

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E
BIOTECNOLOGIA

SUEDNA DA COSTA SILVA

O IMPACTO DA POLPA E AMÊNDOA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) SOBRE O
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE NA PROLE DE RATAS TRATADAS
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

CUITÉ – PB

2020

SUEDNA DA COSTA SILVA

O IMPACTO DA POLPA E AMÊNDOA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) SOBRE O
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE NA PROLE DE RATAS TRATADAS
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal de Campina Grande em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Juliana Késsia Barbosa Soares

Co-orientadora: Dr^a. Marília Ferreira Frazão
Tavares de Melo

Co-orientadora: Dr^a Mayara Queiroga Barbosa

CUITÉ – PB

2020

S586i Silva, Suedna da Costa.

O impacto da polpa e amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense*) sobre o comportamento de ansiedade na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação. / Suedna da Costa Silva. - Cuité, 2020.

64 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2020.

"Orientação: Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares; Profa. Dra. Marília Ferreira Frazão Tavares de Melo; Profa. Dra. Mayara Queiroga Barbosa".

Referências.

1. Dietoterapia. 2. Ansiedade. 3. Pequi. 4. *Caryocar brasiliense*. 5. Ácidos graxos insaturados. 6. Antioxidantes. 7. Amêndoas de Pequi. 8. Estresse oxidativo. I. Soares, Juliana Késsia Barbosa. II. Melo, Marília Ferreira Frazão Tavares de. III. Barbosa, Mayara Queiroga. II. Título.

CDU 615.874.2(043)

SUEDNA DA COSTA SILVA

O IMPACTO DA POLPA E AMÊNDOA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) SOBRE O
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE NA PROLE DE RATAS TRATADAS
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Juliana Késsia Barbosa Soares
Orientadora
UAS/UFCG/CES

Prof.^a Dr.^a Marília Ferreira Frazão Tavares De Melo
Co-orientadora
UAS/UFCG/CES

Prof.^a Dr.^a Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo
UAS/UFCG/CES
Examinadora

Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera
Examinadora
UAS/UFCG/CES

*A Jesiel, irmão amado.
In memoriam*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois, sem ele nada seria possível. Ele que me sustentou ao longo desse trajeto me guiando e protegendo, e permitindo que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço a minha mãe Josinete por toda dedicação e orações intercedendo por mim, mesmo com tantas lutas você nunca duvidou de minha capacidade.

A meu pai Severino, que mesmo de longe pai, você torce por meu sucesso.

Aos meus irmãos Joab , Joedson e Jesiel (*in memorian*) que apesar de tudo sempre me deram total apoio e em todos os momentos. (jesiel você sempre acreditou em mim, até mesmo quando eu não acreditei, foi pensando em você que tive força de continuar esse trabalho e não desistir, as palavras de apoio que me deste ainda na graduação ecoam em meus pensamentos até hoje e mesmo você não estando mais aqui em matéria, sempre estará comigo), meninos amo vocês incondicionalmente.

Ao meu esposo Ruvileynis e ao meu filho Pedro Lucas, que lutaram essa batalha comigo lado a lado, sendo ambos pacientes preocupados e prestativos em todos os momentos ao longo desses dois anos de estudo, vocês são os amores da minha vida.

Agradeço a minha orientadora Juliana Késsia, por toda preocupação e principalmente paciência em me orientar não apenas na realização deste trabalho, mas também na vida, louvo a Deus por ter lhe colocado em minha vida, você é uma pessoa de luz.

Agradeço as minhas co- orientadoras Marília Frazão e Mayara Queiroga, mesmo eu sumindo (risos), sempre estiveram a minha disposição e sempre se preocuparam comigo não apenas para o trabalho, mas também para me ouvir e conversar em momentos que precisei. E também pelos conhecimentos passados mesmo antes da pós-graduação eu aprendi e continuo aprendendo muito com vocês.

Muito obrigado a minha banca, Camila Carolina e Vanessa, por se disponibilizarem a realizar a correção deste trabalho, bem como me ajudaram durante toda a pesquisa, seus ensinamentos e apoio foram essenciais para a construção desse trabalho.

A minha amiga Mikaelle Albuquerque, todo seu apoio, preocupação e torcida ao longo desses anos são extremamente importante para mim, obrigado por tudo!

Agradeço de coração as minhas companheiras de pesquisa Jany, Paloma e Maria Lúcia, meninas vocês são joias preciosas que Deus colocou no meu caminho, estiveram sempre dispostas a trabalharem comigo sem medir esforços, as admiro demais.

Também agradeço de coração aos demais amigos e colegas que me ajudaram tão prontamente ao longo da construção desse trabalho, Andreza, Rita, Larissa, Jaciel, Camila, Maciel, Michelly, aos demais que não citei me perdoem, são muitos nomes que não cabeira aqui, mas sou igualmente grata.

Agradeço muito ao secretário do Programa de pós Graduação Hebert, pois sempre exerceu seu trabalho com empenho e dedicação além de se tornar um ótimo amigo com quem pude contar e conversar em vários momentos ao longo desses dois anos de curso, que Deus te abençoe grandemente.

Aos professores colaboradores Vanessa Bordin Viera, Gerlane Coelho Guerra, Daline Fernandes de Souza Araújo, que possibilitaram a realização de análises importantes que enriqueceram este trabalho.

A UFCG/CES e o Programa de Pós- Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, e a todo corpo docente agradeço pelos ensinamentos transmitidos.

A CAPES/CNPQ pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa.

Muito obrigado!

Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos
serão bem-sucedidos.

Provérbios – 16.3

RESUMO

O Pequi (*Caryocar brasiliense*) é um fruto típico da região do cerrado brasileiro, comumente consumido pela população. Sua polpa e amêndoa são utilizadas na culinária regionais sendo fontes de ácidos graxos insaturados e nutrientes e compostos antioxidantes. Sabendo que dietas ricas em ácidos graxos insaturados são essenciais para a formação e manutenção do tecido cerebral e protegem contra os danos oxidativo melhorando as suas funções e que nutrientes e compostos fenólicos atuam como antioxidantes exercendo função protetora dos tecidos contra a oxidação. Objetivou-se com este trabalho analisar os efeitos do consumo da polpa e amêndoa do pequi sobre o comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação. Foram formados três grupos que receberam os tratamentos por gavagem: controle (água destilada); o grupo amêndoa (farinha da amêndoa de Pequi); e o grupo polpa (polpa do Pequi). Foi analisado o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais e a atividade antioxidante da polpa e da amêndoa do pequi, sendo observado um maior potencial antioxidante na polpa. O comportamento de ansiedade foi avaliado através da exposição aos aparelhos de campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa-escuro. A peroxidação lipídica foi avaliada através do marcador de malonaldeído. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA One way seguido de Tukey sendo considerado significativo quando o $p < 0,05$. Os animais cujas mães consumiram a polpa do pequi se movimentaram mais e permaneceram mais na área central do CA. O grupo amêndoa permaneceu menos tempo na área central e ambos os grupos realizaram menos rearing ($p < 0,05$). Ambos os grupos tratados entraram mais nos braços abertos do LCE, sem permanecer mais tempo. Apenas o grupo polpa ficou mais tempo na área central do LCE ($p < 0,05$). Na caixa claro e escuro, apenas o grupo polpa entrou mais na área clara e permaneceu mais tempo ($p < 0,05$). Os animais tratados com a polpa do pequi obtiveram um menor índice de peroxidação lipídica cerebral, sendo que o grupo tratado com amêndoa não houve diferença. Com os dados obtidos pode-se concluir que a polpa de pequi foi capaz de induzir comportamental tipo ansiolítico e reduzir a peroxidação lipídica na prole de ratos tratados durante a gestação e lactação.

Palavras-chave: Ácidos Graxos, Estresse oxidativo, ácido oléico, ansiedade.

ABSTRACT

Pequi (*Caryocar brasiliense*) is a typical fruit of the Brazilian cerrado region, commonly consumed by the population. Its pulp and almond are used in regional cuisine and are sources of unsaturated fatty acids and nutrients and antioxidant compounds. Knowing that diets rich in unsaturated fatty acids are essential for the formation and maintenance of brain tissue and protect against oxidative damage by improving their functions and that nutrients and phenolic compounds act as antioxidants exercising the protective function of tissues against oxidation. The objective of this work was to analyze the effects of the consumption of Pequi pulp and almond on the behavior of anxiety and cerebral lipid peroxidation in the offspring of rats treated during pregnancy and lactation. Three groups were formed that received the treatments by gavage: the control receiving distilled water; the almond group receiving Pequi almond flour; and the pulp group, receiving Pequi pulp. The content of total phenolic compounds and total flavonoids and the antioxidant activity of the pequi pulp and almond were analyzed, with a greater antioxidant potential in the pulp being observed. Anxiety behavior was assessed through exposure to open field (CA), elevated plus maze (LCE) and dark box devices. Lipid peroxidation was assessed using the malonaldehyde marker. The data were analyzed using the ANOVA One way statistical test followed by Tukey being considered significant when $p < 0.05$. The animals whose mothers consumed the pequi pulp moved more and remained more in the central area of the CA. The almond group spent less time in the central area and both groups performed less rearing ($p < 0.05$). Both treated groups entered more into the open arms of the LCE, without staying longer. Only the pulp group stayed longer in the central area of the LCE ($p < 0.05$). In the light and dark box, only the pulp group entered the light area more and remained longer ($p < 0.05$). The animals treated with the Pequi pulp had a lower rate of cerebral lipid peroxidation, and the group treated with almonds showed no difference. With the data obtained, it can be concluded that the Pequi pulp was able to induce anxiolytic-like behavior and reduce lipid peroxidation in the offspring of rats treated during pregnancy and lactation.

Keywords: Fatty Acids, Oxidative stress, oleic acid, anxiety..

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Exemplo de compostos fitoquímicos presentes em alimentos vegetais, com classificação dos compostos polifenólicos..... | 23 |
| Figura 2 - Fruto do Pequi..... | 26 |
| Figura 3 – Fluxograma da obtenção da polpa e amêndoa do pequi..... | 30 |
| Figura 4 - Descrição do protocolo experimental..... | 33 |
| Figura 5 – Aparelho de Campo Aberto..... | 35 |
| Figura 6 - Labirinto em cruz elevada..... | 36 |
| Figura 7 – Caixa Claro e Escuro..... | 37 |

ARTIGO

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Avaliação de parâmetros de ansiedade realizados no campo aberto de animais tratados com amêndoa ou polpa de Pequi durante a fase inicial da vida. Foi verificada a locomoção (a), rearing (b) e taxa de permanência na área central (c)..... | 54 |
| Figura 2 – Avaliação do desempenho da prole de ratos que foram suplementados com amêndoa e polpa de pequi durante a gestação e lactação no labirinto em cruz elevado onde foi aferido o número de entrada braços abertos (a), a taxa de permanência braços abertos (b) e o tempo no centro (c)..... | 55 |
| Figura 3 – Desempenho da prole de ratos que receberam amêndoa e polpa de Pequi durante a gestação e lactação na caixa claro e escuro onde foi aferido o (a) número de entrada na área clara, (b) o tempo de permanência na área clara e (c) tempo de permanência na área escura..... | 56 |
| Figura 4 – Concentração de Malonaldeído..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Compostos fenólicos, flavonóides totais e atividade antioxidante total de polpa de pequi e amêndoa de pequi..... | 53 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| AG | ácidos graxos |
| AGPI | ácidos graxos polinsaturados |
| AGPICL | ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa |
| CES | Centro de Educação e Saúde |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CLA | ácido linoleico conjugado |
| CSTR | Centro de Saúde e Tecnologia Rural |
| DHA | ácido docosaheptaenóico |
| DP | desvio padrão |
| EPA | ácido eicosapentaenoico |
| EPM | Labirinto em Cruz Elevado |
| EPM | erro padrão da média |
| EROS | espécies reativas de oxigênio |
| FRAP | Capacidade Redutora de Ferro |
| HDL | lipoproteínas de baixa densidade |
| LABROM | Laboratório de Bromatologia |
| LANEX | Laboratório de Nutrição Experimental |
| LDL | lipoproteínas de alta densidade |
| MDA | Malonaldeído |
| SNC | sistema nervoso central |
| UFMG | Universidade Federal de Campina Grande |
| UFRN | Universidade Federal do Rio Grande do Norte |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 OBJETIVOS..... | 18 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 18 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 18 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 19 |
| 3.1 Alimentação Materna e Sua Importância na Formação Do Concepto..... | 19 |
| 3.2 O Papel Dos Ácidos Graxos na Neurogênese..... | 20 |
| 3.3 Antioxidantes..... | 21 |
| 3.4 Antioxidantes Alimentares..... | 24 |
| 3.5 Pequi | 25 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 29 |
| 4.1 Caracterização e Local da Pesquisa..... | 29 |
| 4.2 Aspectos Bioéticos..... | 29 |
| 4.3 Material..... | 29 |
| 4.3.1 Processamento do Pequi – Obtenção da Polpa e Amêndoa..... | 29 |
| 4.3.2 Análises do Conteúdo Total de Antioxidantes da Polpa e Amêndoa do Pequi..... | 31 |
| 4.3.2.1 Extração por Maceração..... | 31 |
| 4.3.2.2 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais..... | 31 |
| 4.3.2.3 Determinação do Teor de Flavonóides Totais..... | 31 |
| 4.3.2.4 Método de Captura do Radical ABTS^{•+} | 32 |
| 4.3.2.5 Capacidade Redutora de Ferro – FRAP | 32 |
| 4.4 ENSAIO BIOLÓGICO..... | 33 |
| 4.4.1 Animais e Dietas Experimentais..... | 33 |
| 4.4.2. Avaliação de Parâmetros Comportamentais..... | 34 |
| 4.4.2.1 Avaliação da Ansiedade Utilizando o Campo Aberto | 34 |
| 4.4.2.2 Avaliação da Ansiedade Utilizando o Labirinto em Cruz Elevado (EPM)..... | 35 |
| 4.4.2.3 Verificação de Parâmetros de Ansiedade Utilizando a Caixa Claro e Escuro..... | 36 |
| 4.4.3 Eutanásia e obtenção do tecido cerebral..... | 37 |
| 4.4.4 Marcador da peroxidação lipídica - Malonaldeído (MDA) | 37 |
| 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 38 |
| REFERÊNCIAS..... | 39 |

| | |
|-------------------|----|
| 5 RESULTADOS..... | 45 |
| ARTIGO..... | 46 |
| ANEXO..... | 63 |

1 INTRODUÇÃO

A fase de gestação e lactação é considerada um período crítico para o desenvolvimento da prole (MORGANE et al., 1993). Este período envolve alterações anatômicas, fisiológicas e comportamentais maternas, além de intensa atividade celular para a formação dos tecidos fetais. A deficiência dos nutrientes essenciais durante esta fase da vida pode induzir danos metabólicos, comprometendo diretamente o desenvolvimento do concepto, causando patologias que podem surgir ainda no período intrauterino e perdurar até a vida adulta (SILVA, 2007).

Os ácidos graxos essenciais participam da formação do tecido cerebral, sendo o ácido docosahexaenóico (DHA), um dos componentes dos fosfolipídios das membranas neuronais, englobando cerca de 17% do total de ácidos graxos no tecido cerebral (HORROCKS ; FAROOQUI, 2004; LEHNINGER et al., 1998; MORIGUCHI; GEINER; SALEM, 2000; SALEM et al., 2001). Este por sua vez é responsável pelo aumento da fluidez da membrana e plasticidade sináptica, contribuindo para o bom funcionamento das funções cerebrais (MITCHEL et al., 2003; MURPHY, 1990).

Os ácidos graxos saturados, insaturados e poli-insaturados de cadeia longa também compõem a bainha de mielina, responsável pela condução dos impulsos elétricos no cérebro (RODRIGUES-CRUZ et al., 2005; CALLEGARO, 2003). A deficiência desses ácidos graxos especialmente os ácidos graxos polinsaturados nessa fase está relacionada com retardo no aprendizado e anormalidades comportamentais (RODRIGUES-CRUZ et al., 2005).

Alimentos fontes de ácidos graxos foram ofertados a ratas durante a gestação e lactação (QUEIROZ et al., 2019; SOARES et al., 2013) induzindo redução de ansiedade na prole. Demais estudos verificaram que o consumo materno de frutas como a castanha de caju (MELO et al., 2017) e a polpa e óleo de abacate (MELO et al., 2019) melhoraram parâmetros de memória na prole de ratos. Outros estudos experimentais mostram que tanto o ácido docosahexaenóico como o ácido eicosapentaenoico (EPA) são antioxidantes nutricionais e podem reduzir a peroxidação lipídica no cérebro de ratos (CHOI-KWON et al., 2004; HOSSAIN et al., 1999). Broinizi et al., (2008), utilizaram o extrato hidroalcoólico do bagaço do pedúnculo de caju em ratos Wistar identificando a atividade protetora contra a peroxidação lipídica no cérebro dos animais reduzindo a lipoperoxidação.

Um fruto fonte de ácidos graxos é o *Caryocar brasiliense* (pequi), (BARRA et al., 2013). A parte comestível do pequi é a polpa e a amêndoa, no qual a polpa é rica em lipídios (33,4%), fonte importante de fibra alimentar (10,02%) e um teor de 3% de proteínas. Já a amêndoa contém lipídios (51,51%), proteínas (25,27%), carboidratos (8,33%) e um teor reduzido de fibra alimentar comparada a polpa (2,2%) (LIMA et al, 2007).

Tanto na polpa como na amêndoa do pequi, pode ser observado o predomínio dos ácidos graxos insaturados, sendo fonte do ácido oleico e ácido linoleico, também contém ácido graxo saturado representado pelo ácido palmítico (LIMA et al, 2007), sendo fonte ainda de compostos fenólicos, carotenóides e minerais (ARRUDA; CRUZ; ALMEIDA, 2012). A presença destes na polpa do pequi atuam como antioxidantes, podendo diminuir a formação de radicais livres e, até mesmo, o risco de desenvolvimento de câncer (OLIVEIRA et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012).

Desta forma, hipotetizamos que o Pequi induziria comportamento tipo ansiolítico devido a sua capacidade antioxidante no tecido cerebral investigando o impacto diferenciado do consumo materno de polpa e amêndoa de pequi sobre o comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto do consumo da polpa e amêndoa do pequi sobre o comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e carotenóides totais presentes na polpa e na amêndoa do pequi;
- Analisar a atividade antioxidante da polpa e amêndoa do pequi;
- Analisar do comportamento de ansiedade na prole das ratas tratadas;
- Analisar do marcador de peroxidação lipídica cerebral da prole;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Alimentação Materna e Sua Importância na Formação do Concepto

A gestação e lactação são períodos críticos no desenvolvimento humano. É neste período que ocorre o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso (SANTOS-MONTEIRO et al, 2002) e endócrino (SYMONDS et al, 2001).

A dieta materna durante a gravidez desempenha um papel vital na saúde materna e infantil. O crescimento e o desenvolvimento fetal são influenciados pelo ambiente intrauterino. Desta maneira a alimentação materna se torna um fator fundamental para a sobrevivência e saúde do feto que depende exclusivamente do fornecimento de nutrientes da mãe (MARTIN-GRONET; OZANNE, 2006).

Uma falha na alimentação da mãe durante a fase da gestação pode levar a alterações no fornecimento energético, como por exemplo, em estado de desnutrição materna que causa prejuízos à prole (PALOU, et al., 2010). Do mesmo que o aumento da oferta de nutrientes pode alterar o metabolismo da prole (DAS; SYSYN, 2004). Dessa forma qualquer variação no estado nutricional da mãe no período de desenvolvimento pode causar uma resposta fetal de adaptação, que em longo prazo, pode levar a permanentes alterações metabólicas, endócrinas em diferentes estruturas do sistema nervoso central SNC (BENETTI, 2014).

Estudos utilizando animais mostraram que a exposição fetal à dieta materna antes e durante o período perinatal é capaz de alterar funções metabólicas. Tendo como consequência, aumento de peso corporal, diabetes, dislipidemias, alterações de comportamento e aumento de estresse oxidativo (KOLETZKO et al., 1998; SAMUELSSON et al., 2008; AKYOL et al., 2009; CHECHI et al., 2010; RODRIGUEZ et al, 2012). Durante esse período, os lipídios são essenciais para a construção dos tecidos e a determinação do crescimento corporal (MORGANE et al., 1993; HERRERA; ORTEGA-SENOVILLA, 2014). São componentes estruturais do sistema nervoso, estimulam o desenvolvimento, diferenciação e regulação da migração de células neuronais (GONZÁLEZ; VISENTIN, 2016; PRADO et al., 2018).

3.2 O Papel dos Ácidos Graxos na Neurogênese

Os ácidos graxos (AG) são constituintes estruturais das membranas celulares, possuem função energética e de reserva metabólica, participam também da formação de hormônios e sais biliares. São abundantes no cérebro, cerca de 60% do seu peso seco, destes 40% são polinsaturados que possuem função primariamente estrutural (VALENZUELA; NIETO, 2003). Processo de formação do cérebro é caracterizado por etapas que compreende neurogênese, migração neural, apoptoses seletivas, sinaptogênese, finalizando com a mielinização. Essas etapas são sequenciais e dão forma e funcionalidade ao tecido cerebral (MORGANE et al., 1993). Em humanos, a maturação do sistema nervoso central tem início na fase intra-uterina e persiste até os primeiros anos de vida pós-natal (MARTINEZ, 1992). O processo morfogênico, diretamente associado à função cerebral, torna a nutrição materna essencial, durante a gestação e a lactação, para o desenvolvimento de neonatos, pois há aumento funcional e bioquímico das demandas de ácidos graxos polinsaturados (AGPI) (XIANG et al., 1999; KOLETZKO et al., 2001).

A composição nutricional durante a formação do cérebro é o principal fator determinante na para a plasticidade das membranas neuronais e da capacidade funcional cerebral na idade adulta (TYAGI et al., 2015; VAN DE REST et al., 2012; INNIS, 1991). Durante a gestação e lactação os ácidos graxos da matriz são transferidos ao feto garantindo a maturação das células neuronais nesse período (JONES et al., 2013).

O desenvolvimento fetal é em grande parte determinado pela disponibilidade de nutrientes na circulação materna e pela capacidade destes nutrientes para serem transportados para a circulação fetal através da placenta (BRETT et al., 2014). A glicose, aminoácidos, ácidos graxos livres (AGL) e o colesterol atravessam a placenta através de transportadores específicos (BRETT et al., 2014). Na circulação materna, os lipídios são principalmente encontrados como triglicerídeos fosfolipídios e ésteres de colesterol. Contudo, os triglicerídeos não podem atravessar a barreira placentária, sendo transformados em ácidos graxos livres através de lipases placentárias (HERRERA, 2002). Os ácidos graxos exercem um papel crítico no crescimento fetal, como o desenvolvimento do cérebro e a adipogênese (BRETT et al., 2014), responsável pelas funções energéticas e de reserva metabólica. Diferentes tipos de ácidos graxos, como os polinsaturados de cadeia longa, são transportados através da placenta para o feto e são

eficientemente transferidos através do leite materno em humanos e ratos (ELIAS; INNIS, 2001; WOLFF, 2003).

O conteúdo total de gordura e a composição do leite materno em humanos são influenciados pelo período de lactação, estado nutricional e tipo de dieta ingerida pela mãe (WOLFF; PRECHT; MOLKENTIN, 1998). Mudanças na disponibilidade de componentes lipídicos por alterações dietéticas têm implicações no desenvolvimento pós-natal (HERRERA, 2002).

A nutrição adequada é um dos fatores ambientais essenciais para um desenvolvimento normal, pois fornece nutrientes necessários. Sem eles, o neurodesenvolvimento é prejudicado (WALKER, 2005). Os ácidos graxos essenciais participam da formação do tecido cerebral, sendo o ácido docosahexaenóico (DHA) um dos componentes dos fosfolipídios das membranas neuronais, englobando cerca de 17% do total de ácidos graxos no tecido cerebral (HORROCKS; FAROOQUI, 2004; LEHNINGER et al., 1998; MORIGUCHI; GEINER; SALEM, 2000; SALEM et al., 2001). Este por sua vez é responsável pelo aumento da fluidez da membrana e plasticidade sináptica, contribuindo para o bom funcionamento das funções cerebrais (MITCHEL et al., 2003; MURPHY, 1990).

Estudos mostram que alterações na composição dietética durante a gestação e lactação, como o aumento no consumo de lipídeos e alta ingestão calórica podem comprometer o desenvolvimento estrutural e funcional do feto (BAYOL, SIMBI; STICKLAND, 2005; BAYOL, BRUCE; WADLEY, 2014), no entanto, a demanda fetal de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (AGPICL), durante a gestação e lactação (KOLETZKO et al., 2001) são considerados componentes essenciais para o desenvolvimento neuronal e visual (GIBSON; NEUMANN; MAKRIDES, 1996; ELIAS; INNIS, 2001; KOLETZKO et al., 2001), uma vez que quantidades importantes desses ácidos graxos são necessárias para a diferenciação celular e sinaptogênese do tecido neural (CLANDININ, 1999), ficando claro a importância da alimentação materna na primeira fase da vida do indivíduo.

3.3 Antioxidantes

A respiração é um fenômeno intimamente relacionado com a vida, tendo como produto espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999). Os radicais livres são átomos ou moléculas que contem um ou

mais elétrons não pareados nos orbitais externos, transformando as estruturas celulares em compostos altamente reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo a sua orbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999).

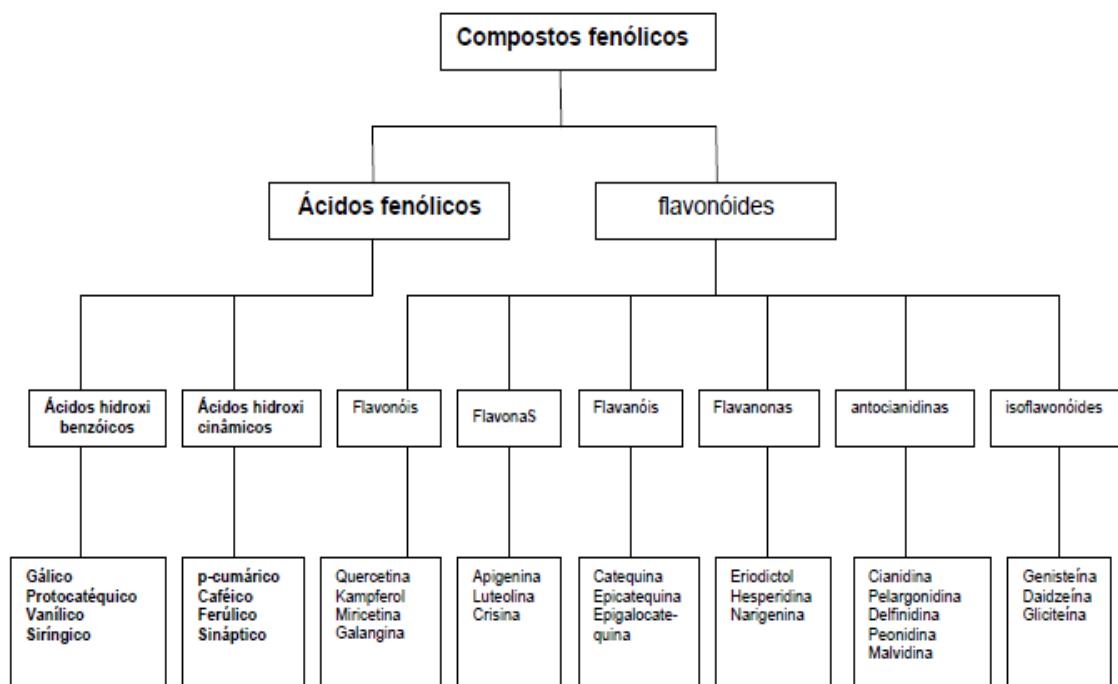
Certos nutrientes e componentes alimentares têm se destacado em função de sua atividade antioxidante, ou seja, com capacidade de transformar e/ou diminuir a ação de oxidação dos radicais livres, impedindo seus efeitos danosos ao organismo (PANZIERA, 2011). O desequilíbrio na produção de radicais livres e na remoção destes pelas defesas antioxidantes, definido como estresse oxidativo, pode causar danos celulares ao atacar membranas, ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos, levando a alterações funcionais e ao desenvolvimento de diversas doenças (VALKO, 2007). Embora o organismo possua defesas antioxidantes endógenas efetivas para o combate ao excesso de radicais livres, tais como as enzimas superóxido-dismutases, peroxidases, catalases e glutathione-peroxidases (MOON, 2009), acredita-se que elas não são infalíveis, portanto, constantemente há formação de radicais livres (CERQUEIRA, 2007). Sendo assim, os antioxidantes obtidos por meio de uma dieta são indispensáveis para a defesa apropriada contra a oxidação e, portanto, têm papel importante na manutenção da saúde (CERQUEIRA, 2007).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2003).

Existe uma grande variedade de compostos fenólicos classificados em dois grupos, flavonóides e não flavonóides (Figura 1). Os flavonóides possuem 2 anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado, estes se diferenciam de acordo com o grau de hidrogenação e substituição do heterociclo podendo ser flavanóis, flavonas, flavonóis, flavononas, antocianidinas e isoflavonóides, geralmente se encontram ligados a açúcares formando glicosídeos (KARAKAYA, 2004). Os não flavonóides são os compostos benzoicos e cinâmicos, possuem apenas um anel aromático ligado a pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais: aldeídos, álcoois ou ácidos. Outros compostos com natureza fenólica são os estilbenos, lignanos, taninos e ligninas (MANACH et al., 2004).

Figura 1 – Exemplo de compostos fitoquímicos presentes em alimentos vegetais, com classificação dos compostos polifenólicos.

Fonte: Karakaya, 2004.



São formados no metabolismo secundário dos vegetais, nos quais estão envolvidos em várias funções: propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e adstringência), crescimento, processo germinativo da semente, defesa contra pragas, entre outras. Em animais e humanos, tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, neutralizando-os. O poder de bloqueio das estruturas radicalares pelos compostos polifenólicos deve-se à estrutura química destes, formado por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxila (BRAVO, 1998; LIU, 2007).

3.4 Antioxidantes Alimentares

A alimentação afeta diretamente o dano oxidativo nos tecidos, esse fato é comprovado pelo fato dos alimentos conterem substâncias antioxidantes, nutrientes ou não nutrientes que combatem os radicais livres, a exemplo dos ácidos graxos polinsaturados, metais com ações catalíticas (Fe⁺, Cu⁺), exercendo efeitos positivos e negativos no equilíbrio entre o dano oxidativo e as defesas (MANACHA et al, 2004; GIADA; MANCINI-FILHO, 2006). Os carotenóides, vitaminas E e C fazem parte dos nutrientes que possuem propriedades antioxidantes.

A vitamina C (ácido ascórbico) é um dos mais potentes antioxidantes naturais, reage com as EROs, oxidando-se a desidroascorbico e se convertendo novamente pela ação da enzima dehidroascobatoreductase. É um sequestrador eficaz de radicais e combate espécies reativas de nitrogênio em meio aquoso, impedindo a nitroação de moléculas (WEBER et al, 1996). *In vivo* atua como pró-oxidante, e na presença de metais como o Fe⁺ e o Cu⁺ os radicais ascorbato e hidroxila são gerados dando início ao processo de peroxidação lipídica (PODSEDEK, 2007). Suas principais fontes são frutos cítricos, hortaliças, e vísceras (KRAUSE, 2010).

A vitamina E compreende os derivados tocoferóis e tocotrienóis, são compostos altamente lipofílicos e atuam nas lipoproteínas de alta densidade (LDL). Sua função consiste em inibir a peroxidação lipídica, combatendo os radicais peroxila e convertendo-se em radical tocoferol regenerando o α -tocoferol ao reagir com a vitamina C. Na dieta é encontrado principalmente em azeites vegetais, leite e derivados, gérmen de trigo, nozes e folhas de vegetais verdes (SIES; STAHL, 1995).

Os carotenóides são pigmentos naturais com papel importante na fisiologia dos vegetais; conferindo cor e participando na fotossíntese junto com a clorofila. Apresentam atividade pró- vitamina A e atividade antioxidante (RODRIGUES-AMAYA; KIMURA, 2004). Os carotenóides sequestram radicais hidroxila semelhante a vitamina E, possuem caráter lipofílico atuando como antioxidante sobre as lipoproteínas de alta densidade (LDL) e baixa densidade (HDL) (PODSEDEK, 2007). Está presente em frutas de vegetais, como exemplo o tomate, cenoura, espinafre, milho e frutos cítricos (KRAUSE, 2010).

Os alimentos fontes de substâncias antioxidantes podem exercer tanto efeitos positivos quanto negativos no equilíbrio entre o dano oxidativo e as defesas frente ao dano (MANACH et al., 2004; GIADA; MANCINI-FILHO, 2006) o que torna importante a presença de alimentos fontes de substâncias antioxidantes na dieta.

3.5 Pequi

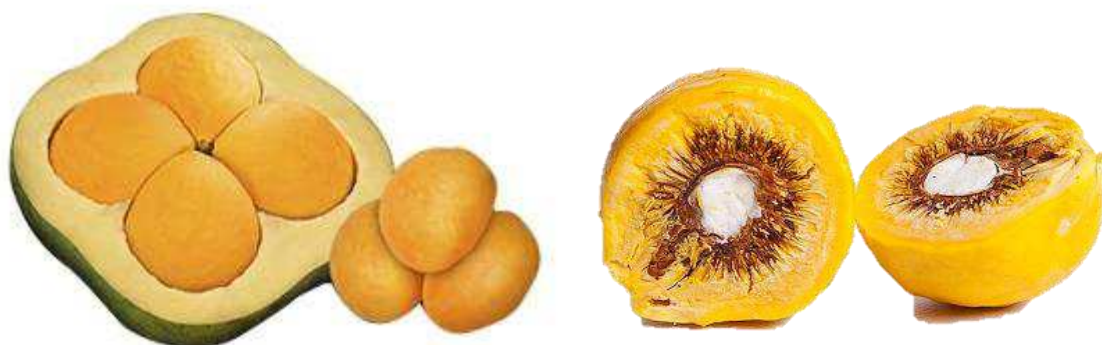
As espécies conhecidas como pequizeiro, e nomes derivados, pertencem à família *Caryocaraceae*, da ordem Theales (Rizobolácea), composta de 25 espécies reunidas em dois gêneros, *Caryocar* e *Anthodiscus*. O gênero *Caryocar*, segundo Franco et al. (2004) possui 16 espécies, das quais, 12 são encontradas no território brasileiro. Essa informação difere da obtida por Oliveira (1988) que relata que são 19 espécies, das quais apenas oito de ocorrência no Brasil. Giacometti (1993), sem determinar o número, localizou as espécies de *Caryocar* em sete dos dez centros de origem das frutíferas brasileiras, a seguir: Centro Alto Noroeste/Rio Negro, com algumas espécies de piquiá (*Caryocar* spp.); Centro Roraima/Manaus (quatro espécies de *Caryocar*); Centro Sudoeste Acre/Rondônia, com o *C. villosum*; Centro Nordeste/Caatinga com *C. coriaceum*; Centro Brasil Central/Cerrado com pequi *Caryocar* spp; Centro Mata Atlântica, setor B; com piqui-vinagreiro (*C. edulis*); e Centro Brasil/Paraguai, com *C. brasiliense*.

A espécie de maior presença no Cerrado do Planalto Central é *C. brasiliense* Camb., dividida em duas subespécies: *C. brasiliense* subsp. *Brasiliense*, de porte arbóreo e com ampla distribuição, e *C. brasiliense* subsp. *Intermedium*, de porte arbustivo, com ocorrência restrita a algumas partes desse ecossistema (SILVA et al., 2001). Oliveira (1988) situa a ocorrência de *C. brasiliense* nos Estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, e na parte alta de São Paulo até o Norte do Paraná; e *C. coriaceum*, no Centro-Oeste e parte do Nordeste. Para RIZZINI (1963), nos Cerrados brasileiros encontram-se, além do *C. brasiliense* Camb., o *C. coriaceum* Wittm., a espécie que se encontra, também, na Chapada do Araripe no Ceará (PEIXOTO, 1973). O cerrado é uma vegetação natural, com cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados, representando cerca de 22% do território brasileiro (RATTER; RIBEIRO, 1996), dos quais, 85% no Planalto Central (COUTINHO, 1997), e o restante da área nos Estados do Amazonas, Pará, Ceará, Bahia, Roraima, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas e Sergipe (CASTRO, 1997).

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma árvore frondosa, que atinge de oito a dez metros de altura e frutifica de setembro a março (SANTANA; NAVES, 2003). Seu fruto, o pequi, é constituído por exocarpo de coloração marrom esverdeada, mesocarpo externo formado por uma polpa branca e mesocarpo interno, porção comestível do fruto, de coloração amarelo-claro a alaranjado escuro. O endocarpo

espinhoso do pequi protege a semente comestível, que é revestida por um tegumento fino e marrom (ARAÚJO, 1995; SILVA e MEDEIROS FILHO, 2006).

Figura 2 - Fruto do Pequizeiro



Fonte: <https://www.deliciasdocerrado.com.br/cerrado> <http://supernutricao.com.br/2018/01/24/pequi-para-que-serve-beneficios/>

Esse fruto pode constituir fonte considerável de nutrientes na alimentação de populações regionais, pois apresenta teor elevado de lipídios, que varia de 27 a 35 g.100 g⁻¹. Em decorrência disso, constitui boa fonte energética, variando de 250 a 350 kcal.100 g⁻¹ de polpa (CORDEIRO et al., 2013; LIMA et al., 2007). O perfil de ácidos graxos da polpa de pequi é favorável à saúde, sendo composto por 60% de ácidos graxos insaturados, com predominância do ácido oleico (BARRA et al., 2013). Destaca-se, ainda, que sua polpa pode ser considerada fonte potencial de antioxidantes naturais (MORAIS et al., 2013). Em relação ao perfil de minerais, a polpa de pequi possui teores consideráveis de magnésio, zinco e fósforo (OLIVEIRA et al., 2010; RAMOS; SOUZA, 2011). Por se tratar de um fruto de fácil produção e com características desejáveis em relação ao sabor e valor nutritivo, o pequi pode representar uma fonte potencial na alimentação e sobrevivência de uma parcela da população brasileira (RIBEIRO, 2000).

A conserva de pequi é bastante consumida, utilizando os caroços inteiros ou em pedaços. A polpa, a exemplo de outros frutos do cerrado, como o tinguí e a macaúba, também é empregada na fabricação de sabão, usando soda cáustica ou a “dicoada”, que pode ser feita da cinza da própria madeira do pequizeiro. A amêndoa do pequi, pela alta porcentagem de óleo que contém e por suas características químicas, pode ser também

utilizada com vantagem na indústria cosmética para a produção de cremes. O óleo da amêndoa é usado ainda na iluminação, como lubrificante. Da casca extraem-se corantes amarelos de ótima qualidade, empregados por tecelões em tinturaria caseira. Contém igualmente alto teor de taninos (BARBOSA et al., 2006)

Como oleaginosa, da polpa do fruto é extraído um óleo que, além de utilizado na culinária, é empregado na indústria cosmética, na produção de sabão, e como produto medicinal, no combate à bronquite, gripes e resfriados, dentre outros. Como fármaco, o suporte de informações é empírico, porém é certo que a polpa do fruto tem alto teor de provitamina A, com média em torno de 200.000 UI (PEIXOTO, 1973; EMBRAPA, 2008). Apesar das várias utilidades e da significativa área geográfica onde a espécie é explorada, não existe cultivo comercial de pequi e a sua exploração, ainda, é puramente extrativista. Mesmo assim, gera emprego e renda no período de safra, e exerce importante papel na socioeconômica de muitas localidades de diferentes regiões do País.

O fruto não é consumido in natura, sendo o seu consumo direto na culinária, cozido com frango ou com arroz. Especificamente, na Região Sul do Ceará também é cozido com feijão e na forma de farofa. A polpa é utilizada na produção de geléias, doces, ração para porcos e galinhas e obtenção do óleo. Da polpa fermentada é produzido um tipo de licor bastante conhecido e apreciado em algumas regiões do País. Na tentativa de dispor do fruto na entressafra, algumas cooperativas do Norte de Minas, assessoram produtores em processos de produção, beneficiamento e comercialização de diversos produtos, tais como polpa congelada e diversos tipos de pequi em conserva (OURO et al., 2006). Com ações dessa natureza consegue-se agregar cerca de 50% do valor em relação ao produto in natura (COOPERATIVA, 2006). O seu óleo também pode ser utilizado na produção de combustíveis e lubrificantes, conforme alguns estudos realizados na USP, Ribeirão Preto, São Paulo (USP, 2005). As pesquisas revelam na sua primeira fase, que misturado ao diesel, ele reduz em 30% a emissão de poluentes (NOVA et al., 2006). Encontra-se em fase de testes o biocombustível, obtido da polpa, em carros, caminhões, tratores, geradores de energias elétricas e locomotivas. A Agência Nacional de Petróleo autorizou a mistura de 5% de biocombustível, extraído do pequi, no óleo diesel. A mistura está sendo testada em carros da Universidade Federal de Diamantina, da USP de Ribeirão Preto (USP, 2005).

A sua madeira tem tido diversas utilizações na fabricação de móveis rústicos, caibros, dormentes, moirões, postes, esteios, xilografia, construção civil e em

embarcações, além de outro uso menos indicado, como a produção de carvão. A utilização da madeira pode resultar em benefícios para os que a exploram e os que se utilizam dos seus produtos, porém causa danos irreparáveis aos ecossistemas de onde são retiradas em razão da não existência de programas de manejo e uso da espécie como madeireira. No Piauí, por exemplo, já foi constatado um estado avançado de erradicação de plantas para a fabricação de carvão, cercas e utensílios domésticos, principalmente na região de Piripiri (CEPA, 1984). A casca, por meio da maceração, produz tanino e uma tintura castanha escura que é utilizada no tingimento artesanal (RIBEIRO et al., 1982). Algumas vezes, tem sido empregada na alimentação de bovinos, porém, na alimentação humana é mais útil, em virtude do seu elevado teor de fibra alimentar. Barbosa e Amante (2002) elaboraram e caracterizaram a farinha da casca tendo encontrado 5,76% de proteína, superior ao da farinha de trigo (1,76%), 1,54% de lipídios, equivalente ao da farinha de trigo (1,3%), com 80% de rendimento de extração. Os carboidratos totais representam 50,94%, superior às polpas de araticum (21,50%), pequi (19,66%), buriti (17,19%) e mangaba (8,41%) (SANO e ALMEIDA, 1998). O teor de fibra alimentar foi de 39,97%, superior ao encontrado no fubá integral (1,2%) na farinha de soja integral (3,3%) (EL-DASH et al., 1994) e na polpa de pequi (11,60%) (SANO; ALMEIDA, 1998).

Além do mais, a busca por fitoterápicos como alternativa aos quimioterápicos para tratamento de diversas enfermidades, tem levado à identificação de diversas espécies nativas com potencial de produção de substâncias de interesse farmacológico. Entre essas, *C. brasiliense* tem apresentado propriedades terapêuticas no tratamento de diversas enfermidades, como micoses, em virtude dos efeitos colaterais dos antifúngicos convencionais, e redução dos efeitos adversos da quimioterapia (PASSOS et al., 2002)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização e Local da Pesquisa

A pesquisa possui caráter experimental utilizando ensaio biológico com intuito de avaliar o impacto do consumo materno, da polpa e amêndoa de pequi durante a gestação e lactação, sobre os parâmetros de comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral da prole. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) e Laboratório de Bromatologia (LABROM) – do Centro de Educação e Saúde (CES) de Universidade Federal de Campina Grande (UFCG); e no Laboratório de Farmacologia - III/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN.

4.2 Aspectos Bioéticos

O protocolo experimental segue as recomendações éticas do National Institute of Health Bethesda (Bethesda, USA), com relação aos cuidados com animais, sendo levado em consideração o bem-estar dos animais no laboratório, de modo que o sofrimento e o estresse dos animais experimentais serão minimizados ao máximo. O presente protocolo de estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR / UFCG, com numero de protocolo ceua/cstr 04/2020.

4.3 Material

O fruto foi adquirido na feira local da cidade de Juazeiro no estado do Ceará sendo o fruto escolhido aleatoriamente embalado e armazenado para transporte de forma a garantir a integridade do mesmo até chegar ao seu destino final na Universidade Federal de Campina Grande *campus* Cuité- PB.

4.3.1 Processamento do Pequi – Obtenção da Polpa e Amêndoa

Para a obtenção da polpa e amêndoa o fruto ao ser adquirido foi selecionado manualmente a fim de eliminar fruto que apresentassem a sua integridade danificada com cortes, perfurações em sua casca, após serem selecionados foram higienizados e sanitizado com solução de hipoclorito de sódio e água, posteriormente o fruto foi descascado manualmente e embalado e mantido sobre refrigeração para garantir a integridade do fruto.

O transporte foi realizado em caixas térmicas e gelo para manter a temperatura do pequi durante o trajeto até a sua chegada em seu destino final.

Em seguida o fruto foi recebido e logo realizado uma segunda seleção no fruto para averiguar a presença de fruto danificado ou que apresentasse estado de deterioração. Passando por um tratamento térmico simples e de curta duração (pré-cozimento) para facilitar o processamento de despulpamento, foi resfriado em água corrente e seguida despulpado manualmente. Sua polpa e os caroços foram levados à secagem em estufa de circulação de ar forçada a uma temperatura de 60°C por 24h e 48h respectivamente. Após esse período a polpa foi triturada em liquidificador convencional, embalado a vácuo e armazenado em freezer para posterior utilização, os caroços foram partidos ao meio para retirada da amêndoa de modo manual e a mesma foi triturada em liquidificador convencional, embalada a vácuo e armazenada em freezer para posterior utilização.

A obtenção da polpa e da amêndoa para utilização na pesquisa seguiu o fluxograma abaixo (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma da obtenção da polpa e amêndoa do pequi



Fonte: autoria própria

4.3.2 Análises do Conteúdo Total de Antioxidantes da Polpa e Amêndoa do Pequi

4.3.2.1 Extração por Maceração

Os extratos foram obtidos a partir da amostra previamente moída, pesada (1g) e transferida para um tubo falcon envolto de papel alumínio com capacidade de 50 mL. A amostra foi adicionada de solvente metanol 80% na proporção 1:10 (m/v) e agitada em vórtex por 1 minuto, em seguida mantida em repouso por 24 horas em temperatura ambiente aproximada de 22 ± 2 °C. Após os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativos e armazenados em frascos âmbar em freezer (-18 °C) até o momento das análises.

4.3.2.2 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999) com modificações por Roesler (2007). Para a reação colorimétrica, alíquotas de 0,4 mL dos extratos previamente diluídos foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 2,0 mL de solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu 0,2 N (diluído na proporção 1:10). Os tubos foram agitados e deixados em repouso na ausência de luz por 6 minutos. Após, adicionou-se 1,6 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% (m/v), e os tubos agitados e incubados durante 5 minutos em banho-maria a 50°C. Em seguida, foram resfriados em água para leitura em espectrofotômetro a 760 nm, calibrado com solução referência de ácido gálico. Foi preparado um branco nas mesmas condições, porém com substituição do extrato pela solução extratora. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico/ 100 g de farinha da amêndoa e polpa de pequi (mg EAG/100g).

4.3.2.3 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen et al. (1999). Alíquota de 0,5mL dos extratos previamente diluídos foram colocados em tubos de ensaio e adicionados de 2 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se 0,15 mL de nitrito de sódio (NaNO_2) e após 5 minutos, 0,15 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3). Os tubos foram deixados em repouso por 6 minutos no escuro e após adicionado de 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e 1,2 mL de

água destilada. A solução foi agitada e a absorbância lida em espectrofotômetro a 510 nm, calibrado com solução referência de catequina. Foi preparado um branco nas mesmas condições, porém com substituição do extrato pela solução extratora. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg equivalente de catequina/ 100g de farinha da amêndoa e polpa de pequi (mg EC/100g).

4.3.2.4 Método de Captura do Radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} (radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizada conforme metodologia descrita por Sariburun et al. (2010) com algumas modificações. O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação da solução ABTS 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados a temperatura de 25°C, no escuro durante 12-16 horas. Uma vez formado o radical, foi diluído em água destilada até obter o valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734nm. A partir de cada extrato, foram preparadas seis diluições diferentes, em triplicatas. Em ambiente escuro foi transferido uma alíquota de 15 µL do extrato previamente diluído para tubos de ensaio contendo 1,5 µL do radical ABTS^{•+}. A leitura realizou-se após 6 minutos da reação a 734nm em espectrofotômetro. Uma solução controle foi preparada conforme o procedimento descrito acima, sem adição da amostra. Como referência, utilizou-se o Trolox e os resultados expressos em µmol equivalentes de trolox/ g de amostra (µmol TEAC g⁻¹).

4.3.2.5 Capacidade Redutora de Ferro – FRAP

Para determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) utilizou-se a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), adaptada por Rockembach et al. (2011). O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, através da mistura de 11 mL de tampão acetato (0,3 M, pH: 3,6), 1,1 mL de solução TPTZ (tripiridiltriazina) (10 mM em HCl 40 mM) e 1,1 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Uma alíquota de 200 µL do extrato previamente diluído foi adicionada a 1800 µL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Para cada amostra foi realizado um branco, sem adição do extrato. As absorbâncias foram medidas após o tempo de incubação a 593nm. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em µmol equivalentes de trolox / g de amostra (µmol TEAC g⁻¹).

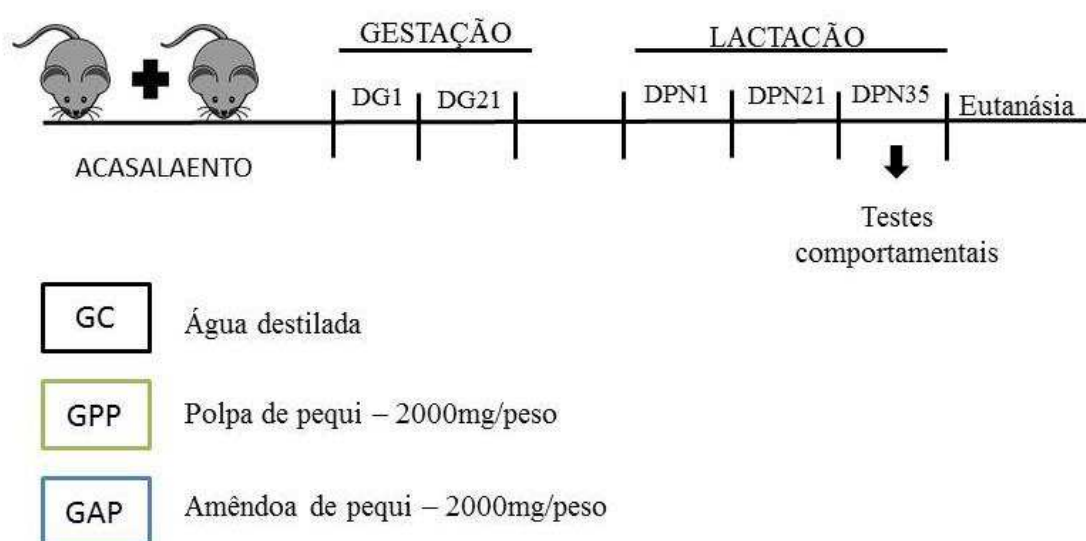
4.4 ENSAIO BIOLÓGICO

4.4.1 Animais e Dietas Experimentais

Vinte e quatro fêmeas primíparas da linhagem Wistar (90 dias de vida/250 ± 50g) obtidas do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Campina Grande - LANEX / UFCG. Após confirmação de prenhes, foram alojadas em gaiolas-maternidade individuais de polipropileno, em condições-padrão do laboratório (temperatura de 22 ± 1°C, umidade 65 ± 5%, ciclo claro/escuro de 12/12 horas – luz artificial das 6:00 as 18:00 horas). Divididas de forma randomizada em três grupos (n=10): Controle (GC) – utilizando com água destilada; Polpa de Pequi (PP) – suplementado com 2000 mg de polpa de pequi /Kg de peso do animal e Amêndoa do Pequi (AP) – suplementado com 2000mg de farinha da amêndoa do pequi /kg de peso do animal, sendo administrada a partir do 7º dia de gestação até o 21º dia lactação. Foi fornecido ração padrão (Presence®) controlada e água *ad libitum*. As ninhadas foram padronizadas em 8(oito) filhotes machos.

Após o desmame os filhotes foram mantidos em gaiolas coletivas recebendo ração padrão (Presence®) e água *ad libitum*. Aos 35 dias de vida foram submetidos a testes comportamentais de ansiedade. Dois dias após o termino dos testes os animais foram eutanasiados.

Figura 4 - Descrição do protocolo experimental



4.4.2. Avaliação de Parâmetros Comportamentais

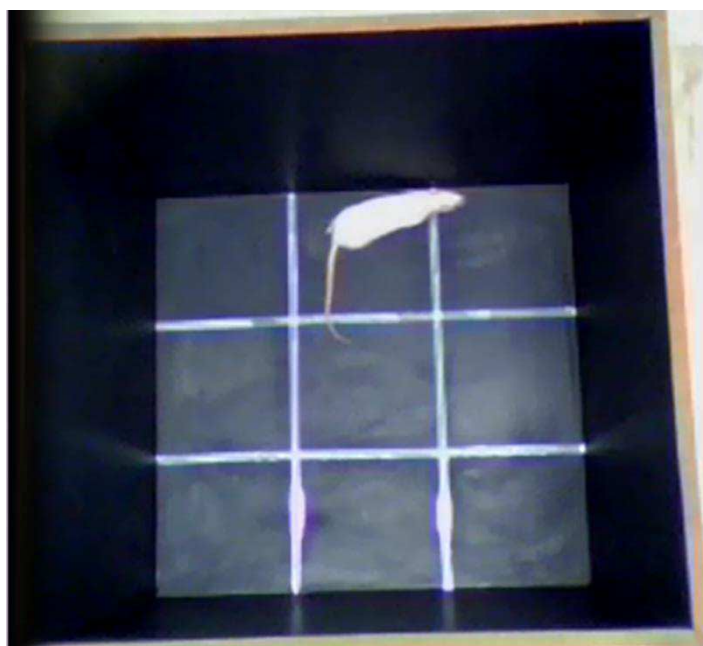
Os testes comportamentais foram realizados aos 35 dias pós-natal, com a finalidade de analisar os efeitos da suplementação das mães no desenvolvimento do SNC na prole.

4.4.2.1 Avaliação da Ansiedade Utilizando o Campo Aberto

O Campo Aberto (WALSH & CUMMINS, 1976; PELLOW et al., 1985) fornece medidas simultâneas de locomoção, exploração e ansiedade. O número de cruzamentos de linhas e a frequência da criação são geralmente usados como medidas da atividade locomotora, mas também são medidas de exploração e ansiedade. Uma alta frequência desses comportamentos indica aumento da locomoção e exploração e um menor nível de ansiedade. O número de entradas na área central e a duração do tempo gasto na área central são medidas de comportamento e ansiedade exploratórios. Uma alta frequência ou duração desses comportamentos indica alto comportamento exploratório e baixos níveis de ansiedade

O teste consiste em uma caixa de madeira quadrada com paredes e piso negros medindo 60x60x60cm subdivididos em 9 unidades delimitados por linhas brancas, onde, cada animal foi colocado no centro do campo aberto um animal por vez, onde permaneceram durante 10 minutos para livre exploração. Sendo avaliados os parâmetros de ambulação (número de cruzamentos dos segmentos pelo animal com as quatro patas), número do comportamento de levantar (rearing) e o tempo de permanência no quadrante central do aparato. A locomoção/ambulação, assim como o ato de levantar é observada através da exploração forçada uma vez que o animal não pode escapar da área de teste, podendo dessa forma avaliar o comportamento de ansiedade (HARRO, 2017; RACHETTI et al., 2013). Antes de iniciar os testes o aparelho foi higienizado com álcool 70% e papel toalha, sendo higienizado com álcool 10% a cada troca de animal para eliminar odor dos animais de modo a não interferir no comportamento do animal seguinte. A manipulação dos animais foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador.

Figura 5– Aparelho de Campo Aberto



Fonte: autoria própria

4.4.2.2 Avaliação da Ansiedade Utilizando o Labirinto em Cruz Elevado (EPM)

O EPM é frequentemente utilizado como um modelo experimental para avaliar o comportamento de ansiedade em roedores (PELLOW, FILE, 1985). O teste consiste em colocar o animal em um EPM feito de madeira em forma de cruz, elevado do solo, formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos (perpendiculares aos primeiros), objetivando analisar a frequência de entradas e o tempo gasto pelo animal em cada tipo de braço, além do tempo de permanência na área central. Quanto a esse tipo de teste, observa-se que o animal tende a explorar os dois tipos de braços, entrando e permanecendo por mais tempo nos braços fechados, uma vez que os roedores evitam espaços abertos. Segundo Handley e Mithani (1984) e Pellow e File (1986), a preferência pelos braços abertos ou fechados é considerada um indicador confiável de ansiedade, no qual, quanto maior o nível de ansiedade, menor é a preferência pelos braços abertos bem como o tempo de permanência nos mesmos, e vice-versa. O teste ocorreu 24 horas após o campo aberto com todos os grupos experimentais. O teste ocorreu da seguinte forma: o animal foi colocado no centro do aparelho, voltado para

um dos braços fechados, onde foi permitida a livre exploração durante 5 (cinco) minutos.

Figura 6 - Labirinto em cruz elevada



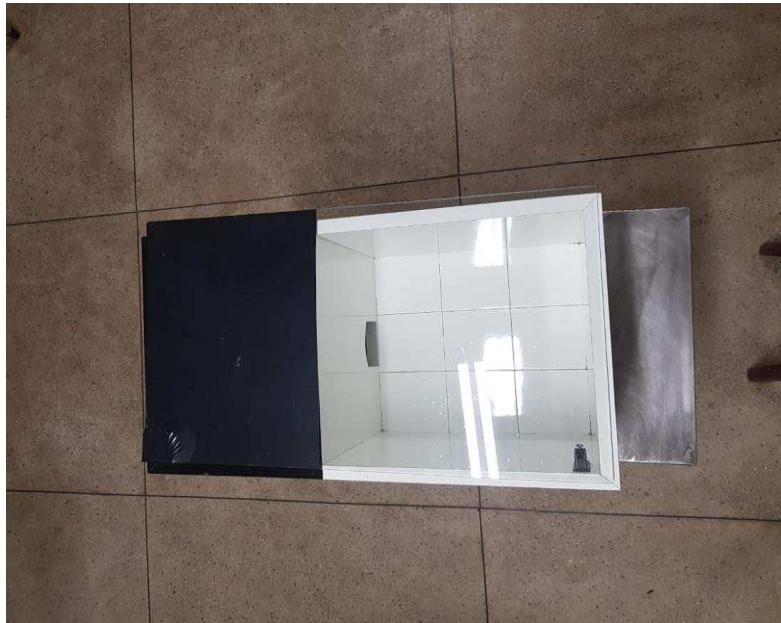
Fonte: autoria própria

4.4.2.3 Verificação de Parâmetros de Ansiedade Utilizando a Caixa Claro e Escuro

O método consistiu em colocar o animal em uma caixa contendo um luz e um compartimento escuro (CRAWLEY E GOODWIN, 1980). A caixa de transição claro-escuro é feita de madeira e revestida com material impermeável com dimensões totais de: 27 cm (A) × 45 cm (C) × 27 cm (C) e consiste em dois compartimentos, o compartimento claro com dimensões maiores (27 × 27 × 27 cm) com o piso dividido em 9 quadrados (9 cm × 9 cm) e o compartimento escuro menor (27 × 18 × 27 cm). Na divisória entre os dois compartimentos há uma abertura central medindo 7 cm × 7 cm. Esta caixa também possui uma tampa superior, pintada de preto na extensão que cobre o compartimento escuro. Além disso, uma lâmpada foi usada para iluminar o compartimento transparente. Durante o teste, animais de 37 dias foram colocados no centro do compartimento transparente com o focinho voltado para a entrada central. Uma câmera foi posicionada no compartimento transparente para registrar o movimento do animal naquele compartimento. Cada animal passou 5 minutos na caixa. O aparelho foi limpo antes e após o teste com álcool a 70% e com álcool a 10% em cada troca de animais. Os seguintes parâmetros foram avaliados: Número de entrada no

compartimento claro; Tempo de permanência no compartimento claro; Tempo de permanência no compartimento escuro.

Figura7 – Caixa Claro e Escuro



Fonte: autoria própria

Todas as sessões de testes comportamentais foram realizadas no período da manhã, no horário das 06h00minh as 08h00min e filmadas com câmera de vídeos instalada sob o aparato e os dados posteriormente associados como indicador dos efeitos da suplementação dietética materna.

4.4.3 Eutanásia e obtenção do tecido cerebral

A eutanásia foi realizada por Exsanguinação (punção cardíaca), após confirmação da eutanásia, foi retirado o cérebro, e imediatamente colocado em uma superfície com gelo sendo dividido em faixas para posterior análise do conteúdo de malonaldeído (MDA). Os tecidos foram mantidos em - 80 °C até o momento das análises.

4.4.4 Marcador da peroxidação lipídica - Malonaldeído (MDA)

As concentrações de malonaldeído (MDA) foram determinadas no tecido cerebral dos animais como descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). As amostras foram descongeladas, picadas e homogeneizadas (Homogeneizador Ultra Stirrer,

Modelo 80) com tampão Tris HCl (pH = 7,4) na proporção 1:5 (m/ v). O homogenato obtido foi centrifugado a 2500 G por 10 minutos a 4 oC e ao sobrenadante adicionado reativo cromogênico (1-metil-2-fenilindol e acetonitrila) e ácido clorídrico (HCl - 37%). O conteúdo de MDA foi calculado através da interpolação em curva padrão com o 1,1,3,3 – tetraetoxipropano. A leitura das absorbâncias foi realizada em Leitor de microplacas Polaris® (Celer Biotecnologia S. A.) a 586 nm e dados expressos em nmol/ g de tecido. Todos os reagentes foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA).

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) ou e analisados pelo ANOVA One Way, para comparação entre os grupos. Foi considerado o nível de significância para rejeição da hipótese nula de $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

AKYOL, A.; LANGLEY-EVANS, S.C.; MCMULLEN, S. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. **Br J Nutr**, v.102, n.11, p.1601-1610, 2009.

ARBUKLE LD, INNIS SM. Docosahexaenoic acid is transferred through maternal diet to milk to tissues of natural milk-fed piglets. **J Nutr**. 1993; 123(10): 1668-75.

ARRUDA H. S., CRUZ R. G., ALMEIDA M. E. F. **Chemical characterization, functionality and toxicity of pequi**. *Nutrição Brasil*. 2012; 11(5).

Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi / Maria Elisabeth Barros de Oliveira... [et al.] – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 32 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 113). ISSN 1677-1915

BAYOL, S. A.; BRUCE, C. R.; WADLEY, G. D. Growing healthy muscles to optimise metabolic health into adult life. **J Dev Orig Health Dis**, v. 5, n. 6, p. 420-434, Dec 2014.

BAYOL, S. A.; SIMBI, B. H.; STICKLAND, N. C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **J Physiol**, v. 567, n. Pt 3, p. 951-961, Sep 15 2005.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p.317-333, 1998.

BRETT, K. E. et al. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 9, p. 16153-16185, 2014.

BRONZINO, J.; KISSANE J. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosc. Behav. Rev.**, v. 17, p. 91-128, 1993.

CALLEGARO D. Esclerose múltipla. In: Nitrimi R, Bachesch AL, editores. **A Neurologia que todo médico deve saber**. São Paulo: Atheneu; 2003.

CARDOSO, Bárbara Rita; COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato. Estresse oxidativo na Doença de Alzheimer: o papel das vitaminas C e E. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 249-259, 2009.

CARLSON S. **LCPUFA and functional development of pattern and term infants**. In: Bindels JG, Goedhart AC, Visser HKA, editors. *Recent developments in infant nutrition*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1996.

CHECHI, K.; HERZBERG, G. R.; CHEEMA, S. K. Maternal dietary fat intake during gestation and lactation alters tissue fatty acid composition in the adult offspring of C57Bl/6 mice. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.83, p.97-104, 2010.

CHOIN- KWON, S. et al. Temporal changes in cerebral antioxidante enzyme activities ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. **Dev. Brain Res.**, v. 152 (1), p. 11-18, 2004.

CLANDININ, M. T. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. **Lipids**, v. 34, n. 2, p. 131-137, Feb 1999.

COHEN SL, WARD WE. Flaxseed oil and bone development in growing male and female mice. *J Toxicol Environ Health A*. 2005; 68(21):1861-70.

CORDEIRO, M.W.S.; CAVALLIERI, A.L.F.; NAVES, M.M.V. **Caracterização física e química de frutos de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) de diferentes regiões do estado de Mato Grosso**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

DAS, U. G.; SYSYN, G. D. Abnormal fetal growth: intrauterine growth retardation, small for gestational age, large for gestational age. **PediatrClin North Am.**, v.51, n.3, p.639-654, 2004.

DILS RR. Mammary glands. In: Snyder F, editor. **Lipid metabolism in mammals**. New York: Plenum Press; 1977. v.2.

E L B NOVELLI et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals** (2007) 41, 111–119.

EDMOND J, HIGA TA, KORSACK RA, BERNER EA, LEE WN. Fatty acid transport and utilization for the developing brain. **J Neurochem**. 1998; 70(3): 1227-34.

ELIAS, S. L.; INNIS, S. M. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 4, p. 807-814, Apr 2001.

GIBSON, R. A.; NEUMANN, M. A.; MAKRIDES, M. Effect of dietary docosahexaenoic acid on brain composition and neural function in term infants. **Lipids**, v. 31 Suppl, p. S177-181, Mar 1996.

GONZÁLEZ, H. F., AND VISENTIN, S. (2016). Nutrients and neurodevelopment: lipids. *Arch. Argent. Pediatr.* 114, 472–476. doi: 10.5546/aap.2016.eng.472

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. New York: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press, 1999. P.285, 293

HARRO, J. *Animals, anxiety, and anxiety disorders: how to measure anxiety in rodents and why*. Behavioural brain research, 2017.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, n. 1, p. 43-55, Oct 2002.

HERRERA, E., AND ORTEGA-SENOVILLA, H. (2014). Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15, 24–31. doi: 10.2174/1389201015666140330192345

- HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Docosahexanoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acid**, v. 70, p. 361- 372, 2004.
- HOSSAIN, M.S. et al. Antioxidative effects of docosahexaenóico acid in the cerebrum versus cerebellum an Brainstem of aged hypercholesterolemic rats. *J. Neurochem.*, v. 72 (3), p. 1133- 1138, 1999.
- INNIS SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res.* 1991; 30(1):39-103.
- JENSEN, R.; SAUERWALD, T. Physiological aspects of human milk lipids. **Early Hum. Dev.**, v. 65, p. S3-18, 2001.
- JONES, K.L.; WILL, M. J.; HECHT, P. M.; et al. Maternal diet rich in omega- 6 polyunsaturated fatty acids during gestation and lactation produces autistic- like sociability deficits in adult offspring. *Behavioural Brain Reserch*, 238: 193- 199, 2013.
- KOLETZKO, B. et al. Physiological aspects of human milk lipids. **Early Hum Dev**, v. 65 Suppl, p. S3-S18, Nov 2001.
- KOLETZKO, B.; AGGETT, P. J.; BINDELS, J. G.; BUNG, P.; FERRE, P.; GIL, A.; LENTZE, M. J.; ROBERFROID, M.; STROBEL, S. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. **British Journal of Nutrition**, v.80, n.1, p.S5-45, 1998.
- KOLETZKO, B.; RODRIGUEZ-PALMERO, A.; DEMMELMAIR, H.; FILDLER, N.; KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, G.A.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em polpa de frutos. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.4, p.726-732, 2005.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1998.
- LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*. V. 46, p. 207- 219, 2007.
- LONGHI, R., ALMEIDA, RF, PETTENUZZO, LF *et al.* Efeito de uma dieta rica em ácidos graxos *trans* nos parâmetros de estresse mitocondrial, inflamatório e oxidativo no córtex e no hipocampo de ratos Wistar. *Eur J Nutr* **57**, 1913-1924 (2018).
- LUPIEN,S. J. et al. Effects of stresse throughout the lifespan on the brain, be and cognotion. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.10,p. 434- 445, 2009.
- MARBOIS BN, AJIE HO, KORSAK RA , SENSHARMA DK, EDMOND J. The origin of palmitic acid in brain of the developing. **Lipids**. 1992; 27(8):587-92.
- MARTEINSDOTTIR, I. et al. Changes in dietary fatty acids alter phospholipids fatty acid composition in selected regions of rat brain. **Prog. Neuro- Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 22,p. 1007- 1021, 1998.

- MARTINEZ, M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. **J. Pediatr.**, v. 120, p. S129-138, 1992.
- MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. **Biochem.Soc. Trans.**, v.34, p.779–782, 2006.
- MITCHEL, S. A. et al. The apaf – 1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interaction with PTB an unr. **Mol. Cell.**, v.11(3), p. 757- 771, 2003.
- MORGANE P.J; MILLER, M.; KEMPLER, T.; STERN, W.; FORBES W.; HAL R.; MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R. J.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZCINTRA, S.; CINTRA, L et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 17, p.91–128, 1993.
- MORIGUCHI, T.; GEINER, R. S.; SALEM Jr, N. behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. **J. Neurochem.**, v. 75, p. 2563- 2573, 2000.
- MURHPY, M.; MERCER, J.G. Diet- regulated anxiety. **Int J Endocrinol.** 2013: Aug 20: DOI: 10.1155/2013/701967.
- MURPHY, M. G. Dietary fatty acids and membrane protein function. **J. Nutr. Biochem.**, v. 1, p. 68-70, 1990.
- OLIVEIRA, M.E.B.; GUERRA, N.B.; MAIA, A.H.N.; ALVES, R.E.; MATOS, N.M.S.; SAMPAIO, F.G.M.; LOPES, M.M.T. **Características químicas e físico-químicas de pequis da chapada do Araripe, Ceará.** *Revista Brasileira de Fruticultura.* v.32, n.1, p.114-125, 2010.
- P. R. B. Broinizi; E. R. S. Andrade-Wartha; A. M. O. e Silva; R. P. Torres; H. M. C. Azeredo; R. E. Alves; J. Mancini-Filho. **Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.
- PAHAYE, D. B., BUM, E. N., TAÏWÉ, G. S., NGOUPAYE, G. T., SIDIKI, N., MOTO, F. C. O., OMAM, J. P. O. Neuroprotective and anti-amnesic effects of *Mitragyna inermis* Willd (Rubiaceae) on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Behavioural neurology*, 2017.
- PALOU, M.; et al. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* 151.3: 1030-1041, 2010
- PRADO, E. L., ASHORN, U., PHUKA, J., MALETA, K., SADALAKI, J., OAKS, B. M., ET AL. (2018). **Associations of maternal nutrition during pregnancy and post-partum with maternal cognition and caregiving.** *Matern. Child. Nutr.* 14:e12546. doi: 10.1111/mcn.12546
- RACHETTI, A. L. F., ARIDA, R. M., PATTI, C. L., ZANIN, K. A., FERNADES-SANTOS, L., FRUSSA-FILHO, R., CYSNEIROS, R. M. Fish oil supplementation and

physical exercise program: distinct effects on different memory tasks. *Behavioural brain research*, 237, 283-289, 2013.

REGINA CELI MOREIRA VILARINHO BARBOSA et Al. DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE SENSORIAL DO TABLETE DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*). *Ceres*. 53(310): 579-588, 2006.

RODRIGUES-CRUZ M, TOVAR PAR, DEL PRADO M, TORRES VTN. Molecular mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids. *Rev Invest Clin*. 2005; 57(3):457-72.

RODRIGUEZ, J. S.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, G. L.; REYES-CASTRO, L. A.; IBANEZ, C.; RAMIREZ, A.; CHAVIRA, R.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W.; ZAMBRANO, E. Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v.30, p.75-81, 2012.

SALEM, J. N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Backgrounder**, v. 3(1), p. 1-8, 1999

SALEM, J. N. et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v36, p. 945 – 979, 2001.

SAMUELSSON, A. M.; MATTHEWS, P. A.; ARGENTON, M.; CHRISTIE, M. R.; MCCONNELL, J. M.; JANSEN, E. H. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, v.51, p.383-392, 2008.

SANTOS- MONTEIRO J, GUEDES RCA, MANHÃES –DE- CASTRO RAUL, CABRAL FILHO J.E. Estimulação psicossocial e plasticidade cerebral em desnutridos. *Ver. Bras. Saude Mater. Infant*. Vol.2 no.1 Recife jan/apr. 2002.

SINCLAIR, A. J. et al. Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v.16, p. 391- 397, 2007.

SYMONDS ME, BUDGE H, STEPHENSON T, MCMILLEN C. Fetal endocrinology an development- manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. *Reproduction* 121: 853-862, 2001.

TYAGI, E.; ZHUANG, Y.; AGRAWAL, R.; YING, Z.; GOMEZ- PINILLA, F. Interactive actions of BDNF methylation and cell metabolism for building neural resilience under the influence of diet. *Neurobiol Dis* 73:307- 318. 2015.

UAUY, R.; DANGOUR, A. D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. **Nutr. Rev.**, v.64, p. 24-33, 2006.

VALENZUELA, A. B.; NIETO, S. K. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importância en el desarrollo del sistema nervioso y visual. **Rev. Chil. Pediatr.**, v. 74, p.149-157, 2003.

VAN DE REST, O.; VAN HOOIJDONK, L.W; DOETS, E.; et al. B vitamins and n-3 fatty acids for brain development and function: review of human studies. *Annals of nutrition and metabolism*, 60: 272- 292, 2012.

WALKER, C.D. (2005). Nutritional aspects modulating brain development and the responses to stress in early neonatal life. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, Vol. 29, No. 8, (December 2005), pp. 1249-63, ISSN 0278-5844

WOLFF, R. L. Trans-18:1 Isomers in Rat Milk Fat as Effective Biomarkers for the Determination of Individual Isomeric trans-18:1 Acids in the Dams' Diet. **Lipids**, v. 38, p. 1143-1148, 2003.

WOLFF, R. L.; PRECHT, D.; MOKKENTIN, J. Trans-18 : 1 acid content and profile in human milk lipids. Critical survey of data in connection with analytical methods. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 6, p. 661-671, Jun 1998.

XIANG, M.; ALFVEN, G.; BLENNOW, M.; TRYGG, M.; ZETTERSTROM, R. Long-chain polyunsaturated fatty acids in human milk and brain growth during early infancy. **Acta Paediatr.**, v. 89, p. 142-147, 1999.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente pesquisa estão apresentados como artigo científico, que será submetido de acordo com as normas das revistas.

ARTIGO: O consumo materno de polpa de pequi durante a gestação e lactação induz comportamento ansiolítico e reduz peroxidação lipídica no tecido cerebral da pele de ratos. Será submetido a Revista Food & Function, ISSN: **2042-650**. Fator de impacto: **3.289**.

O consumo materno de polpa de pequi durante a gestação e lactação induz comportamento ansiolítico e reduz peroxidação lipídica no tecido cerebral da prole de ratos

RESUMO

O pequi (*Caryocar Brasiliense camb.*) é um fruto típico do cerrado brasileiro, fonte de ácidos graxos essenciais, vitaminas e compostos fenólicos. O presente estudo objetivou-se analisar os efeitos do consumo deste fruto sobre o comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica no cérebro de ratos cujas mães foram tratadas com 2000mg/kg de peso com a polpa ou a amêndoa do pequi por via orogástrica durante a gestação e lactação. Os parâmetros de ansiedade foram avaliados utilizando o campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa claro/escuro, o cérebro foi removido e utilizado para aferir os níveis de malonaldeído. Os dados foram analisados utilizando ANOVA One-way ($p < 0,05$). No campo aberto os animais do grupo polpa de pequi mostraram maior atividade exploratória comparada ao grupo amêndoa. No LCE os animais do grupo polpa entraram mais vezes, nos braços abertos, permaneceram por maior tempo nos braços abertos de no centro comparado ao grupo amêndoa. Na caixa claro e escuro os animais de grupo polpa entraram mais vezes e permaneceram mais tempo no lado claro diferente do grupo amêndoa. Apenas os animais do grupo polpa de pequi apresentaram menor peroxidação lipídica no cérebro. Podemos concluir que a polpa do pequi possui propriedades que protegem o tecido cerebral e que seu consumo o consumo durante a gestação e lactação reduz peroxidação lipídica no tecido cerebral e induz comportamento ansiolítico na prole de ratos.

Palavras-chave: Ácidos Graxos, Estresse oxidativo, ácido oléico, ansiedade.

1 INTRODUÇÃO

A alimentação adequada é essencial para o desenvolvimento normal do organismo, pois este fornece os nutrientes necessários, sem eles o desenvolvimento é prejudicado (WALKER, 2005). A formação do cérebro é caracterizada por etapas que compreende neurogênese, migração neural, apoptose seletivo, sinaptogênese, finalizando com a mielinização. Essas etapas são sequenciais e dão forma e funcionalidade ao tecido cerebral (MORGANE et al., 1993). A formação e maturação do sistema nervoso central iniciam-se ainda na fase intrauterina e vai até os primeiros anos de vida (MARTINEZ, 1992). A disponibilidade de nutrientes da mãe é de extrema importância para a formação do conceito, esses nutrientes são passados ao feto através da placenta (BRENT et al., 2014) e após o nascimento pelo leite materno (WOLF, 2003). Os ácidos graxos são os principais constituintes do sistema nervoso central (HORROCKS; FAROOQUI, 2004; LEHNINGER et al, 1998). São responsáveis pelo aumento na fluidez da membrana e plasticidade sináptica que contribui para as funções cerebrais (MITCHEL et al, 2003; MURPHY, 1990).

Estudos mostram que os ácidos graxos também atuam como antioxidantes nutricionais (CHOIN-KWON et al., 2004; HOSSAIN et al., 1999) assim como as vitaminas antioxidantes C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos (BROINIZI et al., 2008) que atuam reduzindo a peroxidação lipídica no tecido cerebral. A peroxidação lipídica é a consequência do estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo está diretamente relacionado com distúrbios comportamentais como a ansiedade. (GUNEY et al, 2014; YAN et al., 2016) pois o cérebro é particularmente vulnerável a danos oxidativos devido principalmente ao seu grande conteúdo em ácidos graxos poliinsaturados, alto consumo de oxigênio e atividade mitocondrial, bem como sua menor capacidade antioxidante em comparação com outros órgãos e tecidos (GAGO; SANTAMARIA; TUNEZ, 2014). Esse estresse altera a composição e o funcionamento das membranas celulares cerebrais, reduzindo a arborização dendrítica nas regiões do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal que são responsáveis pelo comportamento de ansiedade e depressão (LUPIEM et al., 2009).

O pequi é um fruto oriundo do cerrado brasileiro, comumente consumido pela população dessa região, constituído por exocarpo de coloração marrom esverdeada,

mesocarpo externo formado por uma polpa branca e mesocarpo interno, porção comestível do fruto, de coloração amarelo-claro a alaranjado escuro. O endocarpo espinhoso do pequi protege a semente comestível, que é revestida por um tegumento fino e marrom (ARAÚJO, 1995; SILVA e MEDEIROS FILHO, 2006). É um alimento rico em carotenóides, vitamina C e lipídios monoinsaturados majoritariamente o ácido oleico que é um ácido graxo insaturado essencial para o organismo (ALMEIDA; SILVA, 1994; RODRIGUES; AMAYA, 1997). Essas características sugerem que o pequi possua compostos que protegem a fração lipídica neuronal da oxidação. Com isso esse estudo visa analisar os efeitos do consumo da polpa e da amêndoa do pequi sobre os parâmetros de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização e local da pesquisa

A pesquisa possui caráter experimental utilizando ensaio biológico, conduzidos no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) e Laboratório de Bromatologia (LABROM) – CES/UFCG; e no Laboratório de Farmacologia - III/UFRN.

O protocolo experimental segue as recomendações éticas do National Institute of Health Bethesda (Bethesda, USA), com relação aos cuidados com animais, sendo levado em consideração o bem-estar dos animais no laboratório, de modo que o sofrimento e o estresse dos animais experimentais serão minimizados ao máximo. O presente protocolo de estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR / UFCG, com número de protocolo CEUA/CSTR N°04/2020.

2.2 Material

O fruto foi adquirido na feira local da cidade de Juazeiro no estado do Ceará sendo selecionado manualmente, higienizados e sanitizado com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2,0 a 2,5% e água, posteriormente foi descascado manualmente com o auxílio de uma faca de aço inoxidável, submetido a um tratamento térmico simples 70°C (pré-cozimento), resfriado em água corrente e seguida despulpado manualmente com uma faca de aço inoxidável. Sua polpa e os caroços foram levados à

secagem em estufa de circulação de ar forçada a uma temperatura de 60°C por 24h e 48h respectivamente. Após esse período a polpa foi triturada em liquidificador convencional, embalado a vácuo e armazenado em freezer à -18°C para posterior utilização, os caroços foram partidos ao meio para retirada da amêndoa de modo manual e a mesma foi triturada em liquidificador convencional, embalada a vácuo e armazenada em freezer à -18°C para posterior utilização.

2.3 Análises do conteúdo de antioxidantes totais da polpa e amêndoa de pequi

2.3.1 Extração por Maceração

Os extratos foram obtidos a partir da amostra previamente moída, pesada (1g) e transferida para um tubo falcon envolto de papel alumínio com capacidade de 50 mL. A amostra foi adicionada de solvente metanol 80% na proporção 1:10 (m/v) e agitada em vórtex por 1 minuto, em seguida mantida em repouso por 24 horas em temperatura ambiente aproximada de 22 ± 2 °C. Após os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativos e armazenados em frascos âmbar em freezer (-18 °C) até o momento das análises.

2.3.2 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999) com modificações por Roesler (2007). Os extratos previamente diluídos foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 2,0 mL de solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu 0,2 N, agitados e deixados em repouso em ausência de luz por 6 minutos, depois adicionou-se 1,6 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% (m/v), agitados-os e incubados durante 5 minutos em banho-maria a 50°C. Em seguida, foram resfriados em água para leitura em espectrofotômetro a 760 nm, calibrado com solução referência de ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico/ 100 g de farinha da amêndoa e polpa de pequi (mg EAG/100g).

2.3.3 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen et al. (1999). Alíquota de 0,5mL dos extratos previamente diluídos foram colocados em tubos de ensaio e adicionados de 2 mL de água destilada, seguido de 0,15 mL de nitrito de sódio (NaNO_2) e após 5 minutos, 0,15 mL de cloreto de alumínio

(AlCl_3), foram deixados em repouso por 6 minutos no escuro e após adicionado de 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e 1,2 mL de água destilada. A solução foi agitada e a absorbância lida em espectrofotômetro a 510 nm, calibrado com solução referência de catequina. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg equivalente de catequina/ 100g de farinha da amêndoa e polpa de pequi (mg EC/100g).

2.3.4 Método de captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

A atividade antioxidante pelo método $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizada conforme metodologia descrita por Sariburun et al. (2010) com algumas modificações. O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi formado pela reação da solução ABTS 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados a temperatura de 25°C, no escuro durante 12-16 horas, posteriormente diluído em água destilada até obter o valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734nm. A partir de cada extrato, foram preparadas seis diluições diferentes, em triplicatas. Em ambiente escuro foi transferido uma alíquota de 15 μL do extrato previamente diluído para tubos de ensaio contendo 1,5 μL do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A leitura realizou-se após 6 minutos da reação a 734nm em espectrofotômetro. Uma solução controle foi preparada conforme o procedimento descrito acima, sem adição da amostra. Como referência, utilizou-se o Trolox e os resultados expressos em μmol equivalentes de trolox/ g de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

2.3.5 Capacidade Redutora de Ferro – FRAP

Para determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) utilizou-se a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), adaptada por Rockembach et al. (2011). O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, através da mistura de 11 mL de tampão acetato (0,3 M, pH: 3,6), 1,1 mL de solução TPTZ (tripiridiltriazina) (10 mM em HCl 40 mM) e 1,1 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Uma alíquota de 200 μL do extrato previamente diluído foi adicionada a 1800 μL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Para cada amostra foi realizado um branco, sem adição do extrato. As absorbâncias foram medidas após o tempo de incubação a 593nm. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em μmol equivalentes de trolox / g de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

2.4 Ensaio Biológico

2.4.1 Animais e dietas experimentais

Fêmeas primíparas da linhagem Wistar (90 dias de vida/250 ± 50g) obtidas do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Campina Grande - LANEX / UFCG. Foram acasaladas na proporção de um macho para cada fêmea. Após confirmação de prenhes, foram alojadas em gaiolas-maternidade individuais de polipropileno, em condições-padrão do laboratório (temperatura de 22 ± 1°C, umidade 65 ± 5%, ciclo claro/escuro de 12/12 horas – luz artificial das 6:00 as 18:00 horas). As amostras foram divididas de forma randomizada em três grupos (n=10): Controle (GC) – água destilada; Polpa de Pequi (PP) – tratadas com 2000 mg de polpa de pequi /Kg de peso do animal e Amêndoa do Pequi (AP) – tratadas com 2000mg de farinha da amêndoa do pequi /kg de peso do animal, sendo administrada a partir do 7º dia de gestação até o 21º dia lactação através de sonda orogástrica. Foi fornecido ração padrão (Presence®) e água *ad libitum*. As ninhadas foram padronizadas em 10(dez) filhotes machos.

Após o desmame os filhotes foram mantidos em gaiolas coletivas recebendo ração padrão (Presence®) e água *ad libitum*. Aos 35 dias de vida foram submetidos a testes comportamentais de ansiedade. Dois dias após o termino dos testes os animais foram eutanasiados.

2.4.2 Avaliação de parâmetros comportamentais

2.4.2.1 Avaliação da Ansiedade Utilizando o Campo Aberto

Modelo experimental descrito por WALSH & CUMMINS, (1976); PELLOW et al., (1985), consiste em uma caixa de madeira quadrada com paredes e piso negros medindo 60x60x60cm subdivididos em 9 unidades delimitados por linhas brancas, onde, cada animai foi colocado no centro do campo aberto um animal por vez, onde permaneceram durante 10 minutos para livre exploração. Sendo avaliados os parâmetros de ambulação (número de cruzamentos dos segmentos pelo animal com as quatro patas), número do comportamento de levantar (rearing) e o tempo de permanência no quadrante central do aparato. Antes de iniciar os testes o aparelho foi higienizado com álcool 70% e papel toalha, sendo higienizado com álcool 10% a cada troca de animal

para eliminar odor dos animais de modo a não interferir no comportamento do animal seguinte. A manipulação dos animais foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador.

2.4.2.2 Avaliação da Ansiedade Utilizando o Labirinto em Cruz Elevado (EPM)

Descrito por PELLOW, FILE, (1985), consiste em colocar o animal em um EPM feito de madeira em forma de cruz, elevado do solo, formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos (perpendiculares aos primeiros), objetivando analisar a frequência de entradas e o tempo gasto pelo animal em cada tipo de braço, além do tempo de permanência na área central. O animal foi colocado no centro do aparelho, voltado para um dos braços fechados, onde foi permitida a livre exploração durante 5 (cinco) minutos.

2.4.2.3 Verificação de parâmetros de ansiedade utilizando a Caixa Claro e Escuro

A caixa de transição claro-escuro é feita de madeira e revestida com material impermeável com dimensões totais de: 27 cm (A) × 45 cm (C) × 27 cm (C) e consiste em dois compartimentos, o compartimento claro com dimensões maiores (27 × 27 × 27 cm) com o piso dividido em 9 quadrados (9 cm × 9 cm) e o compartimento escuro menor (27 × 18 × 27 cm). Na divisória entre os dois compartimentos há uma abertura central medindo 7 cm × 7 cm. Esta caixa também possui uma tampa superior, pintada de preto na extensão que cobre o compartimento escuro, e uma lâmpada utilizada sobre o compartimento claro. Uma câmera foi posicionada no compartimento transparente para registrar o movimento do animal naquele compartimento. Cada animal passou 5 minutos na caixa. O aparelho foi limpo antes e após o teste com álcool a 70% e com álcool a 10% em cada troca de animais. Os seguintes parâmetros foram avaliados: Número de entrada no compartimento claro; Tempo de permanência no compartimento claro; Tempo de permanência no compartimento escuro.

2.4.3 Eutanásia e obtenção do tecido cerebral

A eutanásia foi realizada por Exsanguinação (punção cardíaca), após confirmação da eutanásia, foi retirado o cérebro, e imediatamente colocado em uma superfície com gelo sendo dividido em faixas para posterior análise do conteúdo de malonaldeído (MDA). Os tecidos foram mantidos em - 80 °C até o momento das análises

2.4.4 Marcador da peroxidação lipídica- Malonaldeído (MDA)

As concentrações de malonaldeído (MDA) foram determinadas no tecido cerebral dos animais como descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). As amostras foram descongeladas, picadas e homogeneizadas (Homogeneizador Ultra Stirrer, Modelo 80) com tampão Tris HCl (pH = 7,4) na proporção 1:5 (m/ v). O homogenato obtido foi centrifugado a 2500 G por 10 minutos a 4 °C e ao sobrenadante adicionado reativo cromogênico (1-metil-2-fenilindol e acetonitrila) e ácido clorídrico (HCl - 37%). O conteúdo de MDA foi calculado através da interpolação em curva padrão com o 1,1,3,3 – tetraetoxipropano. A leitura das absorbâncias foi realizada em Leitor de microplacas Polaris® (Celer Biotecnologia S. A.) a 586 nm e dados expressos em nmol/ g de tecido. Todos os reagentes foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA).

3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (EPM) e analisados pelo ANOVA One Way, seguido de teste de Tukey, para comparação entre os grupos. Foi considerado o nível de significância para rejeição da hipótese nula de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Compostos fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante total da polpa e amêndoa do pequi

Quanto aos teores a polpa do pequi apresentou maior teor de fenólicos totais e flavonoides totais em sua composição em comparação a amêndoa, bem como uma maior atividade antioxidante.

Tabela 1 – Compostos fenólicos, flavonóides totais e atividade antioxidante total da polpa de pequi e amêndoa do pequi.

| | Polpa de Pequi | Amêndoa de Pequi |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Fenólicos Totais (mg AGE/100g) | 120,48 ($\pm 2,942$)* | 75,69 ($\pm 1,471$) |
| Flavonóides Totais (mg CE/100g) | 15,23 ($\pm 0,735$)* | 4,50 ($\pm 0,297$) |

| Atividade Antioxidante | | |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------|
| FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$) | 0,075 ($\pm 0,000$)* | 0,049 ($\pm 0,000$) |
| ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$) | 5,21 ($\pm 0,000$)* | 3,06 ($\pm 0,000$) |

Fonte: autoria própria (2020)

4.2 Avaliação de parâmetros de ansiedade

4.2.1 Campo aberto

Na ambulação, o grupo polpa apresentou uma maior atividade exploratória quando comparado aos grupos controle e amêndoa ($p \leq 0,05$) (Figura 1 A).

Quanto ao rearing o grupo controle apresentou maior atividade que os demais grupos, contudo, o grupo polpa realizou mais rearing do que o grupo amêndoa ($p \leq 0,05$) (Figura 1 B).

Já na taxa de permanência no centro do campo aberto o grupo polpa apresentou uma maior porcentagem quando comparado aos demais grupos analisados. O grupo amêndoa permaneceu menos tempo no centro do campo aberto comparado ao controle ($p \leq 0,05$) (Figura 1 C).

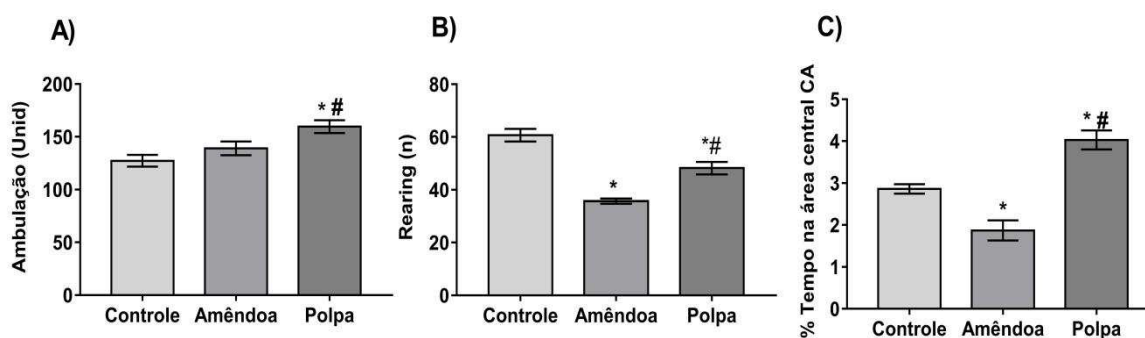


Figura 1 – Avaliação de parâmetros de ansiedade realizados no campo aberto de animais tratados com amêndoa ou polpa de Pequi durante a fase inicial da vida. Foi verificada a locomoção (A), rearing (B) e taxa de permanência na área central (C). Os dados foram expressos como média \pm DP, $n = 10$ por grupo (ANOVA One-way); ($p < 0,05$), *versus grupo controle #versus grupo amêndoa.

4.2.2 labirinto em Cruz Elevado

Foram avaliados o numero de entradas nos braços abertos, a taxa de permanência nos braços abertos e o tempo de permanência na área central do aparato.

Os animais de ambos os grupos experimentais entraram mais nos braços abertos quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Figura 2 A), porém não houve diferença no percentual de permanência entre os grupos (Figura 2 B).

Quanto ao tempo de permanência dos animais no centro do labirinto em cruz elevado, os animais do grupo polpa permaneceram por maior tempo comparado aos outros grupos. O grupo amêndoa não diferiu do grupo controle. ($p \leq 0,05$) (Figura 2 C).

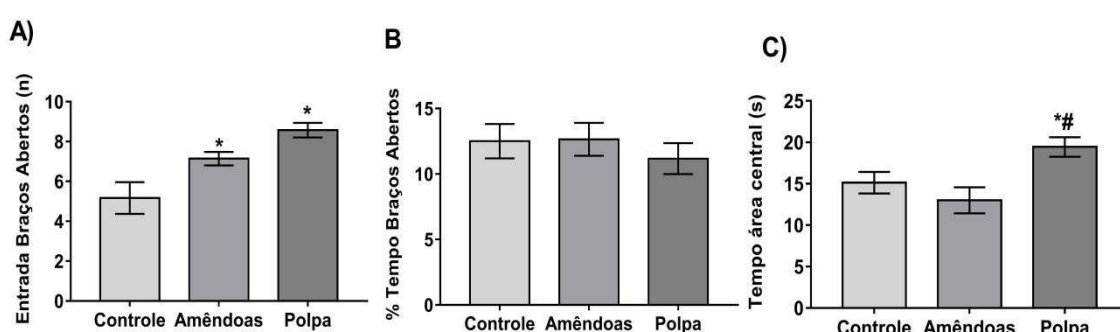


Figura 2 – Avaliação do desempenho da prole de ratos que foram suplementados com amêndoa e polpa de pequi durante a gestação e lactação no labirinto em cruz elevado onde foi aferido o numero de entrada braços abertos (A), a taxa de permanência braços abertos (B) e o tempo no centro (C). Os dados foram expressos como média \pm DP, $n = 10$ por grupo (ANOVA One- way); ($p \leq 0,05$), *versus grupo controle #versus grupo amêndoa.

4.2.3 Caixa Claro e Escuro

Utilizando caixa claro e escuro, foi analisado o número de entradas no compartimento claro, o tempo de permanência no compartimento claro e o tempo de permanência no compartimento escuro.

O grupo polpa apresentou maior numero de entradas e permanência no compartimento claro em relação aos grupos controle e amêndoa ($p \leq 0,05$) (figuras 3 A e B). Quanto ao tempo de permanência no compartimento escuro, o grupo polpa permaneceu menos tempo na área escura da caixa claro-escuro ($p \leq 0,05$) (Figura 3 C).

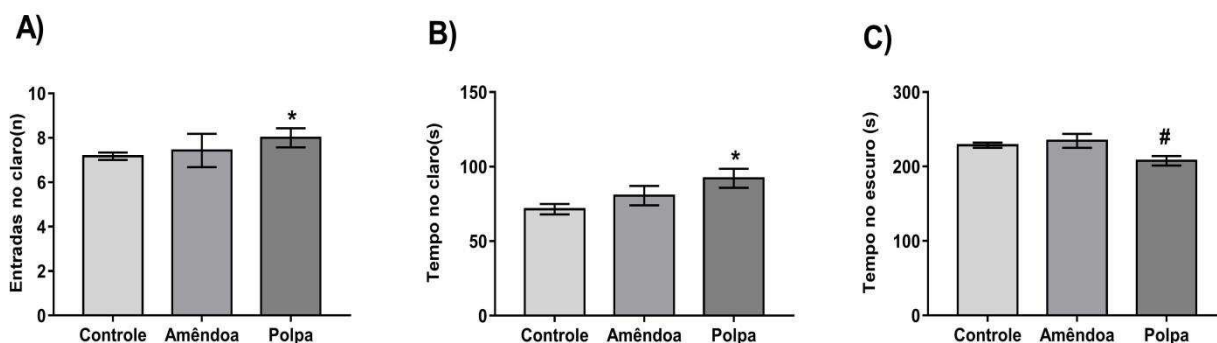


Figura 3 – Desempenho da prole de ratos que receberam amêndoa e polpa de Pequi durante a gestação e lactação na caixa claro e escuro onde foi aferido o (a) numero de entrada na área clara, (b) o tempo de permanência na área clara e (c) tempo de permanência na área escura. Os dados foram expressos como média \pm DP, n = 10 por grupo (ANOVA One- way); ($p \leq 0,05$) *versus grupo controle #versus grupo amêndoa.

4.3 Marcador de peroxidação lipídica cerebral – Malonaldeído

Os animais do grupo polpa apresentaram um menor índice de peroxidação lipídica comparado aos grupos controle e amêndoa mostrando dessa forma um efeito protetor no tecido cerebral dos animais contra o estresse oxidativo ($p \leq 0,05$) (Figura 4).

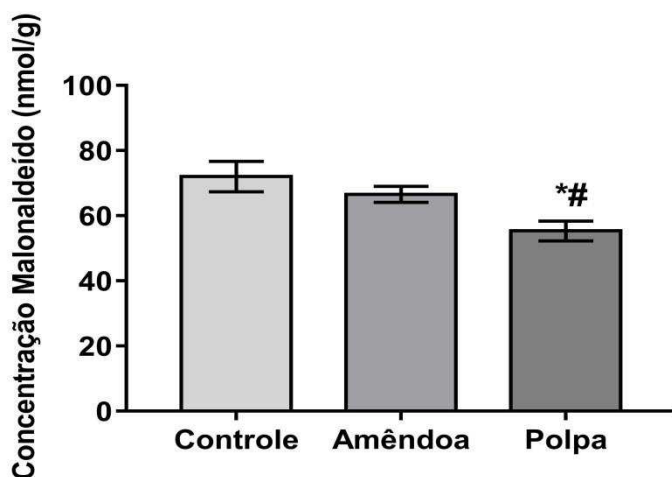


Figura 4 – Concentração de Malonaldeído. Os dados foram expressos como média \pm DP, n = 10 por grupo (ANOVA One- way); ($p < 0,05$), *versus grupo controle #versus grupo amêndoa.

5 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foi investigado como o consumo da polpa e amêndoa de Pequi quando ofertado a ratas durante a fase inicial podem afetar o funcionamento cerebral da prole. Os dados mostraram um comportamento tipo ansiolítico e uma redução na peroxidação lipídica na prole de mães que receberam a polpa. Do ponto de vista nutricional, sabe-se que a polpa e a amêndoa do pequi apresentam elevado teor de lipídios, comparável ao do abacate, açaí e buriti (ALMEIDA; SILVA, 1994), porém a polpa possui mais ácidos graxos essenciais, além de apresentar maiores teores de compostos fenólicos e antioxidantes e carotenoide comparado a amêndoa (LIMA, 2007). O comportamento de ansiedade foi avaliado utilizando o campo aberto, labirinto em cruz elevada e a caixa de transição claro/escuro.

Utilizando o campo aberto, verificou-se um aumento na ambulação dos animais que consumiram a polpa do pequi. Embora que no rearing a atividade tenha sido menor quando comparado ao controle, ela foi maior quando comparada aos animais tratados com a amêndoa. Pesquisa utilizando ratos adultos exercitados investigando os efeitos do consumo de uma dieta fonte de CLA, não observou aumento do rearing nos animais sedentários, apenas nos exercitados (Barbosa et al, 2018). Estudo similar investigando os efeitos do ácido linoleico conjugado na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação, verificou um aumento no rearing da prole, sem afetar a ambulação (Queiroz et al., 2019). Sendo assim, a polpa de Pequi induziu um comportamento tipo ansiolítico na prole da ratas, quando avaliado este parâmetro. O trabalho de Queiroz et al., (2019) reforça os efeitos do consumo materno de dietas fontes de lipídeos insaturados, como os lipídeos achados na polpa de Pequi e como este nutriente pode alterar o funcionamento cerebral da prole.

Analisando a atividade locomotora e a taxa de exploração dos animais no centro do campo aberto, o que caracteriza uma maior atividade exploratória, os animais cujas mães receberam a polpa do pequi apresentaram maior locomoção e maior afinidade ao centro do aparato quando comparado aos demais grupos. Longhi et al.(2018) em seu estudo investigando os efeitos de dietas contendo ácidos graxos trans, observaram redução na atividade locomotora e maior aversão ao centro do aparato caracterizando um efeito ansiogênico. A gordura fonte de ácidos graxos trans compromete o funcionamento do sistema nervoso quando ofertado na fase inicial da vida (BORBA et al., 2010), como confirmado no experimento de Longhi et al., (2018). No presente

estudo, a polpa de Pequi é fonte de ácidos graxos essenciais, o que favorece a adequada estruturação dos neurônios e conseqüentemente o funcionamento cerebral (CHEN; SU, 2013).

Analisando os dados coletados utilizando o labirinto em cruz elevada (PELLOW; FILE, 1985), no presente estudo observou-se que os animais dos grupos experimentais entraram mais vezes nos braços abertos do aparato, não havendo diferença entre eles, quando avaliado a taxa de permanência nos braços abertos. Mas quanto à permanência na área central do aparato os animais do grupo polpa de pequi permaneceram por mais tempo. Queiroz, (2019) em seu estudo observou que os animais cujas mães receberam a dieta com CLA apresentou uma maior entrada e tempo de permanência nos braços aberto do labirinto em cruz elevada, e um maior tempo em sua área central, mostrando um efeito ansiolítico induzido pelo consumo materno desses ácidos graxos. Soares et al., (2013), identificou a o lipídio presente no leite de cabra proporcionou um efeito ansiolítico em filhotes de ratas suplementadas durante a gestação e lactação. Pudell et al., (2014) em seu estudo utilizou ratos tratado com óleo de peixe e observaram diminuição no comportamento de ansiedade. Esses achados confirmam que uma dieta materna deficiente de ácidos graxos essenciais no período de formação e desenvolvimento neuronal desencadeia um excessivo comportamento de ansiedade na idade adulta (CHEN; SU, 2013) por outro lado quando consumido em quantidade necessária promove um comportamento tipo ansiolítico.

Os ácidos graxos, como os encontrados no Pequi, podem se ligar a um receptor que esta associado aos canais de cloreto no cérebro, o ácido gama-aminobutírico-A (GABAA) que atuam controlando o comportamento ansiolítico (RODRÍGUEZ-LANDA et al., 2013; CONTRERAS et al., 2014).

Os animais do grupo polpa na caixa claro e escuro do presente estudo, apresentaram maiores numero de entradas e permanência no compartimento claro. Queiroz, (2019) observaram nos filhotes cujas mães foram tratadas com CLA um maior numero de entradas dos animais na parte clara, porém não houve maior permanência. O teste utilizando caixa claro / escuro se baseia na aversão inata que os roedores possuem por áreas iluminadas e no seu comportamento exploratório espontâneo em resposta a estressores leves (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). O consumo de dieta hiperlipídica possui efeito neurotóxico, tendo como resultado o desenvolvimento de transtornos comportamentais como a ansiedade na fase adulta (SASSAKI, 2013). Contudo, uma dieta contendo ácidos graxos essenciais promove efeito contrario, protegendo o tecido

cerebral durante a sua formação e manutenção, evitando e/ou diminuindo a ansiedade (MALLICK; BASAK; DUTTARROY, 2019).

Estudos afirmam que níveis elevados de ansiedade estão diretamente relacionados com o aumento do estresse oxidativo no cérebro (GUNEY ET AL., 2014; YAN ET AL., 2016; ERCAN ET AL., 2017). O estresse oxidativo nada mais é do que o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes provocando danos celulares, esse desequilíbrio pode gerar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e outras substâncias oxidáveis (BROINIZI et al, 2008). A peroxidação lipídica é a consequência do estresse oxidativo mais comumente estudada, pois essa promove uma reação em cadeia nos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, alterando a sua integridade, fluidez e permeabilidade (STAHL, 2001). O cérebro é altamente susceptível a oxidação causada pelos radicais livres, por possuir baixa capacidade antioxidante e um alto consumo de oxigênio (BROINIZI et al, 2008). Os ácidos graxos e os compostos antioxidantes possuem efeito protetor, promovendo a redução da peroxidação lipídica (BASIRICÒ et al., 2015; BASIRICÒ et al., 2017). Essa ação protetora pode evitar danos cerebrais e prevenir transtornos neurológicos, como de ansiedade (STEENKAMP et al, 2017).

O malonaldeído é produto das principais reações em cadeia relacionadas com a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Estudos demonstram que o malonaldeído possui ação citotóxica e genotóxica sendo encontrado em níveis elevados em patologias associadas ao estresse oxidativo (ANDRADE et al, 2005). No presente estudo observamos que o consumo da polpa do pequi, diminuiu os níveis de MDA no cérebro dos animais, demonstrando assim um efeito antioxidante desta parte do fruto.

Estudos realizados com diferentes fontes de ácidos graxos poli-insaturados relatam efeito protetor contra a peroxidação lipídica assim como o resultado encontrado com o pequi. Como mostra o trabalho de Campos et al (2011), que testou diferentes concentrações de ômega 3 em camundongos e redução nos níveis de malonaldeído no tecido cerebral (MDA) nos grupos tratados. No estudo de Novelli (2006) foi verificado que uma dieta pobre em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), mas rica em carboidrato induz diminuição nos teores de antioxidantes totais no soro de animais. Por outro lado, dieta fonte de CLA ofertada durante a fase inicial da vida induziu redução do MDA no tecido cerebral da prole, como o encontrado na presente pesquisa. Murphy e Mercer (2013) relatam que alimentos ricos em açúcares, podem induzir um comportamento tipo

ansio gênico, assim como encontrado por Novelli (2006). Por outro lado, dietas fontes de ácidos graxos insaturados como a utilizada por Queiroz et al., (2018) podem provocar uma redução na peroxidação lipídica com consequente redução da ansiedade.

Estes achados acontecem porque o estresse altera a composição e o funcionamento das membranas celulares cerebrais, levando a uma redução da arborização dendríticas nas regiões do giro do cíngulo, hipocampo, região da amígdala e córtex pré-frontal que predispõem a comportamentos de ansiedade e depressão (LUPIEM et al, 2009). Sendo assim, os efeitos na redução do MDA com consequente redução da ansiedade encontrada no grupo tratado com a polpa de pequi se justifica pela polpa de pequi ser rica em ácidos graxos insaturados, carotenóides, compostos fenólicos e flavonoides, o que elevada significativamente à capacidade antioxidante da mesma (KUSKOSKI et al., 2005). Essa mesma atividade antioxidante não foi encontrada na amêndoa, porém o consumo da amêndoa não foi capaz de induzir aumento da peroxidação lipídica com consequente comportamento ansio gênico, o que é um fator positivo para o consumo desta parte do Pequi.

6 CONCLUSÃO

Com base no exposto, a polpa do pequi (*Caryocar brasiliense*) em relação a amêndoa proporcionou uma redução da peroxidação lipídica no tecido cerebral e induziu comportamento ansiolítico na pele de ratos quando tratados durante a fase inicial da vida.

REFERÊNCIAS

AUST, O.; SIES, H.; STAHL, W.; POLIDORI, M.C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J. Chromatogr.*,v.936, n.1, p.83-93, 2001.

Basiricò, L., Morera, P., Dipasquale, D., Tröscher, A., Bernabucci, U., 2017. Comparison between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 100, 2299–2309.

Basiricò, L., Morera, P., Dipasquale, D., Troscher, A., Serra, A., Mele, M., Bernabucci, U., 2015. Conjugated linoleic acid isomers strongly improve the redox status of bovine mammary epithelial cells (BME-UV1). *J. Dairy Sci.* 98, 7071–7082.

BROINIZI; E. R. S. ANDRADE-WARTHA; A. M. O. E SILVA; R. P. TORRES; H. M. C. AZEREDO; R. E. ALVES; J. MANCINI-FILHO. Propriedades antioxidantes em

subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 44, n. 4, out./dez., 2008

BRONZINO, J.; KISSANE J. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosc. Behav. Rev.*, v. 17, p. 91-128, 1993.

CHEN, H.F.; SU, H.M. Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic–pituitary–adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (2013) 70–80.

CONTRERAS, C. M.; RODRÍGUEZ-LANDA, J. F.; GARCÍA-RÍOS, R. I.; CUETOESCOBEDO, J.; GUILLEN-RUIZ, G.; BERNAL-MORALES, B. Myristic acid produces anxiolytic-like effects in Wistar rats in the elevated plus maze. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.

Ercan, A.C., Bahceci, B., Polat, S., Cenker, O.C., Bahceci, I., Koroglu, A., Sahin, K., Hocaoglu, C., 2017. Oxidative status and prolidase activities in generalized anxiety disorder. *Asian J. Psychiatr.* 25, 118–122.

Felipe Alconchel-Gago , Abel Santamaría , Isaac Túnez. Antioxidant effect of oleic acid and hydroxytyrosol in an experimental model similar to Huntington’s disease. *Actual. Med.* 2014; 99: (792): 60-64. DOI: 10.15568/am.2014.792.or01

Guney, E., Ceylan, M.F., Tektas, A., Alisik, M., Ergin, M., Goker, Z., Dinc, G.S., Ozturk, O., Korkmaz, A., Eker, S., Kizilgun, M., Erel, O., 2014. Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders. *J. Affect. Disord.* 156, 62–66.

MALLICK, R.; BASAK, S.; DUTTARROY, A. K.. **Ácido docosaehaenóico, 22: 6n-3: seus papéis na estrutura e função do cérebro.** *Jornal Internacional de Neurociência do Desenvolvimento*. Volume 79 , dezembro de 2019 , páginas 21-31.

MORGANE P.J; MILLER, M.; KEMPLER, T.; STERN, W.; FORBES W.; HAL R.; AUSTIN-LAFRANCE, R. J.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZCINTRA, S.; CINTRA, L et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 17, p.91–128, 1993.

PUDELL CLAUDIA, et al. **Fish oil improves anxiety-, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomized rats.** *Eur J. Neurosci.* Jan 2014; 39 (2): 266-74. doi: 10.1111/ejn.12406.

RODRÍGUEZ-LANDA, J. F.; GARCÍA-RÍOS, R. I.; CUETO-ESCOBEDO, J.; BERNAL-MORALES, B.; CONTRERAS, C. M. Participation of Chloride Channels in the Anxiolytic-Like Effects of a Fatty Acid Mixture. *BioMed research international*, v. 2013, 2013.

SASAKI, A.; VEGA, W.C.; ST-CYR, P. S.; MCGOWAN, P. P.O. **Dieta rica em gordura perinatal altera sinalização glicocorticóide e comportamento de ansiedade na idade adulta.** Neuroscience v.240. p. 1-12. 2013.

YAN, B., GUO, J., LIU, X., LI, J., YANG, X., MA, P., WU, Y., 2016. Oxidative stress mediates dibutyl phthalate-induced anxiety-like behavior in Kunming mice. Environ. Toxicol. Pharmacol. 45, 45–51

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CSTR



DECLARAÇÃO

Declaro a quem possa interessar que o **Sr. Danilo José Ayres de Menezes** deu entrada em processo para apreciação de projeto de pesquisa, por via eletrônica, visando parecer consubstanciado, junto a CEUA/CSTR/UFCG. O projeto **“ANÁLISE DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO, POLPA E AMÊNDOA DE PEQUI EM RATAS DA LINHAGEM WISTAR DURANTE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO E EM SUA PROLE SOB OS PARAMETROS BIOQUÍMICOS E DE MEMÓRIA E ANSIEDADE ”** tem número de protocolo ceua/cstr **04/2020**

Patos, 18 de Fevereiro de 2020

Atenciosamente,

Maria Mychelly Silva Dantas

Secretária do CEP

cep@cstr.ufcg.edu.br