solução ABTS^{•+} 7 mM com a solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Para este método uma alíquota de 20 µL da diluição (1:11) que reagiu com 2,0 mL do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 minutos da reação, em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 734 nm e para a construção da curva padrão foi utilizado o antioxidante Trolox, nas concentrações de 100 – 2000 µM. Os resultados foram expressos em µM Trolox 100 g⁻¹ amostra.

2.2.4 Compostos fenólicos

A análise de compostos fenólicos nos extratos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia proposta por Sigleton; Rossi (1965) e modificada por Woisky; Salatino (1998), utilizando ácido gálico como padrão. Sendo uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos, o reagente Folin-Ciocalteu oxida fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W.

Uma alíquota de 0,5 mL de extrato da diluição (1:11) foram transferidos para um tubo de ensaio e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada 1:10. A mistura foi agitada em agitador de tubos de ensaio (Modelo MX-F – LAB 1000) e deixada em repouso de 3 a 8 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 mL de uma solução de carbonato de sódio 4% e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 740 nm. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos mg de ácido gálico 100 g⁻¹ amostra, com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentrações variando de 10 a 100 µg mL⁻¹.

2.2.5 Ensaio *in vivo*

O experimento com animais foi realizado na Universidade Estadual de Campinas-Faculdade de Odontologia de Piracicaba-SP.

2.2.5.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos machos Sprague-Dawley SPF (“specific pathogen free”), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB),

os animais chegaram com um mês de idade e foram mantidos em adaptação até completarem dois meses de idade para o início do período experimental. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba em gaiolas individuais com maravalha autoclavada, rack ventilado para ratos Alesco® (Figura 1), sala climatizada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e, com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 07:00h). Durante todo o protocolo os animais receberam água filtrada e ração *ad libitum*, com exceção do período de jejum para realização do teste de preferência à sacarose e do protocolo de ECMI. Foi extremamente controlada a entrada no biotério, permitida apenas para o experimentador responsável pelo projeto e dois auxiliares, vestidos adequadamente com jaleco, luvas, máscara e proteção para os pés. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp - Protocolo CEUA nº3352-1 – de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Figura 1 - Rack ventilado para ratos Alesco® e gaiolas individuais

2.2.5.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

Figura 2 - Esquema do delineamento experimental do ensaio biológico

C + VEÍCULO: controle+ óleo de milho; C+CUR: controle+ cúrcuma dissolvida no óleo de milho; ECMI + VEÍCULO: estresse crônico moderado e imprevisível + óleo de milho; CURC+ ECMI: cúrcuma dissolvida no óleo de milho + estresse crônico moderado e imprevisível;

Os animais foram analisados durante 8 semanas do protocolo experimental. O peso corporal foi registrado uma semana antes do início experimental e semanalmente foi realizado até o final do protocolo.

A cúrcuma em pó foi dissolvida no óleo de milho e sua concentração utilizada foi de 50 mg/kg/peso, segundo estudo de Sengupta, Sharme e Chakraborty (2011). Os demais grupos recebiam a solução veículo que era composta por óleo de milho. A via de administração foi a gavagem, utilizou-se um volume que não excedia 2 mL para cada 100g de peso corporal do animal, ambos os procedimentos foram realizados a partir da primeira semana experimental, no mesmo horário, durante cinco dias por semana. Nos grupos submetidos ao estresse estes procedimentos foram realizados antes da aplicação estímulo estressor. A aplicação do protocolo de estresse foi realizado nas semanas 3, 4 e 5 de acordo com a Tabela 3. Na 6ª semana os animais foram submetidos ao teste de natação forçada

(TNF). Na 8ª semana do protocolo experimental os animais foram sacrificados por decapitação, para coleta de sangue e posterior dosagens sanguíneas.

2.2.5.3 Sessão de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI)

Na 3ª, 4ª e 5ª semanas, os animais dos grupos ECMI+CURC e ECMI+VEÍCULO foram submetidos ao protocolo de ECMI (Tabela 3) modificado de acordo com Neves et al. (2009; 2012) de acordo com metodologia descrita por Moreau et al. (1993). O protocolo de ECMI consistiu na aplicação de diferentes estímulos estressores, como imobilização dos animais, período com iluminação contínua durante uma noite, período de pernoite sob privação de comida e água, período de pernoite sob privação de água e comida imediatamente seguida por 2 horas de exposição à garrafa de água vazia. Após esses procedimentos os animais ainda foram submetidos a um pernoite em gaiola com maravalha úmida (100 mL de água distribuída na maravalha), e manutenção em ciclo claro/escuro invertido por 2,5 dias.

Tabela 3 - Protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível

	Manhã	Tarde
Segunda-feira	8:00 – 9:00 h: imobilização	13:00-14:00 h: imobilização 18:00 h: iluminação contínua durante a noite
Terça-feira	8:00 – 9:00 h: imobilização	14:00 - 15:00 h: imobilização seguida de privação de água e comida durante 18 horas
Quarta-feira	-	13:00 - 14:00 h: imobilização seguida de privação de água durante 18 horas
Quinta-feira	8:00 – 10:00 h: exposição a garrafas de água vazias. 11:00 – 12:00 h: imobilização	14:00 - 15:00 h: imobilização 18:00h: pernoite em gaiolas com maravalha úmida.
Sexta-feira	8:00 – 9:00 h: imobilização	18:00 h: ciclo claro/escuro invertido

Durante a aplicação do protocolo de ECMI, a imobilização dos animais foi realizada em garrafas pet de 600 mL, limitando totalmente a movimentação

2.2.5.4 Avaliação de anedonia - teste de preferência à solução de sacarose 1%

A preferência à sacarose em ratos foi testada semanalmente, às 4ªs feiras, durante o protocolo experimental, com o objetivo de avaliar se houve o desenvolvimento de anedonia

(perda da capacidade de responder a estímulos prazerosos). No dia do teste, todos os animais foram privados de água e comida durante 18 horas. Os ratos receberam duas garrafas de água, uma contendo uma solução de sacarose 1% e outra contendo apenas água filtrada. A posição das garrafas foi determinada aleatoriamente. Após 2 horas de exposição às garrafas, a quantidade de cada solução consumida foi determinada por meio da pesagem das garrafas e a preferência pela sacarose foi calculada ($100 \times \text{consumo de sacarose} / \text{consumo total de líquido}$) (GRIPPO; JOHNSON, 2002).

2.2.5.5 Teste da Natação Forçada (TNF)

Na 6ª semana, os animais foram submetidos, individualmente, ao TNF, entre 08:00 e 12:00h, em um tanque de acrílico medindo 20cm x 20cm x 50cm com 30 cm de água a 25°C. O TNF é constituído de duas sessões de natação: a primeira sessão consistiu no pré-teste, no qual os animais foram submetidos a 15 minutos de natação (PORSOLT, LE PICHON, JALFRE, 1977). Após a sessão, os animais foram retirados da água, secos com uma toalha e mantidos próximos a um aquecedor de ambiente.

Após estarem completamente secos (cerca de 30 minutos), os ratos foram recolocados em suas gaiolas e transportados ao biotério de experimentação. No dia seguinte, 24 horas após a primeira sessão, os animais foram novamente submetidos à natação, nas mesmas condições, durante 5 min.

Durante a sessão do Teste da natação forçada (duração de 5 minutos) os animais foram filmados e o comportamento de cada animal foi analisado por um indivíduo treinado em estudo cego, que assistiu aos vídeos com o auxílio de dois cronômetros, sendo um utilizado para cronometrar os cinco minutos do teste e outro para avaliar a imobilidade. Foram analisados tempo de mobilidade, nado e imobilidade, sendo considerados imobilidade a ausência de nado ativo e pequenos movimentos realizados com intuito de manter a cabeça fora da água (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática de mobilidade e imobilidade no teste de natação forçada.

Fonte: Adaptado de Abelaira; Réus; Quevedo (2013).

2.2.5.6 Coleta das amostras

Ao final da 8ª semana, os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos com anticoagulante (EDTA e heparina) e sem anticoagulante e, centrifugado em seguida. O cérebro foi isolado para pesagens. As amostras foram congeladas a -80°C para posteriores análises.

2.2.5.7 Citotoxicidade

A dosagem dos marcadores de dano isquêmico hepático, transaminase oxalacética e transaminase pirúvica (TGO e TGP) foram determinadas pelo ensaio enzimático colorimétrico utilizando-se kits comerciais da LaborLab®. Foi utilizado o soro o qual foi adicionado à uma solução de reação que foi incubada a 37°C durante 30 minutos para TGP E 60 minutos para TGO, e a absorbância da solução foi determinada a 505 nm utilizado um leitor de microplacas.

2.2.6 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de homogeneidade das variâncias (Box-Cox) e normalidade dos dados (Shapiro-Wilk) e, quando indicado pelos testes, foram realizadas as transformações necessárias para então proceder a análise de variância. Os dados obtidos semanalmente foram submetidos separadamente à análise de variância bifatorial (ANOVA), utilizando o software

SAS (SAS/STAT, 2003). Os dados que apresentaram diferença significativa pelo teste F foram submetidas ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a comparação de médias.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Experimento de otimização

Os efeitos das variáveis agitação e concentração de etanol foram estudados para a otimização da extração de compostos fenólicos e determinação da atividade antioxidante dos extratos da cúrcuma em pó. As respostas obtidas nos 12 ensaios, em ordem experimental aleatorizada estão mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de compostos fenólicos, DPPH e ABTS dos extratos de cúrcuma em pó

Ensaio	Variáveis explanatórias				
	% etanol	Agitação	Fenólicos (mg de ácido gálico 100 g ⁻¹)	DPPH (μ M Trolox 100 g ⁻¹)	ABTS (μ M Trolox 100 g ⁻¹)
1	-1	-1	2,35	95,99	59,69
2	+1	-1	14,21	26,08	1175,5
3	-1	+1	2,36	80,19	47,59
4	+1	+1	9,83	31,12	455,13
5	0	0	17,76	34,26	475,46
6	0	0	9,90	22,59	248,52
7	0	0	14,49	28,69	315,66
8	0	0	19,54	31,98	392,69
9	-1,41	0	3,44	85,19	150,19
10	+1,41	0	27,10	46,86	515,46
11	0	-1,41	11,037	10,83	119,20
12	0	+1,41	13,27	24,90	273,99

* valores expressos como médias de triplicatas

Foi aplicada a metodologia de superfície de resposta nos resultados obtidos e foram calculados os coeficientes de regressão das equações de segunda ordem. Os modelos foram ajustados considerando somente os efeitos estatisticamente significativos.

2.3.1.1 Atividade antioxidante

2.3.1.1.2 DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante através do método DPPH, a variável agitação não apresentou influência para a avaliação da atividade antioxidante. O modelo apresentou um coeficiente (R^2) obtido para o modelo foi de 0,83, evidenciando que a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 83%.

A equação demonstra a atividade antioxidante pelo método de DPPH em função da concentração de etanol(x) é: $DPPH = 28,9733 - 21,6949 \times (\% \text{ etanol}) - 22,2247 \times (\% \text{ etanol})^2$. A agitação linear, agitação quadrática e interação etanol *versus* agitação não foram significativas ($p \geq 0,05$).

Na Tabela 5 pode se observar a análise de variância para o modelo ajustado e verificou-se que a regressão apresentou significância estatística ($p < 0,05$) e, apesar de a razão $F_{\text{calculado}}$ por F_{tabelado} de 4,52, este modelo não pode ser utilizado para fins preditivos, pois a falta de ajuste também foi significativa.

Tabela 5 – Análise da variância para o modelo ajustado

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Teste F
Regressão	6783,205	2	3391,603	20,14668*
Resíduo	1346,764	8	168,3455	
Falta de ajuste	1331,0850	6	221,8475	28,29868*
Erro puro	15,6790	2	7,8395	
Total	8129,9690	10		

$R^2 = 0,83$ $F_{0,95;2;8} = 4,46$ $F_{0,95;6;2} = 19,33$

*estatisticamente significativo a $p < 0,05$

A Figura 5 apresenta a superfície de resposta para a capacidade de sequestro de radicais livres pelo método de DPPH em função do etanol.

Figura 5- Superfície de resposta para atividade antioxidante pelo método DPPH em função da concentração de etanol (%) e agitação

Pode-se observar que neste experimento, o aumento da atividade antioxidante do DPPH foi acompanhado pelo decréscimo da concentração de etanol, em qualquer nível de agitação. Observou-se que em extratos aquosos, a atividade sequestrante do radical livre DPPH foi superior, quando comparada a extratos etanólicos.

Existem especificidades em cada método de análise quanto à solubilidade dos compostos, já que na metodologia do ABTS é possível avaliar aqueles que são de natureza lipofílica e hidrofílica, já o DPPH não possui esta capacidade, sendo sensível aos compostos hidrofílicos (DASTMALCHI et al., 2011; MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011).

Os valores de DPPH obtidos no experimento de otimização são superiores aos encontrados no estudo de Thaikert; Paisooksantivatana (2009) que coletaram amostras de cúrcuma de diferentes localizações, e os resultados oscilaram entre 8,04 e 31,98 μM Trolox 100 g^{-1} . Em um outro trabalho de Hirun; Utama-Ang; Roach (2014) foi realizado um experimento para otimizar quais seriam as melhores condições de secagem da cúrcuma que apresentariam melhores valores para atividade de água, teor de umidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Porém seus valores máximos atingidos (59,56 μM Trolox 100 g^{-1}), ainda são inferiores ao encontrados nesse trabalho (95,99 μM Trolox 100 g^{-1}), o que indica a necessidade de estudar os efeitos de diferentes concentrações de solventes para otimizar a determinação da atividade antioxidante de extratos.

2.3.1.1.3 Método ABTS

Este método está diretamente relacionado como padrão de Trolox, e os resultados foram calculados em função do padrão. A variável agitação não influenciou o processo de determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS, porém o etanol e interação do etanol versus agitação explicou 63% dos resultados encontrados.

A equação demonstra a atividade antioxidante pelo método de ABTS em função da concentração de etanol(x) e agitação (y) é ABTS: $393,930 + 255,560 \times (\% \text{ etanol}) + 12,157 \times (\% \text{ etanol})^2 - 64,471 \times (\text{agitação}) - 56,5366 \times (\text{agitação})^2 - 177,07 \times (\% \text{ etanol}) \times (\text{agitação})$. O etanol e a interação etanol versus agitação foram significativas ao nível de 95% de probabilidade.

A Tabela 6 apresenta a análise de variância para o modelo ajustado, no qual o teste F indicou que não houve significância estatística para otimização do processo.

A Figura 6 apresenta a superfície de resposta da atividade antioxidante pelo método de ABTS em função do etanol e interação com a agitação.

Tabela 6 - Análise da variância para o Modelo Ajustado

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F
Regressão	591473,0	4	147868,3	2,110765
Resíduo	420326,0	6	70054,33	
Falta de ajuste	297552,0	4	74388	1,211788
Erro puro	122774,0	2	61387	
Total	1011799,0	10		

$$R^2 = 0,63 \quad F_{0,95;4;6} = 4,53 \quad F_{0,95;4;2} = 19,25$$

Figura 6 - Superfície de resposta para atividade antioxidante pelo método ABTS em função da concentração de etanol (%) e agitação

Pode-se observar que os ensaios que apresentavam maior concentração de etanol conseguiram obter maior atividade antioxidante pelo método ABTS, ou seja, seu aumento foi em função do acréscimo de etanol. Os valores encontrados no presente estudos, são superiores aos encontrados por Tiveron et al. (2010), em que a atividade antioxidante da cúrcuma pelo método ABTS foi de $118,6 \mu\text{M Trolox } 100 \text{ g}^{-1}$. Com a metodologia de superfície de resposta, pode-se obter um valor máximo de atividade antioxidante de $1175,5 \mu\text{M Trolox } 100 \text{ g}^{-1}$.

Isto indica que o método de quantificação da atividade antioxidante obteve melhores resultados quando utilizado o método ABTS, pois os valores alcançados segundo essa metodologia foram superiores ao encontrados pelo método de DPPH. Evidencia-se então que, com a metodologia do ABTS pode-se verificar compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, sugerindo que este método neste estudo apresentou-se como mais eficaz justamente por essa especificidade do método.

2.3.1.3 Compostos Fenólicos

Para otimização da extração de compostos fenólicos, a variável agitação não influenciou estatisticamente no processo de determinação dos compostos fenólicos. A figura 7 aponta a influência das variáveis no modelo.

Figura 7- Diagrama de Pareto para Parâmetros e interações com influência na variável resposta

Apesar de não significativos estatisticamente, os efeitos de segunda ordem do etanol e da agitação mostraram tendência à extração de fenólicos totais e foram adicionados à análise. Esta explicou 78% dos resultados encontrados.

O aumento da extração de fenólicos em mg GAE/g foi acompanhado pelo acréscimo da concentração de etanol, em níveis de agitação intermediários. A equação que demonstra a extração de fenólicos totais pelo método Follin-Ciocalteau em função da concentração de etanol (x) e da agitação (y) é: Fenólicos (mg GAE/g) = 17,28 + 6,6048 x (% etanol) - 2,65 x (% etanol)² - 4,22 x (agitação)².

A Tabela 7 apresenta a Análise de Variância para o Modelo ajustado e a Figura 8 apresenta a extração total de fenólicos em função das variáveis.

Tabela 7 - Análise da variância para o modelo ajustado

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F
Regressão	459,938	3	153,3125	7,982157*
Resíduo	134,448	7	19,2069	
Falta de ajuste	121,3303	5	24,26606	3,699658
Erro puro	13,1180	2	6,559	
Total	594,3858	10		

R²= 0,78 F_{0,95;3;7} = 4,35 F_{0,95;5;2} = 19,30

*estatisticamente significativo a p<0,05

Figura 8 - Superfície de resposta para extração de compostos fenólicos em função da concentração de etanol (%) e agitação

Verificou-se que o aumento da extração de compostos fenólicos teve extração ótima em maiores concentrações de etanol e agitação intermediária. Johnson et al. (2008) verificaram o teor de compostos fenólicos em diferentes plantas medicinais, e os valores obtidos para a *Curcuma longa* L. foram de 17,23 mg GAE. g⁻¹. Esse resultado indica que no presente estudo conseguiu-se extrair quantidade superior de compostos fenólicos quando foram combinadas as variações explanatórias de concentração de etanol e níveis de agitação, sendo que o maior valor obtido foi de 27,097 mg GAE. g⁻¹.

2.3.2 Resultados do experimento *in vivo*

2.3.2.1 Peso dos animais

No início do experimento os animais dos grupos controle e estresse não apresentaram diferença no peso corporal. Também não houve diferença no peso final dos grupos estudados (Tabela 8). Resultado semelhante ao encontrado por Grippo et al. (2005) em que o protocolo de estresse crônico não induziu alterações significativas no ganho de peso

Tabela 8 – Peso corporal inicial de ratos submetidos ou não ao tratamento com cúrcuma e ao estresse crônico moderado e imprevisível

	ECMI+CURC	ECMI+VEÍCULO	Controle Cúrcuma	Controle Veículo
Peso inicial (g)	292,5 ± 6,3	302,2 ± 7,5	295,7 ± 5,6	297,5 ± 6,5
Peso final (g)	413,7± 8,3	407 ±7,6	404,996± 7,7	409,937± 6,3

Neves et al. (2012) realizaram estudo com ratos submetidos ao protocolo de ECMI e verificaram que não houve diferença significativa entre o peso corporal inicial dos ratos dos grupos estudados, porém, houve diferença no peso final, indicando que o estresse apresentou influencia sob o ganho de peso e a modificação na dieta de dois grupos experimentais que receberam dieta com alto teor de gordura, pode ter sido outro fator que contribuiu para a diferença de peso entre os grupos. No presente estudo os grupos receberam ração comercial e não tiveram a dieta modificada, porém todos os ratos receberam óleo de milho via gavagem, evidenciando que este fator pode ter influenciado no peso corporal dos animais, já que o protocolo de estresse não influenciou o ganho de peso neste experimento.

2.3.2.2 Peso do cérebro dos animais

Verificou-se que o grupo controle+veículo apresentou volume cerebral estatisticamente superior aos demais (Tabela 9). Os grupos controle+cúrcuma e ECMI+ CÚRCUMA não diferiram estatisticamente. O grupo ECMI + VEÍCULO mostrou a média de peso cerebral significativamente menor aos outros grupos. O grupo ECMI+ CÚRCUMA apresentou o peso do cérebro superior ao grupo que também foi submetido ao estímulo estressor mas recebeu solução controle, indicando um possível efeito benéfico da cúrcuma, em não reduzir o tamanho da estrutura cerebral.

Tabela 9 - Peso do cérebro dos animais. ECMI+CURC: estresse crônico moderado e imprevisível+ cúrcuma; ECMI+ VEÍCULO: estresse+ óleo de milho; Os valores estão apresentados em média e ± desvio padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si (p < 0,05)

Tratamento	Peso do cérebro (g)
ECMI+CÚRCUMA	1,377±0,085b
ECMI+VEÍCULO	1,309±0,043 c
CONTROLE+CÚRCUMA	1,395±0,052 b
CONTROLE+VEÍCULO	1,488±0,063 a

Diferente dos dados deste trabalho, em que as estruturas não foram pesadas separadamente, alguns estudos de alterações cerebrais nos principais transtornos de humor e ansiedade, como depressão unipolar e bipolar, mostraram que as mudanças no volume das estruturas do hipocampo, córtex pré-frontal devem ser consideradas como parte das consequências neurobiológicas dessas doenças. E a remodelação estrutural nessas regiões cerebrais são importantes para os transtornos psiquiátricos em humanos, porque a estrutura alterada pode ser susceptível para contribuir com uma função cognitiva prejudicada afetando sua regulação (BREMNER, 1999; DREVETS, 2000; MCEWEN, 2005).

2.3.2.3 Teste de preferência à solução de sacarose 1%

No teste de preferência à sacarose 1% não houve diferença entre os valores basais entre os grupos estudados. Observou-se que os grupos submetidos ao ECMI apresentaram redução na preferência da solução doce, em relação aos grupos controle + cúrcuma e controle + veículo (Figura 9).

Assim, o presente estudo confirma a hipótese de desenvolvimento de anedonia, pelo protocolo utilizado, que foi evidenciado pela diminuição no consumo e preferência por solução doce pelos animais submetidos ao ECMI. Os resultados mostram que o modelo de ECMI utilizado foi eficaz em desenvolver anedonia nos animais e corrobora com outros estudos (GRIPO, JOHNSON, 2002; GRIPO, BELTZ, JOHNSON, 2003; LUO et al., 2013; ZHU et al., 2014; XINXING et al., 2014).

Xinxing et al. (2014) verificaram que os animais reduziram a preferência por solução doce após 4 semanas de exposição ao protocolo de ECMI. Esses autores verificaram que não ocorreu relação significativa entre a ingestão de sacarose e perda de peso corporal em ratos submetidos ao estresse e, que a diminuição da solução doce refletiu depressão e ansiedade devido os procedimentos do ECMI.

O teste de preferência a sacarose possui anedonia como indicador de mudança de comportamento, um dos principais sintomas do transtorno depressivo maior. Com este teste, a redução do consumo de soluções de sacarose pode ser interpretada como indicação de depressão (WILLNER, 2005).

Para esse teste, o estresse desenvolveu o estado de anedonia, porém, a cúrcuma não reverteu este estado neste período de tempo, uma hipótese seria a necessidade da realização do teste de preferência a sacarose após um intervalo de tempo maior de finalização do protocolo de ECMI.

Figura 9 - Resposta ao teste de preferência à solução de sacarose. ECMI+CURC: estresse crônico moderado e imprevisível+ cúrcuma; ECMI+ VEÍCULO: estresse crônico moderado e imprevisível+ óleo de milho; C+CURC: controle+ cúrcuma; C+VEÍCULO: controle + óleo de milho. Os valores estão apresentados em média e $\pm$ desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

2.3.2.4 Teste de Natação Forçada

O teste foi realizado após o protocolo de ECMI, com intuito de evidenciar o comportamento de imobilidade análogo a depressão em humanos e podem ser observados na Figura 10.

Figura 10- Período de imobilidade (segundos) em resposta ao teste de natação forçada ECMI+ CURC: estresse crônico moderado e imprevisível+ cúrcuma; ECMI+ VEÍCULO: estresse + óleo de milho. Os valores estão apresentados em média e $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Como pode-se observar, o período de imobilidade possuiu diferença significativa entre os grupos estudados. O menor tempo de imobilidade observado foi do grupo Controle + Cúrcuma com média de 39,12 segundos, indicando possível mecanismo de ação preventiva da cúrcuma quando os animais foram submetidos a situação aversiva. O grupo ECMI+ VEÍCULO apresentou os maiores valores de imobilidade, com média de 147,42 segundos. Os demais grupos apresentaram os valores médios de 88 segundos para ECMI+CÚRCUMA e, 88,27 segundos para o grupo CONTROLE+VEÍCULO.

Os resultados indicam que o grupo estressado que não recebeu o tratamento com cúrcuma apresentou valores superiores quando comparado aos demais, demonstrando que, quando os animais foram submetidos a administração do composto em estudo, o tempo de imobilidade foi significativamente menor, evidenciando que especificamente para o teste de natação forçada, a cúrcuma apresentou propriedades que podem ser ditas como antidepressivas, já que diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, que é considerado análogo ao comportamento depressivo em humanos.

Hurley et al. (2013) avaliaram o efeito agudo e crônico da curcumina injetada via intraperitonal em animais submetidos ao teste de natação forçada. Ambos os resultados demonstraram que o composto possuiu efeito antidepressivo, sendo potencializado com o aumento da dose utilizada.

Bhutani, Bishnoi e Kulkarni (2009), observaram que os grupos induzidos ao estresse crônico e grupo controle apresentaram maior tempo de imobilidade quando comparados ao grupo tratado com curcumina, que apresentaram decréscimo no tempo de imobilidade e, esse tempo foi ainda menor em animais em que a curcumina foi co-administrada com a piperina. Este estudo sugerem que a administração de curcumina, principal curcuminóide encontrado na cúrcuma, juntamente com a piperina, potencializa a absorção desse composto fenólico e corrobora com o presente estudo, indicando o efeito neuroprotetor da cúrcuma e seus curcuminóides em animais induzidos ao estresse crônico.

Xu et al. (2005), realizaram o teste da natação forçada em camundongos e verificaram um percentual de redução de imobilidade de até 61,1% em grupos tratados com curcumina. Os resultados foram semelhantes ao observados para imipramina, um antidepressivo clássico. Isto reforça a hipótese verificada neste estudo, de que a cúrcuma apresenta atividade antidepressiva, devido principalmente ao seu composto fenólico majoritário, a curcumina.

2.3.2.5 Transaminase Oxalacética e Transaminase Pirúvica

A curcumina, principal composto fenólico presente na cúrcuma, foi evidenciada como um potente hepatoprotetor (CERNY et al., 2011; CIFTCI et al., 2011; CHADIPIRALLA et al., 2012). Em doenças hepáticas, apresenta a capacidade de modulador de várias citocinas pró-inflamatórias, e suas propriedades antioxidantes sugerem uma base farmacológica para seu uso em doenças do fígado (RIVERA-ESPINOZA; MURIEL, 2009).

As dosagens enzimáticas de transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) foram realizadas com intuito de evidenciar que a cúrcuma não ocasionou lesão hepática ou apresentou atividade citotóxica nos grupos estudados (Figura 11).

Figura 11- Valores de Transaminase Oxalacética e Transaminase Pirúvica em unidades/mL. ECMI+ CURC: estresse crônico moderado e imprevisível+ cúrcuma; ECMI+ VEÍCULO: estresse + óleo de milho. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Para as dosagens de TGO o grupo experimental CURC+ECMI teve como média 102 U/mL, diferindo estatisticamente do grupo C+CUR que obteve como média 62,73 U/mL. Os demais grupos ECMI+ VEÍCULO (85 U/mL), C+VEÍCULO (84,73 U/mL) não apresentaram diferença estatística entre si.

Na dosagem de TGP tanto os animais submetidos ao estresse tratados com cúrcuma (34,7 U/mL), ou não tratados (24,8 U/mL) e, grupos controle cúrcuma (23,45 U/mL) e controle veículo (25, 15 U/mL) não apresentaram diferença estatística entre si.

Apesar da diferença entre dois grupos das dosagens de TGO, estes valores corroboram com os estudos de Branco et al. (2011), que avaliaram parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos de um biotério que foram utilizados somente para obter-se valores de referência desses parâmetros. Os valores encontrados foram de 152, 4 U/mL para TGO, e 61, U/mL para TGP, valores considerados altos pelos próprios autores, que justificam que as análises comparativas dos resultados deve ser feita com cautela, pois as diferenças significativas podem ser resultantes das variações intraespécies, manuseio de metodologia utilizada e, diferentes métodos utilizados para os testes enzimáticos.

Yun et al. (2010), observaram o efeito hepatoprotetor da curcumina em um modelo agudo de indução a lesão no fígado. Esses autores verificaram que os grupos que foram induzidos a lesão e eram submetidos ao tratamento com curcumina apresentaram valores

inferiores de dosagens das transaminases quando comparados ao grupo que somente foi submetido a indução de lesão, indicando efeito citoprotetor desse composto majoritário da cúrcuma. Já os valores de TGO e TGP para o grupo controle foram semelhantes aos encontrados no presente estudo, sendo valores próximos a 100 U/mL para TGO e valores abaixo de 50 U/mL para TGP.

É importante salientar que a cúrcuma no presente estudo não apresentou propriedades citotóxicas, e o de Yun et al. (2010) embasa a hipótese de atividade hepatoprotetora desse composto em estudo. Isto indica que futuros estudos podem ser realizados com esse composto vegetal em modelos animais, mas sempre devem ser realizadas as dosagens dos marcadores do dano isquêmico hepático para evidenciar sua função protetora e não citotóxica no fígado.

3 CONCLUSÃO

- A atividade antioxidante pelo método de DPPH obteve seus melhores valores quando foram utilizados extratos mais hidrofílicos;
- A atividade antioxidante pelo método de ABTS apresenta valores ótimos quando são utilizados extratos etanólicos, sendo superiores aos encontrados pelo método DPPH.
- A extração de compostos fenólicos apresenta seus melhores valores com extratos intermediários combinados com níveis de agitação média, indicando interação entre as variáveis explanatórias do estudo;
- A cúrcuma parece apresentar potencial atividade antidepressiva em animais submetidos ao teste de natação forçada, já que reduziu o tempo de imobilidade.

REFERÊNCIAS

AARSLAND, D.; PAHLHAGEN, S.; BALLARD, C.G.; EHRT, U.; SVENNINGSON, P. Depression in Parkinson disease: epidemiology, mechanisms and management. **Nature reviews neurology**, London, v.8, p.35-47, Jan. 2012.

ABELAIRA, H.M.; RÉUS, G.Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v.35, p.112-120, 2013.

AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 41, p. 40-59, Jan, 2008.

AGRAWAL, S.; GULLAIYA S.; DUBEY, V.; SINGH, V.; KUMAR, A.; NAGAR, A.; TIWARI, P. Neurodegenerative shielding by curcumin and its derivatives on brain lesions induced by 6-OHDA model of Parkinson's disease in albino Wistar rats. **Cardiovascular psychiatry and neurology**, Cairo, v. 2012, p.1-8, Aug. 2012.

AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemical-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 174, p. 27-37, Jul. 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual Of Mental Disorders. 5 th ed. Washington.2013, 991 p.

ANDRADE, J. W. S. **Produção e crescimento do açafrão (*Curcuma longa* L.) em função do tamanho do rizoma e densidade do plantio, em Goiás**. 2004. 62 p. Tese- Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. 16th ed. **Official methods of analysis**. Arlington, 1995. Cap.43, p.3.

BABU, K.G.D.; SHANMUGAM, V.; RAVINDRANATH, S.D.; JOSHI, V.P. Comparison of chemical composition and antifungal activity of *Curcuma longa* L., leaf oils produced by different water distillation techniques. **Flavour and Fragrance Journal**, New York, v.22, p.191-196, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Unicamp, 1996. 299p.

BARROS-NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP. 2001. 401 p.

BEGUM, A.N.; JONES, MR.; LIM, G.P.; MORIHARA, T.; KIM, P.; HEATH, D.D.; ROCK, C.L. PRUITT, M.A.; YANG, F.; HUDSPETH, B.; HU, S.; FAULL, K.F.; TETER, B.; COLE, G.M.; FRAUTSCHY, S.A. Curcumin structure-function, bioavailability and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 326, n.1, p. 196-208, July. 2008.

BHUTANI, M.K.; BISHNOI, M.; KULKARNI, S.K. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v.91, n.1, p.39-43, Mar, 2009.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, Berlin, v.94, p.147-161, 1988.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**: as introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley and Sons, 1978. p.510 – 539.

BOX, G.E.P; DRAPER, NR. **Empirical model-building and response surface**. New York: John Wiley & Sons, 1987. 688 p.

BRANCO, A.C.S.C.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIRA, R.N.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, K.M.; RAMALHO, J.A.; DANTA, J.G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomar George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v.15, n.2, p.209-214, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, July, 1995.

BREMNER, JD. Does stress damage the brain? **Biology Psychiatry**, New York, v.45, p.797-805, Apr.1999.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.5939-5946, Oct, 2002.

CALIL.C.M.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P.; CUNHA, T.S.; MARCONDES, F.K. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.4, p.479-485, 2002

CALIL, C. M.; MARCONDES, F. K. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. **Life Sciences**, Oxford, v. 79, p. 1712-1719, Sep. 2006.

CERNY, D.; LEKIC, N.; VANOVA, K.; MUCHOVA, L.; HORINEK, A.; KMONICKOVA, E.; ZIDEK, Z.; KAMENIKOVA, L.; FARGHALI, H.; Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/-galactosamine model of liver injury in rats: relationship to HO-1/CO antioxidant system. **Fitoterapia**, Milano, v. 82, p.786-791, 2011.

CHADIPIRALLA, K.; REDDANA, P.; CHINTA, R.M.; REDDY, P.V. Thioacetamide-induced fulminant hepatic failure induces cerebral mitochondrial dysfunction by altering the electron transport chain complexes. **Neurochemical Research**, New York v.37, p. 59–68, Jan. 2012.

CHEN, H.; PANDEY, G.H.; DWIVEDI, Y. Hippocampal cell proliferation regulation by repeated stress and antidepressants. **Neuroreport**, Oxford, v.17, n.9, p.863-867, June 2006.

CIFTCI, O.; OZDEMIR, I.; TANYILDIZI, S.; YILDIZ, S.; OGUZTURK, H. Antioxidative effects of curcumin, beta-myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. **Toxicology and Industrial Health**, Princeton, v.27, p. 447–453, 2011

DASTMALCHI, K.; FLORES, G.; PETROVA, V.; PEDRAZA-PENALOSA, P.; KENNELLY, E.J. Edible Neotropical Blueberries: Antioxidant and Compositional Fingerprint Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v.59, n.7, p. 3020–3026, Mar. 2011.

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v.34, p.130-143, Jan.2010

DREVETS, W.C. Neuroimaging studies of mood. **Biology Psychiatry**, New York, v.48, p.813-829, 2000.

EMBRAPA. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza, 2007. 4p. Disponível em: <www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2014.

FEINSTEIN, A.; MAGALHAES, S.; RICHARD, J.F.; AUDET, B.; MOORE, C. The link between multiple sclerosis and depression. **Nature reviews neurology**, London, v.10, p.507-517, Sep. 2014.

GARCIA, R. Stress, metaplasticity, and antidepressants. **Current Molecular Medicine**, Boca Raton, v.2, p.629-638, Nov. 2002

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 450-455, Apr. 2009.

GILLESPIE, C. F.; NEMEROFF, C. B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosomatic Medicine**, Baltimore, v. 67, p. 26-28, May/June 2005.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B. Curcumin as “curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochemistry Pharmacology**, Oxford, v. 75, p. 787-809, Feb. 2008.

GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric – chemistry, technology and quality. **CRC – Critical Review in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.12, n.3, p.199-301, 1980.

GRIPPO, A.; JOHNSON, A.K. Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v.26, n.8, p. 941-962, Dec.2002.

GRIPPO, A.J.; BELTZ, T.G.; JOHNSON, A.K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiology & Behavior**, Oxford, n.78, p.703-710, 2003.

GRIPPO, A.J.; FRANCIS, J.; BELTZ, T.G. FELDER, R.B.; JOHNSON, A.K. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. **Physiology & Behavior**, Oxford, v.84, p.697-706, Mar, 2005.

HAMAGUCHI, T.; ONOL, K.; YAMADA, M.; Curcumin and Alzheimer's Disease. **CNS neuroscience and therapeutics**, Oxford. v.16, n.5, p.285-297, Oct. 2010.

HARRO, J.; TONISSAAR, M.; ELLER, M.; KASK, A.; ORELAND, L. Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. **Brain Research**, Amsterdam, v. 899, n. 1-2, p. 227-239, Apr.2001.

HIDAKA, B.H. Depression as a disease of modernity: explanations for increasing prevalence. **Journal of Affective Disorders**, Amsterdam, v.140, p.205-214, Nov. 2012.

HIRUN, S.; UTAMAM-ANG, N.; ROACH, P.D. Turmeric (*Curcuma longa* L.) drying: an optimization approach using microwave-vacuum drying. **Journal Food Science and Technology**, Mysore, v.51, n.9, Sep. 2014.

HURLEY, L.L.; AKINFIRESOYE, L.; NWULIA, E.; KAMIYA, A.;KULKARNI, A.A.; TIZABI, Y. Antidepressant-like effects of curcumin in WKY rat model of depression is associated with an increase in hippocampal BDNF. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, n.239, p.27-30, Feb. 2013.

JOHNSON, C.E.; OLADEINDE, F.O.; KINYUA, A.M.; MICHELIN, R.; MAKINDE, J.M; JAIYESIMI, A.A.; MBITI, W.N.; KAMAU, G.N.; KOFI-TSEKPO, W.M.; PRAMANIK, S.; WILLIAMS, A.; KENNEDY, A.; BRONNER, Y.; CLARKE, K.; FOFONOFF, P.; NEMERSON, D. Comparative assessment of total phenolic in selected medicinal plants. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, Lle-Lfe v.12, p.40-42, Jan. 2008.

KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extrats using response surface methodology. **Food Chemistry**, Barking,v.119, p.343-348, 2010.

KATZ, R.J.; ROTH, K.A.; CARROL, B.J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, New York, v.5, n.2, p.247-251,1981.

KONARSKA, M.; STEWART, R. E.; MCCARTY, R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. **Behavioral Neural Biology**, New York, v. 53, n. 2, p. 231-243, Mar.1990.

KULKARNI, S.K.; BHUTANI, M.K; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. **Psychopharmacology**, Berlin, v.201, p. 435-442, 2008.

LIU, G.X.; CAI, G.Q.; CAI.; SHENG, ZJ.; JIANG, J.; MEI, Z.; WANG, Z.G.; GUO, L.; FEI, J. Reduced Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice Lacking GABA Transporter Subtype. **Neuropsychopharmacology**, London, n.32, p.1531-1539, 2007.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; PEREIRA, J. G.; STERTZ, L.; GAVIOLI, E. C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Chronic mild stress paradigm reduces sweet food intake in rats without affecting brain derived neurotrophic factor protein levels. **Current Neurovascular Research**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 207-213, Nov. 2008.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 54, n. 5-6, p. 358-362, May/June 2009.

LUO, J.; ZHANG, L.; NING, N.; JIANG, C.; YU, S. Y. Neotrofin reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior via regulating BDNF, PSD-95 and synaptophysin expression in rat. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v.253, p. 48-53, Sep. 2013

MCEWEN, B.S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. **Metabolism**, Philadelphia, v.54, p.20-23, May 2005

MESA, M.D.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; AGUILERA, C.M.; RAMIREZ-BOSCA, A.; GIL, A. Efectos farmacológicos e nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminoides. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 41, n.3, p. 307-321, 2000.

MICHELON, L.; CORDEIRO, Q.; VALLADA, H. Depressão. **Revista Brasileira De Medicina**, São Paulo, v.65, n.12 p. 15-25, Dez.2008.

MOREAU, J.L.; JENCK, F.; MARTIN, J.R.; PERRIN, S.; HAEFELY, W.E. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT_{1C} receptor activation in rats. **Psychopharmacology**, Berlin, v.110, p. 140-144, 1993.

MOREAU, J.L. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. **Encephale**, Paris, v.23, n.4, p.280-289, Jul.1997.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Barking, v.72, p.145-171, 2001.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n.1, p. 139-148, Nov. 2011.

MUSCAT, R.; PAPP, M.; WILLNER, P. Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. **Psychopharmacology**, Berlin, v.109, p.433-438, 1992.

NAM, S.M.; CHOI, J.H.; YOO, D.Y.; KIM, W.; JUNG, H.Y.; KIM, J.W.; YOO, M.; LEE, S.; KIM, C.J.; YOON, Y.S.; HWANG, I.K. Effects of Curcumin (*Curcuma longa*) on learning and spatial memory as well as cell proliferation and neuroblast differentiation in adult and aged mice by upregulating brain-derived neurotrophic factor and CREB signaling. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont v.17, n.6, p.641-649, Jun. 2014.

- NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, New York, v.13, n.10, p.1161-1169, Sep. 2010
- NEVES, V.J.; MOURA, M.J.C.S.; TAMASCIA, M.L.; FERREIRA, R.; SILVIA, N.S.; COSTA, R.; MONTEMOR, P.L.; NARVAES, E.A.O.; BERNARDES, C.F.; NOVAES, P.D.; MARCONDES, F.K. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. **Stress**, Amsterdam, v.12, n.4 p.320-327, Nov. 2009.
- NEVES, V.J.; MOURA, M.J.C.S.; ALMEIDA, B.S.; COSTA, R.; SANCHES, A., FERREIRA, R.; TAMASCIA, M.L.; ROMANI, E.A.; NOVAES, PD.; MARCONDES, F.K; Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats. **Stress**, Amsterdam, v.15, n.2, p.138-148, Jul.2012.
- NOGUEIRA, S. O Veneno do remédio: Efeitos nocivos limitam potenciais usos terapêuticos da curcumina. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n.168, p.48-51, Fev. 2010
- ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa* L.) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, Patos de Minas, n.6, p. 55-69, 2009.
- PEREIRA, C.A; MOREIRA, M.R. **Cultivo da *Curcuma longa* L. (Açafrão-da-Índia ou Cúrcuma)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical , 2009. p.2. (Comunicado Técnico).
- PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, London, v. 266, p. 730-732, Apr.1977.
- RAWAL, S.; SINGH, P.; GUPTA, A.; MOHANTY. Dietary intake of *Curcuma longa* and *Emblica officinalis* increases life span in *Drosophila melanogaster*. **BioMed Research International**, New York, p.1-7, May. 2014.
- RIBEIRO, J.M.; INGLEZ-DIAS, A. Políticas e inovação em atenção a saúde mental: limites ao descolamento do desempenho do SUS. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.16, n.12, p. 4623-4633, Dez. 2011.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; MURIEL, P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. **Liver International**, Oxford, v. 39, p.1457-1466, 2009.
- ROBERTS, I.; KWAN, I.; EVANS, P.; HAIG, S. Does animal experimentation inform human healthcare? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation. **British Medical Association**, London, v.324, p.474-476, Fev, 2002
- ROSSI, L.; MAZZITELLI, S.; ARCIELLO, M.; CAPO, C.R.; ROTILIO, G. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**, Nova York, v. 33, n.12, p.2390-2400, Dec. 2008.
- SAS INSTITUTE. **SAS System: SAS/STAT version 9.1 (software)**. Cary, 2003.

SAVLA, U. Responsible conduct in animal research. **The Journal of clinical investigation**, New York, v.112, n.10, Nov, 2003

SENGUPTA, G.; SHARMA, G.D.; CHAKRABORRY, B. Hepatoprotective and immunodulatory properties of aqueous extract of *Curcuma longa* in carbon tetra chloride intoxicated Swiss albino mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomecine**, Haikon, v.1, n.1, p.193-199, Jun. 2011.

SIEGRIST, J.; LUNAU, T.; WAHRENDORF, M.; DRAGANO, N. Depressive symptoms and psychosocial stress at work among older employees in three continents. **Globalization and Health**, London, v.8, p.1-8, Jul. 2012.

SIGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, Feb. 1965.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, E.; LUGASI, E. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Elsevier**, London, v. 51, p. 456-467, Mai. 2008.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows- Release 10.0 A**. Tulsa, OK, USA; StatSoft, Inc., 2010.

TENG, C.T.; CEZAR, L.T.S. Depressão. **Revista Brasileira de Medicina**. São Paulo, v.67, p.37-52, Dez.2010.

THAIKERT, R.; PAISOOKSAANTIVATANA, Y. Variation of Total Curcuminoids Content, Antioxidant Activity and Genetic Diversity in Turmeric (*Curcuma longa* L.) Collections. **Kasetsart Journal**, Bangkok, v.43, p.507-518, 2009.

TILAK, J.C.; BANERJEE, M.; MOHAN, H.; DEVASAGAYAM, T.P.A. Antioxidant availability of turmeric in relation to its Medicinal and Culinary uses. **Phytotherapy Research**, London, v.18, p.798-804, Nov. 2004.

TIVERON, A.P. **Atividade antioxidante e composição de fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102 p.Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

VILELA, C.A.A.; ARTUR, P.O. Secagem do açafrão (*Curcuma longa* L.) em diferentes cortes geométricos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28,p. 387-394, Abril-Junho, 2008.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, Berlin, v.83, n.1, p.1-16, 1987.

_____. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, New York, v.52, p.90-110, Jul. 2005.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, London, v.37, n.2, p. 99-105, Jun. 1998.

XIA, X.; CHENG, G.; PANA, Y.; XIA, Z.H.; KONG, L.D. 2007. Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v.2, p.356-363, Oct.2007.

XINXING, W.; WEI, L.; LEI, W.; RUI, Z.; BAOYING, J.; LINGJIA, Q. A neuroendocrine mechanism of co-morbidity of depression-like behavior and myocardial injury in rats. **Plos One**, São Francisco v.9, n.2, p.1-9. Feb, 2014.

XU, Y.; KU, B.S; YAO, H.Y.; LIN, Y.H; MA, X.; ZHANG, Y.H. et al. The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. **European Journal Pharmacology**, Amsterdam, v.518, p.40–46, Jul.2005.

XU, Y.; KU, B.; YAO, I.; JIANG, W.; MA, X.; LI, X. Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. **Brain Research**, Amsterdam, v.1122, p. 56-57, Nov. 2006.

YUN, S.S.; KIM, S. P.; KANG, M,Y.; NAM, S.H. Inhibitory effect of curcumin on liver injury in a murine model of endotoxemic shock. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.32, n.2 p.209-214, Oct. 2010.

ZHANG, J., JINNAL, S.; IKEDA, R.; WADA, M.; HAYASHIDA, S.; NAKASHIMA. A simple HPLC- fluorescence method for quantitation of curcuminoids and its application on turmeric products. **Analytical Sciences**, Tokyo,v.25, p.385-389, Mar. 2009.

ZHU, X.; XIA, O.; HAN.; SHAO, M.; JING, L.; FAN, Q.; LIU, Y.; DIAO, J.; LV, Z.; SUN, X. Xiao Yao San Improves depressive-like behavior in rats through modulation of β -arrestin 2-mediated pathways in hippocampus, **Evidence-Basead Complementary And Alternative Medicine**, New York, v.20, p.1-13, July 2014.