Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Cúrcuma (*Curcuma longa L.*): avaliação de suas nanopartículas em um modelo animal de depressão

Gizele Bruna Barankevicz

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

Piracicaba
2018

Gizele Bruna Barankevicz
Bacharela em Nutrição

Cúrcuma (*Curcuma longa L.)*: avaliação de suas nanopartículas em um modelo animal de depressão

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **JOCELEM MASTRODI SALGADO**

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

Piracicaba
2018

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

Barankevicz, Gizele Bruna

Cúrcuma (*Curcuma longa* L.): avaliação de suas nanopartículas em um modelo animal de depressão / Gizele Bruna Barankevicz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

59 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cúrcuma. 2. Nanotecnologia 3. Alimentos funcionais. 4. Depressão I. Título

Dedico essa tese à minha família, por todo amor e valores ensinados ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecer, ser grato à todos que compartilharam esse ciclo ao meu lado. Alguns com breves passagens, outros como atores principais.

“Nada poderá me abalar, nada poderá me derrotar pois minha força e vitória tem um nome é Jesus’’. Se hoje comemoro a etapa em que me torno doutora, Deus é ator principal de tudo. Ele jamais me desamparou e me deu forças para eu conseguir terminar quando até eu mesma duvidei da minha capacidade. A cruz foi pesada, o mundo me fez chorar, mas Deus me quis sempre sorrindo.

Família, meu amor incondicional, minha vida. Desde que decidi morar há mais de 700 km de distância nunca deixaram de me apoiar, serem meu suporte, serem meu pilar. Deus foi muito generoso ao me conceder essas pessoas maravilhosas para serem minha mãe, pai e irmãs, se eu nascesse de novo e pudesse escolher, escolheria vocês sempre. Dona Cida, seu José, Barbara e Maria Fernanda, só nós sabemos o que passamos nesse último ano e mesmo com todas as turbulências eu sempre fui prioridade na vida de vocês. Com certeza estamos mais fortes e tudo vai ficar bem. Amo vocês mais do que ontem e menos que amanhã.

Agradeço imensamente a minha vó Maria Elvira, por toda educação e valores, além dos risos proporcionados com seus “causos”.

Ao Victor, pelos momentos antecedentes a finalização da tese, em que tu me deu o suporte, na reta final, para eu conseguir terminar a escrita. Obrigada pela compreensão, pela força e por confiar em meu potencial, durante o final desse ciclo você se tornou “meu amor para recomeçar”. Também agradeço a Cris e ao Ivan, seus pais, pelos “domingos em família’’ em Piracicaba e por me acolherem com tanto carinho e amor em seu lar, sou grata a vocês por todo amor dedicado à mim.

À Dra. Jocelem Mastrodi Salgado, que foi mais que uma orientadora, foi minha mãe em Piracicaba, não me ajudou somente na tese, esteve presente ao meu lado em diversos momentos da minha vida. Nossa relação no doutorado estreitou e estabelecemos um laço de amizade muito bonito, espero continuar sendo lembrada para nossas conversas ao final de tarde para nosso café ou apenas para mais um passeio divertido ao shopping com direito a happy hour. Obrigada pela confiança, pela orientação e pelos ensinamentos.

À Dra. Fernanda Klein Marcondes, que foi minha segunda orientadora, obrigada por todo apoio e suporte na FOP. Obrigada por sempre me receber de portas

abertas em seu laboratório, confiar em meu trabalho e me proporcionar o desenvolvimento do experimento dessa tese.

Ao professor Najeh, à professora Rubiana e Katriane, pelo apoio e por acreditarem no desenvolvimento das nanopartículas contendo cúrcuma, a ciência precisa de pessoas mais humanas como vocês, obrigada.

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

Ao professor Hilton Thadeu Zarate Couto, por toda ajuda nas análises estatísticas.

Ao pessoal da FOP, Andrea, Rafa, Paty, Lais muito obrigada pelos almoços, tardes divertidas, cafés, por tornarem esse momento mais leve.

Aos técnicos de laboratório e funcionários da FOP Fábio, Rafael, Vanderlei e Elieti, por toda ajuda e contribuição durante o experimento.

Em especial agradeço a Mel, foi difícil não é mesmo Maeline? Aprender a cirurgia para montar o sistema de telemetria, colocar esse sistema para funcionar, realmente esse doutorado foi uma superação e sou muito grata por sua amizade e ajuda nesse caminho. Nosso apoio uma para com a outra fez com que nossos sonhos fossem possíveis e que nossas lágrimas fossem encerradas com inúmeras risadas, obrigada. Lais e Mel, quero sempre contar moedas com vocês, agradeço por nossos caminhos terem se cruzado e saído faísca (quando uma chegava de cara feia a outra já sabia que não dava pra cutucar), sempre estarão em meu coração.

Aos meus queridos amigos da ESALQ e colegas de laboratório: Patrícia, Maria Regina, Fernanda Spada, Talita, Nataly e a Maressa, que durante o meu mestrado me proporcionou conviver com um brilho em forma de pessoa, a Helena (que saudades da pequena). Agradeço também as minhas eternas pupilas Jéssica loira e Jéssica Morena, obrigada por me apoiarem sempre. A Vana querida, obrigada por todos os cafés proporcionados, pelas ligações, pelos desabafos e pelo carinho especial que sempre teve comigo. À Regina e Ana Paula do LAN e ao Fábio da pós graduação da ESALQ por me auxiliar em todas as minhas dúvidas, meu sincero agradecimento.

Patrícia Bachiega, em especial, uma guria com um coração gigantesco, agradeço imensamente por todo apoio durante esses anos em Piracicaba e principalmente na reta final que é quando ficamos sem rumo, perdidos, obrigada por ser uma luz em minha vida.

Kélin, sou grata pela sua amizade incondicional, tu és aquela guria que eu posso ficar meses sem ver mas que o carinho e companheirismo será sempre o mesmo. Desejo a você todo sucesso do mundo, obrigada por sem quem você é, todo mundo merece uma Kélin na vida.

Aos amigos que fiz em Piracicaba, Giulia, Juliana, Alan e Nando, meus “tatás’’, meus irmãos, obrigada por me escolherem para a vida de vocês.

Aos irmãos de ideal de Piracicaba, que juntos compartilhamos ideais de ajudar ao próximo, obrigada por me acolherem e pelo trabalho lindo desempenhado com os moradores de rua.

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado

Ao pessoal da dança de salão, que proporcionaram muita alegria em minha vida por meio da minha paixão em dançar.

“Sou brasileiro, sou paranaense, sou dessa terra, sou cidadão pitanguense”. Aos meu queridos amigos do Paraná, Betina, Luciana, Mari, Ana Clara, Débora, Bruna, Fran, Choco, Lincon, Ana Paula, Emily, Ju Tauffer, por todo apoio nesse trajetória longe de casa que iniciou no mestrado. As minhas queridas primas do grupo “maria lavadeiras” por todas as mensagens de otimismo, pelas “fofocas” e que mesmo distanres souberam enviar boas energias durante esse tempo todo.

À querida Dani, de Floripa, por toda sua disposição e prestatividade em me auxiliar na finalização de uma análise, que deus lhe abençoe sempre.

Aos meus alunos da FAM, que suportaram meus “surtos” durante a fase final desse trabalho, a professora é muito grata por fazer parte da vida de vocês.

Meu sincero agradecimento estende-se a todos que direta ou indiretamente presenciaram e contribuíram nessa caminhada para a geração dessa tese, que hoje garante meu título de Doutora, com doutorado.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

Carl Jung

SUMÁRIO

RESUMO **9**

ABSTRACT **10**

1. INTRODUÇÃO **11**

REFERÊNCIAS **14**

2. MODELOS ANIMAIS VALIDADOS PARA A DEPRESSÃO: DESAFIOS **18**

RESUMO **18**

ABSTRACT **18**

2.1. INTRODUÇÃO 19
2.2. DEPRESSÃO 19
2.3. VALIDAÇÃO DE MODELOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL: DESAFIOS E LIMITAÇÕES 21
2.4. ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL (ECMI) 22
2.5. AVALIAÇÃO DE ANEDONIA - TESTE DE PREFERÊNCIA À SOLUÇÃO DE SACAROSE 1% 25
2.6. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA 25
2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 27

REFERÊNCIAS **29**

3. NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO CÚRCUMA: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA **35**

RESUMO **35**

ABSTRACT **35**

3.1. INTRODUÇÃO 36
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 39
3.2.1. Preparação das nanopartículas 39
3.2.2. Caracterização das nanopartículas 39
3.2.2.1. Eficiência da encapsulação 39
3.2.2.2. Determinação do tamanho de partícula, polidispersidade e potencial zeta 40
3.2.2.3. FTIR 40
3.2.3. Estudo in vivo 40
3.2.3.1. Protocolo de Estresse 42
3.2.3.2. Avaliação de Anedonia - Teste de preferência à solução de Sacarose 1% 43
3.2.3.3. Teste da Natação Forçada (TNF) 44
3.2.3.4. Análise bioquímica 44
3.2.4. Análise Estatística 44
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
3.3.1. Caracterização das Nanopartículas 45
3.3.1.1. FTIR 46
3.3.2. Experimento in vivo 48
3.3.2.1. Avaliação de anedonia 48
3.3.2.2. Teste de Natação Forçada 49
3.3.2.3. Corticosterona 50
3.4. CONCLUSÕES 52

REFERÊNCIAS **53**

4. CONCLUSÕES GERAIS **59**

RESUMO

Cúrcuma (*Curcuma longa L.)*: avaliação de suas nanopartículas em um modelo animal de depressão

Os objetivos desse estudo foram caracterizar modelos experimentais validados para avaliação da depressão em animais; avaliar a viabilidade do desenvolvimento de nanopartículas de cúrcuma a partir do encapsulamento com zeína pelo método de dispersão líquido-liquido; avaliar sua possível atividade antidepressiva em ratos submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), considerado modelo preditivo para indução de depressão. No protocolo experimental foram utilizados 40 ratos da linhagem Sprague- Dawley divididos em 5 grupos (n=8 ratos/grupo): Estresse crônico moderado e imprevisível+nanopartículas (ECMI+NANO), Nanopartícula + Controle (NANO), Estresse crônico moderado e imprevisível + Veículo (ECMI), Estresse crônico moderado e imprevisível + fluoxetina (ECMI+FLUOX), Controle + Veículo (CONTROLE) sendo veículo a água filtrada,também utilizada para ressuspender as nanopartículas. A avaliação de anedonia, considerada chave para mensuração do ECMI, confirmou que o protocolo foi efetivo para avaliar esse comportamento. No TNF observou-se que, os grupos estressados apresentaram maiores valores de imobilidade, comportamento similiar ao desamparo aprendido. A administração de nanopartículas (10 mg kg^{-1}) preveniu a elevação dos níveis de corticosterona em ratos submetidos ao protocolo de ECMI. Estes dados sugerem que as nanopartículas de zeína contendo cúrcuma podem contribuir para uma possível ação neuroprotetora deste alimento funcional na depressão Além disso, comprovou-se que o encapsulamento possibilitou a elaboração de nanopartículas com boas características, apresentando alta eficiência de encapsulamento e baixo índice de polidispersão.

Palavras-chave: Cúrcuma; Nanotecnologia; Alimentos funcionais; Depressão

ABSTRACT

Turmeric (*Curcuma longa* L.): evaluation of their nanoparticles in an animal model of depression

The objectives of this study were to characterize validated experimental models for the evaluation of depression in animals; to evaluate the viability of the development of turmeric nanoparticles from the zein encapsulation by the liquid-liquid dispersion method; to evaluate its possible antidepressant activity in rats submitted to the chronic mild and unpredictable stress procedure (CMUS), considered a predictive model for induction of depression. In the experimental protocol, 40 Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups (n = 8 rats / group): chronic mild and unpredictable stress procedure + nanoparticles (CMUS + NANO), Nanoparticle + Control (NANO), chronic mild and unpredictable stress procedure + Vehicle (CMUS), chronic mild and unpredictable stress procedure + fluoxetine (CMUS + FLUOX), Control + Vehicle (CONTROL) being a filtered water vehicle, also used to resuspend the nanoparticles. The evaluation of anhedonia, considered key to CMUS measurement, confirmed that the protocol was effective in evaluating this behavior. In TNF, it was observed that the stressed groups showed higher values of immobility, a behavior similar to learned helplessness. The administration of nanoparticles (10 mg kg^{-1}) prevented the elevation of corticosterone levels in rats submitted to the CMUS protocol. These data suggest that turmeric-containing zein nanoparticles may contribute to a possible neuroprotective action of this functional food in depression. In addition, it was verified that the encapsulation allowed the elaboration of nanoparticles with good characteristics, presenting high encapsulation efficiency and low polydispersion index

Keywords: Curcuma; Nanotecnology; Functional foods; Depression

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a cidade de Mara Rosa - GO possui o maior plantio comercial de açafrão com aproximadamente 300 hectares. A maior parte da produção é destinada às indústrias de alimentos e corantes. O açafrão dessa região, possui selo de identificação geográfica, garantindo a origem do produto (ANDRADE, 2004

Utilizada principalmente devido a sua cor, o açafrão da terra, conhecido popularmente como cúrcuma, é o diferencial no curry indiano, proporcionando sabor e ação conservante neste tempero tradicional. Comercialmente é utilizada como especiaria, fonte de amido industrial e corante. Devido ao número de grupos hidroxilas na estrutura do seu anel aromático possui alta atividade antioxidante (ROSSI et al., 2008; HAMAGUCHI; ONOL; YAMADA, 2010; NAM et al., 2014).

A composilçao do rizoma aparesenta em maior proporção o amido, contendo cerca de 60 a 70% de carboidratos e em menor quantidade lipídeos (8-17%), proteínas (6-8%) , minerais (3 a 7%) e fibras (2-7%) (MAHMOOD et al., 2015).

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 atenção por suas inúmeras atividades funcionais, dentre elas a atividade antioxidante e antidepressiva (TILAK et al., 2004; BABU et al., 2007).

Os compostos presentes no açafrão são denominados curcuminoides, os quais conferem a coloração amarelo-alaranjada marcante, cujos teores variam de 2 a 6% no rizoma. Os principais curcuminoides são curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (NAGPAL;SOOD, 2013; MAHMOOD et al., 2015; CHANG et al., 2016).

A ingestão média diária dessa especiaria na Índia é de aproximadamente 2 a 2,5 g/dia. Considerando um indivíduo de peso médio (60 kg), isso equivale a uma ingestão média de 60 a 100 mg de curcuminoides por dia, sendo considerada como dose segura a ingestão de até 12 g de curcuminoides diariamente (MAHMOOD et al., 2015).

A curcumina é o principal pigmento fenólico encontrado na cúrcuma, correspondendo a aproximadamente 77% dos curcuminoides. Possui potente ação antioxidante, anfi-inflamatória, antitumoral, anti-HIV e propriedades antimicrobianas

(DE et al, 2009; WANG et al, 2009; EMBUSCADO et al., 2015; (MAHMOOD et al., 2015).

É também capaz de reduzir significativamente os sintomas depressivos (Al-KARAWI; AL MAMOORI; TAYYAR 2015).

Distúrbios na atividade das monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina), processos imuno-inflamatórios, modificações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, são observadas em indivíduos com depressão. Em contrapartida os potenciais efeitos da curcumina na fisiopatologia da depressão são possivelmente correlacionados com a capacidade que esse composto possui em modular os substratos neurobiológicos associados a doença (KAUFMAMM et al 2016). Os possíveis efeitos biológicos desse composto na depressão incluem: inibição da monoamina oxidase, liberação de mediadores como serotonina e a dopamina, regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e modulação de fatores neurotróficos, neuroplasticidade e neurogênese e efeito neuroprotetor (LI et al., 2009; HUANG et al, 2011; ZHANG et al., 2012; LOPRESTI et al.,2015; SEO et al., 2015).

Apesar de muitas evidências de sua eficácia e segurança, a curcumina apresenta instabilidade ao pH fisiológico, lenta absorção pelas células e rápido metabolismo dentro da célula, baixa solubilidade em água e má absorção, fatores que reduzem sua biodisponibilidade e podem consequentemente diminuir os benefícios desse composto bioativo (SUN et al., 2018).

O processo de extração com solventes é fundamental para preservação das propriedades da cúrcuma, tanto que a agência reguladora vigente em cada país implementou uma lista com os solventes aprovados e os limites residuais permitidos para os curcuminoides que forem destinados ao mercado de alimentos. Nesse sentido a indústria busca tecnologias para melhorar a biodisponibilidade e concentração plasmática, uma delas é a nanotecnologia (GHALANDARLAKI et al., 2014).

Nesse contexto, o presente estudo foi conduzido visando à produção de nanopartículas de zeína contendo cúrcuma, pelo método de dispersão líquido-líquido. As nanopartículas foram caracterizadas empregando diferentes metodologias a fim de verificar sua eficiência e posteriormente avaliadas por meio de um modelo de experimentação animal na depressão.

Assim, esta tese foi organizada em três capítulos. O primeiro é a introdução sobre o estudo. No segundo capítulo, apresenta-se a revisão sobre dois modelos experimentais validados para avaliar a depressão em animais, os quais foram

aplicados no estudo. No terceiro capítulo, objetivou-se a produção de nanopartículas contendo cúrcuma e sua possível atividade antidepressiva em ratos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível. Posteriormente foram avaliados parâmetros como indução de anedonia, tempo de imobilidade e o biomarcador corticosterona.

REFERÊNCIAS

AL-KARAWI, D; MAMOORI, D.A.; TAYYAR, Y. The role of curcumin adminstration in patients with major depressive disorder: Mini Meta Analysis of Clinical Trials. **Phytotherapy Research,** DOI: 10.1002**,** 2015.

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.

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 Fragance Journal**, New York, v.22, p.191-196, 2007.

CHANG, X.; WANG, L.; LI, J.; WU, D. Analysis of anti-depressant potential of curcumin against depression induced male albino wistar rats. **Brain Reserch**, p. 219-225, 2016.

DE, R.; KUNDU, P.; SWARNAKAR, S.; RAMAMURTHY, T.; CHOWDHURY, A.; NAIR, G.B.; MUKHOPADHYAY, AK. Antimicrobial activity of curcumin against Helicobacter pylori isolates from India during infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** n.53, p.1592-1597, 2009.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants–a mini review. **Journal of Functional Foods**, n.18, p. 811.819.2015.

GHARSALLAOUI, A**.** Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International.** vol. 40, p. 1107-1121, Jul. 2007.

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.

HUANG, Z.; ZHONG, X.M; LI, Z.Y.; FENG, C.R.; PAN, A.J.; MAO, Q.Q. Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neurosci. Lett,** v.493, n.3, p.145-148.

KAUFMANN, F.N.; GAZAL, M.; BASTOS, C.R.; KASTER, M.P.; GHISLENI, G. Curcumin in depressive disorders: an overview of potential mechanisms, preclinical and clinical findings. **European Journal of Pharmacology**, v. 784, p. 192 – 198, 2016.

LI, Y.C.; WANG, F.M.; PAN, Y.; QINAG, L.Q.; CHENG, G.; ZHANG, W.Y.; KONG, L.D. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-Camp path way in chronic unpredictable mild stress of rats. **Prog. Neuropsychopharmacol.Biol. Psychiatry,** v.33, n.3, p.435-449. 2009.

LOPRESTI, A.; MAES, M.; MEDDENS, M.J.M.; MAKER, G.L.; ARNOULDUSSEN, E.; DRUMMOND, P.D. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial investigating the potencial of peripheral biomarkers to predict treatment response and antidepressant mechanisms of change. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 38-50, 2015.

MAHMOOD, K.; ZIA, K.M.; ZUBER, M.; SALMAN, M.; ANJUM, M.N. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical application: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.81, p. 877 – 890, 2015.

NAGPAL, M.; SOOD, S. Role of curucmin in systemic and oral health: Na overview. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine,** n.4, v.1, p.3-7, 2013.

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 agedmice by upregulating brain-derived neurotrophic factor and CREB signaling. **Journal of Medicinal Food,** Larchmont v.17, n.6, p.641-649, Jun. 2014.

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.

SEO, H.J.; WANG, S.M.; HAN, C.; LEE, S.J. PATKAR, A.A.; MASAND, P.S.; PAE, C.U. Curcumin as a putative antidepressant. **Expert Rev. Neurother**, n.15, p.269-280. 2015.

SUN, J. et al. Role of curcumin in the management of pathological pain. **Phutomedicine.** Stuttgart, vol.48, p. 129-140. Mar. 2018.

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.

WANG, Y.; LU, Z.;WU, H.; LV, F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. **Int J Food MIcrobiol,** v.30,n.1, p.71-74. Sep.2009.

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 produts. **Analytical Sciences,** Tokyo,v.25, p.385-389, Mar. 2009.

2. MODELOS ANIMAIS VALIDADOS PARA A DEPRESSÃO: DESAFIOS

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi caracterizar dois modelos experimentais validados, estresse crônico moderado e imprevisível e o teste de natação forçada, para avaliar a depressão e suas limitações. Foram usadas as bases de dados Scielo, Lilacs e Pubmed, a fim de realizar o levantamento bibliográfico amplo sobre como empregar essas metodologias e seus principais vieses encontrados em estudos que utilizaram essas ferramentas. Pode-se caracterizar a importância da experimentação animal no estudo da depressão, bem como a dificuldade em avaliar-se o comportamento típico de depressão seja em ratos ou camundongos e, delinear o processo metodológico acerca dos métodos empregados, que são considerados reprodutíveis e validados. A experimentação animal, assim como os estudos clínicos em humanos, tem permitido a compreensão dos diversos processos fisiológicos e patológicos que acometem a população. Modelos experimentais devem apresentar uma precisão adequada e devem ser funcionalmente, o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar. A experimentação em animais relacionada com pesquisas sobre depressão é de extrema importância no processo de descoberta de novas formas de prevenção e tratamento para essa doença tão crescente no mundo

Palavras-chave: Experimentação animal; Depressão; Estresse fisiológico

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize two validated experimental models, moderate and unpredictable chronic stress and forced swimming test to evaluate depression and its limitations. The databases Scielo, Lilacs and Pubmed were used in order to carry out the broad bibliographic survey on how to use these methodologies and their main biases found in studies that used these tools. It is possible to characterize the importance of animal experimentation in the study of depression, as well as the difficulty in evaluating the typical behavior of depression be in rats or mice and to outline the methodological process about the methods used, which are considered reproducible and validated. Animal experimentation, as well as clinical studies in humans, has allowed the understanding of the various physiological and pathological processes that affect the population. Experimental models must have adequate accuracy and should be functionally as similar as possible to what is intended to be studied. Experimentation with animals related to research on depression is extremely important in the process of discovering new forms of prevention and treatment for this growing disease in the world

Keywords: Animal experimentation; Depression; Physiological stress

2.1. Introdução

Os modelos animais podem ser utilizados em diversas áreas de pesquisa biológica[1,2]. O conhecimento científico adquirido pelos homens nas áreas biomédicas visando à saúde, somente foi possível devido ao uso da experimentação animal em suas pesquisas. A íntima relação entre a medicina e o uso de animais de laboratório é correlacionada ao conhecimento científico adquirido a respeito destes animais[3].

Referindo-se ao uso de modelos experimentais, torna-se importante a conceituação de doença animal, cujos mecanismos patológicos são suficientemente similares àqueles de uma doença humana, atuando assim como modelo. O modelo animal, deve permitir a avaliação de aspectos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser correlacionados com a saúde humana [1,4].

O uso animal em pesquisa é uma parte integrante e imprescindível do desenvolvimento da medicina moderna, contribuindo para a redução da mortalidade e prevenindo o sofrimento humano [5].

Assim, a busca por modelos experimentais em doenças neurológicas está relacionada ao crescimento da incidência dessas doenças as quais vêm crescendo constantemente nas últimas décadas. As mudanças no cotidiano das pessoas têm trazido inúmeros problemas de ordem neurológica, como a redução da qualidade de vida com o comprometimento da saúde tanto física como mental.

No estágio atual da ciência mundial, várias situações não podem excluir o uso de animais. Modelos experimentais descritos na literatura para estudos na área de doenças neurológicas são escassos. Diante das informações existentes, é importante o conhecimento sobre os principais modelos experimentais utilizados nesta área. Assim, este trabalho objetivou centrar-se em alguns estudos que utilizaram modelos experimentais para avaliar depressão.

2.2. Depressão

Os transtornos mentais atingem mais de 350 milhões de pessoas no mundo e, 40,5% são transtornos depressivos [6]. A prevalência de transtornos mentais na população brasileira 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 [7]. Caracterizados como doenças com alto grau de sobrecarga, os transtornos mentais ocasionam sofrimento tanto para o indivíduo quanto familiares e cuidadores, sendo a depressão a maior responsável por essa alta

carga. Com característica insidiosa reduz a vontade de viver de seus portadores afetando na vida dos que estão ao seu redor [8].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) fez uma projeção que em 2020, a segunda maior causa de comprometimento funcional serão os transtornos depressivos, perdendo somente para as doenças coronarianas.. Esta estimativa associa-se 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 [9].

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, o estado deprimido acarreta a falta de motivação para tarefas cotidianas, por um período maior que duas semanas [10].

Os principais sintomas da depressão são: humor deprimido, anedonia (perda da capacidade de responder a estímulos prazerosos), e sentimentos de inutilidade ou culpa. Sintomas somáticos também são incluídos, como perda de apetite, distúrbio de sono, retardo psicomotor, alteração da expressão facial, alteração de apetite, falta de concentração e memória prejudicada [11].

Embora o DSM-V seja a classificação de distúrbios neurológicos, o próprio manual admite que os transtornos mentais, nem sempre se encaixam dentro dos limites de classes pré-estabelecidas. O manual DSM-V descreve os transtornos psicopatológicos, como qualitativamente distintos, ou seja, como atributos categóricos, que diferem da normalidade pelo tipo de sintoma em vez de gravidade dos sintomas. Por conta disso a depressão não é diagnosticada a menos que cinco critérios estejam presentes na pessoa [12].

O diagnóstico da depressão é um desafio. Deve-se diferenciar a depressão de sintoma e depressão de síndrome. Esse desafio atrapalha as entrevistas clínicas estruturadas que são utilizadas no diagnóstico do transtorno depressivo maior [13].

A etiologia da depressão não está bem elucidada, sendo atribuída a diversos fatores, dentre eles fator hereditário, história familiar e situações estressantes [14]. Segundo Nabavi et al. (2017), são considerados fatores predisponentes o estresse crônico, disfunção endotelial, transmissão monoaminérgica deficiente (serotonina, dopamina, noradrenalina), redução dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e aumento de marcadores pró-inflamatórios[15].

A transmissão monoaminérgica deficiente prejudica a regulação do apetite, atividade psicomotora, humor e sono. No entanto, não está bem esclarecido, se a transmissão deficiente é em decorrência do desenvolvimento de anomalias e perda da sensibilidade dos receptores ou da quantidade insuficiente desses neurotransmissores no cérebro (norepinefrina, dopamina e serotonina)[16].

O BDNF, é responsável pela regulação da neurogênese, plasticidade neural e amadurecimento e sobrevivência de neurônios. Em indivíduos depressivos que cometeram suicídio, foram encontrados níveis baixos de BDNF no cérebro, principalmente em regiões como hipocampo e córtex-pré-frontal. Níveis baixos de BDNF foram encontrados no hipocampo em roedores, sendo esse parâmetro correlacionado positivamente com a liberação de corticosterona e situações de estresse físico e psicológico [16].

Evidências indicam que a depressão se correlaciona a alterações estruturais decorrentes da plasticidade sináptica em regiões específicas do cérebro. No entanto o potencial desses mecanismos de sinalização básicos para aplicação no tratamento clínico da depressão demanda pouco interesse.

Neste contexto investigações voltadas para esta área são necessárias a fim de identificar quais os agentes eficazes no tratamento da doença [18,19].

2.3. Validação de modelos de experimentação animal: desafios e limitações

Modelos de experimentação animal são instrumentos de pesquisa fundamentais que, buscam explorar a patologia mecanismos moleculares dos distúrbios, avaliar a eficácia de possíveis intervenções terapêuticas e fornecer parâmetros de segurança em relação a dosagem de fármacos [20].

Modelos animais, têm sido usados habitualmente em psiquiatria há anos, tanto em ensaios que buscam novas possibilidades de tratamento psicofarmacológico como em pesquisas clínicas para investigar a fisiopatologia dos transtornos mentais [20]. Por outro laudo, existem limitações e ressalvas nos modelos de depressão, sendo um desafio sua reprodutibilidade em animais devido dificuldade de observação dos sentimentos de culpa, pensamentos suicidas, os quais são sintomas restritos aos humanos [21,22].

Mesmo com críticas quanto sua aplicabilidade, é inegável a contribuição dos modelos animais para doenças em humanos visando a compreensão dos transtornos mentais. Os modelos, ao longo do tempo, foram sendo aperfeiçoados e, utilizados

modelos específicos para diferentes tipos de transtornos, como ansiedade, depressão, o que contribui para a elucidação de novas ações terapêuticas [23,24]. No entanto, transpor as alterações psicopatológicas em animais, ainda é desafio, tendo em vista a dificuldade de se reproduzir sintomas específicos da doença[25].

O principal obstáculo ainda é a escassez de modelos animais validados, devido a ausência de informações sobre as origens genéticas e os mecanismos responsáveis por esses distúrbios [20,21,22].

Para verificar a eficácia dos modelos animais, um parâmetro a ser considerado é a validação. Nos modelos animais em transtornos psiquiátricos, podemos descrever três critérios de validade: construto, aparente e preditiva. A validade construto é a habilidade de um modelo reproduzir os aspectos da biologia da doença em estudo, já a validade aparente está relacionada a capacidade de adaptação do modelo animal àquela condição clínica. A validade preditiva é a semelhança na resposta, em animais, aos agentes terapêuticos para determinada condição humana, como exemplo, como prever os efeitos de um possível fármaco. Existem alguns modelos animais com níveis consideráveis de validade, porém a ausência de marcador biológico para confirmar o diagnóstico dos transtornos mentais e avaliar a eficácia dos modelos animais ainda é um desafio [20,26.]

Porém, faz-se necessário a utilização de animais para a pesquisa de doenças humanas, pois tanto o avanço da fisiologia e da fisiopatologia foram permitidos por meio da experimentação animal, bem como muitas inovações em saúde. Dessa forma, os resultados obtidos fornecem informações relevantes para a decisão sobre tratamentos que devem ser considerados em ensaios clínicos [27,28].

2.4. Estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI)

O estresse crônico é considerado um fator ambiental que predispõe a depressão, caracterizando 60% dos casos de episódios depressivos que são desenvolvidos por diferentes situações de estresse, especialmente de origem psicossocial [29].

O ECMI envolve a exposição do animal a diferentes estímulos estressores, como imobilização, privação de água e comida, noite em maravalha úmida, ocasionando a elevação dos níveis séricos de corticosterona e estado de anedonia, que pode ser verificado pela diminuição no consumo por solução doce [30-35]. Nesse

contexto, um dos principais sintomas da depressão em seres humanos é anedonia, que é a redução do interesse ou prazer nas atividades diárias [36,37].

Os roedores geralmente adaptam-se a aplicação repetida de estímulos estressores, no entanto isto não ocorre se o estímulo é imprevisível, como no caso no estresse crônico moderado e imprevisível. Os protocolos de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) constituem um modelo com validade preditiva para estudos de mecanismos envolvidos na depressão [38-40].

A exposição ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico moderado ocasiona a hipertrofia da glândula adrenal [36-40], ocasionando um aumento da liberação de corticosterona sérica [38,39].

Em estudo realizado por Neves et al [41], os quais realizaram o protocolo de ECMI, verificaram que os efeitos do estresse incluindo 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, pesquisadores utilizam o modelo experimental de ECMI para elucidar a neurobiologia da depressão e novos alvos terapêuticos [41,42].

O protocolo consiste na submissão dos animais aos diferentes estímulos envolvidos no ECMI (Tabela 1) com modificações da metodologia descrita por Neves et al [41,42] com base na metodologia descrita por Moreau et al.[31]. O protocolo de ECMI envolve a aplicação de diferentes estímulos estressores, durante três semanas consecutivas, como: imobilização, 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 são submetidos a um pernoite em gaiola com maravalha úmida (100 mL de água distribuída na maravalha), e manutenção em ciclo claro/escuro invertido pelo período dois dias e meio.

Tabela 1. 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	8:00 - 10:00 h: Teste de preferência a solução de sacarose 1%	14:00 - 15:00 h: Imobilização Pernoite em gaiolas com maravalha úmida
Quinta-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	13:00 - 14:00 h: Imobilização Privação de água durante 18 horas
Sexta-feira	8:00 – 10:00 h: Exposição a garrafas de águas vazias. 11:00-12:00 h: Imobilização	18:00 h: Ciclo claro/escuro invertido (até 08:00 h da segunda-feira seguinte)

Durante a aplicação do protocolo de ECMI, a imobilização dos animais deve ser realizada em garrafas pet de 600 mL a fim de limitar a movimentação e o ajuste ao peso do animal. Canos de pvc, utilizados para imobilização ocasionam aos animais uma possível movimentação, além de não acompanharem o crescimento do animal, fato este que poderá comprometer a eficácia do protocolo [49].

As desvantagens no caso desse modelo é o tempo necessário (meses), o trabalho intensivo do procedimento e a falta de reprodutibilidade entre os laboratórios. Porém o ECMI, é um dos modelos que melhor se assemelha com a depressão em humanos, pois envolve surgimento de comportamentos similares como anedonia, que podem ser revertidos pelo tratamento crônico com antidepressivos não agudos[20].

No entanto para evitar esse viés, da reprodutibilidade, cada laboratório deve ter esse protocolo definido com suas alterações ou não, realizar treinamento específicos dos pesquisadores envolvidos, manter a equipe treinada e se possível a mesma, durante toda a execução do protocolo [20].

2.5. Avaliação de anedonia - teste de preferência à solução de sacarose 1%

A preferência à sacarose em ratos deve ser testada semanalmente, às 4as feiras, durante o protocolo experimental, com o objetivo de avaliar se há o desenvolvimento de anedonia (perda da capacidade de responder a estímulos prazerosos). É um teste utilizado como validação do protocolo de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível [30,31,43].

No dia do teste, os animais devem ser privados de água e comida durante 18 horas. Os ratos recebem duas garrafas com 300 mL de água, uma contendo uma solução de sacarose 1% e outra contendo apenas água filtrada. A posição das garrafas é determinada aleatoriamente. Após 2 horas de exposição às garrafas, a quantidade de cada solução consumida é verificada por meio da pesagem das garrafas e a preferência pela sacarose é calculada (100 x consumo de sacarose/consumo total de liquido) [43].

2.6. Teste de natação forçada

Modelos animais de depressão, em sua maioria, envolvem exposição aguda ou crônica a um agente estressor, com intuito de ocasionar sintomas do transtorno, sendo um dos mais populares e tradicionais modelos de depressão o teste de natação forçada (TNF) [44].

Aceito como um modelo preditivo de depressão, o teste observa 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 [45].

Desenvolvido como um modelo animal de depressão, o teste tem como objetivo mensurar os efeitos dos compostos antidepressivos em camundongos, sugerindo que a imobilidade reflete um estado depressivo no qual os animais não encontram mais uma saída, e se resignam a tal situação [36]. Esse comportamento é mensurado e há um tempo de imobilidade, que é correlacionado ao desamparo aprendido ou comportamento de desespero, semelhante ao estado de depressão humana. O tempo de mobilidade (nado ativo) tentando escapar da situação aversiva, pode ser

aumentado pelo uso de antidepressivos, indicando a possível eficácia do medicamento no tratamento da depressão [20, 46-49].

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, de 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 [45].

Após 24 horas da sessão preliminar os animais são submetidos ao teste com duração de cinco minutos [46-48].

Após cada sessão, os animais são retirados da água e rapidamente secos com uma toalha e mantidos próximos a um aquecedor de ambiente. Após estarem completamente secos (cerca de 30 minutos), os ratos devem recolocados em suas gaiolas e retornar ao biotério de experimentação.

Durante a sessão do Teste da natação forçada (duração de 5 minutos) os animais devem ser filmados e o comportamento de cada animal deve ser analisado por um indivíduo treinado em estudo cego, que assista aos vídeos com o auxílio de dois cronômetros, sendo um utilizado para cronometrar os cinco minutos do teste e outro para avaliar a imobilidade Deve-se analisar o 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. Outra alternativa é a utilização do programa Etho Vision® XT 4.1 Software Leesburg,VA - U.S.A para análise do comportamento, o qual realiza a mensuração do tempo de imobilidade e ausência de nado, porém apresenta algumas limitações nesse sentido. Um dos problemas encontrados em um estudo [49], a respeito dessa metodologia, é que durante o teste é possível que junto com o animal se encontre alguns resquícios de maravalha, que são provenientes da gaiola. Durante a avaliação com o software, ao invés de avaliar apenas o rato, essa maravalha pode ser reconhecida como movimentos que a cobaia está realizando, gerando resultados falso positivos. Outros problemas observados são em relação a iluminação, se a qualidade do vídeo proporcionar uma iluminação mais clara, ao invés de o branco do rato/camundongo ser reconhecido como o instrumento avaliado, o software pode avaliar a luz como a

ferramenta a ser mensurada como movimento ou ausência de movimento. Nesse sentido em alguns estudos é interessante utilizar o indivíduo treinado para avaliação desse protocolo ao invés do software [44,45].

A administração repetida dos antidepressivos eficazes reduz a duração da imobilidade em ratos e em camundongos. Desta forma, o tratamento com antidepressivos em ratos parece ser mais seletivo, enquanto em camundongos parece ser mais sensível [50].

Para atestar o potencial antidepressivo dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, houve a necessidade de adaptação do modelo com intuito de aceitação do tempo nadando e as tentativas de escalada como comportamento de fuga. Pela praticidade, rapidez, reprodutibilidade em diferentes laboratórios é considerado um dos modelos mais utilizados. Não obstante, existem vieses a este modelo, sendo um dos principais, a de que o estado de desemparo aprendido não é amparado e, sua resposta é aguda ao uso de antidepressivos, ao contrário do que se observa em pacientes deprimidos, em que sua melhora ocorre após semanas do uso do medicamento [43].

Uma das principais observações a este modelo, é ausência de coexistência do tempo de resposta verificado nestes testes com o que se verifica em indivíduos com depressão, onde há necessidade do uso prolongado de antidepressivos afim de se obter uma resposta terapêutica pertinente. Nota-se limitações no número de modelos animais de depressão que necessitem do uso crônico da medicação para alcançar melhora, aproximando-se dessa forma da resposta esperada em pacientes depressivos.

2.7. Considerações Finais

Modelos de experimentação animal são usados virtualmente em todos os campos da pesquisa biológica nos dias de hoje. No contexto atual, a utilização de modelos experimentais para a depressão tem sido muito importante não somente para o aperfeiçoamento e comprovação de técnicas e procedimentos já existentes, bem como para o desenvolvimento de outros. Não existem modelos considerados “padrão de ouro” em transtornos do sistema nervoso central, apenas modelos comumente usados os quais apresentam dados científicos consideráveis para sua utilização.

Apesar de existirem algumas limitações como a dificuldade de financiamentos, práticas de cuidados, dentre outros, as investigações em animais são necessárias

para que se obtenha a compreensão dos mecanismos da doença que é semelhante aos mecanismos nos humanos, além da descoberta de novos tratamentos para a doença e suas complicações. Em suma os modelos animais apresentam boa validade preditiva, em muitos casos a metodologia foi aperfeiçoada com intuito de detectar o real potencial terapêutico do composto em estudo e aumentar a eficácia da reprodutibilidade do modelo.

A relevância de estudar esses procedimentos deve-se à falta de conhecimento dos mecanismos patológicos das desordens psiquiátricas e da progressão da doença, com intuito de aprimorar os saberes técnico-científicos e futuramente poder utilizar as descobertas na área experimental com animais e na saúde humana.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: historic and conceptual revision. Acta Cir Brasi 2003; 18:1-3.
2. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E, Berisa A, Gil D, Embade N, Valle, M, et al. Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. Proteomic Clin Appl 2010; 4:416-25.
3. Gui KO, Andersen ML, D'Almeida V, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães JE, et al. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação. São Paulo: UNIFESP; 2004.
4. Calabrese EJ. Principles of animal extrapolation. ed. Lewis Publishers: Michigan; 1991
5. Nestor S, Mirian AB. Carta ao editor. rquivos Brasileiros de Ciências da Saúde 2008; 33: 7.
6. Santos IS, Tavares BF, Munhoz TN, Almeida LSP, Silva NTB, Tams BD, et al. Sensibilidade e especificidade do Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) entre adultos da população geral. Cadernos da Saúde. 2013; 29 :1533-43
7. Ribeiro JM, Inglez-Dias A. Políticas e inovação em atenção a saúde mental: limites ao descolamento do desempenho do SUS. Ciência & Saúde Coletiva 2011; 16:4623-4633.
8. Abelha, L. Depressão uma questão de saúde pública. Cadernos de Saúde Coletiva 2014. 22(3): 223-223.
9. Michelon L, Cordeiro Q, Vallada, H. Depressão. Revista Brasileira De Medicina 2008; 65: 15-25.
10. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual Of Mental Disorders. 5 th ed. Washington 2013. 991 p.
11. Aarsland D, Pahlhagen S, Ballard CG, Ehrt, U, Svenningson, P. Depression in Parkinson disease: epidemiology, mechanisms and management. Nature reviews neurology, 2012; 8: 35-47.
12. Eulálio, MC, Andrade TF, Melo RLP, Neri AL. A estrutura latente da depressão em idosos: uma análise taxométrica. Cadernos de Saúde Pública 2014. 31 (3): 555-564.

13. Feinstein A, Magalhães S, Richard JF, Audet B, Moore C. The link between multiple sclerosis and depression. Nature reviews neurology, London 2014; 10: 507-517.
14. Teng CT, Cezar LTS. Depressão. Revista Brasileira de Medicina. São Paulo 2010; 67:37-52.
15. Nabavi SM, Daglia M, Braidy N, Nabavi SF. Natural products, micronutrientes, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. Nutritional neuroscience. 2017; 3: 180-94.
16. Lafer B, Vallada Filho HP. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. Revista Brasileira de Psiquiatria.1999; 21(1): 12-17.
17. Sakata K. Brain-derived neurotrophic factor for depression therapeutics. Austin J Parmacol Ther. 2014; 2(1):1006.
18. Hidaka BH. Depression as a disease of modernity: explanations for increasing prevalence. Journal of Affective Disorders. 2012; 140:205-214.
19. Luo J, Zhanga L, Ninga N, Jiangc, Yua SY. Neotrofin reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior via regulating BDNF, PSD-95 and synaptophysin expression in rat. Behavioural Brain Research. 2013; 253:48-53.
20. McGonigle P. Animal models of CNS disorders. Biochem Pharmacol. 2014; 87: 140-49
21. Garcia R. Stress, metaplasticity, and antidepressants. Current Molecular Medicine, 2002; 2: 629-638
22. Dellagioia N, Hannestad J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2010; 34: 130-143.
23. Insel TR. From animal models to model animals. Biol Psychiatry. 2007; 62: 1337-1339.
24. Jones CA, Watson DJ, Fone KC. Animal models of schizophrenia. Br J Pharmacol. 2011; 164(4): 1162-1194
25. Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. Nature Neuroscience. 2010; 13:1161-1169.
26. Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafai RAl, Khaku A, Mondello S, et al. An updated overview of animal models in neuropsychiatry.Neurosci. 2013; 240:104-218.

27. Savla U. Responsible conduct in animal research. The Journal of clinical investigation. 2003; 112.
28. 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 2002;324:474-476
29. Siegrist J, Lunau T, Wahrendorf M, Dragano, N. Depressive symp psychosocial stress at work among older employees in three continents. Globalization and Health 2012; 8:1-8. 2012.
30. Moreau, JL, Jenck F, Martin JR, Perrin S, Haefely WE. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT1C receptor activation in rats. Psychopharmacology. 1993; 110:140-144
31. Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. Encephale.1997; 23:280-289.
32. Willner,P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. Neuropsychobiology. 2005; 52:90-110.
33. Chen H, Pandey GH, Dwivedi, Y. Hippocampal cell proliferation regulation by repeated stress and antidepressants. Neuroreport. 2006; 7:863-867.
34. Katz RJ, Roth KA, Carrol BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neuroscience and biobehavioral reviews. 1981; 5:247-251
35. Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology. Revista Brasileira de Psiquiatria 2013; 35: 112-120
36. Konarska M, Stewart RE, Mccarty R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. Behavioral Neural Biology. 1990; 53(2): 231-243.
37. 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. 2001; 899(1-2): 227-239.
38. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Pereira JG, Stertz L, Gavioli EC, 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. 2008; 5(4): 207-213.

39. Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC , Quevedo J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. Progress in Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry. 2009;33(3): 450-455.
40. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dall-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. Neurochemistry International. 2009;54(5-6):358-362.
41. Neves VJ, Moura MJCS, Almeida BS, Costa R, Sanches A, Ferreira R, Tamascia ML, Romani EA, Novaes PD, Marcondes FK. Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats. Stress. 2012;15(2):138-148.
42. Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Silvia NS, Costa R, Montemor PL, Narvaes EAO, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. Stress. 2009; 12(4):320-327.
43. Grippo A, Johnson AK. Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2002; 26(8)941-962.
44. Cryan JF, Sweeney FF. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug Discovery. Br J Pharmacol. 2011; 164: 1129-1161.
45. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature. 1977; 266:730-732.
46. Calil CM, Biachi FJ, Tanno AP, Cunha TS, Marcondes FK. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2002; 38(4):479-485.
47. Calil CM, Marcondes FK. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. Life Sciences. 2006;79:1712-1719.
48. Liu GX, Cai GQ, Sheng ZJ, Jiang J, Mei Z, Wang ZG, Guo L, Fei J. Reduced Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice Lacking GABA Transporter Subtype. Neuropsychopharmacology. 2007;32:1531-1539.
49. Barankevicz GB. Poder antioxidante da curcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP; 2015
50. Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? Psychopharmachology. 1988;94:147-161.

3. NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO CÚRCUMA: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA

RESUMO

A cúrcuma é considerada um alimento promissor na redução dos riscos do desenvolvimento da depressão. No entanto, devido a sua baixa biodisponibilidade e consequentemente má absorção sua utilidade acaba tornando-se limitada. A nanoencapsulação é uma técnica que reduz o tamanho da partícula do composto bioativo, possibilitando o aumento da absorção.O objetivo desse estudo foi desenvolver nanopartículas de cúrcuma a partir do encapsulamento com zeína pelo método de dispersão líquido-líquido e avaliar sua possível atividade antidepressiva em ratos submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI). No protocolo experimental foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Sprague- Dawley divididos em 5 grupos (n=8 ratos/grupo): Estresse crônico moderado e imprevisível+nanopartículas (ECMI+NANO), Nanopartícula + Controle (NANO), Estresse crônico moderado e imprevisível + Veículo (ECMI), Estresse crônico moderado e imprevisível + fluoxetina (ECMI+FLUOX), Controle + Veículo (CONTROL) onde veículo foi água filtrada, a mesma utilizada para ressuspender as nanopartículas. A avaliação de anedonia, sintoma similar da depressão em humanos, confirmou que o protocolo foi efetivo para avaliar esse comportamento. No teste de natação forçada observou-se que, os grupos estressados apresentaram maiores valores de imobilidade. A administração de nanopartículas de zeína contendo cúrcuma (10 mg kg^{-1}) preveniu a elevação dos níveis de corticosterona em ratos submetidos ao protocolo de ECMI. Estes resultados indicam que as nanopartículas de zeína contendo cúrcuma podem contribuir para uma possível ação neuroprotetora deste alimento funcional na depressão Além disso, comprovou-se que o encapsulamento possibilitou a elaboração de nanopartículas com boas característica, apresentando alta eficiência de encapsulamento e baixo índice de polidispersão.

Palavras chaves: Nanotecnologia; Depressão; Cúrcuma

ABSTRACT

Turmeric is considered a promising food in reducing the risks of developing depression. However, due to its low bioavailability and consequently malabsorption its usefulness ends up becoming limited. Nanoencapsulation is a technique that reduces the particle size of the bioactive compound, allowing the increase of absorption. The objective of this study was to develop turmeric nanoparticles from the zein encapsulation by the liquid-liquid dispersion method and to evaluate its possible antidepressant activity in rats submitted to the chronic mild and unpredictable stress procedure (CMUS). In the experimental protocol, 40 male Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups (n = 8 rats / group): chronic mild and unpredictable stress procedure + nanoparticles (CMUS + NANO), Nanoparticle + Control (NANO), chronic mild and unpredictable stress procedure + Fluoxetine (CMUS + FLUOX), Control + Vehicle (CONTROL) where vehicle was filtered water, the same used to resuspend the nanoparticles. The evaluation of anhedonia, a similar symptom of depression in humans, confirmed that the protocol was effective in evaluating this behavior. In the forced swimming test, it was observed that the stressed groups had higher immobility

values. The administration of zein nanoparticles containing turmeric (10 mg kg^{-1}) prevented the elevation of corticosterone levels in rats submitted to the CMUS protocol. These results indicate that turmeric-containing zein nanoparticles may contribute to a possible neuroprotective action of this functional food in depression. In addition, it was verified that the encapsulation allowed the elaboration of nanoparticles with good characteristics, presenting high encapsulation efficiency and low polydispersion index**.**

Keywords: Nanotecnology; Depression; Turmeric

3.1. Introdução

A cúrcuma (*Curcuma longa* L) é uma especiaria tradicional, de uso histórico devido ao seu sabor e às suas propriedades medicinais. Seu rizoma pode chegar até 10 cm de comprimento, e quando cortado possui odor agradável, sendo da sua raiz obtido o pó de coloração amarela utilizado na culinária (PEREIRA; MOREIRA, 2009).

Em 1815, a cúrcuma foi isolada do rizoma da planta *Curcuma longa* L, sendo considerada solúvel em etanol e acetona, mas insolúvel em água e éter (GOEL; KUNNUMAKKARA, 2008).

Pertencente à família *Zingiberaceae* é amplamente cultivada em países asiáticos e devido a seu nome popular de açafrão, a espécie é confundida com o açafrão verdadeiro (*Crocus sativus* L), porém são taxonomicamente distintas. Ambas produzem pigmentos que são utilizados na indústria de alimentos, mas o açafrão verdadeiro é destinado a pratos refinados sendo a especiaria mais cara do mundo, um quilograma de açafrão verdadeiro corresponde a um quilograma de ouro (SIGRIST, 2009).

Comercialmente é utilizada como especiaria, fonte de amido industrial e corante. Devido ao número de grupos hidroxilas na estrutura do seu anel aromático possui alta atividade antioxidante (ROSSI et al., 2008; HAMAGUCHI; ONOL; YAMADA, 2010; NAM et al., 2014).

A curcumina é o principal pigmento fenólico encontrado na cúrcuma, possui potente ação antioxidante, anfi-inflamatória, antitumoral, anti-HIV e propriedades antimicrobianas (DE et al, 2009; WANG et al, 2009; EMBUSCADO et al., 2015).

Na medicina oriental, a cúrcuma é utilizada no tratamento de alguns distúrbios de estresse e prevenção da depressão (KAUFMANN et al.,2016). Apesar de alguns estudos verificarem que o consumo de altas quantidades de cúrcuma está correlacionado com menor incidência de doenças inflamatórias e cognitivas, os

mecanismos de ação da cúrcuma no tratamento da depressão ainda não foram totalmente esclarecidos (HURLEY et al., 2013).

A depressão é um transtorno mental, caraterizado por tristeza, falta de interesse e prazer nas atividades diárias, baixa auto-estima, perda de peso ou ganho de peso significativo, distúrbios de sono, sentimentos de inutilidade, pensamentos recorrentes de suicídio. Normalmente esses sentimentos são em um período superior a quinze dias, porém é uma doença tratável, visto que a combinação de terapia e medicamentos antidepressivos podem garantir a recuperação (APA, 2016; WHO 2016). Um estudo da Organização Mundial da Saúde e do Banco Mundial, calculou que, os casos de depressão e ansiedade geram, por ano, custos à economia de US$ 1 trilhão, cerca de 3,5 trilhões de reais. Em contrapartida observa-se que a cada US$ 1 investido em tratamento para esse distúrbio o retorno é de US$ 4, pois os pacientes melhoram sua disposição e seu rendimento no trabalho, já que a depressão é a principal causa de incapacidade em todo o mundo (CHISHOLM et al., 2016; WHO 2016).

Há alguns anos os benefícios proporcionados pela cúrcuma principalmente em doenças neurológicas, são evidenciados na literatura, mas a hipótese de seus efeitos neuroprotetores estão diretamente relacionados com os seus curcuminoides. Acredita-se que cada componente da cúrcuma atua por meio de múltiplas vias, como diminuição do estresse inflamatório, atenuação de citocinas indutoras de estresse que retardam o progresso da depressão e melhoram a função cognitiva (AHMED; GILANI, 2011).

Sanmukhani et al.(2013), verificaram que a curcumina apresenta atividade antidepressiva semelhante a exercida pela fluoxetina, medicação utilizada no tratamento da depressão, em testes realizados com humanos, evidenciando a importância de se estudar esses compostos e seus mecanismos de ação.

A curcumina possui características hidrofóbicas o que lhe permite atravessar a barreira hematoencefálica e apresentar ação neuroprotetora. A hipótese de sua ação como antidepressivo deve-se ao controle da liberação de neurotransmissores como a dopamina e noradrenalina e a proteção da função dos sistemas monoaminérgicos. O exato mecanismo da intervenção antidepressiva ainda precisa ser estudado, a fim de elucidar sua ação a nível cerebral. Em contrapartida, apesar desse efeito promissor, e essa característica lipofílica lhe conferir confiabilidade como

um medicamento eficaz no tratamento da depressão, sua utilidade é limitada, devido sua baixa biodisponibilidade e má absorção (JAIN et al., 2013; ZHANG et al., 2015)

A nanotecnologia é considerado um importante meio de produção de novos materiais e estruturas para uma ampla gama de aplicações na indústria de alimentos (LIVNEY, 2015). Por meio da redução do tamanho de partícula do composto bioativo, a solubilidade pode ser aumentada, bem como sua taxa de dissolução, resultando em aumento substancial da biodisponibilidade. As características organolépticas também podem ser melhoradas, mascarando sabores, odores e cores indesejáveis. Além disso pode proteger o composto da perda da funcionalidade devido aos efeitos da luz, oxigênio, pH, umidade ou interação com outros componentes (GÓMEZ-ESTACA et al., 2015; YAO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2016).

Esses sistemas também permitem incorporar a substância bioativa em uma concentração elevada, entregando o composto ativo a uma taxa controlada e sustentada durante o transporte e no sitio específico, propiciando sua atividade na circulação sistêmica (SUN et al., 2012). Nesse sentido as nanopartículas de cúrcuma poderiam ser aplicadas tanto na indústria de alimentos, como aditivo natural, e na indústria farmacêutica devido às suas propriedades farmacológicas (RAVICHANDRAN, 2013; GHALANDARLAKI et al., 2014). Dessa forma, a formulação demonstra ter potencial aplicação em alimentos funcionais.

A nanotecnologia é um campo emergente e que possibilitará a criação de sistemas inovadores de entregas de compostos lipofílicos, como é o caso da curcumina, composto marjoritário da cúrcuma. Abordagens para melhorar a biodisponibilidade estão sendo estudadas para aumentar a concentração plasmática e melhorar os processos de permeabilidade celular da curcumina por meio da nanotecnologia (GHALANDARLAKI et al., 2014).

A zeína é a principal proteína de armazenamento presente no milho, possui caráter hidrofóbico devido a sua composição de aminoácidos (leucina, prolina e alanina). Não é utilizada para consumo humano direto, mas pode ser facilmente convertida em nanopartículas. Possui alta resistência térmica, capacidade de revestimento, biodegradabilidade e biocompatibilidade, devido a isso, tem sido usada em sistemas de liberação modificada. Além disso já demonstrou a capacidade de aumentar a biodisponibilidade oral do ácido fólico e resveratrol (PATEL et al., 2010; PALIWAL; PALAKURTI, 2014; PENALVA, et al. 2016).

Com base no exposto acima, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a viabilidade de desenvolver nanopartículas de zeína contendo cúrcuma e avaliar a possível atividade antidepressiva.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Preparação das nanopartículas

A cúrcuma (*Curcuma longa* L) para preparação das nanopartículas, 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. As nanopartículas de zeína contendo cúrcuma, foram preparadas na Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO em Guarapuava-PR. As nanopartículas foram obtidas pelo método de dispersão líquido-líquido, descrito previamente por Zhong, Tian e Zivanovic (2009), com base nas metodologias propostas com algumas modificações. Primeiramente, 120 mg de zeína foram dissolvidas em 6 mL de solução hidroalcóolica à 87%. Simultaneamente, 70 mg de cúrcuma foram dissolvidas em 7 mL de etanol, onde 2 mL dessa solução foi gotejada na solução de zeína obtida anteriormente (contendo assim 20 mg de Cúrcuma). Essa fase orgânica resultante foi adicionada gota a gota, sobre 32 mL de solução aquosa de caseinato de sódio à 1%, sob agitação magnética moderada e constante e à temperatura ambiente, onde as partículas foram formadas imediatamente. Após 2 horas, sob agitação, parte do solvente orgânico e parte da água da dispersão coloidal foram removidas por evaporação moderada durante a agitação.

A cúrcuma não encapsulada foi separada das nanopartículas por meio de ultracentrifugação (14000 rpm, a 15°C, por 20 min) e o sobrenadante foi armazenado para posterior análise. Finalmente, as nanopartículas obtidas nessa etapa após centrifugação foram ressuspensas com água Mili-Q.

As nanopartículas de cúrcuma foram mantidas em solução aquosa protegidas da luz, sob congelamento até o momento do uso.

3.2.2. Caracterização das nanopartículas

3.2.2.1. Eficiência da encapsulação

A quantidade de cúrcuma encapsulada nas nanopartículas foi determinada por CLAE (Waters 2695 Alliance - Milford, MA, USA). A fase móvel foi composta de metanol:etanol:ácido acético (0,5%) na proporção de 70:27,5:2,5, eluida a 0,8 mL/min em modo isocrático. As análises foram realizadas com detector PDA no comprimento de onda de 417 nm. Utilizou-se uma coluna C18 (5Um e 25 cm). Uma curva de calibração da cúrcuma em etanol foi construída utilizando os padrões de 5, 10, 25, 30, 40 e 50 ug/ml. A eficiência de encapsulação foi calculada através de uma análise indireta da Cúrcuma livre presente no sobrenadante obtida pelo processo de centrifugação. Alíquotas do sobrenadante contendo a Cúrcuma livre forma diluídas em etanol na proporção de 1:10, e analisadas por CLAE, através da seguinte equação:

$$\%EE = (Ct - Cs/Ct) \times 100 \ (1)$$

Onde Ct=total de cúrcuma utilizada na formulação e Cs=cúrcuma presente no sobrenadante, os ensaios forma feitos em triplicata.

3.2.2.2. Determinação do tamanho de partícula, polidispersidade e potencial zeta

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (BIC 90 plus – Brookhaven Instruments Corp., EUA). As análises foram realizadas a uma dispersão ângulo de 90° e uma temperatura de 25 °C. Para cada amostra, o diâmetro médio de partícula, polidispersidade e desvio padrão de dez medições foram calculados (KHALIL et al, 2013). Para a caracterização da superfície das nanopartículas foi utilizado o potencial zeta, sendo este determinado a partir da mobilidade na célula eletroforética (Nano ZS90, Malvern Instruments, UK) a 25°C e um potencial de ± 150 mV foi estabelecido.

3.2.2.3. FTIR

A caracterização foi realizada por Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FTIR) por Prestige-21 (Shimadzu). As amostras foram homogeneizadas em pastilhas de KBr (brometo de potássio) e analisadas por transmitância na região de 4000-400 cm-1 com resolução de 4 cm-1 e 32 varreduras (STUART,1997).

3.2.3. Estudo in vivo

O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Campinas- Faculdade de Odontologia de Piracicaba-SP. Foram utilizados 40 ratos machos Sprague-Dawley, pesando entre 150 e 180 g no início do experimento, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais chegaram com um mês de idade e passaram por um período de adaptação de uma semana (equivalente a semana -3 do fluoxograma de delineamento experimental, figura 1). Os procedimentos foram iniciados quando os animais atingiram dois meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e em sala climatizada (22 ± 2 ºC), com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 07:00 h). Receberam ração para ratos Presence Nutrição Animal® e foram divididos em 5 grupos experimentais (n=8 ratos/grupo): Estresse crônico moderado e imprevisível+nanopartículas (ECMI+NANO), Nanopartícula + Controle (NANO), Estresse crônico moderado e imprevisível + Veículo (ECMI), Estresse crônico moderado e imprevisível + fluoxetina (ECMI+FLUOX), Controle + Veículo (CONTROL) onde veículo foi água filtrada, a mesma utilizada para ressuspender as nanopartículas. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (Processo CEUA n° 4595-1/2017) e estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

A administração de nanopartículas iniciou-se duas semanas antes da aplicação do protocolo de estresse (equivalente a semana 1 do fluxograma de delineamento experimental, figura 1). Durante o procotolo a administração ocorreu 3 vezes na semana, no período da manhã antes do estímulo estressor, via gavagem, em um volume que não excedia 2mL para cada 100g de peso corporal. A concentração utilizada foi de 10 mg kg^{-1} nanopartículas de cúrcuma, segundo o estudo de Shaikh et al. (2009), sendo a mesma concentração utilizada para o grupo controle positivo fluoxetina.

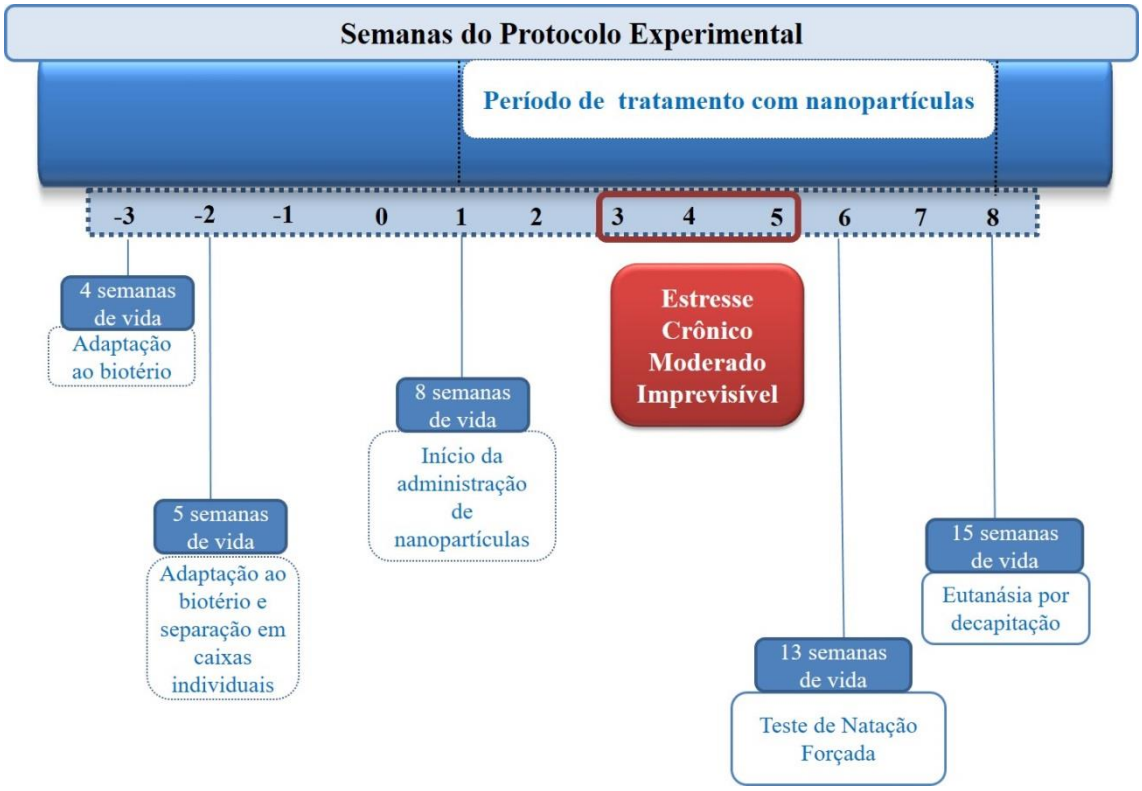

Figura 1. Fluxograma de delineamento experimental

3.2.3.1. Protocolo de Estresse

Na 3ª, 4ª e 5ª semanas, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), de acordo com as modificações de Neves et al. (2009; 2012), a partir da metodologia descrita por Moreau (1997). O protocolo de ECMI consiste na aplicação de diferentes estímulos estressores ao longo de sete dias, repetindo-se os procedimentos por três semanas consecutivas (Tabela 2).

Tabela 2. 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	8:00 - 10:00 h: Teste de preferência a solução de sacarose 1%	14:00 - 15:00 h: Imobilização Pernoite em gaiolas com maravalha úmida
Quinta-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	13:00 - 14:00 h: Imobilização Privação de água durante 18 horas
Sexta-feira	8:00 – 10:00 h: Exposição a garrafas de águas vazias. 11:00-12:00 h: Imobilização	18:00 h: Ciclo claro/escuro invertido (até 08:00 h da segunda-feira seguinte)

3.2.3.2. Avaliação de Anedonia - Teste de preferência à solução de Sacarose 1%

A avaliação de anedonia, foi realizada por meio do teste de preferência à sacarose, semanalmente, às 4as feiras, com intuito de avaliar se houve o desenvolvimento de anedonia (perda da capacidade de sentir prazer). No dia anterior ao teste, todos os animais foram privados de água e comida durante 18 horas. O teste consiste em oferecer aos ratos duas garrafas contendo 300 mL 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, a quantidade de cada solução consumida foi determinada por meio da pesagem das

garrafas e a preferência pela sacarose foi calculada (100 x consumo de sacarose/consumo total de líquido) (GRIPPO et al., 2002).

3.2.3.3. Teste da Natação Forçada (TNF)

Na 6ª semana do protocolo experimental, 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 25ºC. O teste consiste de uma pré sessão, com duração de 15 minutos de natação e a segunda sessão é a qual avaliamos o comportamento de imobilidade. No dia seguinte, 24 horas após a primeira sessão, os animais são novamente submetidos à natação, nas mesmas condições, durante 5 minutos (PORSOLT; LE PICHON;JALFRE, 1977).

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, e analisados o tempo significativo de mobilidade, nado e imobilidade. Foi considerado como imobilidade a ausência de nado ativo e pequenos movimentos realizados com intuito de manter a cabeça fora da água.

3.2.3.4. Análise bioquímica

Os animais foram eutanasiados por decapitação, ao final da 8ª semana do protocolo experimental. O sangue foi coletado em tubos com anticoagulante (EDTA e heparina) e centrifugado para posteriores dosagens. As amostras foram congeladas em ultrafreezer a -80°C.

A concentração plasmática de corticosterona foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico, por meio do uso de kit comercial Assay Designs® (Ann Arbor, MI, USA).

3.2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS(SAS/STAT, 2003) versão 9.0 para Windows. Foi avaliada a homogeneidade da variância e normalidade utilizando os testes de Box-Cox e Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a diferença entre os grupos foi testada usando o teste T de tukey para comparação múltipla das médias. Valores de *p* menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Caracterização das Nanopartículas

A tabela 3 mostra os valores de eficiência de encapsulação, polidispersão, tamanho do diâmetro médio e potencial zeta das nanopartículas formadas a partir de zeína.

Tabela 3. Características das nanopartículas

Características das Nanopartículas	Valores
Eficiência da nanoencapsulação (%)	100
Polidispersão (nm)	0,153
Diâmetro médio (nm)	221,2
Potencial Zeta (mV)	-32,66

Considerando a eficiência da encapsulação, o alto valor obtido, 100%, (tabela 3), demonstrou que o método foi eficiente em associar a cúrcuma na estrutura de zeína. Eficiência de encapsulamento (EE) acima de 50% já é considerado significativo para substâncias com características lipofílicas e os valores podem variar dependendo dos sistemas e processos aplicados (ZAMARIOLI, 2015). Baspinar et al. (2018), durante a elaboração de nanopartículas de zeína-quitosana carregadas com curcumina observaram EE de 89%, dados que corroboram com o presente estudo, indicando a alta eficiência da zeína no encapsulamento da cúrcuma e seus curcuminoides.

O material escolhido para revestir as nanopartículas a zeína, pertence a um grupo de proteínas extraídas do farelo de milho, as quais são solúveis em álcool. Classificadas em prolaminas, a superfície das suas moléculas possuem mais de 50% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tornando-os insolúveis em água. A incorporação de zeína em sistemas aquosos é feita pela preparação de nanopartículas dispersáveis, por dispersão de uma solução aquosa de etanol e zeína na água, onde a zeína precipita para formar nanopartículas porque a mistura com um conteúdo reduzido de etanol torna-se um não-solvente de zeína. O processo é usado para encapsular vários compostos lipofílicos que são co-dissolvidos na solução aquosa de estoque de etanol e co-precipitam com zeína durante a dispersão em água (CHEN; YE; LIU, 2013, 2014; LUO; WANG, 2014).

O tamanho de partícula e a homogeneidade da distribuição de tamanho, expressa como índice de polidispersão são considerados uma das informações mais básica de nanopartículas, sendo o método mais comumente empregado é o espalhamento de luz dinâmica.

Como mostrado na tabela o valor do índice de polidispersão encontrado foi de 0,153 nm, indicando a uniformidade das partículas relacionada a esse parâmetro e a formação de sistemas monodispersos. Valores de polidispersão entre 0,1 a 0,25 nm indicam uma pequena distribuição de tamanho, já valores superiores a 0,5 são indicativo de alta distribuição de tamanho. A estreita distribuição do tamanho da partícula garante a homogeneidade das nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003, CHO et al., 2013).

O tamanho médio das partículas como mostrado na tabela 2 foi de 221,2 nm, como esperado, já que para nanopartículas são aceitados valores inferiores a 300 nm. O tamanho médio de nanopartículas de zeína, são de normalmente 100-200 nm, corroborando com os dados encontrados nesse estudo.

A distribuição do tamanho e o tamanho médio das partículas, são características importantes pois determinam o destino biológico e a capacidade de direcionamento da nanopartícula. Também podem influenciar na estabilidade e liberação do composto que estão carregados nas nanopartículas (MOHANRJ; CHEN, 2006).

Para a caracterização da superfície das nanopartículas foi utilizado a medida do potencial zeta, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MOHANRAJ;CHEN, 2006). As nanopartículas de zeína, apresentaram valor de -32,66 mV, indicando estabilidade nesse processo, uma vez que, elevados valores de potencial zeta,acima (+/-) 30 mV, diminuem a possibilidade de agregação (SCHAFFAZICK et al., 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006; CHO et al., 2013).

3.3.1.1. FTIR

A espectroscopia no infravermelho pela transformada de fourier foi feita a fim de verificar se as características estruturais da curcuma foram mantidas após o nanodimensionamento.

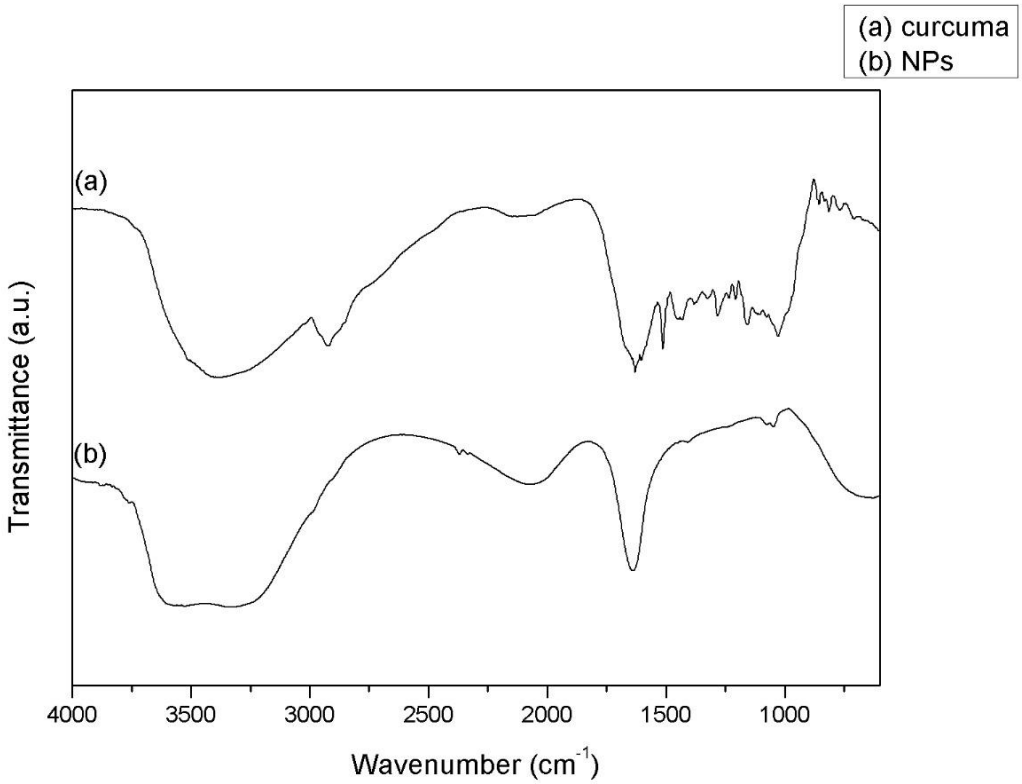

Figura 2. Espectros de infravermelho de cúrcuma e nanopartículas de zeína contendo cúrcuma

A radiação infravermelha é correspondente a parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas, sendo a região entre 4000 e 400 cm^{-1} a de maior utilidade para análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas, como a da curcumina.

A FTIR tem alta velocidade de detecção, capacidade de detectar vários tipos de componentes, no entanto apresenta como desvantagem a não identificação direta dos grupamentos orgânicos, sendo isso realizado por meio de comparação dos dados na literatura (SKOOG et al., 2002; ZHANG et al., 2015).

Os espectros de FTIR (Figura 2), mostraram bandas características na região de 3300-3410 cm^{-1} relacionadas às vibrações do grupo OH livre do fenol. Bandas em 1640, 1645 e 1647 cm^{-1} referem-se à vibração do grupo carbonila, e as bandas na região 1340-1470 cm^{-1} são pertinentes às vibrações C=C do anel aromático e elongação da ligação C−O. As bandas na região de 1020-1155 cm^{-1} são relativas ao estiramento do grupo C−O de éter e na região de 700- 900 cm-1 são referentes a C−H dos grupos alcenos.

3.3.2. Experimento in vivo

3.3.2.1. Avaliação de anedonia

A anedonia foi avaliada por meio do teste de resposta à solução de sacarose 1% (Figura 3).

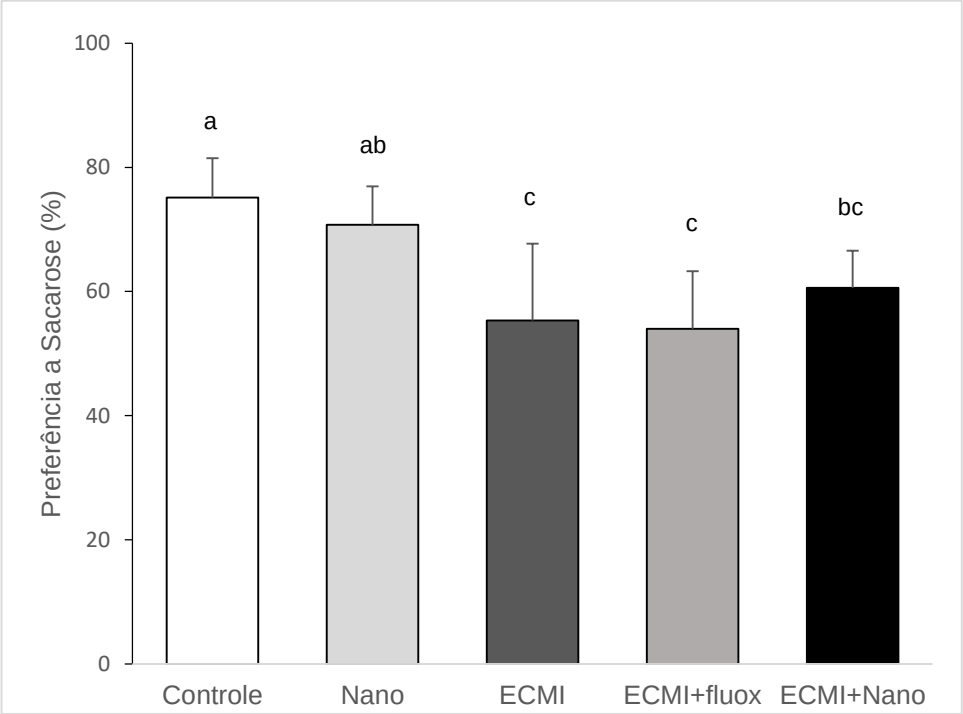

Figura 3. Resposta ao teste de preferência à solução de sacarose. Controle: água filtrada; Nano: nanopartículas de zeína contendo cúrcuma; ECMI: estresse crônico moderado e imprevisível+ água; ECMI + fluox: estresse crônico moderado e imprevisível+ fluoxetina; ECMI + nano: estresse crônico moderado e imprevisível+ nanopartículas de zeína contendo cúrcuma. Os valores estão apresentados em média e ± desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Os grupos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível apresentaram redução significativa ($P < 0,0001$) no consumo de sacarose em relação aos grupos controle. O grupo controle apresentou preferência à solução doce 20% maior que o grupo estresse + veículo.

Apesar de não apresentar diferença estatística, o grupo nano mostrou uma preferência de 10% maior pela solução de sacarose em comparação ao grupo estresse + nano. Os resultados demonstram que a redução hedônica no teste de preferência a sacarose, confirmam a hipótese que o protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, induz ao comportamento de anedonia e ansiedade. Um dos

principais sintomas da depressão em seres humanos é anedonia, ou seja, a redução do interesse ou prazer nas atividades diárias, sendo considerado um indicativo de depressão, corroborando com outros estudos (GRIPPO; JOHNSON, 2002; GRIPPO; BELTZ; JOHNSON, 2003; WILLNER, 2005; GROSS; PINHASOV, 2016).

3.3.2.2. Teste de Natação Forçada

O teste de natação forçada (TNF), foi realizado após a finalização dos estímulos estressores do protocolo de ECMI, a fim de avaliar a imobilidade, comportamento análago a depressão em humanos (Figura 4).

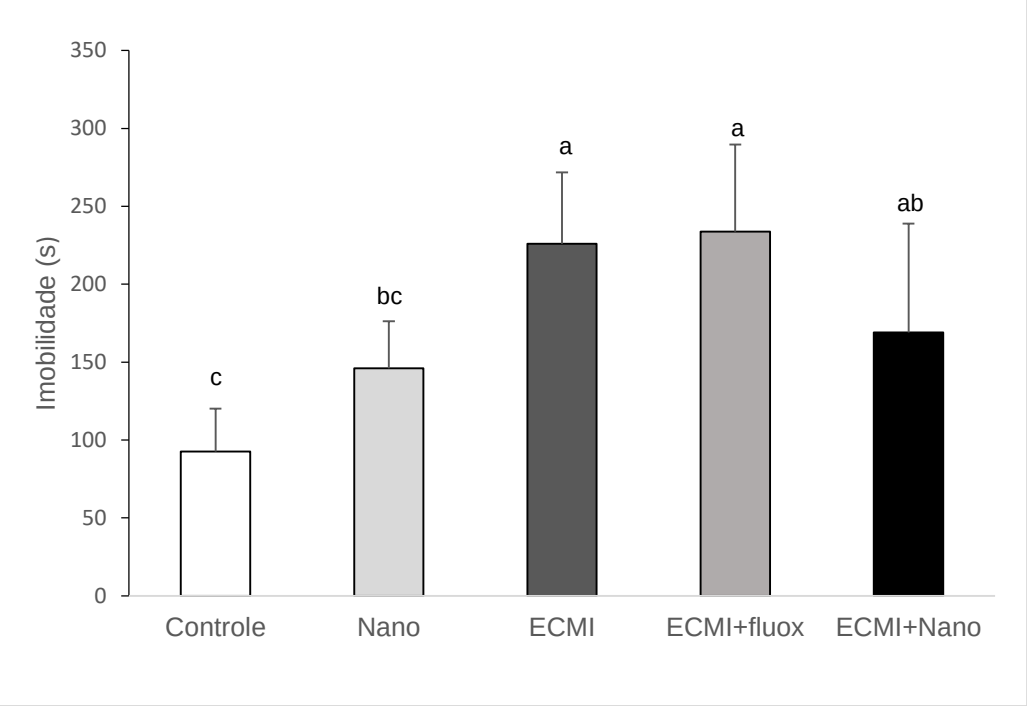

Figura 4. Período de imobilidade (segundos) em resposta ao teste de natação forçada. Controle: água filtrada; Nano: nanopartículas de zeína contendo cúrcuma; ECMI: estresse crônico moderado e imprevisível+ água; ECMI + fluox: estresse crônico moderado e imprevisível+ fluoxetina; ECMI + nano: estresse crônico moderado e imprevisível+ nanopartículas de zeína contendo cúrcuma. Os valores estão apresentados em média e ± desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

O grupo controle apresentou menor tempo de imobilidade, (92,5 segundos) como previsto, e não diferiu estatisticamente do nano (146 segundos). O grupo ECMI+ fluox apresentou maiores valores de período de imobilidade com média de 233,7 segundos, seguido do grupo ECMI com 226 segundos. Esses resultados

indicam que o ECMI desenvolve um comportamento semelhante a depressão, pois os animais não tentam fugir da situação aversiva a qual são submetidos, refletindo em menor período de nado ativo. O Grupo ECMI+ NANO, não diferiu estatisticamente do grupo nano e dos grupos ECMI e ECMI+ fluox, apresentando período de imobilidade de 169,13 segundos. Os valores do grupo ECMI+NANO estão inferiores aos encontrados em outros estudos, evidenciando que, no presente estudo os animais apresentaram maior tempo de nado ativo em relação aos demais grupos estressores, mesmo não apresentando diferença significativa (HUANG et al, 2011; LIAO et al, 2013).

O TNF é um teste comportamental útil para avaliar antidepressivos em camundongos e o mecanismo patológico da depressão (PORSOLT; PICHON; JALFRE, 1977). O tempo de imobilidade reflete o comportamento denominado de desespero, similar ao desamparo aprendido como observado na depressão em humanos. A fim de investigar se a ingestão de turmerona (composto ativo presente na cúrcuma) via oral, poderia produzir mudanças crônicas no comportamento relacionado à depressão, Liao et al (2013) em sua pesquisa, como metodologia administraram o composto nas doses de 1,25, 2,5 e 5.0 mg/kg uma semana em ratos, e posteriormente realizou o TNF, verificando significativa no período de imobilidade nos animais que receberam o tratamento.

3.3.2.3. Corticosterona

Como mostrado na Figura 5, as nanopartículas de zeína contendo cúrcuma diminuíram significativamente os níveis de corticosterona sérica em ratos submetidos ao ECMI.

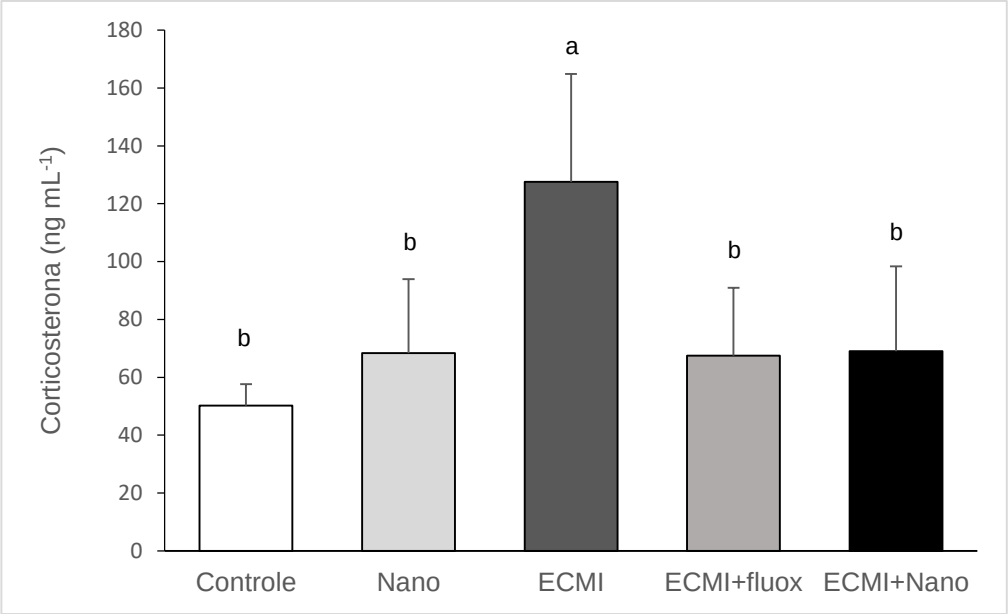

Figura 5. Efeitos do tratamento com nanopartículas nos níveis séricos de corticosterona em animais. Controle: água filtrada; Nano: nanopartículas de zeína contendo cúrcuma; ECMI: estresse crônico moderado e imprevisível+ água; ECMI + fluox: estresse crônico moderado e imprevisível+ fluoxetina; ECMI + nano: estresse crônico moderado e imprevisível+ nanopartículas de zeína contendo cúrcuma. Os valores estão apresentados em média e ± desvio padrão. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

O grupo ECMI, apresentou os maiores valores nos níveis séricos de corticosterona 127 ng ml^{-1}, diferindo estatisticamente dos outros grupos ao nível de $p<0,05$. O menor valor encontrado foi para o grupo controle, de 50, 22 ng ml^{-1}, seguido do grupo ECMI+ fluox com média de 67, 5 ng ml^{-1}. Os grupos ECMI+ nano e nano apresentam valores de 68 ng ml^{-1}. Os dados indicam para esse biomarcador do estresse as nanopartículas apresentaram potencial efeito antidepressivo.

A interação entre os distúrbios no sistema de serotonina, atividade anormal do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), e a corticosterona exercem papel chave no desenvolvimento da depressão. Este hormônio é produzido na glândula adrenal, em ratos, denominado corticosterona, ele auxilia na regulação do metabolismo e interage de maneira significativa com os receptores de 5-HT no cérebro nas situações de estresse crônico. Desempenha também papel fundamental na resposta fisiológica a várias situações estressantes (ALMADA; BORGES; MACHADO, 2014). A glândula adrenal que libera a corticosterona, considerada o cortisol dos roedores, é a mesma que realiza a regulação do HPA, por isso a forte associação deste hormônio com o estresse. Em vítimas de suicídio que possuíam histórico de depressão, os níveis de

cortisol foram considerados elevados, sustentando sua interação na patogênese da doença (LEE et al., 2007; SILVA et al., 2006).

Podemos concluir que, os grupos tratados com fluoxetina ou nanopartículas de zeína contendo cúrcuma e submetidos ao protocolo de ECMI, apresentaram redução significativa dos níves de corticosterona, apresentando resultados similares aos grupos controle. O resultado indica que as nanopartículas exerceram uma possível atividade antidepressiva semelhante a fluoxetina, regulando a corticosterona sérica, normalizando assim a hiperatividade do eixo HPA.

3.4. Conclusões

A zeína é um excelente agente encapsulante para obtenção de nanopartículas contendo cúrcuma pelo método de dispersão líquido-líquido. Esse método permite a obtenção de nanopartículas com pequenos tamanhos de partículas, baixa polidispersão e alta eficiência de encapsulação. O tratamento com as nanopartículas contendo cúrcuma (10 mg kg^{-1}) evita a elevação dos níveis de corticosterona quando comparado ao grupo estresse, resultado similar no grupo estresse fluoxetina foi encontrado, indicado assim uma atividade da cúrcuma análoga ao antidepressivo.

REFERÊNCIAS

AHMED, T.; GILANI, A.H. A comparative study of curcuminoids to measure their effect on inflammatory and apoptotic gene expression. In na Aβ plus ibotenic acid- infused rat model of Alzheimer's disease. **Brain Res**. p.1–18.2011.

ALMADA, L.F.; BORGES, MF.; MACHADO, S.E.C. Considerações neurobiológicas sobre a depressão maior: um histórico neurocientífico. **Revista de Psicologia**, São Paulo, v. 17, n. 26, p.111-124, jul. 2014.

APA-AMERICAN PSYCOLOGICAL ASSOCIATION. **Depression.** Disponível em: <www.apa.org> Acesso em: agosto, 2018.

BASPINAR, Y.; USTUNDAS, M.; BAYRAKTAR, O.; SEZGIN, C. Curcumin and piperine loaded zein-chitosan nanoparticles: Development and in-vitro characterisation**. Saudi Pharmaceutical Journal.** n.26, p.323-334.2018.

CHEN, Y.; YE, R.; LIU, J. Effects of diferente concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zein-based films. **Industrial Crops and Products.** v.53, p.140-147. 2014.

CHEN, Y.; YE, R.; LIU, J. Understanding of dispersion and aggregation of suspensions of zein nanoparticles in aqueous alcohol solutions after termal treatment. Industrial Crops and Products. n. 50, p.764-770. 2013.

CHISHOLM, D. et al. Scaling-up treatment of depression and anxiety: a global return on investment analysis. **The Lancet Psychiatry,** London, v.3, 2016.

CHO, E.J. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Molecular Pharmaceutics**. v.10, p.2093-2110.2013.

DE, R.; KUNDU, P.; SWARNAKAR, S.; RAMAMURTHY, T.; CHOWDHURY, A.; NAIR, G.B.; MUKHOPADHYAY, AK. Antimicrobial activity of curcumin against Helicobacter pylori isolates from India during infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** n.53, p.1592-1597, 2009.

DEL SOCORRO, M.M.L.; TEVES, F.G.; MADAMBA, M.R.S.B. DNA-binding activity and partial characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) of Curcuma longa L. SC-CO2 extracts. Int. Res. J. Biol. Sci., v.2, n.5, p.40-4, 2013.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants–a mini review. **Journal of Functional Foods**, n.18, p. 811.819.2015.

GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-AppliedCurcumin for Different Diseases Therapy. **BioMed Research International**. v.2014,p.1-23. Jun. 2014.

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

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.29,p. 302-307.2015.

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.; 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.

GROSS, M.; PINHASOV, A. Chronic mild stress in submissive mice: Marked polydipsia and socialavoidance without hedonic deficit in the sucrose preference test**. Behavioural Brain Research.** Amsterdam. v. 298, p;25–34. 2016.

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

HUANG, Z. et al. Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neuroscience Letters**. v. 493, p; 145–148. 2011.

URLEY, 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.

JAIN, S.; JAIN, A.K.; POHEKAR, MILIND.; THANKI, KAYSHIK. **Free Radical Biology and Medicine**, New York v.65, p.117-130. dez.2013.

KAUFMANN, F.N.; GAZAL, M.; BASTOS, C.R.; KASTER, M.P.; GHISLENI, G. Curcumin in depressive disorders: an overview of potential mechanisms, preclinical

and clinical findings. **European Journal of Pharmacology**, v. 784, p. 192 – 198, 2016.

KIM, H.J.; KIM, D.J.; KARTHICK, S.N.; HEMALATHA, K.V.; RAJ, C.J.; OK, S.; CHOE, Y. Curcumin dye extracted from Curcuma longa L. used as sensitizers for efficient dye-sensitized solar cells. Int. J. Electrochem. Sci., v.8, n.6, p.8320-8, 2013.

KHALIL, N.M. et al. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam. v.101, n.1. jan. 2013**.**

LEE, M.S. et al. Lifetime prevalence of suicide ideation, plan, and attempt in metropolitan China. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, Copenhagen, v. 11, n.6, p. 429-437, 2007.

LIAO, J.C. et al. Antidepressant-like activity of turmerone in behavioral despair tests in mice. **BMC Complement Altern Med**, v.13, n. 299. 2013.

LIVNEY, Y. D . Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. **Current Opinion in Food Science**. v. 3,p. 125-135.2015.

LUO, Y.; WANG, Q. . Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: a review. **Journal of Applied Polymer Science**. v.131, n.16. 2014

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles- A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research.** v.5, v.1. p.561-573.

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.

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 agedmice by upregulating brain-derived neurotrophic factor and CREB signaling. **Journal of Medicinal Food,** Larchmont v.17, n.6, p.641-649, Jun. 2014.

PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **J Control Release,** Amsterdam. p.108-22. 2014.

PATEL, A.R.; BOUWENS, E.C.M.; VELIKOV, K.P. Soidum caseinate stabilized zein coloidal particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.58, n.23, p. 12497–12503. 2010.

PENALVA, R.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C.J.; GAMAZO, C.; ESPARZA, I.; IRACHE, J.M. Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Bioloy and Medicine,** New York. v.13.p.103-110. 2017.

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).

PINHEIRO, A.C.; COIMBRA, M.A; VICENTR, A.A. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers e Effect of interfacial composition. **Food Hydrocolloids**, v.52, p. 460-467.2016

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.

RAVICHANDRAN.R. Studies on Dissolution Behaviour of Nanoparticulate Curcumin Formulation. **Advances in Nanoparticles**, v.2, p. 51- 59, 2013.

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.

SANMUKHANI, J. et al. Efficacy and safety of curcumin in major depressive disorder: a randomized controlled trial. **Phytotherapy Research**, v. 28, n.4, p. 579-585, abr. 2013.

SAS INSTITUTE. **SAS System:** SAS/STAT version 9.1 (software). Cary, 2003.

SCHAFFZAZZICK, S.R. et al. Protectiveproperties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **Int J Pharm**. n. 289, p.209-213. 2005.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D.D.,; BENIWAL, V.; SINGH, D.; KUMAR, M.N. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **Eur J. Pharm Sci.** v.37.n 3-4, p.223-30. 2009.

SIGRIST, M. S. Divergência genética em Curcuma longa l. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos. 2009. Dissertação-Instituto Agronômico, Campinas. 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.;NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. São Paulo: Bookman, 2002.

SILVA et al. Depressão e risco de suicídio entre profissionais de Enfermagem: revisão integrativa. **Revista da Escola de Enfermagem USP,** v. 49, n.6. 2015.

STUART, B. Biological Applications of Infrared Spectroscopy, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.

SUN, M. et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine,** London. v.7, n.7, p. 1085-1100. 2012.

WANG, Y.; LU, Z.;WU, H.; LV, F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. **Int J Food MIcrobiol,** v.30,n.1, p.71-74. Sep.2009.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression**. Disponível em: < http://www.who.int/> Acesso em: 05 julho 2016.

WILLNER, P. 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.

YAO, M.; MCCLEMENTS, D.J.; XIAO, H.Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. **Current Opinion in Food Science**. v. 2, p. 14-19.2015.

ZAMARIOLI, C.M.; MARTINS, R.M.; CARVALHO, E.C.; FREITAS, L.A.; Nanoparticles containing curcuminoids (Curcuma longa): development of topical delivery formulation. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** São Paulo. n.25, p.53-60. 2015.

ZHANG, Q.; LIU, C.; SUN, Z.; HU, X.; SHEN, Q.; WU, J. Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Food Chemistry**, n.132, p.1607-1613, 2012.

ZHANG, Z-Y. et al. Enhanced Therapeutic Potential of Nano-Curcumin Against Subarachnoid Hemorrhage-Induced Blood–Brain Barrier Disruption Through Inhibition of Inflammatory. **Mol Neurobiol,** Clifton, v.1, n.1, p.1-14. dez.2015.

ZHONG, Q.; MINFENG, JIN. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.2380-2387. 2009.

4. CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de modelos animais na depressão, é fundamental para verificar a eficácia de possíveis antidepressivos. No entanto, existe escassez de modelos validados e também não há consenso em um modelo “padrão ouro’’. Mesmo com essas limitações há a necessidade de investigar os mecanismos de ação da doença bem como a descoberta de novas substâncias eficazes na redução dos sintomas ou redução dos riscos do desenvolvimento da depressão. O ECMI e a Natação Forçada, diante de suas limitações, ainda são considerados bons modelos para avaliação de antidepressivos, porém é necessário a manutenção de uma boa reprodutibilidade entre os laboratórios de pesquisa. Em relação a isso esse estudo verificou a comprovação do protocolo de ECMI por meio da verificação do comportamento de anedonia, e a utilidade do TNF, verificado pela imobilidade nos animais, para avaliar possíveis agentes de origem natural eficazes na redução dos sintomas depressivos. Porém muitos alimentos apresentam baixa biodisponibilidade, e a nanoencapsulação surge como uma alternativa. Nesse estudo a zeína, agente encapsulante utilizado para obtenção de nanopartículas contendo cúrcuma pelo método de dispersão líquido-líquido, mostrou-se como um bom material para essa técnica, com eficiência e encapsulação de 100%. As nanopartículas apresentaram boas características tecnológicas, indicando a viabilidade de sua produção por esse método. O tratamento com as nanopartículas contendo cúrcuma 10mg kg^{-1} evitou a elevação dos níveis de corticosterona quando comparado ao grupo estresse, resultado similar no grupo estresse fluoxetina foi encontrado, indicado assim uma atividade da cúrcuma análoga ao antidepressivo.