

MARÍLIA FERREIRA FRAZÃO TAVARES DE MELO

IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO E
POLPA DE ABACATE (*Persea americana* Mill.) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO FÍSICO, COMPORTAMENTAL E
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS

JOÃO PESSOA – PB

2019

MARÍLIA FERREIRA FRAZÃO TAVARES DE MELO

IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO E
POLPA DE ABACATE (*Persea americana* Mill.) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO FÍSICO, COMPORTAMENTAL E
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências e
Tecnologia dos Alimentos da
Universidade Federal da Paraíba,
para obtenção do título de Doutor em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Orientadora: Juliana Késsia Barbosa Soares

Co-Orientadora: Maria Manuela Estevez Pintado

JOÃO PESSOA – PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M528i Melo, Marília Ferreira Frazão Tavares de.
Impacto da suplementação materna com óleo e polpa de
abacate (*Persea americana* Mill.) sobre o
desenvolvimento físico, comportamental e peroxidação
lipídica em ratos / Marília Ferreira Frazão Tavares de
Melo. - João Pessoa, 2019.
125 f. : il.

Orientação: Juliana Késsia Barbosa Soares Soares.
Coorientação: Maria Manuela Estevez Pintado Pintado.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. abacate; lactante; prole. I. Soares, Juliana Késsia
Barbosa Soares. II. Pintado, Maria Manuela Estevez
Pintado. III. Título.

UFPB/BC

MARÍLIA FERREIRA FRAZÃO TAVARES DE MELO

IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO E POLPA DE ABACATE
(*Persea americana* Mill.) SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO,
COMPORTAMENTAL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS

Tese _____ em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Juliana Késsia Barbosa Soares – PPGCTA/CT/UFPB
Coordenadora da Banca

Profª Drª Jailane de Souza Aquino – PPGCN/CCS/UFPB
Membro Externo



Profª Drª Maria Elieidy Gomes de Oliveira - PPGCTA/CT/UFPB
Membro Interno

Profª Drª Miriam Graciela da Silva Stiebbe – DPSI/CCHLA/UFPB
Membro Externo

Prof Dr. Sócrates Golzio dos Santos – DFPT/CCS/UFPB
Membro Externo

Profª Drª Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo – UAS/CES/UFCG
Membro Externo

À minha família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Meu coração é só gratidão!

À Deus e a minha Mãezinha, que estiveram presentes comigo em cada segundo dessa caminhada, segurando minhas mãos nas dificuldades e sorrindo comigo nos momentos das inúmeras graças recebidas.

Aos meus (Pedro, Manuela e Flávio). Perdão pela ausência, pois em muitos momentos, pouco sobrou de mim pra vocês. Meu agradecimento pelos abraços, que em troca recebi, e pelo amor que me foi incondicionalmente doado. À Leila, nossa secretária que se esforçou em manter toda a rotina doméstica, me tranquilizando para que eu pudesse me dedicar integralmente ao meu trabalho.

À Flávio (♥). Nossas discussões científicas e o seu conhecimento na área neonatal foi essencial para entendimento de pontos importantes do processo de escrita. Você faz parte dessa conquista!

Aos meus pais (Arinaldo e Socorro), meus irmãos (Yara, Elton e Emanuel), meus cunhados, (Gracinha, Genuína e Jefferson), à Gagá (minha segunda mãe), pelo suporte e apoio aos meninos, nos momentos de minha ausência. À Painho, por me ajudar na revisão final da tese.

À família Ferreira e Frazão (são muuuuitos), em especial meus tios e tias, primas e primos queridos, que sempre torceram pelo meu sucesso profissional e se orgulham de mim. Prima Lara, grata pelo apoio e companhia nos meses em que precisei ficar em João Pessoa.

Aos meus sogros Paulo César e Arlete, e a minha cunhada Isabella, pela torcida e carinho.

À minha orientadora e amiga, Juliana Késsia, que esteve presente em TODOS os momentos. Por ter disponibilizado tardes de domingo para correção de meus artigos, nas vezes em que me recebeu em sua casa, nas inúmeras consultas de dúvidas via WhatsApp. Obrigada pela paciência, por me ensinar a ser mais objetiva, por se esforçar para que eu realmente saia do doutorado muito mais preparada para a vida acadêmica. Gratidão!

Às minhas amadas estagiárias, Elisiane e Renally e a Jaciel (bioterista). Vocês foram essenciais para que nosso experimento desse certo. Sem vocês eu não conseguiria fazer tudo sozinha.

À banca de qualificação e defesa, Profas. Jailane, Elieidy e Miriam, e Prof. Sócrates, pelas honrosas contribuições nas correções e sugestões, fundamentais para conclusão deste trabalho. Em especial à Elieidy, minha irmã de alma, pelos lindos textos cheios de luz que me renovavam e por toda ajuda.

À Marcos Macedo, representante da Verdouro, por ter me apresentado aos maiores produtores de abacate Hass no Brasil.

À Ricardo Alberto Lama Oliveira e Felipe Zoppi Lama, da Fazenda Jaguacy Avocado Brasil[®], por terem sido extremamente profissionais no fornecimento do abacate para nosso estudo, na preocupação para obtenção de uma amostra homogênea para a extração do óleo e envio dos frutos para a liofilização.

À Henrique Cesar Terroni, da Terroni Liofilizadores[®], pelo cuidado que teve com nossas amostras em todos os processos que envolveram as etapas, antes e pós liofilização.

À Profa Dra. Gerlane Guerra e Profa. Dra. Daline Araújo, pelas orientações durante as análises do conteúdo antioxidantes dos tecidos. Grata a Carol, Michelly e Suedna por terem me ajudado na execução das análises.

Ao Prof Dr. Leonardo Fonseca Pascoal, coordenador do Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar/UFPB e aos técnicos de laboratório, Valquíria e José, por terem me disponibilizado o laboratório para que eu fizesse as análises bioquímicas.

Aos técnicos Fabiano, Ricardo e Sinara, pelo apoio e orientação enquanto estive fazendo análises no Laboratório de Físico Química do Campus III/UFPB.

Ao Prof. Dr. Sócrates Gólzio, do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise/UFPB, por ter colaborado conosco nas análises dos ácidos graxos. À Celina e a Gabriel, pela valiosa ajuda na preparação das amostras.

À Profa. Dra. Vanessa Bordin, pelas análises do conteúdo de antioxidantes do óleo e da polpa de abacate e a Elisiane por ter nos ajudado.

À Maciel e a Diego, pela valiosa ajuda nas análises dos vídeos de comportamento.

Aos queridos contemporâneos de pesquisa, no LANEX e CES: Ritinha, Diego, Carol, Ana Cristina, Juliete. Obrigada por compartilhar comigo as experiências vividas durante o ano de 2017 e por serem tão companheiros sempre que precisei.

À Carol, Jaielison Yandro e Elisiane pela valiosa colaboração nas patentes.

Aos queridos amigos da vida e de profissão (Thereza Karla, Karis, Melly, Janaína, Carol, Mayara, Heloísa, Camila, Flavinha, Raphaela, Jefferson e Maria Emília), por todo apoio, torcida e incentivo. Mayarinha, obrigada pela criteriosa revisão do artigo.

Às minhas vizinhas queridas, Belísia e Flaviane, pela amizade e torcida.

À direção do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Professor Dr. José Justino Filho e aos funcionários da prefeitura universitária pelo apoio irrestrito na manutenção do nosso biotério.

À todos da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFPB. Obrigada ao coordenador Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato e aos docentes com os quais tive o prazer de estudar.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFPB, Lindalva Regina e em especial a Fernanda, obrigada pela disponibilidade de sempre.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio através do financiamento código 001.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa, meu muito obrigada.

RESUMO

A nutrição exerce influência na manutenção de uma gestação saudável, transportando nutrientes essenciais para o desenvolvimento fetal e pós-natal e, a longo prazo, tem implicações no comportamento da prole e no risco de futuras doenças metabólicas. Abacate (*Persea americana* Mill.) é uma fonte oleaginosa de ácidos graxos com altos níveis de fitocomplexos que apresenta vários efeitos metabólicos e função de neuroproteção. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação materna com óleo e polpa de abacate durante a gestação e lactação sobre o desenvolvimento físico e comportamental da prole e parâmetros bioquímicos e peroxidação lipídica hepática nas mães. As mães foram divididas de forma randomizada em três grupos (n = 8 mães/grupo), de acordo com a suplementação por gavagem, durante a gestação e lactação: Controle (GC) – água destilada; Óleo de Abacate (OA) – 3000 mg de óleo de abacate/kg de peso do animal e Polpa de Abacate (PA) – 3000 mg de polpa de abacate/kg de peso do animal. Ao nascimento, a prole (n = 15 filhotes/grupo) foi padronizada em ninhadas de 6 (seis) filhotes machos e após o desmame receberam *ad libitum* a mesma ração padrão ofertada para as mães. Ao final da lactação foram analisadas nas mães, o consumo alimentar, peso corporal, comprimento, índice de massa corporal, circunferência abdominal e torácica, peso dos órgãos e do tecido adiposo, percentual lipídico do fígado e do leite materno, perfil bioquímico (Glicemia, Colesterol total, TGC, HDL, LDL, ALT, AST) e o MDA hepático. Na prole, análise do desenvolvimento somático e ontogenia reflexa pós-natal (T0 a T21), Teste de Habituação no Campo Aberto e Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) foram avaliados nas fases adolescente (T45) e adulta (T90). O conteúdo de ácidos graxos cerebral em T0, T21, T45 e T90 foi avaliado. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. As lactantes OA e PA apresentaram redução do consumo alimentar sem alteração no peso corporal, nos parâmetros murinométricos e no peso dos órgãos ($p > 0,05$). A gordura retroperitoneal diminuiu no grupo de mães OA e PA em comparação a GC, porém, PA apresentou redução em relação a OA ($p < 0,05$). A suplementação de polpa o óleo promoveram uma redução na glicemia, TGC, LDL, AST e ALT ($p < 0,05$). O HDL aumentou e o índice aterogênico (IA) reduziu, nas lactantes OA e PA ($p < 0,05$). Houve redução do MDA hepático (OA e PA) ($p < 0,05$). Na prole foi constatada aceleração da maturação reflexa e da ontogenia reflexa em OA e PA, especialmente no grupo polpa ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram diminuição do parâmetro de ambulação na segunda exposição ao campo aberto, em T45 e T90 ($p < 0,05$). No TRO, OA e PA apresentaram melhora da memória em curto e longo prazo, nas fases adulta e adolescente ($p < 0,05$). O resultado do perfil de ácidos graxos do cérebro apresentou maior conteúdo de AGPI nos grupos AO e PA em T21, T45 e T90. Nas mães, a suplementação com abacate maximizou os ajustes lipídicos da lactação, com resultados positivos para a manutenção da saúde. Na prole, a suplementação materna com óleo e polpa de abacate antecipou a maturação reflexa e o desenvolvimento somático pós natal e melhorou a memória nas fases adolescente e adulta. Assim, recomenda-se a ingestão dietética dessa fonte lipídica durante a gestação e a lactação.

Palavras-chave: abacate; ácidos graxos; lactante; índice aterogênico; prole; neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

Nutrition exerts influence in the maintenance of a healthy pregnancy, transporting of essential nutrients to the fetal and postnatal development and in long term, has implications in the behaviour of the offspring and risk of future metabolic diseases. Avocado (*Persea americana* Mill.) is an oleaginous fruit source of fatty acids with high phyto-complex concentrations that exhibit various metabolic effects and neuroprotection functions. The objective of this work was to evaluate the effects of maternal supplementation with avocado oil and pulp (during gestation and lactation) on the physical and behavioral development of offspring and biochemical parameters, and hepatic lipid peroxidation in dams. The dams were randomly divided into three groups (n = 8 dams/group), according to gavage supplementation during gestation and lactation: Control (GC) - distilled water; Avocado oil (AO) - 3000 mg avocado oil/kg animal weight, and Avocado pulp (AP) - 3000 mg avocado pulp/kg animal weight. At birth, the offspring (n = 15 pups/group) were standardized in litters of 6 (six) male offspring and after weaning received *ad libitum* the same standard feed offered to the dams. At the end of lactation, were analyzed in dams, food intake, body weight, length, body mass index, abdominal and thoracic circumference, organ and adipose tissue weight, lipid percentage of the liver and breast milk, the biochemical profile (Glycemia, Total cholesterol, TGC, HDL, LDL, ALT, AST) and hepatic MDA. In the offspring, analysis of somatic development, and postnatal reflex ontogeny (T0 to T21), and Open Field Habituation Tests, with Object Recognition Testing (ORT) were performed for the adolescent (T45) and adult (T90) phases. The content of brain fatty acids at T0, T21, T45 and T90 was also evaluated. The results were analyzed and were considered significant at $p < 0.05$. AO and AP dams presented reductions in food intake with no change in murine parameters, body weight, or organ weight ($p < 0.05$). Retroperitoneal fat decreased in the AO and AP dams group in comparison to the CG group, but the AP had a reduction in relation to the AO ($p < 0.05$). Pulp or oil supplementation promoted a reduction in glycemia, TGC, LDL, AST and ALT ($p < 0.05$). HDL increased and the atherogenic index (AI) decreased in the AO and AP dams ($p < 0.05$). There was a reduction in hepatic MDA (AO and AP) ($p < 0.05$). In the offspring, acceleration of reflex maturation and reflex ontogeny was observed in AO and AP, especially in the pulp group ($p < 0.05$). All groups presented a decrease in the ambulation parameter in the second exposure to the open field, in T45 and T90 ($p < 0.05$). In the ORT, AO and AP showed improvement in short and long term memory, in both the adult and adolescent phases ($p < 0.05$). The result of the brain fatty acid profile presented higher PUFA content in the AO and AP groups at T21, T45 and T90. In dams, supplementation with avocado maximized lipidic lactation adjustments, with positive results for maintaining health. In the offspring, maternal supplementation with oil or avocado pulp anticipated reflex maturation, somatic postnatal development and improved memory in the adolescent and adult phases. Thus, the dietary intake of this lipid source during gestation and lactation is recommended.

Key-words: avocado; fatty acids; lactating dams; atherogenic index; offspring; neurodevelopment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Crescimento cerebral nos primeiros 1.000 dias de vida.....	23
Figura 2	Comparação da curva de velocidade dos processos de desenvolvimento no cérebro humano e do roedor.....	24
Figura 3	Desenho experimental da obtenção e análise da matéria prima.....	35
Figura 4	Escala fotográfica numérica de maturação do abacate Hass.....	37
Figura 5	Esquema ilustrativo do processo de extração do óleo de Abacate.....	37
Figura 6	Etapas do processo de liofilização do acabate Hass.....	38
Figura 7	Descrição dos grupos e protocolo experimental das mães e prole.....	43
Figura 8	Ilustração do Campo Aberto utilizados para avaliar a ambulação do animal..	48
Figura 9	Desenho experimental adaptado do Teste de Reconhecimento de Objetos..	49
ARTIGO I		
Figure 1	Experimental protocol.....	80
Figure 2	Body weight during pregnancy and lactation.....	84
Figure 3	Weekly consumption during pregnancy and lactation.....	85
Figure 4	Biochemical parameters of dams treated with avocado oil or pulp during pregnancy and lactation.....	88
Figure 5	MDA levels in the liver of dams treated with avocado oil or pulp during pregnancy and lactation.....	89
ARTIGO II		
Figure 1	Experimental protocol.....	104
Figure 2	Experimental design adapted from the object recognition test.....	106
Figure 3	Mean body weight in grams of neonatal rats.....	109
Figure 4	Tail lengths of the offspring of mothers.....	109
Figure 5	Influence of maternal supplementation with avocado oil and pulp on total offspring ambulation.....	110
Figure 6	Adolescent offspring; short and long term memory test.....	111
Figure 7	Exploration of test objects (short and long-term memory) in adult offspring.....	112

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1	Centesimal composition of the lyophilized avocado pulp (<i>Persea americana</i> Mill.) (Hass variety)	81
Table 2	Birth rates of dams supplemented with oil or avocado pulp during gestation and lactation	85
Table 3	Murinometric Parameters, organ and adipose tissue weight of lactating dams treated with avocado oil or pulp	86
Table 4	Lipid percentage for livers and breast milk of dams treated with avocado oil or pulp during gestation and lactation	87

ARTIGO II

Table 1	Fatty acid composition of avocado oil and lyophilized pulp (<i>Persea americana</i> Mill.): hass variety.....	103
Table 2	Description of the reflex test.....	105
Table 3	Composition of fatty acids present in the brain puppies (T0 and T21) of dams supplemented with oil and avocado pulp.....	107
Table 4	Composition of fatty acids present in the brain offspring (T45 and T90) of dams supplemented with oil and avocado pulp.....	108
Table 5	Reflex maturation in offspring of mothers supplemented with avocado oil and pulp during gestation and lactation.....	109
Table 6	Somatic development in offspring of mothers supplemented with avocado oil and pulp during gestation and lactation.....	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Composição nutricional do abacate (<i>Persea americana</i> Mill)	32
Quadro 2	Composição de ácidos graxos do abacate (<i>Persea americana</i> Mill)	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Abertura do Conduto Auditivo
AG	Ácidos graxos
AGE	Ácidos graxos essenciais
AGPI	Ácido graxo polinsaturado
ALA	Ácido graxo linolênico
AOL	Abertura dos Olhos
AP	Aversão ao Precipício
APA	Abertura do Pavilhão Auricular
APE	Aparecimento dos Pelos Epidérmicos
ARA	Ácido araquidônico
BNDF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
GC	Grupo controle
CA	Circunferência abdominal
CC	Comprimento da cauda
CCQA	Laboratório de Química do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos
CES	Centro de Educação e Saúde
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CFT	Compostos fenólicos totais
CLA	Ácido linoleico conjugado
CPV	Colocação Espacial Desencadeada Pelas Vibrissas
CSTR	Centro de Saúde e Tecnologia Rural
CT	Circunferência torácica
DHA	Ácido docosahexaenóico
EII	Erupção dos dentes incisivos inferiores
EIS	Erupção dos dentes incisivos superiores
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EQ	Equivalentes de catequina
FAO	Food and Agriculture Organization
FRAP	Atividade redutora férrica
GAE	Equivalentes de ácido gálico

GN	Geotaxia negativa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de massa corporal
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LA	Ácido graxo linoleico
LABROM	Laboratório de Bromatologia
LANEX	Laboratório de Nutrição Experimental
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
MDA	Malonaldeído
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
OA	Óleo de abacate
OF	Objeto familiar
ON	Objeto novo
TN	Tempo de exploração do objeto novo
TF	Tempo de exploração do objeto familiar
PA	Polpa de abacate
PP	Prensão palmar
PS	Peso seco
RDQL	Recuperação do decúbito em queda livre
RPD	Recuperação postural de decúbito
RS	Resposta ao susto
SAT	Ácido graxo saturado
T0	Primeiro dia de vida da prole
T21	21 dias de vida da prole
T45	45 dias de vida da prole
T90	90 dias de vida da prole
TGC	Triglicerídeos
TRO	Teste de Reconhecimento de Objetos
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 METABOLISMO MATERNO: IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....	20
2.2 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL NO PERÍODO PERINATAL E PÓS NATAL.....	22
2.3 MATURAÇÃO REFLEXA E SOMÁTICA DA PROLE.....	27
2.4 MEMÓRIA E APRENDIZAGEM DA PROLE.....	29
2.5 ABACATE.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.2 AMOSTRAS.....	36
3.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA POLPA E IDENTIFICAÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS DA POLPA E DO ÓLEO DE ABACATE.....	38
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO ÓLEO E POLPA DE ABACATE	39
3.4.1 Obtenção do Extrato.....	39
3.4.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais.....	39
3.4.3 Determinação do total de flavonoides.....	40
3.4.4 Determinação de Carotenóides Totais.....	41
3.4.5 Atividade Antioxidante – Método FRAP.....	41
3.4.6 Atividade Antioxidante – Método ABTS+.....	41
3.5 ENSAIO BIOLÓGICO.....	42
3.5.1 Animais e Dietas Experimentais.....	42
3.6 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E CONSUMO DE RAÇÃO.....	44
3.7 ONTOGENIA REFLEXA E MATURAÇÃO SOMÁTICA DOS NEONATOS.....	44
3.7.1 Ontogenia Reflexa.....	44
3.7.2 Indicadores de Maturação Somática.....	46

3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	47
3.8.1 Avaliação da memória usando o Teste de Habituação ao Campo Aberto.....	47
3.8.2 Avaliação da memória usando Teste de Reconhecimento de Objetos.....	48
3.9 AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA.....	49
3.10 EUTANÁSIA, PESO E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS.....	50
3.11 ANÁLISE DO CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS TECIDUAIS E DO LEITE MATERNO.....	50
3.11.1 Tero de Gordura.....	51
3.11.2 Transesterificação de ácidos graxos.....	51
3.11.3 Análise em cromatografia gasosa.....	52
3.12 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	52
3.13 MARCADOR DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA HEPÁTICA.....	53
3.13.1 Malonaldeído (MDA).....	53
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
REFERÊNCIAS.....	55
4 RESULTADOS.....	74
ARTIGO I: Biochemical profiles and hepatic lipid peroxidation of lactating rats supplemented with avocado.....	75
ARTIGO II: Maternal Supplementation with avocado (Persea americana Mill.) Pulp and Oil Alters Reflex Maturation, Physical Development, and Offspring Memory in Rats.....	100
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
APÊNDICES.....	118
ANEXOS.....	120

1 INTRODUÇÃO

A nutrição materna exerce influência na concepção, na manutenção da gravidez saudável, na biodisponibilidade de nutrientes necessários ao desenvolvimento fetal (MENNINTTI, 2015; BURTON, 2016), no suporte para a produção láctea (McNAMARRA; HUBER, 2018), no crescimento, desenvolvimento e comportamento da prole (SANCHEZ et al., 2012; SOARES et al., 2013; MELO et al., 2017; MENNITTI et al., 2018) e na diminuição do risco de doença metabólica materna (PERRINE et al., 2016; CHAVAN-GAUTAM et al., 2018; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; CASTRO-RODRIGUEZ; ZAMBRANO, 2018).

No período perinatal ocorre um aumento na demanda energética e de nutrientes para suprir o desenvolvimento fetal, para a produção láctea e para os ajustes metabólicos maternos (MALEK; MAKRIDES, 2015; KOMINIAREK; RAJAN, 2016). O início da gestação é marcado pela fase anabólica onde aumento do consumo lipídico dietético irá suprir as demandas metabólicas para que ocorra o armazenamento de gordura no tecido adiposo materno (CETIN; LAORETI et al., 2015). No último trimestre gestacional o tecido adiposo acumulado será disponibilizado e os estoques serão transferidos através da placenta. Esta fase catabólica é importante para satisfazer as necessidades de ácidos graxos fetais (CHAVAN-GAUTAM; RANI; FREEMAN, 2018). Na lactação, os ácidos graxos continuam sendo disponibilizados através do leite materno e a reserva de gordura corporal aliada à ingestão materna de fontes lipídicas irá interferir diretamente na composição láctea produzida durante esta fase (LAURITZEN; CARLSON, 2011; BRONNER; AUERBACH, 2005; INNIS, 2014).

Fontes lipídicas na dieta materna causam alterações importantes no perfil de ácidos graxos plasmático, hepático, tecido adiposo e leite materno das mães (FERNANDES et al., 2012; LÓPEZ-SOLDADO; ORTEGA-SENOVILLA; HERRERA, 2017). Na prole, os lipídios atuam na formação dos tecidos, na determinação do crescimento físico e neurodesenvolvimento fetal adequado (GEORGIEFF, 2007; MENNINTTI et al., 2015).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são essenciais (AGE) e durante a fase perinatal estão intrinsecamente ligados com o processo de gênese e maturação do cérebro que vai desde o período intrauterino e prossegue até os primeiros anos de vida. Nesta fase, a síntese de AGPI é intensa e os fosfolipídios são necessários para a proliferação das membranas celulares e mielinização (LAURITZEN et al., 2001). Por não serem sintetizados endogenamente necessitam ser ingeridos para um suprimento materno e fetal adequado (MORGANE, 1993; VELASCO, 2009). Estes ácidos graxos exercem influência no desenvolvimento cerebral pois

participam diretamente da neurogênese, migração neural, apoptoses, sinapses e mielinização, conferindo ao cérebro a forma característica e função (INNIS, 2014). A dieta materna rica em fontes lipídicas insaturadas está relacionada com a aceleração no desenvolvimento reflexo (SANTILLÁN et al., 2010; SOARES et al., 2014) e mudanças no comportamento (FERRAZ et al., 2011; SOARES et al., 2013; MELO et al., 2017) da prole.

Os ácidos graxos saturados (SAT) e os monoinsaturados (MUFA) podem ser sintetizados endogenamente e participam do desenvolvimento estrutural e funcional do sistema nervoso. Durante a gestação eles são transferidos pela placenta, secretados no leite materno no período da lactação e acumulados no cérebro e outros órgãos durante o desenvolvimento fetal (INNIS, 2004; INNIS, 2005). Foi demonstrado que o ácido graxo monoinsaturado oleico é o constituinte principal da mielina (GARBAY et al., 2000; POLO-HERNÁNDEZ et al., 2014) além de apresentar benefícios para a saúde da prole durante as fases fetal e de lactação, estimulando a capacidade termogênica dos lactentes (PRIEGO et al., 2013) e mudanças no metabolismo hepático, impedindo o surgimento da obesidade e esteatose na prole (TORRES et al., 2010). O saturado palmítico também está envolvido nos processos de gliogênese, sinaptogênese e mielinização (GONZÁLEZ; VISENTIN, 2016).

Um desequilíbrio na oferta de ácidos graxos, durante a gestação e lactação, pode resultar no aumento das concentrações lipídicas séricas em um pico maior que o normal para o período e a hipercolesterolemia materna apresentará um risco aumentado para aterosclerose (DUMOLT et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019).

Nesse contexto, o abacate (*Persea americana* Mill.) apresenta alto teor lipídico em sua composição e destaca-se pelo conteúdo do ácido graxo saturado palmítico (C16:0), dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) como oleico (C18:1, ω -9) e o palmitoleico (C16:1, ω -7) e dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) linoleico (C18:2, ω -6) e linolênico (C18:3, ω -3), este último em menor quantidade (TANGO; CARVALHO; LIMONTA, 2004; DREHER; DAVENPORT, 2013; MELO et al., 2019). Além dos lipídios, o abacate contém alto teor de fibras e metabólitos secundários (fitosteróis, compostos fenólicos e carotenóides) com alto poder antioxidante (AMEER, 2016; MELO et al., 2019), que estão associados a diversos efeitos terapêuticos (ADA, 2009; USDA, 2015; DREHER; DAVENPORT, 2013). Estudos experimentais evidenciam efeitos benéficos do abacate, com foco nos seus componentes lipídicos e antioxidantes, na melhora do perfil lipídico e diminuição do índice aterogênico (ORTIZ MORENO et al., 2007; SHEHATA; SOLTAN, 2013), no controle glicêmico (DEL TORO-EQUIHUA et al., 2016) e na melhora da função mitocondrial e diminuição do estresse oxidativo cerebral (ORTIZ-AVILA et al., 2015).

Devido a importância nutricional do abacate, seus benefícios para a saúde e a escassez de estudos na literatura investigando o impacto de seu consumo durante a fase perinatal sobre o metabolismo materno, bem como o crescimento e neurodesenvolvimento da prole, com o presente trabalho objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação materna com óleo e polpa de abacate durante a gestação e lactação sobre parâmetros murinométricos, bioquímicos, gordura corporal e peroxidação lipídica em ratas lactantes. Além disso, avaliou-se na prole das ratas suplementadas, o desenvolvimento reflexo, a maturação somática, o perfil de ácidos graxos no cérebro e memória em diferentes fases da vida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 METABOLISMO MATERNO: IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

A nutrição durante a gestação e lactação está diretamente associada ao crescimento e desenvolvimento fetal e neonatal e à saúde materna (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; CASTRO-RODRÍGUEZ; ZAMBRANO, 2018). Durante a gestação o metabolismo lipídico materno sofre intensas modificações para que ocorra a transferência placentária de nutrientes essenciais para garantir o suprimento fetal (HAGGARTY, 2002). Na lactação, os ácidos graxos continuam sendo disponibilizados através do leite materno e a reserva de gordura corporal aliada à ingestão materna de fontes lipídicas irá interferir diretamente na composição láctea produzida durante esta fase (LAURITZEN; CARLSON, 2011; BRONNER; AUERBACH, 2005; INNIS, 2014).

Na gestação as alterações metabólicas são necessárias para garantir a deposição lipídica nos compartimentos materno e fetal pois os ácidos graxos essenciais (AGE) são extremamente necessários durante a vida intrauterina e desempenham papéis importantes no crescimento e desenvolvimento pré-natal (HERRERA, 2000; HERRERA et al., 2006; CHAVAN-GAUTAM; RANI; FREEMAN, 2018).

O início da gestação até o final do 2º trimestre é marcado por uma fase anabólica onde os lipídios são acumulados nos depósitos de gordura materna (PIPE, 1979; CETIN; LAORETE et al., 2015). Nesse período há um aumento no consumo mediado pelas alterações hormonais próprias da gestação (DOUGLAS; JOHNSTONE; LENG, 2007). Desta forma, gorduras dietéticas são acumuladas nos depósitos maternos e serão essenciais para a aceleração no processo de desenvolvimento fetal que ocorre no final da gestação (CHAVAN-GAUTAM; RANI; FREEMAN, 2018), e para o aumento das demandas metabólicas da lactação (AUGUSTINE; LADYMAN; GRATAN, 2008). Nesta fase há um aumento na sensibilidade à insulina, diminuição da lipólise materna (RAMOS et al., 2003; KINOSHITA; ITOH, 2006) e um aumento do perfil lipídico materno, que desenvolve um perfil aterogênico com aumento nos níveis de colesterol total, colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TGC), que aumenta de maneira exponencial (DARMADY, 1982; LIPPI et al., 2007). O aumento dos TGC é útil para que ocorra a transferência dos ácidos graxos para o feto, pela placenta (HERRERA, 2000).

O final da gestação (3º trimestre) é marcado por uma intensa lipólise, que caracteriza o estado catabólico da fase (HERRERA et al., 2006). Este período é apoiado pela resistência à insulina (DAHLGREN, 2006; SONAGRA et al., 2014) condição que também causa o desenvolvimento de hiperlipidemia materna, desempenhando papel chave na disponibilidade de AGE para o feto (HERRERA et al., 2006). A demanda pelos ácidos graxos acumulados no tecido adiposo materno no início da gestação é correspondida e eles são transportados para o feto para dar suporte ao crescimento físico e cerebral (GEORGIEFF, 2007; MENNINTTI et al., 2015).

Na lactação, os ácidos graxos continuam sendo disponibilizados através do leite materno e a reserva de gordura corporal aliada à ingestão materna de fontes lipídicas irá interferir diretamente na composição láctea produzida durante esta fase (LAURITZEN; CARLSON, 2011; BRONNER; AUERBACH, 2005; INNIS, 2014). Nesta fase há um aumento na excreção fisiológica dos TGC e colesterol total (PERRINE et al., 2016). A redução dos TGC ocorre a partir do catabolismo de lipoproteínas de baixa densidade e da geração de componentes da lipoproteína de alta densidade (HDL) (SMITH et al., 1998; QURESHI et al., 1999). O colesterol é transferido para o leite materno, o que reduz suas concentrações séricas, embora as concentrações lipídicas possam retornar aos seus níveis normais após o final da lactação (KALLIO, 1992).

Nesta fase ocorre uma redefinição fisiológica das alterações metabólicas anormais que ocorreram na gestação (PERRINE et al., 2016) e uma má nutrição materna pode resultar no aumento das concentrações lipídicas em um pico maior que o normal para o período, pois a hipercolesterolemia materna apresenta risco aumentado para aterosclerose (DUMOLT et al., 2018).

Estudos experimentais têm investigado a influência do consumo dietético materno (gestação e lactação) de fontes lipídicas e alterações no perfil bioquímico das mães, ao desmame: Cavalcante et al. (2013) mostraram que a administração dieta hiperlipídica ocidentalizada (margarina, creme de leite, banha e óleo de soja) aumentou a glicemia de jejum; o consumo de gordura trans (óleo parcialmente hidrogenado e gordura de leite bovino enriquecido com trans) provocou aumento no colesterol total (GATES et al., 2017); e os triglicerídeos plasmáticos foram aumentados após o consumo de dietas hiperlipídicas rica em banha (NAKASHIMA, 2008) e de dietas hiperlipídicas contendo banha (SÁNCHEZ-BLANCO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2019).

Por outro lado, o consumo materno de específicas fontes lipídicas, testadas experimentalmente, mostraram seu efeito na redução do risco de doenças cardiovasculares. O

consumo de uma dieta hiperlipídica suplementada com óleo de peixe, rico em gorduras mono e poliinsaturadas (fonte de ômega 3) provocou uma diminuição da glicemia de jejum em lactantes suplementadas durante a gestação e lactação (ALBERT et al., 2017). Ratas que receberam dieta contendo uma mistura dos óleos de agrião (rico em linolênico) e girassol (rico em oleico e linoleico) durante a gestação e lactação, apresentaram ao desmame, diminuição do colesterol total e a fração LDL e as mães que receberam apenas óleo de agrião, apresentaram aumento no HDL quando comparadas às mães que receberam apenas óleo de girassol (REDDY; NAIDU, 2015).

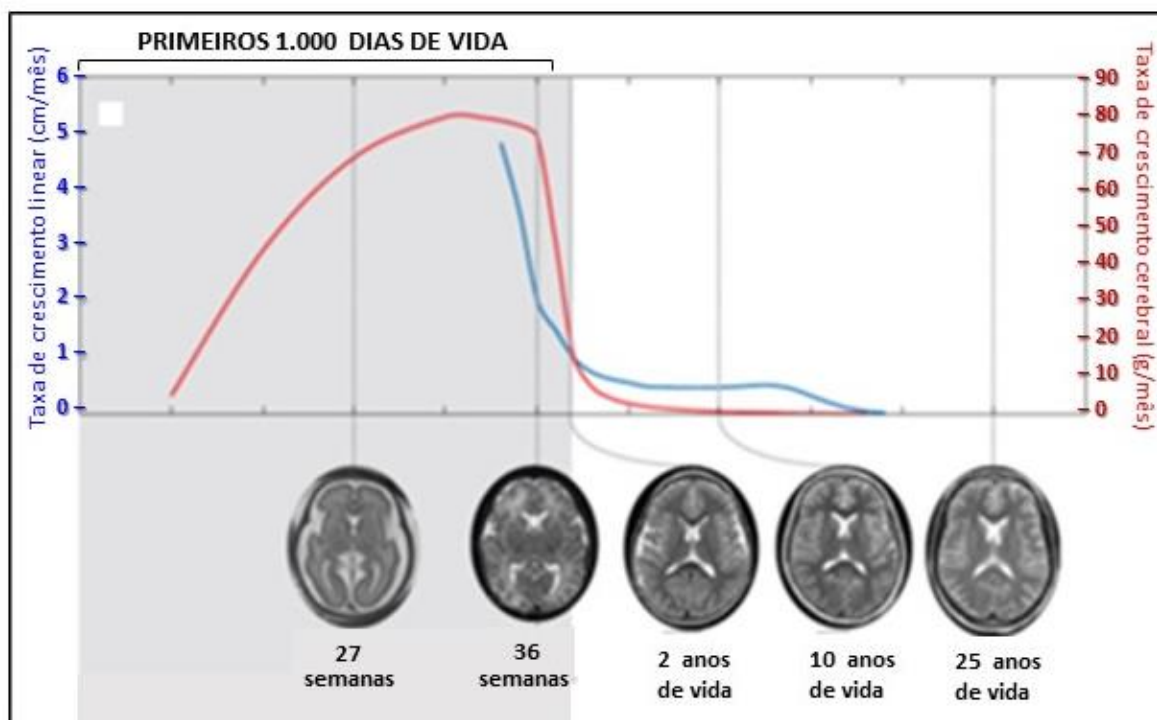
Além dos lipídios, compostos antioxidantes como os fitosteróis foram testados na dieta materna. O estudo utilizou um modelo de camundongos deficiente em Apolipoproteína E, hipercolesterolêmico, que consumiram durante a gestação e a lactação, dietas ricas em colesterol e dieta rica em colesterol suplementada com fitosteróis. As mães suplementadas com fitosteróis apresentaram diminuição do colesterol total, da fração LDL e não houve alteração nos níveis de HDL e TGC (RIDEOUT et al., 2015).

Neste sentido, dentre alimentos fontes de lipídios, o abacate contém denso valor lipídico e as investigações experimentais se concentram apenas em ratos adultos, todavia estudos com gestantes e lactantes são inexistentes. Resultados experimentais na fase adulta evidenciam os efeitos benéficos do abacate, com foco nos seus componentes lipídicos e antioxidantes, na melhora do perfil lipídico, diminuição do índice aterogênico (ORTIZ MORENO et al., 2007; SHEHATA; SOLTAN, 2013), e no controle glicêmico (DEL TORO-EQUIHUA et al., 2016).

2.2 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL NO PERÍODO PERINATAL E PÓS NATAL

Pesquisas em nutrição tem investido no grupo materno infantil com foco nos 1.000 dias de vida, período que vai da concepção até os 2 anos de idade, fundamental para um desenvolvimento saudável (BLACK et al., 2017). Durante os primeiros 1.000 dias, a taxa de crescimento cerebral é muito alta (linha vermelha), iniciando na concepção, caindo lentamente no início da fase pós-natal e cessando aproximadamente por volta dos 2 anos de idade onde nessa fase o cérebro já se assemelha ao de adulto (GOYAL; IANNOTTI; RAICHLE, 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento cerebral nos primeiros 1.000 dias de vida.

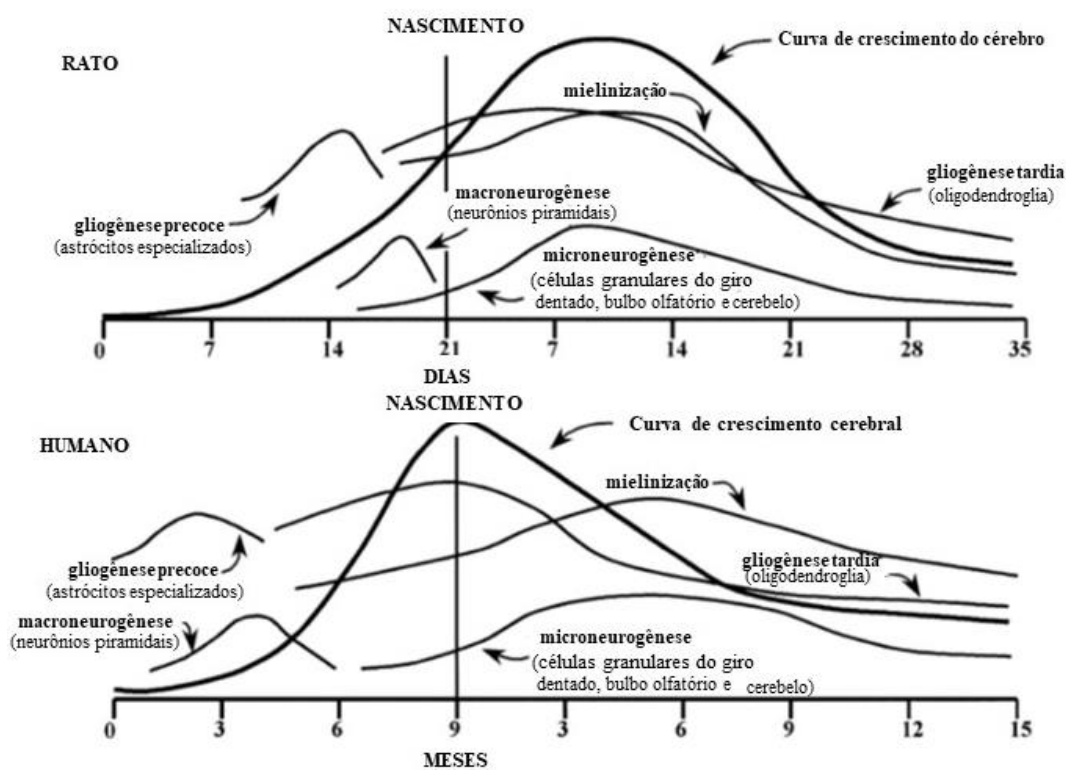


Fonte: Adaptado de Goyal; Iannotti; Raichle (2018).

O sistema nervoso inicia sua formação no período de desenvolvimento embrionário, início da gestação, onde é formada uma placa que se transforma em um sulco neural que se converte em tubo que fecha completamente antes do primeiro mês de vida intrauterina (MORGANE et al., 1993). Durante o desenvolvimento neural, as células nervosas iniciam a arborização e estratificam em um padrão laminar, estas compõem redes para processos sensoriais, visual e impressões auditivas, que podem mesmo ser detectado no nascimento (LAGERCRANTZ, 2016).

Os eventos do crescimento e desenvolvimento do cérebro ocorrem de acordo com uma sequência temporal e geneticamente programada (CLANDININ et al., 1980; MORGANE et al., 1993; SOMOGY et al., 1998). No rato, este período compreende da última semana de gestação até os 21 dias de vida, final do período de lactação. No humano é intensamente do último trimestre da gestação até aproximadamente os dois anos de vida (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002) (Figura 2).

Figura 2 - Comparação da curva de velocidade dos processos de desenvolvimento no cérebro humano e do roedor.



Fonte: Morgane et al., 2002.

No desenvolvimento cerebral, as diferentes regiões desenvolvem-se de forma heterogênea, de acordo com os tipos celulares, a duração e o período em que ocorre a divisão celular (MORGANE et al., 1993). Segundo Smart e Dobbing (1971), neste período a vulnerabilidade do sistema nervoso a um insulto é máxima. Portanto, alterações nos processos de desenvolvimento terão consequências variadas, dependendo do período de ocorrência, de sua duração e da evolução ontogenética da espécie animal (MORGANE et al., 1978). É neste período, de crescimento rápido do sistema nervoso, chamado de período crítico do desenvolvimento, onde ocorrem os processos de neurogênese, gliogênese, migração e diferenciação celular, mielinogênese, formação das sinapses e a síntese e liberação de neurotransmissores (LAURITZEN et al., 2001; MADORE et al., 2014).

Em todas as fases do ciclo os nutrientes interferem na neuroquímica e neurofisiologia do cérebro (GEORGIEFF et al., 2007), porém, no período crítico de desenvolvimento, a nutrição materna é crucial para fomentar o crescimento neuronal (LAURITZEN; CARLSON, 2011; INNIS, 2014). Desta forma, a má nutrição materna (excesso ou déficit de nutrientes) pode comprometer estes processos e alterar intensamente os eventos ontogenéticos sequenciais, com

efeitos variados sobre o sistema nervoso em formação (DOBBING, 1968; MORGANE et al., 1993; LYNCH; SMART; DOBBING, 1975). Durante esta fase crítica, regiões cerebrais específicas, incluindo o hipocampo, o corpo estriado e os córtices visual e auditivo respondem de forma semelhante a insultos nutricionais (KRETCHMERN; BEARD; CARLSON, 1996).

O desenvolvimento do sistema nervoso é um processo complexo e influenciado por fatores ambientais, onde a nutrição se insere. Estabelecer o papel de nutrientes, isoladamente e com muitos covariantes, é uma tarefa desafiadora (GONZALEZ; VISENTIN, 2016). Todavia, a influência dos lipídicos dietéticos vem sendo estudada e têm se destacado por participarem efetivamente da formação do sistema nervoso através do suprimento materno de ácidos graxos, juntamente com os componentes estruturais dos fosfolipídios, que são incorporados nas membranas neuronais (MADORE et al., 2014; GOYAL; IANNOTTI; RAICHLE, 2018). Durante a gestação e a lactação, a qualidade dos lipídios da dieta materna é de grande importância, pois determina o tipo de ácido graxo que se acumulará no tecido fetal e influenciará diretamente no perfil de ácidos graxos do secretado através do leite materno (YETIMLER, 2012; INNIS, 2014).

Entre os principais lipídios que participam do desenvolvimento cerebral encontram-se os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI): o docosahexaenóico (C22:3 ω -6) (DHA), o eicosapentaenoico (20:5 ω -3) (EPA), o ácido α -linolênico (C18:3 ω -3) (ALA), o araquidônico (C20:4 ω -6) (ARA) e o ácido linoleico (18:2 ω -6) (LA) (MAKRIDES et al., 1994). Estes ácidos graxos são essenciais, pois não são sintetizados endogenamente e devem ser fornecidos pela dieta materna em quantidades adequadas. Uma ingestão desequilibrada pode causar alterações no neurodesenvolvimento (CHANG; KE; CHEN, 2009; GONZÁLEZ; VINSENTIN, 2016).

O DHA e ARA são os principais constituintes do cérebro e estão incorporados principalmente aos fosfolipídios. As evidências da influência do DHA na neurogênese, neurotransmissão, mielinização, estrutura e sinalização da membrana neuronal já foram bem estabelecidas (MAKRIDES et al., 1994; MAKRIDES; COLLINS; GIBSON, 2011; WEISER; BUTT; MOHAJERI, 2016). Deficiências de DHA no início da vida podem resultar em comprometimento da função cognitiva e desenvolvimento. O DHA também está presente na retina e no córtex e é necessário para a acuidade visual e cognição (UAUY; DANGOUR, 2006). O ARA é precursor do ácido graxo docosatetraenóico (C22:4), o componente essencial de todas as membranas celulares (KOLETZKO; CARLSON; GOUDOEVER, 2015) e o ácido graxo mais abundante nos lipídios da mielina (GOYAL; IANNOTTI; RAICHLE, 2018). Durante a infância, a quantidade de ARA excede a deposição de DHA (MAKRIDES et al., 1994).

Outros ácidos graxos também participam da formação cerebral: o ácido graxo palmítico, um ácido graxo saturado e os ácidos graxos monoinsaturados oleico (n-9) e palmitoleico (n-7). Eles são considerados não essenciais, pois podem ser metabolizados endogenamente, porém o consumo materno aumenta sua disponibilidade, já que são transferidos através da placenta, durante a gestação, secretados no leite humano, no período da lactação e acumulados no cérebro e outros órgãos durante o desenvolvimento fetal (INNIS, 2004; INNIS, 2005).

O ácido graxo saturado palmítico participa dos processos de palmitoilação, gliogênese, sinaptogênese e mielinização (GONZÁLEZ; VISENTIN, 2016). A palmitoilação é um processo que permite que as proteínas se movam em um ambiente lipídico como o sistema nervoso central (DRISDEL et al., 2006). Há evidências que sinapses recém-formadas podem regular a dinâmica do processo de palmitoilação proteína proteica em períodos críticos de desenvolvimento precoce (EL-HUSSEINI; BREDT, 2002).

O ácido graxo monoinsaturado oleico é um dos principais constituintes da mielina (GARBAY et al., 2000) e está relacionado com o crescimento axonal e o agrupamento neuronal (MEDINA; TABERNERO, 2010). O ácido palmitoleico participa da construção das membranas ou estruturas sinápticas. Esta associação foi sugerida por um estudo que investigou o efeito do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) que desempenha papel crítico na diferenciação neuronal, na composição de ácidos graxos de culturas de neurônios do córtex e do hipocampo e mostrou que o BDNF aumentou a proporção do ácido graxo palmitoleico, sugerindo que os níveis intracelulares deste ácido graxo estão relacionados com as alterações neuronais do sistema nervoso central que ocorrem durante o desenvolvimento (SUZUKI et al., 2012). Agostoni et al. (2011) demonstraram associação entre a ingestão de ácidos graxos monoinsaturados em mulheres grávidas e sua prole coletando sangue nas mães e seus recém-nascidos para determinar o seu perfil de ácidos graxos totais do sangue. Eles encontraram os monoinsaturados em aproximadamente 29% dos ácidos graxos do sangue de mães grávidas, 18% do sangue do cordão umbilical e 23% do sangue dos recém-nascidos.

Para o funcionamento adequado do cérebro, a membrana neuronal deve estar íntegra. Elas são formadas pelos fosfolipídios que são reservatórios para a síntese de mensageiros lipídicos na estimulação neuronal (CHANG; KE; CHE, 2009). Sua estrutura física é determinada pela presença moléculas lipídicas e quaisquer alterações ocorridas na sua formação pode comprometer a reprodução de informação neuronal no axônio e sinapse (CHANG; KE; CHE, 2009; YEHUDA, 2012). A fluidez da membrana é fundamental no transporte de proteínas na bicamada lipídica, tornando-se importante na formação do tecido cerebral e visual. Alterações no neurodesenvolvimento estão relacionados com o consumo de AGE durante a fase

crítica de formação morfogênica e funcional do cérebro. A carência dos ácidos graxos é capaz de modificar a estrutura das membranas sinápticas, alterando sua função. O consumo de ácidos graxos, a partir de modificações dietéticas, durante a gestação e lactação, estão intimamente correlacionados com a aceleração no neurodesenvolvimento, processo de aprendizagem e memória demonstrando influência positiva na ingestão dietética lipídica nesta fase do ciclo da vida (MENNITTI et al., 2015).

2.3 MATURAÇÃO REFLEXA E SOMÁTICA DA PROLE

A formação cerebral tem início ainda no período embrionário e os neurônios formam redes para processos sensoriais, visuais e auditivos, que podem ser detectados ao nascimento. Este complexo é influenciado por múltiplos fatores genéticos ambientais interagindo uns com os outros, onde a nutrição exerce papel importante no desenvolvimento do cérebro e na influência pós-natal na neuroontogenia (GONZALEZ; VINSENTIN, 2016). A fase pós-natal é marcada pelas mudanças maturacionais na atividade do sistema nervoso central, que tem uma influência direta no desenvolvimento da ontogenia reflexa da prole e o período final é o mais crítico do desenvolvimento, quando todos os aspectos de maturação neural são consolidados. Desta forma, a análise do desaparecimento ou aparecimento dos reflexos são indicadores úteis para avaliar o grau de maturidade do sistema nervoso (FOX, 1965; SMART; DOBBING, 1971). Os processos de desenvolvimento e maturação ocorrem nos períodos de gestação e lactação (SOARES et al., 2009), que são fases de intensa atividade sinaptogênica (DOBBING, 1968; MORGANE et al., 1978; MORGANE et al., 1993).

Os reflexos são movimentos involuntários em resposta a estímulos, mede a maturação e reflete a integridade do desenvolvimento do sistema cerebelar, sensório-motor e da integração das vibrissas (ZHANG et al., 2010). Processo adequado da formação de mielina, das conexões neuronais através das sinapses e da ação adequada dos neurotransmissores resulta em um adequado desenvolvimento reflexo (BOURRE et al., 1987; MORGANE et al., 1993). A aceleração no aparecimento dos reflexos reflete a maturidade do sistema nervoso. É importante considerar que a antecipação da geotaxia negativa demonstra uma evolução positiva na função do labirinto e/ou vestibulo, enquanto a antecipação da aversão ao precipício reflete a maturidade da função sensório-motora (SANTILLÁN et al., 2010). O reflexo recuperação postural de decúbito envolve ambas funções motora e visual (BOYLE, 2001).

Os nutrientes podem influenciar o crescimento e desenvolvimento pré e pós-natal do sistema nervoso (GONZALEZ; VISENTIN, 2016). Entretanto, a quantidade e a qualidade lipídica da dieta materna influenciam diretamente o desenvolvimento físico e da maturação somática da prole (HAUSMA; McCLOSKEY; MARTIN, 1991). Modificação das fontes de gordura dietética materna e o período de administração da dieta influenciam as características de maturação física e ontogenia reflexa (SOARES et al., 2009; SANTILLÁN, 2010; MEDEIROS et al., 2015; MELO et al., 2017; CADENA-BURBANO et al., 2017). Dieta materna com diferentes quantidades de ω -6 e ω -3 (óleo de soja e girassol) aceleraram o aparecimento do reflexo de aversão ao precipício (SANTILAN et al., 2010). Soares et al. (2014) investigaram os efeitos da dieta materna com três fontes lipídicas (leite de cabra, óleo de coco e o óleo de soja) sobre a ontogênese dos reflexos de ratos neonatos e constataram que os lipídios provenientes do leite de cabra (rico em CLA) causaram aceleração do desenvolvimento da prole, elucidando o que outros estudos têm apontado com relação ao papel dos lipídios da dieta no neurodesenvolvimento. Outra fonte lipídica, a castanha de caju, durante a gestação e lactação também promoveu aceleração da maturação reflexa dos neonatos (MELO et al., 2017).

Contrariamente, outros estudos apontaram o efeito da dieta materna em retardar a ontogenia somática e reflexa da prole: 1) pelo consumo de dieta cetogênica, com carência de ácidos graxos essenciais associados a desnutrição proteica (SOARES et al., 2009); 2) pelo consumo de dieta rica em gordura vegetal hidrogenada, rica em ácidos graxos trans, onde a utilização desta fonte lipídica causou o retardo no desdobramento do pavilhão auricular, mas não na abertura do ducto auditivo. Além disso, houve antecipação na maturação da geotaxia negativa indicando uma alteração sobre o desenvolvimento motor e cerebelar, quando esse tipo de ácido graxo está presente na dieta desses animais (BORBA; SILVA; ROCHA-DE-MELO, 2011); 3) pelo consumo de dietas ricas em gordura saturada. Mendes-da-Silva et al. (2014), visando investigar o desenvolvimento somático e sensorio-motor da prole de ratas tratadas com dieta hiperlipídica (banha de porco) durante a gestação e lactação, observaram atraso no desenvolvimento reflexo dos descendentes. Nesse estudo, a qualidade e quantidade da fonte lipídica merece ser levada em consideração, devido à baixa concentração de ácidos graxos essenciais. Todos esses estudos já realizados demonstram e reforçam a influência das fontes lipídicas dietéticas maternas, os quais afetaram o desenvolvimento do sistema nervoso interferindo na cronologia dos eventos de neuroontogênese e maturação somática.

2.4 MEMÓRIA E APRENDIZAGEM DA PROLE

As funções cognitivas, dentre elas memória e aprendizagem, são de responsabilidade do córtex cerebral e hipocampo (BERMUDEZ-RATTONI et al., 2005; MUMBY et al., 2005; WINTERS; BUSSEY, 2005). O hipocampo é uma estrutura localizada na porção medial do córtex do lobo temporal e atua no armazenamento das memórias e emoções (RIEDEL; MICHEAU, 2001; MUMBY et al., 2005; OPITZ, 2014). Além das estruturas responsáveis pela aprendizagem, o córtex possui também estruturas que exercem funções responsáveis pelo comportamento que envolve as emoções de seres humanos e animais, sendo estes, o hipotálamo e o sistema límbico (LeDOUX, 1993).

Há vários tipos de memórias e dentre elas destacam-se: a memória a curto prazo, que guarda informações por segundos ou minutos e a memória a longo prazo, que armazena informações por tempo um tempo maior, podendo durar anos, inclusive prolongando-se por toda a vida. (COWAN, 2008; NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013; LAROCQUE et al., 2015). As memórias de curto e longo prazo são avaliadas pelo Teste de Reconhecimento de Objetos (BARBOSA et al., 2013; MÚNERA, 2013; NAVA-MESA; LAMPREA; RACHETTI et al., 2013). A memória de reconhecimento de objetos tem sido considerada como um modelo validado para memória declarativa, que necessita do funcionamento de diferentes estruturas como neocórtex, diencéfalo e lobo temporal medial (KART-TEKE; DE SOUZA SILVA; HUSTON, 2006). É caracterizada por ser uma tarefa não recompensada que explora a tendência natural do rato na exploração de objetos novos de maneira mais intensa que dos objetos já familiares (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Outra memória bastante estudada na experimentação animal é a habituação, um tipo de memória não-declarativa e que representa o declínio de uma resposta a um estímulo após este ser apresentado repetidamente (STADDON; CHELARU; HIG, 2002). O teste de habituação ao Campo Aberto analisa a capacidade de habituação em longo prazo e é determinada pela diminuição da ambulação durante a segunda exposição do animal ao aparelho, indicando assim facilitação da memória (RACHETTI et al., 2013). Neste tipo de memória os núcleos da base e cerebelo são as estruturas cerebrais envolvidas (DAUM; ACKERMANN, 1997; FORDE; SHOHAMY, 2011).

A função cerebral é dependente da integridade das membranas neuronais, da formação da mielina nos neurônios e células da glia e está diretamente relacionada com a memória e aprendizagem (YEHUDA, 2012). As funções que essas estruturas exercem na memorização e

no comportamento, podem ser afetadas de forma negativa quando não houver uma nutrição adequada no período de formação cerebral (GOW; HIBBELN, 2014). A nutrição materna produz impactos no desenvolvimento neurológico, não apenas no período de morfogênese cerebral, que ocorre na fase embrionária, mas na fase pós-natal, principalmente nos dois primeiros anos de vida. Desta forma, pode repercutir negativamente no período pós-natal, quando o excesso ou deficiência de nutrientes pode causar alterações permanentes no comportamento, na anatomia, química e fisiologia cerebral, podendo se prolongar até a vida adulta (YEHUDA; RABINOVITZ; MOSTOFSKY, 2006; LAURITZEN; CARLSON, 2011; SANCHEZ et al., 2012; INNIS, 2014; MANDUCA et al., 2017).

O cérebro é composto em sua maior parte por lipídios; sendo predominantes o DHA (ácido graxo ω -3) e o ARA (ácido graxo ω -6), que estão distribuídos principalmente na forma de fosfolipídios (DAS, 2003; CAO et al., 2009; GOYAL; IANNOTTI; RAICHLE, 2018). O DHA está envolvido na neurogênese, neurotransmissão, mielinização, plasticidade sináptica, e múltiplas funções de membrana, incluindo estrutura e sinalização (WEISER; BUTT; MOHAJARI, 2016). A deficiência de ω -3 na dieta materna ocasiona redução do DHA nos fosfolipídios nas membranas celulares (OZIAS; CARLSON; LEVANT, 2007) e sua diminuição no cérebro está associado a prejuízos no desempenho cognitivo e comportamental, efeitos particularmente importantes durante o neurodesenvolvimento (INNIS, 2007).

Investigações sobre a influência ácido graxo ω -3 no desenvolvimento neurológico demonstraram que a suplementação materna com este ácido graxo aumentou a memória à longo prazo da prole (KAVRAAL et al., 2012) e o consumo de uma dieta rica em gordura e relação ω -6/ ω -3 desequilibrada induziu, na prole, modificações metabólicas de longa duração e algumas alterações na expressão gênica no hipocampo, mas não teve efeito sobre a memória (LÉPINAY et al., 2015). Fernandes et al. (2011) ao substituir a fonte lipídica da dieta materna por linhaça, fonte de ω -3, durante a pré-concepção, gestação e lactação observou um aumento no conteúdo de DHA do hipocampo, associado a um melhor desempenho na memória espacial, na prole em idade jovem. A incorporação de castanha de caju (fonte de AGPI) na dieta materna facilitou a memória no teste de habituação e na memória de curto prazo na prole (MELO et al., 2017).

Contrariamente, ratas alimentadas com dieta contendo alta quantidade de gordura saturada, antes da concepção e durante a gestação/lactação causou déficit de aprendizagem não associativa, através da avaliação da atividade locomotora (Campo Aberto) e de memória espacial da prole (Labirinto de Morris) (PAGE; JONES; ANDAY, 2014). Da mesma forma, o

consumo materno com dieta contendo gordura vegetal hidrogenada (trans) alterou a memória espacial da prole, na fase jovem (SOUZA; ROCHA; CARMO, 2012).

As evidências científicas confirmam que durante a gestação e lactação os lipídios dietéticos são capazes de modular o metabolismo materno, fornecendo os ácidos graxos, fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso, motivo de importância para investigar outras fontes lipídicas, entre elas o abacate, e seus efeitos em curto e longo prazo, no neurodesenvolvimento e comportamento da prole.

2.5 ABACATE

Abacate (*Persea americana* Mill.), pertence a família Laureaceae. É um fruto originário do continente americano, encontrado em toda a América Latina e em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo. De acordo com dados da Food and Agriculture Organization (FAO) o mercado de abacate cresceu nos últimos anos e na última década. As exportações mundiais deste produto cresceram em uma taxa média anual de 15%. Em 2016, o abacate tornou-se a segunda maior exportação de frutas da América Latina e Caribe. O México, o Peru e o Chile são os principais exportadores mundiais e os maiores compradores são os Estados Unidos, Japão e Canadá (FAO, 2017).

No Brasil, o abacateiro é encontrado em todo o território e apresenta grande importância comercial (TEIXEIRA et al., 1995). Diferentes variedades são produzidas no país (Hass, Fuerte, Fortuna, Geada, Quintal, Margarida, Breda), porém Hass e Fuerte, conhecidas como avocado, são as de escolha para exportação, pois possuem maior valorização pelo alto teor lipídico (DONADIO, 1995; FISCHER et al., 2011).

As diretrizes do Comitê Dietético Americano indicam que quantidades de vários nutrientes, a exemplo das vitaminas E, C e ácido fólico, presentes no abacate, correspondem à média do consumo estimado para mulheres grávidas e lactantes (USDA, 2015). A polpa do abacate é densa em nutrientes que consiste em níveis significativos de potássio, magnésio, vitamina A, vitamina C, vitamina E, vitamina K₁, ácido fólico, vitamina B₆, niacina, ácido pantotênico, riboflavina (DREHER, 2013). Sua composição pode sofrer alterações dependendo da variedade e cultivar, mas possui cerca de 72% de água, 15,4% de lipídios, e 8,64% de carboidratos, 1,96% de proteína (USDA, 2015). Dos carboidratos, 80% são compostos por fibras dietéticas, sendo 70% de fibras insolúveis e 30% de fibras solúveis (DREHER; DAVEMPORT, 2016) (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição nutricional do abacate (*Persea americana* Mill.).

COMPOSIÇÃO DO ABACATE	
	100g⁻¹ de polpa
Umidade (g)	72
Energia (kcal)	167
Proteína (g)	2,00
Lipídios Totais (g)	15,40
Gordura Saturada (g)	2,10
Gordura Monoinsaturada (g)	9,80
Gordura Poliinsaturada (g)	1,80
Colesterol (mg)	-
Estigmasterol (mg)	2,00
Campesterol (mg)	5,00
Beta-sitosterol (mg)	76,00
Carboidratos Totais (g)	8,60
Fibra insolúvel (g)	4,80
Fibra solúvel (g)	2,00
Açúcares (g)	0,30
Vitaminas Hidrossolúveis	
Vitamin C (mg)	8,80
Tiamina (mg)	0,10
Riboflavina (mg)	0,10
Niacina (mg)	1,900
Ácido pantotênico (mg)	1,50
Vitamin B ₆ (mg)	0,30
Folate (µg)	89,00
Colina (µg)	14,00
Vitamin B ₁₂ (µg)	-
Vitaminas Lipossolúveis e Carotenóides	
Vitamin A (µg RAE)	7,00
Beta Caroteno (µg)	63,00
Alfa Caroteno (µg)	24,00
Beta Criptoxantina (µg)	27,00
Luteína + zeaxantina(µg)	271,00
Vitamin E (α -tocoferol) (mg)	2,0
Vitamin D (µg)	-
Vitamin K ₁ (Filoquinona) (µg)	21,00
Minerais	
Cálcio (mg)	13,00
Magnésio (mg)	29,00
Potássio (mg)	54,00
Fósforo (mg)	507,00
Sódio (mg)	8,00
Ferro (mg)	0,60
Zinco (mg)	0,70
Selênio (ug)	0,40

Fonte: USDA (2015).

Com elevado valor nutricional, o abacate é considerado um dos mais importantes, quando comparado a outros frutos tropicais (DREHER, 2013). O seu azeite assemelha-se ao de oliva, por ser extraído da polpa dos frutos e pela similaridade de suas propriedades físico-químicas, principalmente pela composição de seus ácidos graxos (TANGO; CARVALHO; LIMONTA, 2004), predominando em ambos o ácido oleico.

A extração do óleo a partir da polpa (mesocarpo) tornou-se alternativa importante do ponto de vista comercial (FERRARI, 2015). A composição dos ácidos graxos pode variar dependendo do cultivar, variedade, fase de maturação, localização geográfica, bem como o método de extração (MORENO et al., 2003). O ácido graxo monoinsaturado oleico (ω -9), o ácido graxo saturado palmítico (ω -7) e o ácido graxo poliinsaturado linoleico (ω -6) são os AG principais (FLORES et al., 2014) enquanto o ácido graxo poliinsaturado linolênico (ω -3) encontra-se em menor quantidade, porém, está entre as gorduras chave fornecidas, sendo o monoinsaturado oleico sua maior fração lipídica (LU et al., 2009). Em comparação com a maioria das frutas e produtos hortícolas, o alto teor de ácidos graxos insaturados do abacate permite uma maior absorção de nutrientes solúveis em gordura (KOPEC et al., 2014). A composição do perfil lipídico do abacate, variedade Hass, encontra-se no Quadro 2.

Quadro 2 – Composição de ácidos graxos do abacate (*Persea americana* Mill.).

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO ABACATE	
Ácidos Graxos	g.100 g⁻¹ de lipídios
Saturados (g)	
Palmítico (C16:0)	14,80
Esteárico (C18:0)	0,27
Monoinsaturados (g)	
Palmitoleico (C16:1)	4,86
Oleico (18:1)	63,73
Poliinsaturados (g)	
Linoleico (C18:2)	15,27
Linolênico (C18:3)	1,09

Fonte: YANTY; MARIKKAR; LONG (2011).

Uma diversidade de fitonutrientes estão presentes no abacate, destacando níveis importantes de fitoesteróis (beta-sitosterol, estigmasterol e campesterol), carotenóides (betacaroteno, alfa-caroteno, luteína, neocromo, neoxantina e crisantemaxantina, beta-criptoxantina, zeaxantina e violaxantina), flavonóides (epicatequina e epigallocatequina 3-O-galato) e álcoois poli-hidroxilados (AMEER, 2016). Muitos desses componentes têm poder

antioxidante e reduzem o estresse oxidativo através da eliminação de radicais livres ou por estimular um aumento na capacidade antioxidante endógena (CALDAS et al., 2017).

Pela variedade de nutrientes essenciais como os ácidos graxos MUFA e AGPI, elevado teor de fibras e dos seus fitonutrientes, este fruto é reconhecido como fonte alimentar com potenciais efeitos benéficos à saúde (ADA, 2009; USDA, 2015). Diferentes partes do abacate (folhas, semente, casca, raízes e polpa) tem sido pesquisadas (TABESPOUR; RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2017), todavia, os estudos com a utilização da polpa e do óleo são em menor número. O interesse científico sobre os efeitos benéficos do abacate surgiu na década de 90, onde um grande número de ensaios clínicos foram realizados e apontaram efeitos positivos de seu consumo com a diminuição dos lipídios sanguíneos em indivíduos hipercolesterolêmicos, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (ALVIZOURI-MUNOZ et al., 1992; LERMAN-GARBER et al., 1994; CARRANZA et al., 1995; LOPEZ-LEDESMA; MUNARI; HERNANDEZ-DOMINGUEZ, 1996; CARRANZA-MADRIGAL et al., 1997). Recentemente, uma série de pesquisas clínicas e não clínicas correlacionaram o efeito anti-obesidade do abacate (MONIKA; GEETHA, 2016), na proteção contra o aumento da gordura abdominal (TENTOLOURIS et al., 2008; PANIAGUA et al., 2007), coadjuvante no aumento da saciedade pós-prandial (WIEN et al., 2011; HUANG et al., 2017), com efeito hepatoprotetor (MAHMOED; REZQ, 2013), na redução do colesterol total e da fração de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (VÁZQUEZ et al., 2009; AL-DOSARI, 2011; PAHUA-RAMOS et al., 2014; WANG et al., 2015) e no aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) (DÍAZ et al., 2004; VÁZQUEZ et al., 2009).

Outros estudos retratam as propriedades antioxidantes do abacate contra danos ao DNA celular, com possíveis efeitos protetores antienvelhecimento (YONG et al., 2009; JOHNSON et al., 2010) e na prevenção contra alguns tipos de cânceres (DING et al., 2009; GUZMÁN-RODRIGUES, 2016). Em ratos diabéticos, o consumo da polpa de abacate reduziu os níveis de malonaldeído (MDA) no pâncreas (AJANI; OLANREWAJU, 2014) e o consumo de óleo diminuiu o estresse oxidativo cerebral (ORTIZ-AVILA et al., 2015). Todavia, não existem estudos que avaliem o consumo de abacate durante a gestação e lactação e o seu impacto em relação ao metabolismo materno, desenvolvimento do sistema nervoso e comportamento da prole.

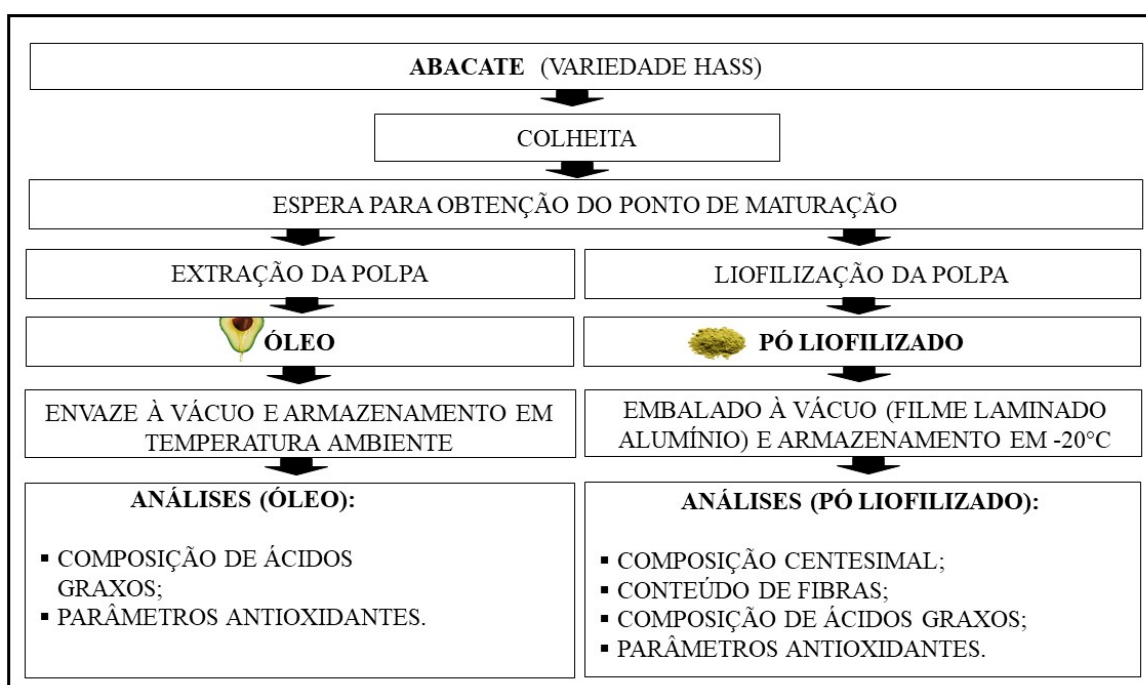
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) e Laboratório de Bromatologia (LABROM) – Centro de Educação e Saúde (CES)/Universidade Federal de Capina Grande (UFCG); nos Laboratórios de Físico Química e Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar – Campus III/Universidade Federal da Paraíba (UFPB); nos Laboratórios de Bromatologia do Departamento de Nutrição e no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) – Campus I/UFPB; no Laboratório de Química do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) – Instituto de Tecnologia de alimentos (ITAL) e no Laboratório de Farmacologia - III/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

O óleo e o pó liofilizado foram obtidos a partir da polpa do abacate, variedade Hass. Após atingir o grau de maturação, o óleo foi extraído e a polpa foi liofilizada para obtenção do pó. Em seguida, o óleo foi analisado quanto à composição de ácidos graxos e conteúdo total de antioxidantes e o pó liofilizado foi analisado quanto à sua composição centesimal, conteúdo total de fibras solúveis e insolúveis, composição de ácidos graxos e parâmetros antioxidantes (Figura 3).

Figura 3 – Desenho experimental da obtenção e análises da matéria prima.



3.2 AMOSTRAS

O abacate (*Persea americana* Mill.), da variedade Hass, foi escolhido pelo maior conteúdo lipídico e por ser a variedade mais utilizada para exportação. Os frutos utilizados na pesquisa foram colhidos em março de 2017, na Fazenda Jaguacy Avocado Brasil®, localizada no município de Bauru, São Paulo, de acordo com as coordenadas geográficas de latitude 22°19'18"S, longitude 49°04'13"W e 526 m de altitude. Do mesmo lote coletado, parte dos frutos foi utilizada para extração do óleo, na própria fazenda, e outra parte foi transportada para a Empresa Terroni Liofilização®, localizada em São Carlos, São Paulo, para obtenção do pó liofilizado da polpa.

Diariamente, técnicos da fazenda e da empresa de liofilização mantiveram contato em vídeo para acompanhamento do processo de maturação dos frutos, visando à uniformização da amostra a ser processada. Para extração do óleo e liofilização da polpa foi utilizada uma escala de maturação onde os frutos escolhidos tinham que apresentar casca firme, íntegra e na coloração escura, sem injúria ou murchidão e a polpa deveria estar macia ao leve toque, mas não em processo de amolecimento. Estas características foram observadas nos pontos 4 e 5 da escala fotográfica criada para homogeneização da amostra (Figura 4). Nestas condições foram selecionados os frutos que seriam utilizados nos processos, de extração do óleo e liofilização da polpa, que foram realizados simultaneamente, no mesmo dia e horário.

O óleo foi extraído da polpa do abacate com a utilização de uma centrífuga de três fases (Centrífuga Gratt modelo GMT 400, Capinzal/SC, Brasil), onde o óleo, água e os sólidos foram separados. Em seguida, a fase óleo passou por decantador e filtro prensa (Ecirtec - modelo FPE 25/10, Baurú/SP, Brasil), envase à vácuo em vidro âmbar e armazenado sob temperatura ambiente (22 ± 1 °C) (Figura 5).

Figura 4 - Escala fotográfica numérica de maturação do abacate Hass.



Fonte: Fazenda Jaguacy Avocado Brasil® – São Carlos/SP, Abril de 2017.

Figura 5 - Esquema ilustrativo do processo de extração do óleo de abacate.



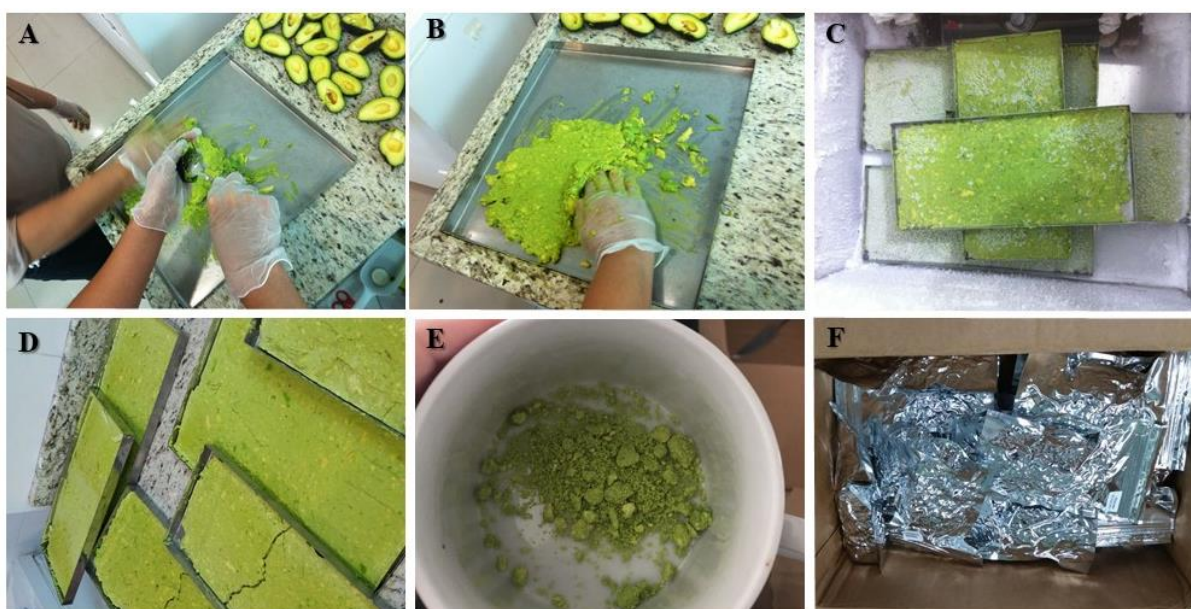
Fonte: Fazenda Jaguacy Avocado Brasil® para o autor da pesquisa – São Carlos/SP, Abril de 2017. 5A: despolpamento mecânico dos frutos; 5B: adição de água morna para quebra da parede celular; 5C: processamento no tricanter; 5D: filtro prensa e decantador; 5E: tanques de estocagem com nitrogênio; 5F: óleo envasado.

Para transformação da polpa em pó liofilizado, esta foi inicialmente removida e levemente amassada com as mãos e ultracongelada (Ultracongelador Modelo COLD 500 – Terroni®) por 24h sob temperatura de -45°C e posteriormente liofilizada durante 44 h no

Liofilizador Modelo LH0601-B (Terroni®), em etapas sequenciais e distintas de descongelamento e pressão a vácuo. A temperatura do condensador variou entre -50 a -57 °C. Imagens das etapas que antecederam a liofilização e o resultado pós liofilização estão ilustradas na Figura 6.

Após a liofilização o pó foi acondicionado em embalagens individuais metalizadas e laminadas com capacidade para 100 g e armazenadas em temperatura de -20 °C. Imagens das etapas que antecederam a liofilização e o resultado pós liofilização estão ilustradas na Figura 6.

Figura 6 - Etapas do processo de liofilização do acabate Hass.



Fonte: Terroni® para o autor da pesquisa – São Carlos/SP, Abril de 2017. 6A: retirada da polpa dos abacates selecionados; 6B: leve amassamento com as mãos; 6C: bandeja pronta após congelamento ultrarápido de 24 horas; 6D: abacate após liofilização; 6E: pó liofilizado após retirada das bandejas; 6F: pacotes de abacate liofilizados embalados à vácuo.

3.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA POLPA E IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA POLPA E ÓLEO DE ABACATE

Amostras de polpa liofilizada foram submetidas a análises para determinação do teor de umidade e conteúdo de proteínas, lipídios, fibras (solúveis e insolúveis), cinzas (AOAC; 2016; FOLCH; LESS; STANLEY, 1957) e os valores de carboidratos foram quantificados por diferença.

A extração dos lipídios da polpa e do óleo foi realizada pelo método Folch, Less e Stanley (1957), seguido da transmetilação dos ácidos graxos de acordo com Hartman e Lago (1973) e

posterior injeção e quantificação dos ácidos graxos em cromatografia gasosa (McCANCE; WIDDOWSON'S, 2002).

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO ÓLEO E POLPA DE ABACATE

3.4.1 Obtenção do Extrato

Para determinação do teor de polifenóis totais, flavonoides totais, carotenoides totais e da atividade antioxidante *in vitro* (FRAP e ABTS), o óleo e a polpa do abacate foram submetidos a extração destes constituintes bioativos.

A extração dos constituintes do óleo do abacate foi realizada conforme metodologia descrita por Parry et al. (2005) com algumas modificações. Inicialmente foram pesados 1 g de óleo em um tubo de ensaio e adicionaram-se 3 mL de metanol a 80%. Em seguida, o tubo com a mistura foi submetido a agitação em vórtex por 1 minuto e, posteriormente, centrifugado (Marca Centribio – Modelo 80-2B) a 7.546 xg por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi recolhido em frasco âmbar e armazenado em -18 °C até o momento das análises. Para extração dos seus constituintes bioativos da polpa do abacate foi pesado um grama de polpa em um tubo de ensaio e adicionado etanol 80% na proporção 1:10 (g/v). Posteriormente o tubo com a mistura foi coberto com papel alumínio, deixado em repouso (maceração) por 60 minutos em temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Após, a mistura foi filtrada sendo o volume completado para 10 mL com o solvente de extração. O extrato foi recolhido em frasco âmbar e armazenado em -18 °C até o momento das análises. Todas as extrações (óleo e polpa) foram realizadas em triplicatas.

3.4.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

Para determinar o teor de compostos fenólicos totais do óleo e polpa do abacate utilizou-se metodologia descrita por Liu et al. (2002), com algumas modificações. Resumidamente, 250 µL de cada extrato (óleo ou polpa) foram misturados em tubo de ensaio com 1250 µL do reagente

Folin-Ciocalteu a 10%. As soluções foram agitadas em vórtex e armazenadas em temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) na ausência da luz por 6 minutos. Após, foram adicionados 1000 μL da solução de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi levada ao banho maria a uma temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 5 minutos. Após, a absorbância foi medida a 765 nm utilizando espectrofotômetro (BEL Photonics®, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Também foi realizado um branco com a ausência dos extratos para zerar o espectrofotômetro. O conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras foi determinado utilizando uma curva padrão preparada com ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cem gramas de polpa de abacate com base no peso seco (mg EAG/100 g). Para o óleo os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cem gramas de óleo de abacate com base no peso (mg EAG/100 g).

3.4.3 Determinação de Flavonóides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen; Mengcheng & Jianming (1999). Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos do óleo e da polpa de abacate foram adicionados a 2 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 150 μL de nitrito de sódio a 5%. Após 5 minutos, 150 μL de cloreto de alumínio a 10% foram adicionados e, após 6 minutos, 1 mL de hidróxido de sódio a 1 M, seguido pela adição de 1,2 mL de água destilada. A absorbância da amostra foi medida a 510 nm usando um espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil) contra um branco na ausência dos extratos. O teor de flavonoides totais dos extratos foi determinado usando uma curva padrão de equivalentes de catequina (EC). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (EC) por cem gramas de polpa de abacate com base no peso seco (mg EC/100 g). Para o óleo os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (EC) por cem gramas de óleo de abacate com base no peso (mg EC/100 g).

3.4.4 Determinação de Carotenóides Totais

Foram determinados pelo método de Higby (1962). Os extratos foram preparados utilizando-se 1 g de polpa e óleo de abacate macerados em 10 mL de hexano PA e carbonato de cálcio os quais permaneceram protegidos da luz durante 12 horas sob refrigeração. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 53.664 xg durante 10 minutos, para posterior leitura em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram calculados utilizando a fórmula: Carotenoides totais = $42 (A_{450} \times 100) / (250 \times L \times W)$, sendo A_{450} = absorbância; L = largura da cubeta em cm; e W = quociente entre a massa da amostra em gramas e o volume final da diluição em mL.

3.4.5 Atividade Antioxidante - Método FRAP

Para determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada metodologia descrita por Benzie & Strain (1999), adaptada por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). 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 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (10 mM em HCl 40 mM) e 1,1 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Para a análise, 200 µL dos extratos (óleo e polpa de abacate) foram adicionados a 1800 µL do reagente FRAP em um tubo de ensaio e levados ao banho maria a 37 °C por 30 minutos. Para cada extrato foi realizado um branco, sem a porção dos extratos. Após, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (BEL Photonics®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 593 nm. Para determinar a atividade antioxidante (FRAP) dos extratos de óleo e de polpa de abacate foi utilizada curva de calibração com Trolox e os resultados foram expressos em µmol de trolox/g de amostra.

3.4.6 Atividade Antioxidante - Método ABTS +

O método ABTS foi realizado de acordo com a metodologia de Surveswaran et al. (2007), com algumas modificações. Inicialmente, formou-se o radical ABTS através da reação da solução $ABTS^{\cdot+}$ a 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, o mesmo foi diluído em água destilada até obter o valor de absorbância de 0,800 ($\pm 0,020$) a 734 nm. A partir de cada extrato (óleo e polpa de abacate) foram preparadas quatro diluições diferentes, em triplicatas. Em ambiente escuro foi transferido para um tubo de ensaio uma alíquota de 100 μ L dos extratos e adicionado 500 μ L do radical ABTS. Após os tubos de ensaio foram mantidos na ausência de luz por 6 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura a 734 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics®, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Também foi feita uma solução “controle” que consistiu em uma alíquota de 100 μ L do solvente extrator dos extratos adicionada de 500 μ L do radical ABTS. A solução “branco” foi o solvente extrator de cada extrato, utilizada para zerar o espectrofotômetro. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em μ M trolox/g de amostra. Também calculou-se o IC₅₀.

3.5 ENSAIO BIOLÓGICO

3.5.1 Animais e Dietas Experimentais

Fêmeas primíparas da linhagem Wistar (± 90 dias de vida/ 250 ± 50 g) foram obtidas do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Campina Grande - LANEX / UFCG e utilizadas para obtenção de 45 ratos neonatos. O acasamento foi feito utilizando a proporção 1:2 de macho e fêmeas. Após confirmação de prenhez, as ratas foram alojadas em gaiolas-maternidade individuais de polipropileno, em condições-padrão do laboratório (temperatura média de 22 ± 1 °C, umidade $65 \pm 5\%$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas – luz artificial das 6:00 as 18:00 horas). As ninhadas foram padronizadas em 6 (seis) filhotes machos.

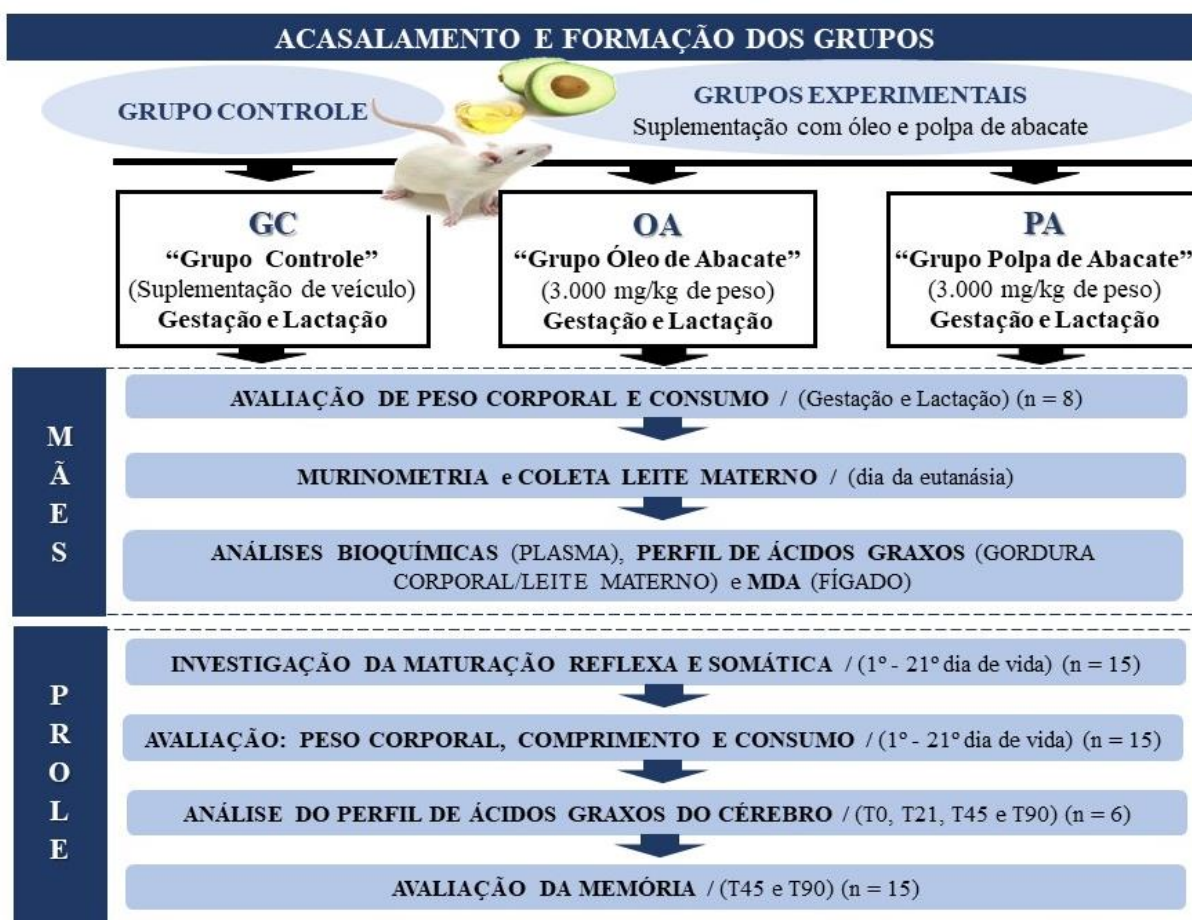
Vinte e quatro mães foram divididas de forma randomizada em três grupos: Controle (GC) – tratado com água destilada; Óleo de Abacate (OA) – suplementado com 3000 mg de óleo de abacate/kg de peso do animal e Polpa de Abacate (PA) – suplementado com 3000 mg de polpa de abacate/kg de peso do animal. A gavagem foi administrada a partir do 7º dia de gestação até o 21º dia lactação (MORGANE et al., 2002; MELO et al., 2017). Foram fornecidos ração padrão (Presence®, Paulínia, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Após o desmame, com 21 dias de vida, a prole passou a receber a mesma ração padrão ofertada as mães e esta foi

fornecida até a fase adulta. A descrição dos grupos e do protocolo experimental estão ilustrados a seguir (Figura 7).

A dose administrada foi definida a partir do estudo realizado por Torres et al. (2016), que utilizaram a suplementação de 3.000 mg de óleo de pequi/kg de peso do animal com efeitos antiinflamatórios e antioxidantes.

O protocolo experimental seguiu 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 foram minimizados ao máximo. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR/UFCG, pelo nº 006-2017 (Anexo A).

Figura 7 - Descrição dos grupos e protocolo experimental das mães e prole.



3.6 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E CONSUMO DE RAÇÃO

O peso corporal e o consumo de ração das ratas gestantes e lactantes foram aferidos, semanalmente, em balança eletrônica digital Balmak[®] (modelo ELP – 10, Santa Bárbara do Oeste/SP, Brasil), com variação de 20 a 10.000 g. O consumo alimentar representou a diferença entre a ração ofertada e o rejeito, seguindo a fórmula: $\text{Ingestão (g)} = \text{cota oferecida (g)} - \text{rejeição limpa (g)}$. O alimento que não foi consumido e permaneceu na área externa da gaiola foi considerado como rejeito limpo (VADIVEL; PUGALENTHI, 2010).

Nas mães o peso foi registrado a partir do 1º dia de gestação (1ª, 2ª e 3ª semanas) até o 21º dia de lactação (1ª, 2ª e 3ª semanas). O consumo, a partir do 7º dia de gestação (2ª e 3ª semanas) até o 21º dia de lactação (1ª, 2ª e 3ª semanas). Na prole (neonatos), o peso foi registrado diariamente, a partir do 1º dia de vida até o desmame (21º dia de vida). Após o desmame, o peso foi registrado semanalmente e o consumo registrado diariamente até a fase adolescente com 45 dias de vida (T45) e a fase adulta, com 90 dias de vida (T90). A aferição de peso e consumo foram realizados sempre no mesmo horário, das 10 as 12 horas da manhã.

3.7 ONTOGENIA REFLEXA E MATURAÇÃO SOMÁTICA DOS NEONATOS

A consolidação de respostas reflexas e somáticas foram pesquisadas diariamente, no horário entre 6 e 8 horas da manhã, do 1º ao 21º dia pós-natal. A resposta foi considerada consolidada quando a reação esperada se repetiu por três dias consecutivos, sendo considerado o dia da consolidação o 1º dia do aparecimento. O tempo máximo de observação considerado foi de 10 segundos, cronometrados por cronômetro digital de mão (Kenko[®], Modelo KK-2808, São Paulo, Brasil).

3.7.1 Ontogenia Reflexa

Os reflexos pesquisados seguiram o modelo experimental estabelecido por Smart e Dobbing (1971). Foram avaliados os seguintes reflexos: a) Desaparecimento da Preensão

Palmar (PP) e Aparecimentos das seguintes respostas: b) Recuperação Postural de Decúbito (RPD), c) Colocação Espacial Desencadeada Pelas Vibrissas (CPV), d) Aversão ao Precipício (AP), e) Geotaxia Negativa (GN), f) Resposta ao Susto (RS) e g) Recuperação do Decúbito em Queda Livre (RDQL).

Procedimentos:

- a) Desaparecimento da Preensão Palmar (PP) – utilizando-se um bastonete metálico, com aproximadamente, 5 cm de comprimento por 1 mm de diâmetro, fez-se uma leve percussão na palma da pata dianteira esquerda ou direita de cada animal. Em resposta, deve ocorrer a flexão rápida dos artelhos. Com o desenvolvimento do recém-nascido, ocorre o desaparecimento dessa resposta;
- b) Recuperação Postural de Decúbito (RPD) – colocou-se o animal em decúbito dorsal sobre uma superfície plana e lisa. Em resposta, deve acontecer o retorno ao decúbito ventral. A resposta foi considerada positiva quando o animal assumia o decúbito ventral, apoiado sobre as quatro patas;
- c) Resposta de Colocação Espacial Desencadeada pelas Vibrissas (CPV) – o filhote foi suspenso pela cauda, de tal forma que suas vibrissas tocavam levemente a borda de uma superfície plana. Em resposta, o animal deve colocar as duas patas anteriores sobre a mesa e realizar movimentos de marcha, associados com extensão de tronco;
- d) Aversão ao Precipício (AP) – o animal foi colocado sobre uma superfície plana e alta (mesa), com as patas dianteiras na extremidade da mesa, de maneira que ele detectava o precipício. Em resposta o animal deve se deslocar para um dos lados e caminhar em sentido contrário à borda, caracterizando a aversão ao precipício;
- e) Geotaxia Negativa (GN) – o animal foi colocado no centro de uma rampa medindo 34 x 24 cm, revestida com papel antiderrapante (papel crepom), com inclinação aproximada de 45°, com a cabeça na parte mais baixa da rampa. Em resposta, o animal deve girar o corpo, em um ângulo de 180° graus, posicionando a cabeça em sentido ascendente;
- f) Resposta ao Susto (RS) – o animal foi submetido a um estímulo sonoro intenso e súbito, produzido pela percussão de um bastão de madeira sobre um recipiente metálico (6 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), a uma distância aproximada de 10 cm da cabeça. Em resposta, deve ocorrer a haver uma retração das patas anteriores e posteriores, com imobilização rápida e involuntária do corpo do animal;
- g) Recuperação do Decúbito em Queda Livre (RDQL) – o animal foi segurado pelas quatro patas, com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm, e solto em queda livre sobre um

leito de espuma sintética (30 x 12 cm). Em resposta, o animal deve recuperar o decúbito durante a queda livre caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas.

3.7.2 Indicadores de Maturação Somática

A partir do 1º dia pós-natal em diante os filhotes foram examinados diariamente, sempre no mesmo horário da avaliação da ontogenia reflexa, de modo a determinar o dia em que a maturação somática se completou. Para isso foram avaliadas as seguintes características físicas (tomadas como indicadores de desenvolvimento somático).

Procedimentos:

- a) Abertura do Pavilhão Auricular (APA) – normalmente, o animal nasce com o pavilhão auditivo dobrado; portanto, o pavilhão auricular aberto foi detectado no dia em que a dobra foi desfeita. Nesta avaliação, a maturação foi considerada positiva quando os dois pavilhões estiveram desdobrados;
- b) Abertura do Conduto Auditivo (ACA) – Ao nascimento, o conduto auditivo encontra-se fechado. Considerou madura a ACA no dia em que o orifício auricular podia ser visualizado. Nesta avaliação a maturação foi considerada positiva quando os condutos, direito e esquerdo, encontraram-se abertos;
- c) Erupção dos Dentes Incisivos Superiores (EIS) – foi registrado o dia em que houve a erupção dos dentes incisivos superiores. Levou-se em consideração a resposta positiva quando ambos os incisivos estiveram expostos;
- d) Erupção dos Dentes Incisivos Inferiores (EII) – foi registrado o dia em que houve a erupção dos dentes incisivos inferiores. Levou-se em consideração a resposta positiva quando ambos estiveram expostos;
- e) Abertura dos Olhos (AOL) – no rato, os olhos encontram-se totalmente encobertos pelas pálpebras, durante alguns dias após o nascimento. A resposta foi considerada positiva quando os dois olhos estiveram abertos, com presença de movimento reflexo das pálpebras;
- f) Aparecimento dos Pelos Epidérmicos (APE) – os ratos nascem sem pêlos, o seu aparecimento foi confirmado quando detectado a presença da pelugem, para tal teste deslizou-se gentilmente uma haste plástica sobre a epiderme do animal;

g) Comprimento da Cauda (CC) – o animal foi colocado sobre uma régua milimetrada, sendo a cauda delicadamente mantida bem estendida, desde a base até a extremidade.

3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

Uma semana antes do final da adolescência (T45) e início da fase adulta (T90), foram avaliados a memória da prole utilizando o Teste de Habituação do Campo Aberto (RACHETTI et al., 2013) e o Teste de Reconhecimento de Objetos, para avaliação da memória em curto e longo prazo (NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013). Os testes foram realizados no período da manhã, no horário das 6:00 as 8:00 horas. Todas as sessões de testes comportamentais foram filmadas com câmera de vídeos instalada no teto e os dados posteriormente associados e analisados como indicador dos efeitos da suplementação dietética materna.

3.8.1 Avaliação da memória usando o Teste de Habituação ao Campo Aberto

Para a avaliação da aprendizagem não associativa do animal, foi realizado o Teste de Habituação ao Campo Aberto com o objetivo de avaliar a capacidade de habituação do animal a longo prazo. Segundo Rachetti et al. (2013), a atividade locomotora do animal no campo aberto, está intimamente ligada à sua capacidade de aprendizagem, assim, a habituação do animal após exposição repetida ao campo aberto é considerado um indicativo de aprendizagem não associativa.

Para concretude do teste utilizou-se a metodologia descrita por Rachetti et al. (2013). O animal foi exposto ao campo aberto em dois momentos. Primeiro, foi realizado o teste de habituação e após 7 (sete) dias repetiu-se o mesmo com a finalidade intuito de comparar a atividade locomotora dos animais para relacionar com aprendizagem não associativa.

O parâmetro analisado na realização desse teste foi a quantidade de ambulações dos campos pelo animal, considerando a locomoção das quatro patas para o interior de cada campo. O tempo de observação foi de 10 minutos. O procedimento foi realizado sempre entre as 06:00 a 08:00h. No dia do experimento, os animais permaneceram em seus locais e só foram

manipulados no momento de serem colocados no campo aberto (Figura 8) para que não tivesse mudança de ambiente ou alguma alteração no comportamento. Posteriormente, os vídeos foram analisados e as categorias comportamentais identificadas e registradas manualmente. A cada animal testado o aparelho foi limpo, antes de iniciar e depois de concluído o teste, com solução de álcool a 10% e papel absorvente.

Figura 8 - Ilustração do Campo Aberto utilizado para avaliar a ambulação do animal.



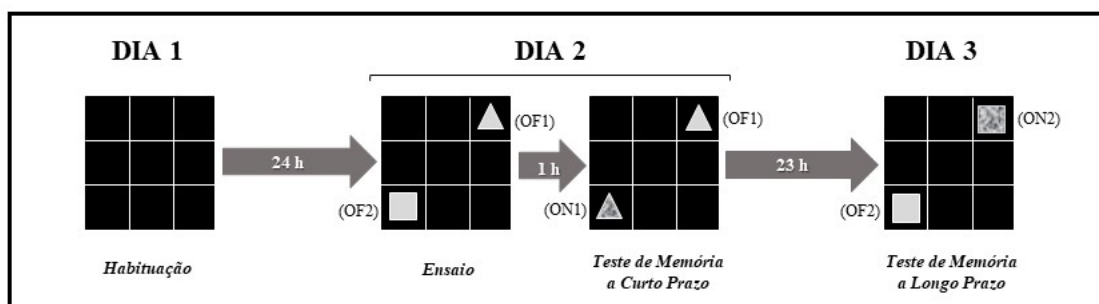
Fonte: Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) – Cuité/PB, Junho, 2017.

3.8.2 Avaliação da memória usando Teste de Reconhecimento de Objetos

Para avaliar a memória em curto e longo prazo foi utilizado o Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) (NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013). O teste consiste em um campo aberto preto (60x60x60 cm), com quatro linhas cruzadas formando 9 quadrantes de 20 x 20 cm, uniformemente iluminado e com objetos na cor preta, com formatos (pirâmides ou prisma retangular) e texturas (liso ou áspero) diferentes. O teste constituiu em 4 (quatro) ensaios de 10 minutos que aconteceu em 3 (três) etapas: 1) Dia 1 – habituação durante 10 minutos para minimizar o estresse da manipulação; 2) Dia 2 – realizado 24 h após o ensaio de habituação onde cada animal foi colocado no campo aberto contendo dois objetos: objeto familiar 1 (OF1) e objeto familiar 2 (OF2) de textura idêntica (lisa), mas com formatos diferentes (triângulo e prisma retangular) e localizados perto de dois cantos opostos escolhidos aleatoriamente. Para mensuração da memória à curto prazo, uma hora após, o animal foi colocado novamente para

exploração de dois objetos (OF1 em sua localização original e um novo objeto - ON1), de forma idêntica, mas com diferente textura em relação ao OF1 e localizado no local onde OF2 tinha sido colocado durante o ensaio amostral; e 3) Dia 3 – realizado 23 h após o ensaio curta duração onde cada animal foi colocado no campo aberto para explorar dois objetos (OF2 em seu lugar original) e um novo objeto (ON2), de forma idêntica, mas com diferente textura (Figura 9).

Figura 9 - Desenho experimental adaptado do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO).



Fonte: adaptado de Nava-Mesa; Lamprea; Múnera (2013).

Para avaliação da memória à curto prazo foi observado o tempo gasto pelo animal para explorar o objeto novo de textura diferente (ON1) e para avaliação da memória à longo prazo foi observado o tempo gasto pelo animal para explorar o objeto novo de textura diferente (ON2), 24 h após a primeira exposição, no dia 3. As sessões foram filmadas com uma câmera de vídeo e a cada animal testado o aparelho foi limpo, antes de iniciar e depois de concluído o teste, com solução de álcool a 10%. O resultado da taxa de exploração foi calculado para cada animal e expresso pela razão $TN/(TF + TN)$ (TN = tempo gasto explorando o objeto novo; TF = tempo gasto explorando o objeto familiar (GUSTAVSSON et al., 2010; D'ÁVILA, 2017).

3.9 AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA

No último dia de experimento, após o desmame para as lactantes e após os testes comportamentais para a prole (T45 e T90), os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma mistura de Cloridrato de Ketamina + Cloridrato de Xilasina (1 mg/kg de peso do animal), que correspondeu a uma dose de 50 mg/kg de peso de Cloridrato de Ketamina e 20 mg/kg de peso de Cloridrato de Xilasina. Após anestesia foram aferidos o Peso corporal,

Comprimento naso-anal, Comprimento da cauda, Circunferências abdominal (CA), Torácica (CT) e calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) (NOVELLI et al., 2007).

3.10 EUTANÁSIA, PESO DOS ÓRGÃOS E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Sob anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca e utilizado para determinações bioquímicas. Em seguida, foram retirados e pesados, o cérebro e o fígado. O hemisfério esquerdo do cérebro da prole e parte do fígado das mães foram divididos em porções para análise de gorduras totais e composição de ácidos graxos. Para análise do conteúdo de malonaldeído (MDA) no fígado das mães os tecidos foram divididos manualmente em tiras, com a utilização de uma lâmina de bisturi. Do cérebro utilizou-se o hemisfério esquerdo e do fígado, o maior lobo. No fígado foram feitos cortes longitudinais no sentido antero-posterior. Os tecidos foram imediatamente pesados e colocados em uma superfície com gelo e em seguida foram mantidos em - 80 °C até o momento das análises.

3.11 ANÁLISE DO CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS TECIDUAIS E DO LEITE MATERNO

Nas mães, no último dia da lactação, para análise do conteúdo lipídico, o leite materno foi coletado e após eutanásia foram retiradas amostras do fígado. Da prole, para análise do conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos, foram retirados e analisados os cérebros no primeiro dia de vida (T0), ao desmame (T21), aos 45 (T45) e 90 dias de vida (T90). Todos os tecidos ficaram armazenados a - 20°C até o momento das análises.

O leite materno foi obtido no 21º dia de lactação, após jejum de 8 horas. As mães foram anestesiadas com uma mistura de Cloridrato de Ketamina + Cloridrato de Xilasina (1 mg/kg de peso do animal), que correspondeu a uma dose de 50 mg/kg de peso de Cloridrato de Ketamina e 20 mg/kg de peso de Cloridrato de Xilasina, e o leite materno coletado por ordenha manual, de acordo com metodologia adaptada de Keen et al. (1981). As mães foram separadas de sua prole por um período de 1 hora antes da ordenha e 5 minutos antes da mesma receberem injeção

intraperitoneal de 0,30 mL de ocitocina. A ordenha manual durou cerca de 20 a 30 minutos e o leite coletado foi acondicionado em um microtubo e, posteriormente, congelado em -20°C .

3.11.1 Teor de Gordura

Foram pesados 2 g de cada amostra em béquer de 50 mL (amostra úmida) e adicionado 30 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1). Após essa adição, foi feita a transferência do conteúdo para um recipiente de vidro fundo com as laterais cobertas com papel alumínio e foi feita a agitação por 2 minutos com auxílio do triturador. O triturado foi filtrado em papel de filtro qualitativo para uma proveta de 100 mL com boca esmerilhada. Em seguida, as paredes do recipiente foram lavadas com mais 10 mL da mistura clorofórmio:metanol que também foi filtrado junto com o volume anterior. Com a proveta tampada, foi anotado o volume do extrato filtrado da proveta e, posteriormente foi adicionado 20% do volume final do extrato filtrado, de sulfato de sódio a 1,5%. Em seguida, a proveta foi fechada, a mistura agitada e se deixou separar as fases. Observou-se que a fase superior ficou com aproximadamente 40% e a inferior com 60% do volume total. O volume da fase inferior foi anotado e, em seguida, a fase superior foi descartada por sucção com pipeta graduada. Para quantificação dos lipídios, foi tomada uma alíquota de 5 mL do extrato (fase inferior) com pipeta volumétrica e transferida para um béquer previamente tarado. Esse béquer foi posto em estufa a 105°C para que a mistura de solventes fosse evaporada, tendo cuidado para que a gordura não fosse degradada pelo calor. Aguardou-se o resfriamento em dessecador, o béquer foi pesado e obteve-se, por diferença, o peso do resíduo de gordura (FOLCH; LESS; STANLEY, 1957).

3.11.2 Transesterificação de ácidos graxos

No tratamento das amostras, a metilação dos ácidos graxos presentes nos extratos lipídicos foi realizada seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). Tomou-se uma alíquota do extrato lipídico, calculada para cada amostra, de acordo com a concentração de gordura encontrada na quantificação lipídica, realizada pelo método de Folch, Less e Stanley (1957), adicionando-se 1 mL do padrão interno (C19:0) e a solução de saponificação (KOH).

Posteriormente, essa solução foi levada para aquecimento em refluxo por 4 minutos. Imediatamente após esse tempo, foi adicionada a solução de esterificação, deixando a solução por mais 3 minutos em aquecimento e refluxo. Logo após, deixou-se a amostra esfriar para as subseqüentes lavagens com éter, hexano e água destilada, obtendo-se, ao final, um extrato (com os ésteres metílicos e os solventes), que foi acondicionado em vidro âmbar, devidamente codificado até secagem completa dos solventes. Após a secagem, fez-se a suspensão em 1 ml de hexano e o acondicionamento no vial.

3.11.3 Análise em cromatografia gasosa

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (VARIAN 430-GC, Califórnia, EUA), acoplado com coluna capilar de sílica fundida (CP WAX 52 CB, VARIAN, Califórnia, EUA) com dimensões de 60 mm x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme. Foi utilizado o hélio como gás de arraste (vazão de 1mL/min). A temperatura inicial do forno foi de 100 °C, com programação para atingir 240 °C, aumentando 2,5 °C por minuto, permanecendo por 30 minutos, totalizando 86 minutos de corrida. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C e a do detector em 260 °C. Alíquotas de 32 e 1,0 µL do extrato esterificado foram injetadas em injetor tipo Split/Splitless. Os cromatogramas foram registrados em software tipo Galaxie Chromatography Data System. Os resultados dos ácidos graxos foram quantificados por integração das áreas dos ésteres metílicos e expressos em percentual de área.

3.12 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O sangue das lactantes, após coletado, foi centrifugado a 7546 xg por 10 min (Centribio, modelo 80-2B, China) e o sobrenadante utilizado para dosar o colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), utilizando o conjunto de diagnósticos Labtest (Minas Gerais, Brasil): Colesterol Liquiform®, HDL- Liquiform®, Triglicérides Liquiform®. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (UV-VIS, modelo 5100, China) utilizando absorbância específica para cada teste (500nm – Colesterol Total e HDL / 505 nm - Glicemia, Triglicerídeos, AST e ALT).x

A concentração da fração de colesterol LDL foi calculada utilizando-se a fórmula de Friedewald ($LDL = COLEST\ TOTAL - (HDL + TG/5)$) (FRIEDEWALD, 1972). O índice aterogênico (IA) foi calculado segundo a equação: $IA = TGC/HDL-C$ (GAZIANO et al., 1997).

3.13 MARCADOR DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA HEPÁTICA

3.13.1 Malonaldeído (MDA)

A determinação do conteúdo de MDA foi realizada pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Após fragmentação do fígado, uma tira de cada tecido foi separada para esta análise, colocada em microtubo de 2,0 mL e levada ao congelamento a uma temperatura de - 80 °C. Para iniciar a determinação do MDA, as amostras do tecido foram descongeladas e posteriormente pesadas. Mediante o peso foi calculada a quantidade de tampão Tris HCl para cada amostra, utilizando-se a proporção de 1:5 (p/v). O tecido foi picado com uma tesoura por, aproximadamente 15 segundos, em meio resfriado. O material fragmentado foi triturado e homogeneizado a frio, sob ação de um triturador (Ultra Stirrer[®], Modelo: Ultra 80,), e a ele adicionado o tampão Tris HCl. O homogenato obtido foi centrifugado a 2500 xg por 10 min a 4 °C e 300 µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo, sendo adicionados 750 µL do reativo cromogênico e 225 µL de ácido clorídrico (HCl – 37%). Em seguida, o material foi colocado em banho-maria com agitação a 45 °C, durante 40 min e, posteriormente, levado à uma centrifugação a 2500 xg durante 5 min a 4 °C. Do sobrenadante, 300 µL foi transferido para microplaca de 96 poços, em duplicata, e levado para leitor de microplacas (Polaris, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) a um comprimento de onda de 586 nm. O conteúdo de MDA foi calculado através de interpolação em curva padrão com o 1,1,3,3 – tetraetoxipropano, o qual foi hidrolisado durante o passo de incubação com HCl a 45 °C, gerando o MDA. Os resultados foram expressos em nmoL/g tecido.

3.14 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. Porém, os resultados da ontogenia reflexa e desengajamento somático foram expressos em valores de mediana do dia (Min-Máx) e analisados por Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn's. Foi considerado o nível de significância para rejeição da hipótese nula de $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

ADA (American Dietetic Association). Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 109, p. 735–46, 2009.

AGOSTONI, C.; GALLI, C.; RIVA, E.; RISE, P.; COLOMBO, C.; GIOVANNINI, M.; MARANGONI, F. Whole blood fatty acid composition at birth: From the maternal compartment to the infant. **Clinical Nutrition**, v. 30, p. 503–505, 2011.

AJANI, A.; OLANREWAJU, B. O. Avocado pear fruits and leaves aqueous extracts inhibit α -amylase, α -glucosidase and snp induced lipid peroxidation—an insight into mechanisms involve in management of type 2 diabetes. **International Journal of Applied and Natural Sciences**, v. 3, p. 21–34, 2014.

ALBERT, B. B.; VICKERS, M. H.; GRAY, C.; REYNOLDS, C. M.; SEGOVIA, S. A.; DERRAIK, J. G. B.; GARG, M. L.; CAMERON-SMITH, D.; HOFMAN, P. L.; CUTFIELD, W. S. Fish oil supplementation to rats fed high-fat diet during pregnancy prevents development of impaired insulin sensitivity in male adult offspring. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5595, p. 1-11, 2017.

AL-DOSARI, M.S. Hypolipidemic and antioxidant activities of avocado fruit pulp on high cholesterol fed diet in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 1475–1483, 2011.

ALVIZOURI-MUNOZ, M.; CARRANZA-MADRIGAL, J.; HERRERA-ABARCA, J. E.; CHAVEZ-CARBAJAL, F.; AMEZCUA-GASTELUM, J. L. Effects of avocado as a source of monounsaturated fatty acids on plasma lipid levels. **Archives of Medical Research**, v. 23, p. 163–167, 1992.

AMEER, K. Avocado as a Major Dietary Source of Antioxidants and Its Preventive Role in Neurodegenerative Diseases. **Advances in Neurobiology**, v. 12, p. 337-54, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 20. ed. Washington: AOAC International, 2016, 3100 p.

AUGUSTINE, R. A.; LADYMAN, S. R.; GRATTAN, D. R. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. **Journal of Physiology**, v. 586.2, p. 387–397, 2008.

BARBOSA, F. F.; SANTOS, J. R.; MEURER, Y. S. R.; MACEDO, P. T.; FERREIRA, L. M. S.; PONTES, I. M. O.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Differential cortical c-Fos and Zif-268 expression after object and spatial memory processing in a standard or episodic-like object recognition task. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.7, n. 112, p. 1-12, 2013.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, n. 299, p. 15-27, 1999.

BERMUDEZ-RATTONI, F.; OKUDA, S.; ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J. L. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. **Learning & Memory**, v. 12, p. 447-449, 2005.

BLACK, M. M.; WALKER, S. P.; FERNALD, L. C. H.; ANDERSEN, C. T.; DIGIROLAMO, A. M.; LU, C.; McCOY, D. C.; FINK, G.; SHAWAR, Y. R.; SHIFFMAN, J.; DEVERCELLI, A. E.; WODON, Q. T.; VARGAS-BARÓN, E.; GRANTHAM-McGREGOR, S. Early childhood development coming of age: science through the life course. **Lancet**, v. 389, p. 77-90, 2017.

BORBA, J. M. C.; SILVA, M. S. P.; ROCHA-DE-MELO, A. P. **Lipids, Nutrition and Development**. In: Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products. p. 95, 2011.

BOURRE, J. M.; YOU YOU, A.; DURAND, G.; PASCAL, G. Slow recovery of the fatty acid composition of sciatic nerve in rats fed a diet initially low in ω -3 fatty acids. **Lipids**, v. 22, p. 535-538, 1987.

BOYLE, R. **The vestibular labyrinth in health and disease**. In: Vestibulospinal Control of Reflex and Voluntary Head Movement. Annals of the New York Academy of Sciences. New York, 2001, pp.364-380.

BRONNER, Y. L.; AUERBACH, K. G. **Maternal nutrition during lactation**. In: RIORDAN J. (ed.), Breastfeeding and human lactation (3^a ed.), p. 437-457, 2005.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L.; THORNBURG, K. L. Placental Origins of Chronic Disease. **Physiology Reviews**, v. 96, p. 1509-1565, 2016.

CADENA-BURBANO, E.V.; CAVALCANTI, C. C. L.; LAGO, A. B.; BENJAMIN, R. A. C.; OLIVEIRA, T. R. D. P.; SILVCA, J. M. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-12, 2017. doi: 10.1080/1028415X.2017.1354958

CALDAS, A. P. S.; CHAVES, L. O.; SILVA, L. L.; MORAIS, D. C.; ALFENAS, R. C. G. Mechanisms involved in the cardioprotective effect of avocado consumption: A systematic review. **International Journal of Food Properties**, 2017, v. 20, n. S2, S1675–S1685, 2017.

CAO, D.; KEVALA, K.; KIM, J.; MOON, H. S.; JUN, S. B.; LOVINGER, D.; KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, p. 510–521, 2009.

CARRANZA, J.; ALVIZOURI, M.; ALVARADO, M. R.; CHAVEZ, F.; GOMEZ, M.; HERRERA, J. E. Effects of avocado on the level of blood lipids in patients with phenotype II and IV dyslipidemias. **Archivos de Cardiologia de Mexico**, v. 65, p. 342–348, 1995.

CARRANZA-MADRIGAL, J.; HERRERA-ABARCA, J. E.; ALVIZOURI-MUNOZ, M.; ALVARADO-JIMENEZ, M. D. R.; CHAVEZ-CARBAJAL, F. Effects of a vegetarian diet vs. a vegetarian diet enriched with avocado in hyper-cholesterolemic patients. **Archives of Medical Research**, v. 8, n. 4, p. 537–41, 1997.

CAVALCANTE, T. C. F.; SILVA, J. M. L.; SILVA, A. A. M.; MUNIZ, G. S.; NETO, L. M. L.; SOUZA, S. L.; CASTRO, R. M.; FERRAZ, K. M.; NASCIMENTO, E. Effects of a Westernized Diet on the reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. **Lipids**, v. 48, p. 1157–1168, 2013.

CETIN, I.; LAORETI, A. The importance of maternal nutrition for health. **Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine**, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2015.

CHANG, C. Y.; KE, D. S.; CHEN, J. Y. Essential fatty acids and human brain. **Acta Neurologica Taiwanica**, v. 18, n. 4, p. 231-241, 2009.

CHAVAN-GAUTAM, P.; RANI, A.; FREEMAN, D. J. Distribution of Fatty Acids and Lipids During Pregnancy. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 84, p. 209 – 237, 2018.

CLANDININ, M. T.; CHAPPELL, J. E.; LEONG, S.; HEIM, T.; SWYER, P. R.; CHANCE, P. W. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. **Early Human Development**, v. 41, p. 121-129, 1980.

COWAN, N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **Progress in Brain Research**, v. 169, p. 323-338, 2008.

DAHLGREN, J. Pregnancy and insulin resistance. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 4, n. 2, p. 149-52, 2006.

DARMADY, J. M; POSTLE, A. D. Lipid metabolism in pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 89, p. 211–15, 1982.

DAS, U. N. Can memory be improved? A discussion on the role of ras, GABA, acetylcholine, NO, insulin, TNF- α , and long-chain polyunsaturated fatty acids in memory formation and consolidation. **Brain and Development**, n. 25, p. 251–261, 2003.

DAUM, I.; ACKERMANN, H. Nondeclarative memory--neuropsychological findings and neuroanatomic principles. **Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie**, v. 65, n. 3, p. 122-132, 1997.

D'AVILA, L. F.; DIAS, V. T.; VEY, L. T.; MILANESI, L. H.; ROVERSI, K.; EMANUELLI, T.; BÜRGER, M. E.; TREVIZOL, F. TOXICOLOGICAL ASPECTS OF INTERESTERIFIED FAT: Brain damages in rats. **Toxicology Letters**, v. 5, n. 276, p. 122-128, 2017.

DEL TORO-EQUIHUA, M.; VELASCO-RODRÍGUEZ, R.; LOPE-ASCENCIO, R. L.; VASQUEZ, C. Effect of an avocado oil-enhanced diet (*Persea americana*) on sucrose-induced insulin resistance in Wistar rats. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 4, n. 2, p. 350-357, 2016.

DÍAZ PERILLA, M.; ANDREA TORO, C. Efecto De La Adición De Aguacate a La Alimentación Habitual Sobre Los Niveles De Lípidos En Personas Con Dislipidemia. **Universitas Scientiarum**, v. 9, n. 2, p. 49–58, 2004.

DING, H.; HAN, C.; GUO, D.; CHIN, Y. W.; DING, Y.; KINGHORN, A. D.; D'AMBROSIO, S. M. Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. **Nutrition and Cancer**, v. 61, p. 348–356, 2009.

DOBBING, J. **Vulnerable periods in developing brain**. In: Davison AN, Dobbing J. (eds) *Applied Neurochemistry*, Oxford: Blackwell, 1968; 287–316.

DONADIO, L. C. **Abacate para exportação: aspectos técnicos da produção**. 2.ed. rev. amp. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 53 p.

DOUGLAS, A.J.; JOHNSTONE, L.E.; LENG, G. Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. **Physiology & Behavior**, v. 91, p. 352–365, 2007.

DREHER, M. L.; DAVENPORT, A. J. Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 738–750, 2013.

DRISDEL, R. C.; ALEXANDER, J. K.; SAYEED, A.; GREEN, W. N. Assays of protein palmitoylation. **Methods**, v. 40, n. 2, p. 127-134, 2006.

DUMOLT, J. H.; RADHAKRISHNAN, S. K.; MOGHADASIAN, M. H.; LE, K.; PATEL, M. S.; BROWNE, R. W.; RIDEOUT, T. C. Maternal hypercholesterolemia enhances oxysterol concentration in mothers and newly-weaned offspring but is attenuated by maternal phytosterol supplementation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 52, p. 10-17, 2018.

EL-HUSSEINI, A.; BREDT, D. S. Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 10, p.791-802, 2002.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, 47–59, 1988.

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

FAO (**Food and Agriculture Organization**). The Outlook for Agriculture and Rural Development in the Americas: A Perspective on Latin America and the Caribbean 2017- 2018 / ECLAC, FAO, IICA. – San Jose, C.R.: IICA, 2017. 152 p. Disponível em <http://www.fao.org> Acesso em 07 de junho de 2018.

FERNANDES, F. S.; SARDINHA, F. L. C.; BADIA-VILLANUEVA, M.; CARULLA, P.; HERRERA, E.; TAVARES DO CARMO, M. G. Dietary lipids during early pregnancy differently influence adipose tissue metabolism and fatty acid composition in pregnant rats with repercussions on pup's development. Prostaglandins, **Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 86, p. 167–174, 2012.

FERNANDES, F. S.; SOUZA, M. S. A. S.; CARMO, M. G. T.; BOAVENTURA, G. T. Maternal intake of flaxseed-based diet (*Linum usitatissimum*) on hippocampus fatty acid profile: Implications for growth, locomotor activity and spatial memory. **Nutrition**, v. 27, p. 1040–1047, 2011.

FERRARI, R. A. Nota Científica: Caracterização físico-química do óleo de abacate extraído por centrifugação e dos subprodutos do processamento Scientific Note: Physicochemical characterization of avocado oil extracted by centrifugation and of the process byproducts. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 79-84, 2015.

FERRAZ, A. C.; DELATTRE, A. M.; ALMENDRA, R. G.; SONAGLI, M.; BORGES, C.; ARAUJO, P.; MONICA, L.; ANDERSEN, S. T.; LIMA, M. M. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**, v. 219, p. 116–122, 2011.

FISCHER, I. H.; JÚNIOR, H. J. T.; ARRUDA, M. C.; JÚNIOR, N. S. M. Pós-colheita de abacates ‘Fuerte’ e ‘Hass’: características físicas e químicas, danos e controle de doenças. **Semina Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 209-220, 2011.

FLORES, M. A.; PEREZ-CAMINO, M. D. C.; TROCA, J. Preliminary studies on composition, quality and oxidative stability of commercial avocado oil produced in Chile. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 4, p. 21-26, 2014.

FOERDE, K.; SHOHAMY, D. The role of the basal ganglia in learning and memory: Insight from Parkinson's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 4, p. 624–636, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2, p. 234-241, 1965.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifug. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, 499-502, 1972.

GARBAY, B.; HEAPE, A. M.; SARGUEIL, F.; CASSAGNE, C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, n. 61, p. 267–304, 2000.

GATES, L.; LANGLEY-EVANS, S. C.; KRAFT, J.; LOCK, A. L.; SALTER, A. M. Fetal and neonatal exposure to trans-fatty acids impacts on susceptibility to atherosclerosis in apo E*3 Leiden mice. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 3, p. 377-385, 2017.

GAZIANO, J. M.; HENNEKENS, C. H.; O'DONNELL, C. J.; BRESLOW, J. L.; BURING, J. E. **Circulation**, v. 96, n. 8, p. 2520-2525, 1997.

GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85 (suppl.), p. 614S-620S, 2007.

GONZÁLEZ, H. F.; VISENTIN, S. Biochemist Nutrients and neurodevelopment: Lipids. Update. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 114, n. 5, p. 472-476 2016.

GOW, R. V.; HIBBELN, J. R. Omega-3 Fatty Acid and Nutrient Deficits in Adverse Neurodevelopment and Childhood Behaviors. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, p. 555–590, 2014.

GOYAL, M.S.; IANNOTTI, L.L.; RAICHLE, M.E. Brain Nutrition: A Life Span Approach. **Annual Review of Nutrition**, v. 38, p. 17.1-17.19, 2018.

GUSTAVSSON, M.; HODGKINSON, S. C.; FONG, B.; NORRIS, C.; GUAN, J.; KRAGELOH, C. U.; BREIER, B. H.; DAVISON, M.; MCJARROW, P.; VICKERS, M. H. Maternal supplementation with a complex milk lipid mixture during pregnancy and lactation alters neonatal brain lipid composition but lacks effect on cognitive function in rats. **Nutrition Research**. v. 30, p. 279–289, 2010.

GUZMÁN-RODRIGUEZ, J. J.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 620-627, 2016.

HAGGARTY, P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth—a review. **Placental**, v. 23, Suppl. A, p. S28–38, 2002.

HARTMAN, L., LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, London, v. 22, p. 475-476, 1973.

HAUSMAN, D. B.; MCCLOSKEY, H. M.; MARTIN, R. J. Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weanling rats. **Nutrition Journal**, v. 121, n. 12, p. 1917-23, 1991.

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54 (Suppl. 1), p. S47–51, 2000.

HERRERA, E.; AMUSQUIVAR, E.; LÓPEZ-SOLDADO, I.; ORTEGA, H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. **Hourmone Research**, v. 65, Suppl 3, p. 59-64, 2006.

HIGBY, W.K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 27, p. 42-49, 1962.

HUANG, Y.; PARK, E.; XIAO, D.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. B. The Impact of Avocado Fruit on Postprandial Satiety: an Acute Dose Response Study. **The FASEB Journal**, v. 31, n.1, 2017.

INNIS, S. M. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 554, p. 27–43, 2004.

INNIS, S. M. Essential Fatty Acid Transfer and Fetal Development. **Placenta**, v. 26, p. S70-75, 2005.

INNIS, S. M. Dietary (ω -3) Fatty Acids and Brain Development. **The Journal of Nutrition Development Neuroscience**, v. 137, p. 855-859, 2007.

INNIS, S. M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **Am Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, p. 734S–41S, 2014.

JOHNSON, E.; MARAS, J. E.; RASMUSSEN, H. M.; TUCKER, K. L. Intake of lutein and zeaxanthin differ with age, sex and ethnicity. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, p. 1357–1362, 2010.

KALLIO, M. J.; SIIMES, M. A.; PERHEENTUPA, J.; SALMENPERA, L.; MIETTINEN, T. A. Serum cholesterol and lipoprotein concentrations in mothers during and after prolonged exclusive lactation. **Metabolism**, v. 41, p. 1327–30, 1992.

KART-TEKE, E.; DE SOUZA SILVA, M. A.; HUSTON, J. P.; DERE, E. Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 2, p. 173–182, 2006.

KAVRAAL, S.; ONCU, S. K.; BITIKTAS, S.; ARTIS, A. S.; DOLU, N.; GUNES, T.; SUER, C. Maternal intake of Omega-3 essential fatty acids improves long term potentiation in the dentate gyrus and Morris water maze performance in rats. **Brain Research**, v. 1482, p. 32-39, 2012.

KEEN, C. L., LONNNERDAL, B., CLEGG, M., HURLEY, L. S. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. **Journal Nutrition**, v. 11, p. 226-230, 1981.

KINOSHITA, T.; ITOH, M. Longitudinal Variance of Fat Mass Deposition during Pregnancy Evaluated by Ultrasonography: The Ratio of Visceral Fat to Subcutaneous Fat in the Abdomen. **Gynecology Obstetric Investigation**, v. 61, p. 115-118, 2006.

KOLETZKO, B.; CARLSON, S. E.; VAN-GOUDOEVER, J. B. Should Infant Formula Provide Both Omega-3 DHA and Omega-6 Arachidonic Acid? **Annals of Nutrition and Metabolism Journal**, v. 66, n. 2-3, p. 137-138, 2015.

KOMINIAREK, M. A.; RAJAN, M. A. Nutrition Recommendations in Pregnancy and Lactation. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 6, p. 1199-1215, 2016.

KOPEC, R. E.; COOPERSTONE, J. L.; SCHWEIGGERT, R. M.; YOUNG, G. S.; HARRISON, E. H.; FRANCIS, D. M.; CLINTON, S. K.; SCHWARTZ, S. J. Avocado Consumption Enhances Human Postprandial Provitamin a Absorption and Conversion from a Novel High-Beta-Carotene Tomato Sauce and from Carrots. **Journal Nutrition**, v. 144, n. 8, p. 1158-1166, 2014.

KRETCHMER, N.; BEARD, J.L.; CARLSON, S. The role of nutrition in the development of normal cognition. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 63, n; 6, p. 997S-1001S, 1996.

LAGERCRANTZ, H. Connecting the brain of the child from synapses to screen-based activity. **Acta Paediatrica**, v. 105, n. 4, p. 352-357, 2016.

LAROCQUE, J. J.; EICHENBAUM, A. S.; STARRETT, M. J.; ROSE, N. S.; EMRICH, S. M.; POSTLE, B. R. The short- and long-term fates of memory items retained outside the focus of attention. **Memory & Cognition**, v. 43, n. 3, p. 453-468, 2015.

LAURITZEN, L., HANSEN, H. S., JORGENSEN, M. H., MICHAELSEN, K. F. The essentiality of long chain ω -3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 1, p. 1-94, 2001.

LAURITZEN, L.; CARLSON, S. E. Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. **Maternal & Child Nutrition**, v. 7, Suppl. 2, p. 41–58, 2011.

LeDOUX, J. E. L. Emotional memory systems in the brain. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 69-79, 1993.

LÉPINAY, L.; LARRIEU, T.; JOFFRE, C.; ACAR, N.; GÁRATE, I.; CASTANON, N.; FERREIRA, G.; LANGELIER, B.; GUESNET, P.; BRÉTILLON, L.; PARNET, P.; LAYÉ, S.; DARNAUDÉRY, M. Perinatal high-fat diet increases hippocampal vulnerability to the adverse effects of subsequent high-fat feeding. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, 82–93, 2015.

LERMAN-GARBER, I.; ICHAZO-CERRO, S.; ZAMORA-GONZALEZ, J.; CARDOSO-SALDANA, G.; POSADAS-ROMERO, C. Effect of a high-monounsaturated fat diet enriched with avocado in NIDDM patients. **Diabetes Care**, v. 17, n. 4, p. 311–315, 1994.

LIPPI, G.; ALBIERO, A.; MONTAGNA, M.; SALVAGNO, G. L.; SCEVAROLLI, S.; FRANCHI, M.; GUIDI, G. C. Lipid and lipoprotein profile in physiological pregnancy. **Clinical Laboratory**, v. 53, p. 173–77, 2007.

LIU, M.; LI, X. Q.; WEBER, C.; LEE, C. Y.; BROWN, J.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2926–2930, 2002.

LOPEZ-LEDESMA, R.; FRATI MUNARI, A. C.; HERNANDEZ-DOMINGUEZ, B. C. Monounsaturated fatty acid (avocado) rich diet for mild hypercholesterolemia. **Archives of Medical Research**, v. 27, p. 519–523, 1996.

LÓPEZ-SOLDADO, I.; ORTEGA-SENOVILLA, H.; HERRERA, E. Maternal adipose tissue becomes a source of fatty acids for the fetus in fasted pregnant rats given diets with different fatty acid compositions. **European Journal Nutrition**, p. 1-12, 2017.

LU, Q.Y.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; LEE, R.-P.; GAO, K.; BYRNS, R.; HEBER, D. California Hass Avocado: Profiling of carotenoids, tocopherols, fatty acids, and fat content during maturation and from different growing areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10408–10413, 2009.

LYNCH, G.; SMART, J. L.; DOBBING, J. Motor coordination and cerebellar size in adults undernourished in early life. **Brain Research**, v. 83, p. 249-259, 1975.

MADORE, C.; NADJAR, A.; DELPECH, J. C.; SERE, A.; AUBERT, A.; PORTAL, C.; JOFRE, C.; LAYÉ, S. Nutritional deficiency ω -3 PUFA during the perinatal period alters the innate immune system and the brain associated with neuronal plasticity genes. **Brain Behavioural Immunity**, v. 13, p. 0889-1591, 2014.

McCANCE; WIDDOWSON'S. **The Composition of Foods, Sixth summary edition**. Food Standards Agency (2002). Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-428-0.

MAKRIDES, M.; COLLINS C. T.; GIBSON R. A. Impact of fatty acid status on growth and neurobehavioural development in humans. **Maternal and Child Health**, v. 7, p. 80–88, 2011.

MAKRIDES, M.; NEUMANN, M. A.; BYARD, R. W.; SIMMER, K.; GIBSON, R. A. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 189–194, 1994.

MALEK, L.; MAKRIDES, M. Nutrition in Pregnancy and Lactation. In: Koletzko B, et al. (eds), Nutrition of Healthy Infants, Children and Adolescents. Pediatric Nutrition in Practice. **World Review of Nutrition and Dietetics**. v. 113, p. 127–133, 2015.

MANDUCA, A.; BARA, A.; LARRIEU, T.; LASSALLE, O.; JOFFRE, C.; LAYÉ, S.; MANZONI, O. J. Amplification of mGlu5-Endocannabinoid Signaling Rescues Behavioral and Synaptic Deficits in a Mouse Model of Adolescent and Adult Dietary Polyunsaturated Fatty Acid Imbalance. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 29, p. 6851-6868, 2017.

McNAMARRA, J. P.; HUBER, K. Metabolic and Endocrine Role of Adipose Tissue During Lactation. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 6, p. 177-195, 2018.

MEDEIROS, M. C.; AQUINO, J. S.; SOARES, J.; FIGUEIROA, E. B.; MESQUITA, H. M.; PESSOA, D. C.; STAMFORD, T. M. Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 7-13, 2015.

MEDINA, J. M.; TABERNERO, A. The neurotrophic effect of oleic acid: implications for olive oil in health and disease. In: Preedy VR, Watson RR (eds) Olives and olive oil in health and disease prevention. **Academic Press**, New York, p. 1405–1412, 2010.

MELO, M. F. F. T.; PEREIRA, D. E.; SOUSA, M. M.; MEDEIROS, D. M. F.; LEMOS, L. T. M.; MADRUGA, M. S.; SANTOS, N. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; MENEZES, C. C.; SOARES, J. K. B. Maternal intake of cashew nuts accelerates reflex maturation and facilitates memory in the offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 61, p. 58–67, 2017.

MENDES-DA-SILVA, C.; GIRIKO, C. A.; MENNITTI, L. V.; HOUSOUME, L. F.; SOUTO, T. S. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. **Arquivos de Neurologia Psiquiátrica**, v. 72, n. 2, 2014.

MENNITTI, L. V.; OLIVEIRA, L. J.; MORAIS, C. A.; ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; NASCIMENTO, C. M. O; PISANI, L. P. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 99-111, 2015.

MENNITTI, L. V.; OYAMA, L. M.; SANTAMARINA, A. B.; PENHA, C. M.; NASCIMENTO, O.; PISANI, L. P. Early exposure to distinct sources of lipids affects differently the development and hepatic inflammatory profiles of 21-day-old rat offspring. **Journal of Inflammation Research**, v. 11, p. 11–24, 2018.

MONIKA, P.; GEETHA, A. Effect of hydroalcoholic fruit extract of *Persea americana* Mill. on high fat diet induced obesity: a dose response study in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 54, p. 370–378, 2016.

MORENO, A. O.; DORANTES, L.; GALÍNDEZ, J.; GUZMÁN R. I. Effect of diferente extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2216-2221, 2003.

MORGANE P. J; KEMPLER, T.; STERN, W.; HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, O. The effect of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978.

MORGANE P. J; MILLER, M.; KEMPLER, T.; STERN, W.; FORBES W.; HAL R.; BRONZINO, J.; KISSANE J. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience Behavioral Review**, v. 17, p. 91-128, 1993.

MORGANE, J. P.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 471–483, 2002.

MUMBY, D. G.; TREMBLAY, A.; LECLUSEM V.; LEHMANN, H. Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. **Hippocampus**, v. 15, n. 8, p.1050-6, 2005.

NAKASHIMA, Y. Fish-Oil High-Fat Diet Intake of Dams after Day 5 of Pregnancy and during Lactation Guards against Excessive Fat Consumption of Their Weaning Pups. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 54, p. 46–53, 2008.

NAVA-MESA, M. O.; LAMPREA, M. R.; MÚNERA, A. Divergent short- and long-term effects of acute stress in object recognition memory are mediated by endogenous opioid system activation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 106, p. 185-192, 2013.

NOVELLI, E. L. B; FERNANDES, A.; GALHARDI, M. C.; CICOGNA, A. C.; DINIZ, Y.; RODRIGUES, G. H. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.41, n. 12, p. 111-119, 2007.

OPITZ, B. Memory function and the hippocampus. **Frontiers of Neurology and Neuroscience**, v. 34, p. 51-59, 2014.

ORTIZ-AVILA, O.; ESQUIVEL-MARTÍNEZ, M.; OLMOS-ORIZABA, B. E.; AAVEDRAMOLINA, A.; RODRIGUEZ-OROZCO, A. R.; CORTÉS-ROJO, C. Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

ORTIZ-MORENO, A.; HERNANDEZ-NAVARRO, M.; DORANTES-ALVAREZ, L.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; HERNANDEZ-ORTEGA, M. **Comparative study of the hypolipidemic effect induced by different monounsaturated avocado oils**. In: PROCEEDINGS VI WORLD AVOCADO CONGRESS (ACTS VI CONGRESO MUNDIAL DEL AGUACATE). Vina Del Mar, Chile. pp. 12–16, 2007.

OZIAS, M. K.; CARLSON, S.E.; LEVANT, B. Maternal parity and diet (n-3) polyunsaturated fatty acid concentration influence accretion of brain phospholipid docosahexaenoic acid in developing rats. **Journal Nutrition**, v. 137, n. 1, p. 125-129, 2007.

PAGE, K. C.; JONES, E. K.; ANDAY, E. K. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. **American Journal of Physiology-Regulatory**, v. 306, p. R527–R537, 2014.

PAHUA-RAMOS, M.E.; GARDUÑO-SICILIANO, L.; DORANTES-ALVAREZ, L.; GERMAN CHAMORRO-CEVALLOS, G.; HERRERA-MARTÍNEZ, J.; OSORIO-ESQUIVEL, O.; ORTIZ-MORENO, A. Reduced-calorie Avocado Paste Attenuates Metabolic Factors Associated with a Hypercholesterolemic-high Fructose Diet in Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 18–24, 2014.

PANIAGUA, J. A.; DE LA SACRISTANA, A. G.; SANCHEZ, E.; ROMERO, I.; VIDAL-PUIG, A. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 5, p. 434–444, 2007.

PARRY, J.; SU, L.; LUTHER, M.; ZHOU, K.; YURAWECZ, M. P.; WHITTAKER, P.; YU, L. Fatty Acid Composition and Antioxidant Properties of Cold-Pressed Marionberry, Boysenberry, Red Raspberry, and Blueberry Seed Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 566-573, 2005.

PERRINE, C. G.; NELSON, J. M.; CORBELLI, J.; SCANLON, K. S. Lactation and Maternal Cardio-Metabolic Health. **The Annual Review of Nutrition**, v. 35, p. 15.1–15.19, 2016.

PINHEIRO, R.O.; LINS, P.P.; CARVALHO, J.L.P.; ARAÚJO, E.V.; ALVES, A.F.; PEREIRA, R.A.; TOSCANO, L.T.; SILVA, A.S.; SOUZA, E.L.; ALVES, J.L.B.; AQUINO, J.S. Maternal dyslipidaemic diet induces sex-specific alterations in intestinal function and 2 lipid metabolism in rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 7, p. 721-734, 2019.

PIPE, N.G.J.; SMITH, T.; HALLIDAY, D.; EDMONDS, C.J.; WILLIAMS, C.; COLTART, T. M. Changes in fat, fat-free mass and body water in human normal pregnancy. **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 86, n. 12, p. 929-940, 1979.

POLO-HERNÁNDEZ, E.; TELLOA, V.; ARROYOA, A. A.; DOMÍNGUEZ-PRIETO, F. C.; DOMÍNGUEZ-PRIETO, F. C.; TABERNERO, A.; MEDINA, J. M. Oleic acid synthesized by stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) in the lateral periventricular zone of the developing rat brain mediates neuronal growth, migration and the arrangement of prospective synapses. **Brain Research**, v. 1570, p. 13-25, 2014.

PRIEGO, T.; SÁNCHEZ, J.; GARCÍA, A. P.; PALOU, A.; PICO, C. Maternal Dietary Fat Affects Milk Fatty Acid Profile and Impacts on Weight Gain and Thermogenic Capacity of Suckling Rats. **Lipids**, v. 48, p. 481–495, 2013.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 396-402, 2000.

QURESHI, I. A. XI, X. R.; LIMBU, Y. R.; BIN, H. Y.; CHEN, M. I. Hyperlipidaemia during normal pregnancy, parturition and lactation. **Annals Academy of Medicine Singapore**, v. 28, p. 217–21, 1999.

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**, v. 237, p. 283–289, 2013.

RAMOS, M. P.; CRESPO-SOLANS, M. D.; CAMPO, S.; CACHO, J.; HERRERA, E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. **American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism**, v. 285, p. E318–28, 2003.

REDDY, K. V. K.; NAIDU, K. A. Maternal supplementation of α -linolenic acid in normal and protein-restricted diets modulate lipid metabolism, adipose tissue growth and leptin levels in the suckling offspring. **European Journal of Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 761-70, 2015.

RIDEOUT, T. C.; MOVSESIAN, M. C.; TSAI, Y.; IQBAL, A.; RASLAWSKY, A.; PATEL, M. Maternal Phytosterol Supplementation during Pregnancy and Lactation Modulates Lipid and Lipoprotein Response in Offspring of apoE Deficient Mice. The **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 8, p. 1728-1734, 2015.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, p. 835-853, 2001.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; CASTRO-RODRÍGUEZ, D. C.; ZAMBRANO, E. Pregnancy and Lactation: A Window of Opportunity to Improve Individual Health. In: Paul C. Guest (ed.). *Investigations of Early Nutrition Effects on Long-Term Health: Methods and Applications*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1735, p. 115-144, 2018.

SÁNCHEZ-BLANCO, C.; AMUSQUIVAR, E.; BISPO, K.; HERRERA, E. Influence of cafeteria diet and fish oil in pregnancy and lactation on pups' body weight and fatty acid profiles in rats. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 4, p. 1741-53, 2016.

SANTILLÁN, M. E.; VINCENTI, L. M.; MARTINI, A. C.; CUNEO, M. F.; RUIZ, R. D.; MANGEAUD, A.; STUTZ, G. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different u-6:u-3 ratios in mice. **Nutrition**, v. 26, p. 423–431, 2010.

SHEHATA, M. M. S. M.; SOLTAN, S. S. A. Effects of Bioactive Component of Kiwi Fruit and Avocado (Fruit and Seed) on Hypercholesterolemic Rats. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 8, n. 1, p. 82-93, 2013.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of Developing Brain. 1i. Effects of Early Nutritional Deprivation on Reflex Ontogeny and Development of Behaviour in the Rat. **Brain Research**, v. 28, n.1, p. 85-95, 1971.

SMITH, J. L.; LEAR, S. R.; FORTE, T. M.; KO, W.; MASSIMI, M.; ERICKSON, S. K. Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. **Journal Lipid Research**, v. 39, n. 11, p. 2237-49, 1998.

SOARES, A. K. F; GUERRA, R. G. S.; CASTRO, M. L.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R. C. A.; CABRAL-FILHO, J. E.; COSTA, J. A.; MEDEIROS, M. C. Somatic and reflex development in suckling rats: effects of mother treatment with ketogenic diet associated with lack of protein, **Nutrition Neuroscience**, v. 12, p. 260-266, 2009.

SOARES, J. K. B.; MELO, A. P. R.; MEDEIROS, M.; QUEIROGA, R. C. R. E.; BOMFIM, M. A. D.; SANTIAGO, E. C. A.; GUEDES, R. C. A. Anxiety behavior is reduced, and physical growth is improved in the progeny of rat dams that consumed lipids from goat milk: An elevated plus maze analysis. **Neuroscience Letters**, v. 552, p. 25– 29, 2013.

SOARES, J. K. B.; QUEIROGA, R. C. R. E.; BOMFIM, M. A. D.; PESSOA, D. C. N. P.; BARBOSA, E. A.; SOUZA, D. L.; CABRAL-FILHO, J. E.; MEDEIROS, M. C. Acceleration of reflex maturation and physical development in suckling rats: effects of a maternal diet containing lipids from goat milk. **Nutritional Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 01-06, 2014.

SOMOGY, P.; TAMAS, G.; LUJAN, R.; BUHL, E. H. Salient features of synaptic organization in the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 26, p. 113-135, 1998.

SONAGRA, A. D.; BIRIDAR, S. M.; DATTATREYA, K.; JAYAPRAKASH-MURTHY, D. S. Normal Pregnancy- A State of Insulin Resistance. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 11, p. CC01–CC03, 2014.

SOUZA, M. S. A. S.; ROCHA, M. S.; CARMO, M. G. T. Effects of a normolipidic diet containing trans fatty acids during perinatal period on the growth, hippocampus fatty acid profile, and memory of Young rats according to sex. **Nutrition**, v. 28, p. 458–464, 2012.

STADDON, J. E. R.; CHELARU, I. M.; HIG, J. J. Habituation, memory and the brain: the dynamics of interval timing. **Behavioral Processes**, v. 57, p. 71-88, 2002.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

SUZUKI, S.; HONGLI, Q.; OKADA, A.; KASAMA, T.; OHTA, K.; WARITA, K.; TANAKA, K.; MIKI, T.; TAKEUCHI, Y. BDNF-Dependent Accumulation of Palmitoleic Acid in CNS Neurons. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, p. 1367–1373, 2012.

TABESHPOUR, J.; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. Effects of Avocado (*Persea americana*) on Metabolic Syndrome: A Comprehensive Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 819-837, 2017.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R.; LIMONTA, S. N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 17-23, 2004.

TEIXEIRA, C. G. et al. **Abacate: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos**. 2a. ed. Série Frutas Tropicais n° 8, ITAL, Campinas, 1995.

TENTOLOURIS, N.; ARAPOSTATHI, C.; PERREA, D.; KYRIAKI, D.; REVENAS, C. Differential effects of two isoenergetic meals rich in saturated or monounsaturated fat on endothelial function in subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, p. 2276–2278, 2008.

TORRES, D. O.; DOS SANTOS, A. C.; SILVA, A. K.; LEITE, J. I.; DE SOUZA, J. R.; BELTRÃO, E. I.; PEIXOTO, C. A. Effect of maternal diet rich in omega-6 and omega-9 fatty acids on the liver of LDL receptor-deficient mouse offspring. **Birth Defects Research Part B Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 89, n. 2, p. 164–70, 2010.

TORRES, L.R.O.; SANTANA, F.C.; TORRES-LEAL, F.L.; MELO, I.L.; YOSSHIME, L.T.; MATOS-NETO, E.M.; SEELAENDER, M.C.; ARAÚJO, C.M.; COGLIATE, B.; MANCINI-FILHO, J. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 205-216, 2016.

UAUY, R.; DANGOUR, A. D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. **Nutrition Reviews**, v. 64, p. S24–33, 2006.

USDA (U.S. Department of Agriculture) (2015) Avocado, almond, pistachio and walnut Composition. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, DC. 2015.

VADIVEL, V.; PUGALENTHI, M. Studies on the incorporation of velvet bean (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) as an alternative protein source in poultry feed and its effect on growth

performance of broiler chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 7, p. 1367-1376, 2010.

VÁZQUEZ, A.; ESTER, H.; SORALYS, C.; ROSA, L.; INCIARTE, G.; COROMOTO, L. Efecto Del Consumo De Aguacate (*Persea americana* Mill.) Sobre El Perfil Lipídico En Adultos Con Dislipidemia Effect of Consumption of Avocado (*Persea americana* Mill.) on the Lipid Profile in Adults with Dyslipidemia. **Anales Venezolanos de Nutrición**, v. 22, n. 2, 84–89, 2009.

VELASCO, C. P. **Impacto da restrição de ácidos graxos essenciais na manutenção das conexões retinotectais de roedores**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2009.

WANG, L.; BORDI, P. L.; FLEMING, J. A.; HILL, A. M.; KRIS-ETHERTON, P. M. Effect of a Moderate Fat Diet with and without Avocados on Lipoprotein Particle Number, Size and Subclasses in Overweight and Obese Adults: A Randomized, Controlled Trial. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 1, e001355– e001355, 2015.

WEISER, M. J.; BUTT, C. M.; MOHAJERI, M. H. 2016. Docosahexaenoic acid and cognition throughout the lifespan. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1-40, 2016.

WINTERS; B. D.; BUSSEY, T. J. Glutamate Receptors in Perirhinal Cortex Mediate Encoding, Retrieval, and Consolidation of Object Recognition Memory. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4243-4251, 2005.

YANTY, N. A. M.; MARIKKAR, J. M. N.; LONG, K. Effect of varietal differences on composition and thermal characteristics of avocado oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 88, p. 1997- 2003, 2011.

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; MOSTOFISKY, D. I. Nutritional deficiencies in learning and cognition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 43, p. S22–S25, 2006.

YEHUDA, S. Polyunsaturated fatty acids as putative cognitive enhancers. **Medical Hypotheses**, v. 79, p. 456–461, 2012.

YETIMLER, B.; ULUSOY, G.; ÇELİK, T.; JAKUBOWSKA-DOĞRU, E. Differential effect of age on the brain fatty acid levels and their correlation with animal cognitive status in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 53–59, 2012.

YONG, L. C.; PETERSEN, M. R.; SIGURDSON, A. J.; SAMPSON, L. A.; WARD, E.M.; SAMPSON, L. A. High dietary antioxidant intakes are associated with decreased chromosome translocation frequency in airline pilots. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 90, n. 5, p. 1402-1410, 2009.

ZHANG, M.J.; ZHU, C.Z.; DUAN, Z.M.; NIU, X. Applying the extensor digitorum reflex to neurological examination. **Journal of Nippon Medical School**, v. 77, n. 5, p. 250-253, 2010.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese estão apresentados em forma de dois Artigos Científicos originais que foram submetidos a periódicos de alto fator de impacto.

ARTIGO I: Biochemical profiles and hepatic lipid peroxidation of lactating rats supplemented with avocado.

(Submetido ao periódico: American Journal of Obstetrics & Gynecology. Fator de impacto: 5.73 - Qualis A1)

ARTIGO II: Maternal Supplementation with avocado (*Persea americana* Mill.) Pulp and Oil Alters Reflex Maturation, Physical Development, and Offspring Memory in Rats.

(Publicado no periódico: Frontiers in Neuroscience. Fator de impacto: 3.56 - Qualis A1)

ARTIGO I**BIOCHEMICAL PROFILES AND HEPATIC LIPID PEROXIDATION OF LACTATING
RATS SUPPLEMENTED WITH AVOCADO****(Submetido ao periódico: American Journal of Obstetrics & Gynecology.****Fator de impacto: 5.73 - Qualis: A1)**

Biochemical profiles and hepatic lipid peroxidation of lactating rats supplemented with avocado

Marília MELO, MS^{1,2}, Maria Elieidy OLIVEIRA, PhD^{1,3}, Elisiane SILVA, Mrs², Renally Moura, Mrs², Rita de Cássia BIDÔ, MS^{1,2}, Gerlane GUERRA, PhD⁴, Daline ARAÚJO, PhD⁵, Flávio MELO, MD⁶, Michelly QUEIROZ, MS^{1,2}, Vanessa VIERA, PhD⁷, Juliana Kessia SOARES, PhD^{2,7}

¹Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil; ²Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Brazil; ³Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil; ⁴Departamento de Biofísica e Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil; ⁵Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Brazil; ⁶Banco de Leite Humano, Hospital Regional de Guarabira, Guarabira, Brazil; ⁷Laboratório de Bromatologia, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Brazil.

Corresponding Author:

Marília Melo, MS.
Laboratório de Nutrição Experimental
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Campina Grande
Sítio Olho d'Água da Bica, S/N
58175-000 Cuité – Paraíba, Brazil

Email: mariliafrazao@hotmail.com

Phone: +55 83 3372-1900

Conflicts of Interest: The authors reports no conflict of interest.

Funding Source: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES)–Finance Code 001.

Number of Pages: 31 pages

Number of Figures: 05

Abstract

Background: Nutrition can influence the maintenance of healthy nutrient transport necessary for optimal fetal development. It has long term implications for maternal health, pregnancy outcomes, and metabolic disease risks. Avocado (*Persea americana* Mill.), an oleaginous fruit source of fatty acids and phytochemicals present various metabolic effects.

Objective: The objective of this study was to evaluate the impact of supplementation with avocado oil and pulp on murinometric and biochemical parameters, on retroperitoneal fat, and lipid peroxidation in lactating dams.

Materials and Methods: The rats were randomly divided into three groups (n = 8 dams/group) in accordance with gavage supplementation during gestation and lactation: Control group (CG) - distilled water; Avocado Oil group (AO) - 3000 mg avocado oil/kg animal weight, and Avocado Pulp group (AP) - 3000 mg avocado pulp/kg animal weight. Food intake, body weight, length, BMI, abdominal and thoracic circumference, organ and adipose tissue weights, and liver and breast milk lipid percentages were evaluated. Glycemia levels (GLIC), triglycerides (TGC), total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), glutamic oxalacetic transaminase (AST), glutamic pyruvic transaminase (ALT) and atherogenic index (IA) were evaluated. Hepatic malonaldehyde (MDA) was also analyzed. The results were analyzed and significant differences considered at $p < 0.05$.

Results: The AO and AP lactating dams presented reductions in food intake during gestation and lactation, with no change in body weight ($p < 0.05$). The murine parameters and the weights of the organs presented no significant differences ($p > 0.05$). Mesenteric fat increased in the AO as compared to the AP and CG dams ($p < 0.05$). Retroperitoneal fat decreased in the AP and AO dams as compared to the CG, however, the AP group presented a greater reduction than the AO group ($p < 0.05$). Both the pulp and oil groups presented reductions in GLIC, TGC, LDL, AST, and ALT biochemical parameters ($p < 0.05$). In the AO and AP groups HDL increased and AI decreased, with a reduction hepatic MDA as well ($p < 0.05$).

Conclusions: Maternal avocado supplementation maximized lipidic modulation throughout lactation, with positive results towards maintaining maternal health and reducing the risk of metabolic disease.

Keywords: *Persea americana*; lactating dams; murineometry; atherogenic index; lipid peroxidation.

Introduction

Nutrition is essential for the maintenance of maternal peri- and postnatal health.^{1,2} The maternal nutritional environment influences conception, maintenance of a healthy pregnancy, the transport of nutrients necessary for optimal fetal development,^{3,4} and has long term implications for maternal and offspring health and metabolic disease risks.⁵⁻⁸

During gestation, to supply fetal development, there is an increase in energy demand and an increase in nutritional requirements.⁹ In the early stages, metabolic adaptations are triggered in response to lipid demands and increased fat storage in maternal adipose tissue.¹⁰ The last trimester is characterized by a catabolic state, where greater lipolysis entails and accumulated maternal fat becomes available for placental transfer in order to satisfy fetal fatty acid demands¹¹. In this period, there is an increase in circulating plasma lipids.^{12,13,14}

The lactation period also presents increased nutritional requirements with metabolic increases,¹⁵ where substrates such as glucose, amino acids, triglycerides, and fatty acids are transported to the mammary glands from the tissue reserves. In this period, changes in the lipidic sources of the maternal diet cause important alterations in the total lipid content and maternal biochemical profile.^{12,6} Authors claim that lactation is a period in which a resetting of the alterations of lipid profile of pregnancy can occur, and this phenomenon is necessary for lowering the risk of future metabolic diseases development, such as cardiovascular diseases and metabolic syndrome.^{16,11}

Supplementation with differing lipid sources may have various consequences for maternal health.¹⁷⁻¹⁹ Avocado (*Persea americana* Mill.) has been noted, and is considered important²⁰ for its nutritive and bioactive components (phenolic compounds, phytosterols, and carotenoids).^{21,22} The many lipids can be extracted from the fruit, which contains in its composition an important quantity of oleic (ω -9) and palmitic (ω -7), polyunsaturated fatty acid linoleic fatty acid (ω -6) and a lesser quantity of linolenic (ω -3).^{23,22} Several studies point to the hypolipidemic, hypoglycemic, anti-obesity, cardioprotective and antioxidant effects of avocado.²⁴⁻²⁶ Given the nutritional quality of avocado, being a vegetable source, and the lack of information in the literature on the effects of avocado supplementation on maternal metabolism, we hypothesized that supplementation with avocado oil and/or pulp during gestation and lactation may benefit maternal health without altering physical parameters, improve body deposits while protecting the liver against lipid peroxidation towards the end of lactation. The objective of this study was to evaluate the impact of maternal supplementation

with avocado oil and/or pulp during gestation and lactation on biochemical parameters, visceral fat, and hepatic lipid peroxidation.

Materials and Methods

Animals

Female primiparous Wistar rats (90 days of life/ 250 ± 50 g) were obtained from the Laboratory of Experimental Nutrition, at the Campina Grande Federal University, (Nutrition Department) - LANEX/UFCG. The research complied with the ethical recommendations of the National Institute of Health (Bethesda, USA) regarding animal care, and was submitted and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) at the Center for Health and Rural Technology - CSTR/UFCG, under protocol N° 006-2017.

After confirming pregnancy, the rats were housed in individual polypropylene maternity cages under standard laboratory conditions (mean temperature $22 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity $65 \pm 5\%$, light/dark cycle 12/12 hours - artificial light from 6:00 am to 6:00 pm), and randomly divided into three groups.

Twenty-four dams were randomized into three groups: Control group (CG) - administered distilled water; Avocado Oil group (AO) - supplemented with 3000 mg of avocado oil/kg of animal weight, and Avocado Pulp group (AP) - supplemented with 3000 mg of avocado pulp/kg of animal weight. The gavage was administered from the 7th day of gestation until the 21st day of lactation. Standard feed (Presence®) and water ad libitum were provided. The experimental design is detailed in **Figure 1**.

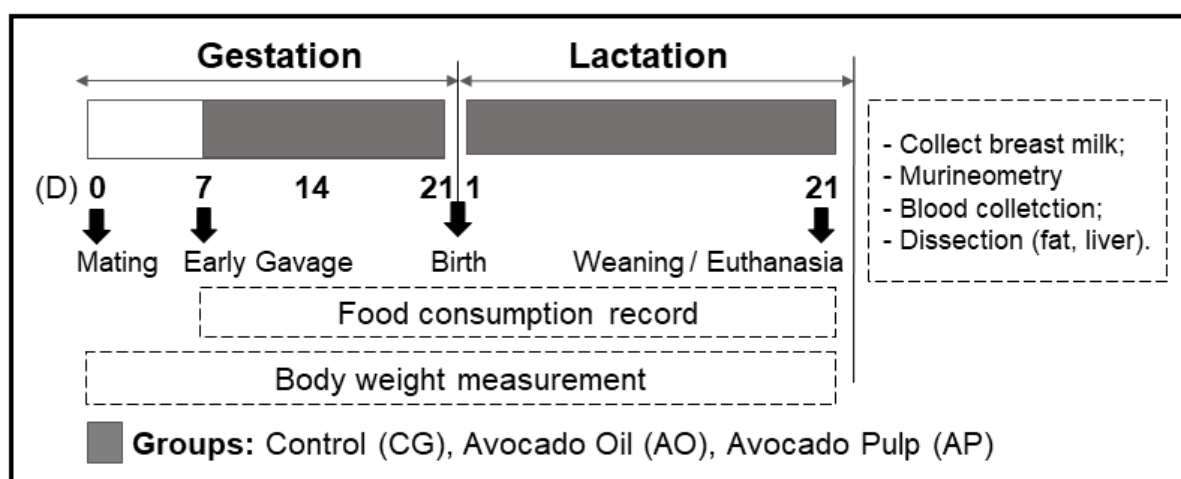


Figure 1. Experimental protocol. Sequence of experimental days conducted with Wistar rats treated during gestation and lactation, with water (CG), avocado oil (AO) or avocado pulp (AP).

Avocado Oil and Lyophilized Powder Preparation

Avocados (*Persea americana* Mill.) of the Hass variety were obtained from the *Fazenda Jaguacy Avocado Brasil*[®], located in the Bauru municipality, of São Paulo; geographically at latitude 22°19'18"S, and longitude 49°04'13" W, and 526 m of altitude. The fruits obtained were used to extract both the oil and lyophilized pulp powder. The oil was extracted from the avocado pulp using a three-phase centrifuge (Gratt Centrifuge model GMT 400), at a rotation of 3500 rpm. Afterwards, the oil, water and solids were separated. The oil phase then decanted and filter pressed (Ecirtec - model FPE 25/10), and subsequently packaged. Part of the fruit was used to extract oil and another part was lyophilized to obtain pulp powder. The lyophilized powder was vacuum packed, and stored at -20°C.

Centesimal Composition: Analysis of Avocado Pulp

Samples of the lyophilized pulp were submitted to analysis to determine the moisture together with protein, lipid, fiber, and ash contents.^{27,28} Carbohydrate values were quantified by difference (**Table 1**).

Table 1. Centesimal composition of the lyophilized avocado pulp (*Persea americana* Mill.) (Hass variety).

	100g ⁻¹ pulp
Humidity	2.28 (± 0.30)
Proteins	5.74 (± 0.04)
Lipids	61.78 (± 0.95)
Carbohydrates	4.28 (± 0.00)
Total Fibers	20.98 (± 0.04)
Insoluble fiber	14.23 (± 0.00)
Soluble fiber	6.75 (± 0.04)
Ash	9.35 (± 0.55)

Experimental Procedures

Body Weight and Feed Consumption

Body weight and feed intake were recorded daily using a Balmak ® Digital Electronic Scale (model ELP - 10), (20 to 10,000 g). Consumption was calculated as the difference of the quantity offered, and the feed rejected. The weight was recorded from the 1st day of gestation (1st, 2nd and 3rd weeks) until the 21st day of lactation (1st, 2nd and 3rd weeks). Consumption was recorded from the 7th day of gestation (2nd and 3rd weeks) until the 21st day of lactation (1st, 2nd and 3rd weeks).

Birth Parameters

One day after delivery, the litters were carefully manipulated and the total number of pups born, number of live and dead puppies, total litter weight and number of male and female pups quantified.

Milk Collection

On the 21st day of lactation, after an 8-hour fast, the dams were anesthetized intramuscularly with Ketamine Hydrochloride (50 mg/kg body weight) + Xilasine Hydrochloride (10 mg/kg body weight); and the breast milk collected manually, according to a methodology adapted from Keen et al.²⁹ Dams were separated from their offspring for 1 hour prior to milking and 5 minutes before milking received intraperitoneal injection of 3 IU oxytocin. The manual milking lasted about 20 to 30 min and the milk collected was packed into microtubes and frozen at -20° C.

Murinometric Parameters: Weight of Organs and Adipose Tissue

The murine parameters were performed shortly after milking, with the rats anesthetized. Body weight (PC), nasal-anal length (ANC), abdominal circumference (CA), and thoracic circumference (CT) were measured. PC and ANC data were later used to calculate Body Mass Index - BMI = body weight/compaction² (cm²)³⁰.

After euthanasia, the liver, brain, mesenteric adipose and retroperitoneal tissues were resected and weighed. The amount of total visceral fat was calculated by summing the mesenteric and retroperitoneal fat weights.

Lipid Extraction

Liver lipids and breast milk lipids percentage were performed by lipid extraction method.²⁸ Two (2) g of each sample were weighed in a 50 ml beaker (wet sample) and added to 30 ml of a chloroform:methanol mixture (2:1). The content was then transferred to a deep glass container with the sides covered with aluminum foil and stirred for 2 min in a grinder. The triturate was filtered through qualitative filter paper into a 100 ml graduated cylinder with a polished mouth. The walls were then washed with an additional 10 ml of chloroform:methanol which was also filtered with the previous volume. The volume of the filtered extract of the graduated cylinder was recorded with the cylinder closed. Of the final filtered extract volume 20% was added to 1.5% sodium sulfate. Then, the mixture was stirred with the graduated cylinder closed and time was given for the phases to separate. It was observed that the upper phase was approximately 40%, and the bottom phase 60% of the total volume. The volume of the lower phase was recorded and then the upper phase was discarded by suction with a graduated pipette. Lipid quantification was done using an aliquot extract of 5 ml (lower phase) separated with a volumetric pipette and transferred to a previously weighed beaker. This beaker was placed in an oven at 105°C for the solvent mixture to evaporate, being careful that the fat would not be degraded by heat. After cooling in a desiccator, the beaker was weighed, and the fat residue weight was obtained from the difference.

Biochemical Profile Determination

The anesthetized animals' blood was collected by cardiac puncture. Blood samples were centrifuged at 7546 xg for 10 min. Serum was collected in microtubes and frozen at -20 °C for analysis of glycemia, triglycerides (TGC), total cholesterol, HDL cholesterol, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) using LABTEST® enzymatic kits. The reading was performed on a UV-VIS spectrophotometer model 5100 using specific absorbance for each test, as indicated by the kit manufacturer. The concentration of the LDL cholesterol fraction was calculated using the Friedewald formula ($LDL = TOTAL\ CHOLESTEROL - (HDL + TGC/5)$).³¹ Determination of the atherogenic index (IA) was calculated according to the equation: $IA = TGC/HDL$.³²

Malonaldehyde Levels (MDA)

Liver samples were suspended in 1:5 (w/v) TrisHCL buffer and scissor diced for approximately 15 sec in a cooled medium. The suspension was homogenized for 2 min with an automatic homogenizer and centrifuged at 2500 xg and 4°C for 10 min.³³ The supernatants were used to determine the MDA content and the results were expressed as MDA nmol/g tissue.

Statistical Analysis

The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation from the mean (SD). For statistical analysis, ANOVA One Way test was used, followed by the Tukey test for comparison between groups. Significant statistical differences were considered when $p < 0.05$.

Results

Body Weight and Weekly Consumption

For weekly body weight measurements of the pregnant and lactating females; no significant differences were observed between the groups ($p \geq 0.05$) (**Figure 2**).

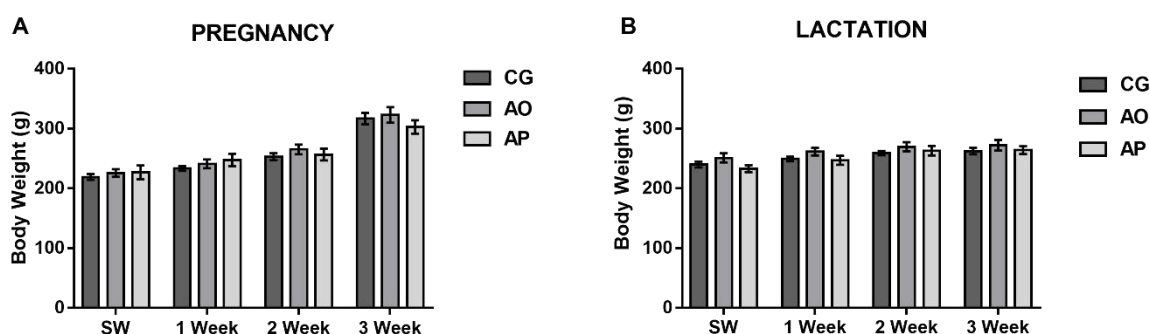


Figure 2. Body weight during pregnancy (2A) and lactation (2B). Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) ($n = 8$ per group). CG: control group; AO: avocado oil group; AP: avocado pulp group. SW: Starting weight. One-Way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

Regarding food intake during gestation (**Figure 3, A**), dams in the AP group (141.5 ± 2.83) presented lower intake in the second week compared to CG (159.75 ± 4.79) and in the third week ($p < 0.05$), AP intake was the lower (169.4 ± 6.18), compared to the AO (186.40 ± 3.14)

and CG (184.85 ± 3.89). The oil supplemented dams did not present significant differences when compared to the control dams in this period ($p < 0.05$).

During lactation, respectively in the first and second weeks, the AP dams (168.4 ± 4.10 , 311.10 ± 6.12) presented lower consumption in relation to CG (212.17 ± 1.82 , 380.17 ± 6.76) and to AO (206.50 ± 3.87 , 342.00 ± 5.88). The dams who consumed oil (AO) (342.00 ± 5.88) presented reduced consumption in relation to CG (380.17 ± 6.76) in the second week (only) ($p < 0.05$) (**Figure 3, B**). No significant differences were observed in the third week of lactation between the groups ($p \geq 0.05$).

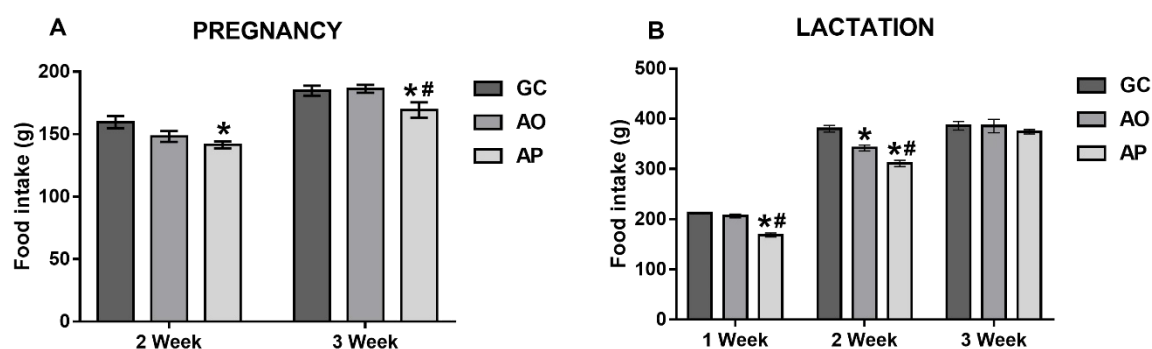


Figure 3. Weekly consumption during pregnancy (3A) and lactation (3B). Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) ($n = 8$ per group). (*) indicates difference versus CG; (#) indicates difference versus AO (One-Way ANOVA followed by Tukey) ($p < 0.05$). CG: control group; AO: avocado oil group; AP: avocado pulp group.

Birth Parameters

There was no significant difference in the birth rate between the groups evaluated ($p \geq 0.05$) (**Table 2**).

Table 2. Birth rates of dams supplemented with oil or avocado pulp.

GROUPS	CONTROL	OIL	PULP
BIRTH PARAMETERS			
Number of live born	10.43 ± 2.23	10.67 ± 3.78	10.80 ± 2.44
Number of live born puppies	10.43 ± 2.23	10.67 ± 3.78	10.40 ± 2.50
Number of dead born puppies	-	-	0.40 ± 0.70
Number of male puppies	6.00 ± 2.00	6.67 ± 2.25	5.30 ± 1.70

Number of female puppies	4.43 ± 1.62	4.00 ± 2.00	5.40 ± 1.17
Litter weight (g)	0.067 ± 0.01	0.070 ± 0.01	0.063 ± 0.02

- Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) (n = 8 per group).
- CG: control group; AO: avocado oil group; AP: avocado pulp group.
- One-Way ANOVA followed by Tukey (p <0.05).

Murinometric Parameters: Weight of organs and adipose tissue

On the day of weaning, the murine parameters and organs weight did not differ significantly between the CG, AO and AP groups (p ≥ 0.05) (**Table 3**). For retroperitoneal fat, both AP and AO presented decreases compared to CG (p <0.05), AO dams presented increased mesenteric fat as compared to CG and AP (p <0.05).

Summing both: mesentery and retroperitoneal fat (visceral fat), the AP and AP dams presented a decrease from the CG (p <0.05).

Table 3. Murinometric Parameters, organ and adipose tissue weight of lactating dams treated with avocado oil or pulp.

Groups			
	CG	AO	AP
Murinometric parameters			
Weight at the end of lactation (g)	245.8 ± 5.08	244.86 ± 5.60	253.11 ± 6.51
BMI (g/cm ²)	0.57 ± 0.01	0.59 ± 0.02	0.61 ± 0.01
AC (cm)	15.20 ± 0.47	15.31 ± 0.31	15.00 ± 0.31
TC (cm)	13.75 ± 0.48	13.25 ± 0.19	13.00 ± 0.19
Organs weight			
Liver (g)	9.91 ± 0.20	10.72 ± 0.94	11.29 ± 0.33
Brain (g)	1.68 ± 0.03	1.78 ± 0.02	1.74 ± 0.05
Adipose tissue			
Mesenteric Fat (g)	3.52 ± 0.36	4.81 ± 0.57*	3.07 ± 0.41 [#]
Retroperitoneal Fat (g)	4.31 ± 0.83	1.85 ± 0.42*	1.32 ± 0.91*
Visceral Fat (g)	7.75 ± 0.73	6.36 ± 0.06*	5.51 ± 1.41*

- Data are mean ± SD values (n = 8 per treatment group).
- (*) indicates difference versus CG; (#) indicates difference versus AO (One-Way ANOVA followed by Tukey) (p <0.05).
- CG: control group; AO: avocado oil group; AP: avocado pulp group. BMI: Body mass index; AC: Abdominal circumference; TC: Thoracic circumference.

Lipid Percentages for Liver and Breast Milk

The liver lipidic percentage the AO and AP dams was significantly higher than for the control dams ($p < 0.05$).

As for the dams' maternal milk: AO (20.12 ± 1.67) and AP (21.76 ± 0.60), they presented higher lipid content as compared to CG (16.80 ± 0.19), yet the AP group presented a higher percentage than the AO group ($p < 0.05$) (**Table 4**).

Table 4. Lipid percentage for livers and breast milk of dams treated with avocado oil or pulp during gestation and lactation.

Lipidic Percentage (%)	Groups		
	CG	AO	AP
Liver	1.88 ± 0.39	$2.74 \pm 0.49^*$	$2.84 \pm 0.35^*$
Maternal milk	16.80 ± 0.19	$20.12 \pm 1.67^*$	$21.76 \pm 0.60^{*#}$

- The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) ($n = 8$ per group).
- (*) Indicates difference versus CG; (#) indicates difference versus AO (One-Way ANOVA followed by Tukey's test) ($p < 0.05$).
- CG: control group, AO: avocado oil group, AP: avocado pulp group.

Biochemical Analyses

There was a significant decrease in the glycemia of the AO (152.72 ± 5.73) and AP dams (157.22 ± 16.37) when compared to the CG dams (216.49 ± 6.73) ($p < 0.05$) (**Figure 4, A**). The triglycerides presented reduced levels for AP (33.30 ± 3.90) in relation to AO dams (58.54 ± 3.62) and CG (61.25 ± 3.62) ($p < 0.05$) (**Figure 4, B**). There was no significant difference in total cholesterol levels between the three groups ($p < 0.05$) (**Figure 4, C**). However, increased values for HDL cholesterol were presented in the AO (41.77 ± 2.11) and AP (40.95 ± 2.92) dams as compared to the CG dams (30.74 ± 3.12) ($p < 0.05$) (**Figure, 4D**). Consequently, the LDL cholesterol fractions in the two treatments, AO (15.77 ± 2.66) and AP dams (11.59 ± 0.96) were reduced as compared to CG dams (24.29 ± 3.32), yet AP levels were still lower when compared to AO ($p < 0.05$) (**Figure, 4E**).

The Atherogenic Index (TGC/HDL) was also reduced in AO (1.57 ± 0.08) and AP dams (1.32 ± 0.12) compared to the control dams, CG (2.14 ± 0.27) ($p < 0.05$) (**Figure, 4F**).

The AST and ALT values were lower in AO (190.52 ± 3.38 ; 65.24 ± 4.86) and AP (194.58 ± 3.40 ; 59.56 ± 0.92) dams as compared to CG (215.61 ± 2.10 ; 93.95 ± 4.72) ($p < 0.05$) (**Figure 4, G-H**).

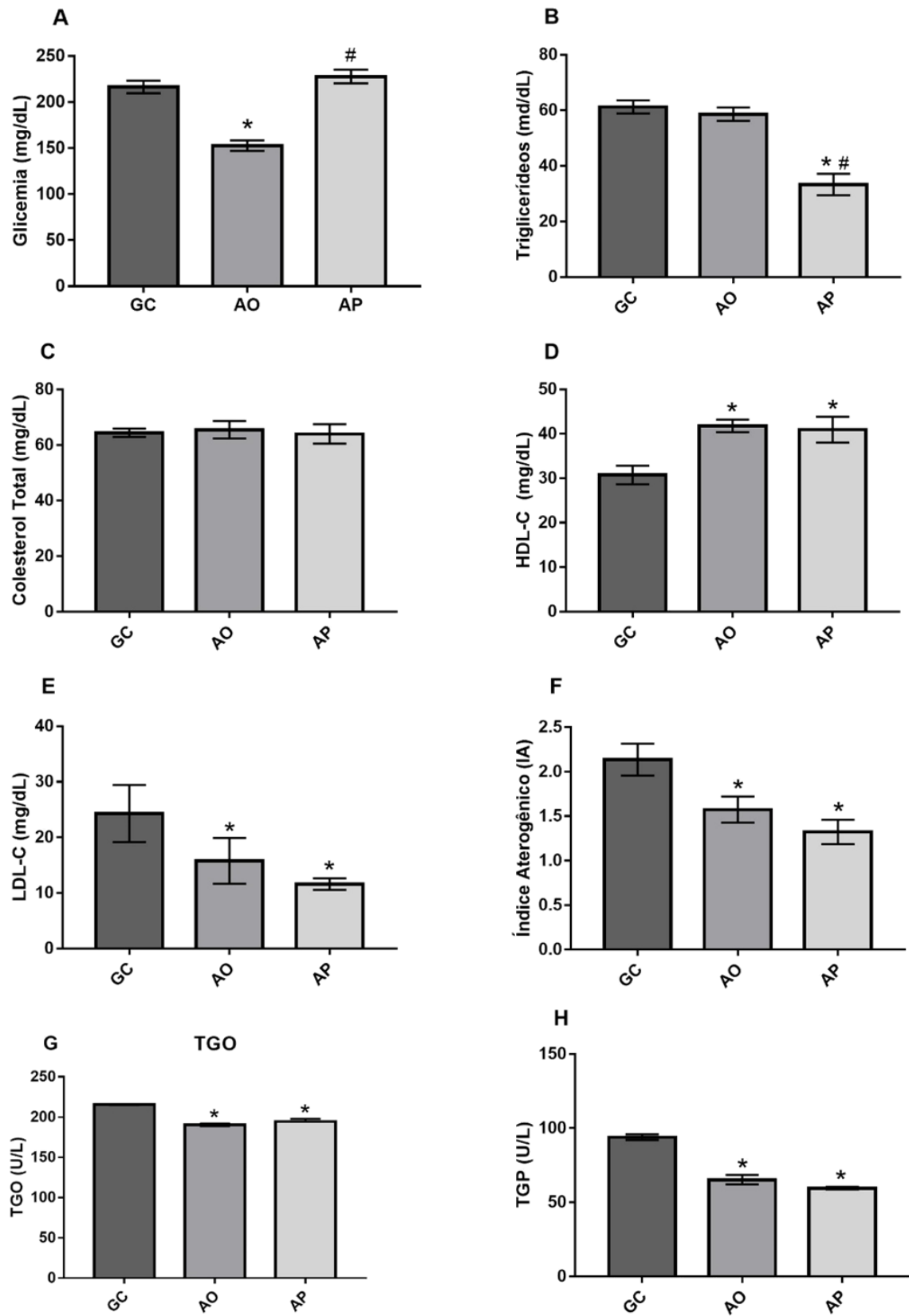


Figure 4. Biochemical parameters at the end of lactation of rats treated with avocado oil or pulp during pregnancy and lactation. 4A: Glycemia; 4B: Triglyceride; 4C: Total cholesterol; 4D: HDL cholesterol - (HDL-c); 4E: LDL cholesterol (LDL); 4F: Atherogenic Index (IA); 4G: Aspartate aminotransferase

(AST); 4H: Alanine aminotransferase (ALT). Results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) ($n = 8$ per group). (*) indicates difference ($p < 0.05$) versus CG; (#) indicates difference ($p < 0.05$) versus AO (One-Way ANOVA followed by Tukey) ($p < 0.05$). CG: control group; AO: avocado oil group; AP: avocado pulp group.

Hepatic MDA Levels

The lipid peroxidation in the livers of the lactating dams, as determined by the MDA content (Figure 5), presented low levels in the dams who consumed pulp (AP 79.54 ± 11.66) and oil (AO 97.09 ± 10.11) as compared to the control group (CG 145.90 ± 12.62) ($p < 0.05$). The AP group also presented significantly lower values in relation to AO ($p < 0.05$).

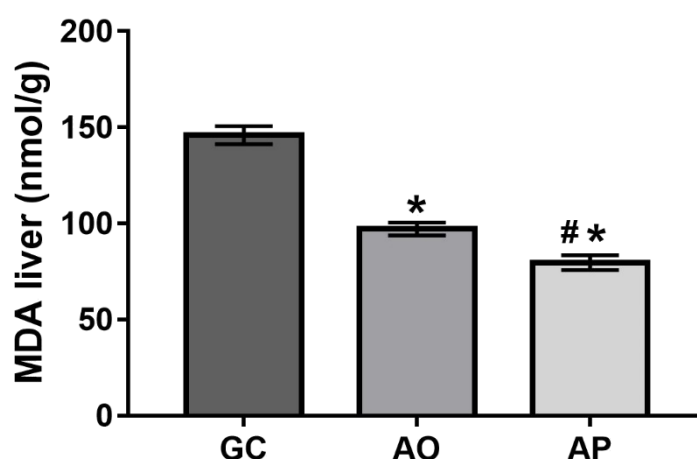


Figure 5. MDA levels in the liver of dams treated with avocado oil or pulp during pregnancy and lactation. Data expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) ($n = 8$ per group). (*) indicates difference ($p < 0.05$) versus CG; (#) indicates difference ($p < 0.05$) versus AO (One-Way ANOVA followed by Tukey's test) ($p < 0.05$). CG: control group; AO: avocado oil group; AP: avocado pulp group.

Comment

Principal findings

The results of the present study demonstrate that supplementation with avocado oil and pulp during gestation and lactation promotes significant alterations in dietary intake, and improvements in biochemical plasma profiles for glycemia, triglycerides, cholesterol fractions, AST and ALT, and for liver malonaldehyde levels (MDA) of the lactating dams.

Preliminary results from our study indicated that avocado oil and pulp are sources of oleic monounsaturated fatty acids (C18:1, ω -9), palmitoleic (C16:1, ω -7), linoleic polyunsaturates (C18: 2, ω -6), and linolenic (C18:3, ω -3), with oleic monounsaturated fatty

acids presenting the highest content. It also has phenolic compounds, flavonoids, and carotenoids; with high antioxidant activity, being that the pulp presents higher values than the oil²².

Results of the study in the context of other observations

During the perinatal phase maternal physiological changes support fetal growth and development. In lactation, a resetting of the alterations of lipid profile of pregnancy can occur, and this phenomenon is necessary for lowering the risk of future metabolic diseases development, such as cardiovascular diseases and metabolic syndrome.^{16,11} Adequate feeding at this stage may help reduce the risk of maternal metabolic diseases.

The increase of maternal body weight during pregnancy is physiological and decreases at postpartum occur due to energy transfer for breastfeeding.³⁴ In our study, supplementation with avocado oil (AO) and pulp (AP) did not induce changes in maternal body weight in any of the phases studied. Our findings corroborate those of Mennitti et al.⁸, where rats treated with diets from different lipid sources (soybean oil, lard, hydrogenated vegetable fat, or fish oil) during gestation and lactation presented no changes in weight by the end of lactation. Other high lipid diets (HFD) and differing fatty acid profiles in the maternal diet using either fish and olive oils¹⁹ or olive oil alone⁵ also did not promote differences in weight. However, the animals treated with olive oil presented reduced food consumption,⁵ this, as well as the animals treated with avocado oil or pulp, in the present research. This may be justified by the fact that the animals tend to decrease perinatal food intake when treated with high-energy diets,¹⁷ without influencing body weight.

The reduction in food intake was more evident during pregnancy and during the first two weeks of lactation in the AP group. Possibly, this occurred because avocado pulp, in addition to lipids, presents high levels of dietary fiber.²³ The lyophilized pulp presented 20.98 g in total fibers, 14.23 g insoluble, and 6.75 g soluble. Fibers increase satiety and delay gastric emptying.^{35,36}

Oleic fatty acid present in both avocado pulp and oil reduces food intake by increasing the endogenous lipid mediator called Oleoylethanolamide (OEA). The ingestion of oleic acid stimulates mobilization of this OEA mediator in the cells of the intestinal mucosa, which activates an afferent signal via the vagus nerve, to the hypothalamus, increasing satiety.^{37,38}

The birth parameters of the dams treated with avocado did not present changes for the variables studied. These results corroborate those of other studies with pregnant rats, who received differing lipid diets yet whose litters presented no alterations.^{39,17-19}

Murinometry, evaluated on the last day of lactation (corporal BMI, with abdominal and thoracic circumferences) did not present significant differences. Also no difference was observed for liver weight as a function of maternal lipid supplementation. According to Piao et al.,⁴⁰ organ weight is associated with many environmental conditions, including nutritional factors. In a study conducted by Gates,⁶ there was a decrease in liver weights in lactating dams who consumed HF diets during gestation and lactation, regardless of lipid source, and this decrease was associated with loss of body weight that also occurred in lactating dams, a condition not observed in our study.

During lactation, the adipose tissue undergoes morphological and metabolic changes, essential to support the production of breast milk.^{41,42} Changes in lipid metabolism are accompanied by changes in white and brown adipose tissue.⁴³ White adipose tissue consists of mesenteric and retroperitoneal adipose tissues, known as visceral fat.⁴⁴ In lactation, there is a reduction in lipogenesis and an increase in lipolysis in white adipose tissue, often associated with its hypotrophy.⁴⁵ The AO dams presented increases in mesenteric fat in relation to the AP and CG dams; however, the retroperitoneal fat and total (visceral) fat of the AO and AP dams presented significant reductions in comparison to the CG dams. The AP dams presented greater reductions in retroperitoneal fat in relation to the AO dams. Contrary to our results, maternal supplementation with a hyperlipidic diet containing soybean oil⁴⁶ and lard⁴⁷ increased retroperitoneal and peri-renal fat in the lactating dams, respectively. The reduction of retroperitoneal and visceral fat in dams supplemented with avocado pulp or oil can be explained by the fatty acid profile of avocado, where nearly half of its content is composed of oleic monounsaturated fatty acid²³. The oleic acid, present in a diet containing olive oil, was shown to be responsible for causing less accumulation of visceral fat and contributed to the thermogenic phenotype of mice.⁴⁸ *In vitro* study, has found that oleic fatty acid contributes to thermogenesis by increasing the expression of genes linked to the fatty acid oxidation pathway, with increased cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A (PKA) activity.⁴⁹ The endogenous lipid mediator derived from oleic fatty acid, OEA, is also related to body composition modifications since it stimulates lipolysis and β -oxidation.⁵⁰

In lactation, there is an increase in lipolysis in the adipose tissue, with the mobilization of accumulated fat deposits during gestation to support milk synthesis.⁴² In our study, supplementation with avocado pulp and oil may have influenced increased mobilization of these deposits, evidenced by the lower content of retroperitoneal fat and higher fat content in breast milk, which indicates mobilization of this fat for milk production. However, the group supplemented with avocado pulp had a lower content of retroperitoneal fat and higher fat content in the breast milk than the group treated with avocado oil, suggesting that the mobilization of fat into breast milk was higher in the group supplemented with avocado pulp. Avocado is rich in bioactive components⁵¹⁻⁵³ presenting activity in regulation of adipocyte biology, promoting the release of energy or impeding its storage.⁵⁴

As with changes in lipid storage, in lactation, dietary lipid intake may contribute to the regulation of glucose homeostasis and to plasma lipid metabolism. Lactation is associated with changes in insulin and glucose homeostasis, where diabetic or non-diabetic dams tend to have a gradual physiological reduction in fasting or postprandial glycemic levels throughout the postpartum weeks in relation to non-dams.⁵⁵⁻⁵⁶ We observed a decrease in the glycemic values of the dams supplemented with oil and pulp, in relation to the control dams, which corresponds with the results of Toro-Equihua⁵⁷, whose supplementation with different percentages of avocado oil (5 to 20%) caused an increase in the insulin sensitivity in male adult Wistar rats. Oleic fatty acid is associated with an anti-inflammatory effect with increased insulin sensitivity.⁴⁹ This process occurs during the absorption phase, where the presence of oleic fatty acid induces an increase in the release of incretin GIP and GLP-1, which in turn improve insulin sensitivity.⁵⁸

In addition to monounsaturated fatty acids, avocado also has a large amount of phenolic compounds,^{21,22} as demonstrated in our results. Analysis of the lyophilized avocado pulp extract revealed *in vitro* antioxidant action in the ability to inhibit α -amylase and α -glycosidase enzyme activity.⁵⁹ These enzymes are essential for the hydrolysis of dietary carbohydrates, and their inhibition may delay digestion, causing a reduction in the rate of glucose uptake into the blood.⁶⁰

Hyperglycemia, together with dyslipidemia are risk factors for atherosclerosis⁶¹ and since lactation has the function of modifying the atherogenic metabolic profile developed in normal pregnancy,¹⁶ it becomes an important dietary factor regulating this process. During lactation, physiological excretion of triglycerides and cholesterol into the breast milk occurs

due to the increased catabolism of low density lipoproteins (VLDL and LDL) and an increase in generation of high density lipoproteins (HDL), leading to a decline in plasma triglycerides.⁶² Our results reveal that supplementation with avocado oil and pulp increases the hypolipidemic effect that occurs during lactation, with a decrease in triglycerides (TGC), LDL, and VLDL fractions; and an increase in HDL as compared to the CG. When comparing avocado oil and TGC levels; only avocado pulp promoted reductions. When measuring the atherogenic index (TGC/HDL), we verified that both avocado oil and pulp caused reductions in comparison to the control dams, yet the pulp's effect was more intense. The atherogenic index is a strong marker of atherogenic dyslipidemia and predicts risk of cardiovascular diseases.⁶³⁻⁶⁴

Studies with pregnant and lactating dams indicate that in the maternal diet the type of fatty acid predominant may alter their lipid profiles, increasing or decreasing atherogenic risk in this phase. Cavalcante¹⁷ and Nakashima⁴⁷ observed an increase in triglycerides in lactating rats receiving a hyperlipidic cafeteria-type HDF diet containing trans-fats, and lard rich in saturated fatty acids. In another study, Reddy and Naidu⁶⁵ found an increase in the HDL cholesterol fractions of dams who received a diet containing cress seed as a lipid source rich in linolenic acid. Such evidence supports our results, where the modification in the lipid quality of the diet during the perinatal phase had an impact on the maternal lipid profile at the end of lactation.

Oleic fatty acids are the main lipid fraction of avocado, presenting important anti-lipidemic action, notwithstanding that the great variety found in its active nutrients and phytochemicals such as polyphenols, carotenoids, phytosterols^{23,22} and dietary fibers^{66,22} is also related to these effects. Lipid reduction as promoted by phytosterols may be related to reducing intestinal absorption of triglycerides and/or fatty acids through increased fecal fatty acid loss.⁶⁷ Experimental results confirm our findings, however with lactating rats we note a finding by Rideout⁶⁷ that when investigating the effects of a hypercholesterolemic diet supplemented with phytosterols in mice during gestation and lactation, that by the end of lactation, reduction of total cholesterol and LDL without modification in the HDL fraction had occurred.

Other experimental studies with animals in the adult phase also found consistent results: Pahua-Ramos et al.³⁵ demonstrated that the administration of an avocado paste (2 g/kg/day) in rats receiving a hypercholesterolemic diet rich in fructose caused a significant reduction in triglycerides and LDL cholesterol. Also in adult rats, a significant decrease in triglycerides, total cholesterol, and LDL and VLDL fractions was obtained after oral administration for 10

weeks; with 1 and 2 mL of avocado pulp/kg body weight.⁶⁸ In mice, supplementation with 2.5 or 5% avocado oil in a hypercholesterolemic diet caused an increase in HDL and maintenance of triglycerides.⁶⁹ However, research with avocado supplementation in pregnant and lactating rats is non-existent, which reinforces the importance of the present study.

The Hass avocado, used in the present study, has been demonstrated to contain numerous antioxidant compounds, which are responsible for neutralizing oxidation reactions.^{70,22} Determination of malondialdehyde (MDA) was used to evaluate lipid peroxidation in the dams' livers.³³ A reduction in the MDA content in the liver of the AO and AP lactating dams was noted in relation to the CG dams, where the pulp also promoted lower MDA content when compared to the oil. Although the lipid percentage of the liver of the AO and AP dams was higher than in the control dams, our results also showed low levels of AST, ALT and MDA, indicating that avocado pulp and oil have a protective effect on lipid oxidation. The correlation of our results clearly demonstrates that supplementation with avocado oil and pulp presents a protective effect on liver function. This effect may be oleic. A high oleic diet increases accumulation of liver fats, dependent on LXR, a receptor that regulates genes linked to lipogenesis, (but also acts to inhibit genes linked to inflammation),⁷¹ and protect the liver.

On the other hand, the bioactive compounds present in avocado are also related to lipid peroxidation reductions and a significant decrease in hepatic MDA content, and plasma enzymes AST and ALT.⁶⁸ Mohamed and Reza⁷² evaluated types and concentrations of phenolic and flavonoid compounds in avocado pulp; and in adult male rats demonstrated the protective hepatic effect of supplementation with avocado pulp, that also decreased AST and ALT enzyme levels and MDA content. In our study the same effects were observed even though promoted during gestation and lactation; phases characterized by high maternal lipolysis and increases in circulating plasma lipids. The results demonstrate the beneficial effect of maternal supplementation with avocado, a source of monounsaturated fatty acids and antioxidant compounds. Avocado thus acts to maximize lipidic lactate adjustments, with a positive impact on maternal health maintenance and reducing the risk of metabolic diseases.

Strengths and limitations

Our study has an important positive outcome. It was the first study to define whether maternal supplementation with pulp and avocado the oil could alter murine and biochemical

parameters, retroperitoneal fat and lipid peroxidation in lactating mothers have a distinct effect on maternal metabolism.

As a limitation of this study, the groups treated with avocado were not compared with animals treated with lipid source deficient in essential fatty acids.

Conclusion and Research implications

This research demonstrated that maternal gestational and lactation avocado oil and pulp supplementation presented improvements in retroperitoneal fat reductions, being likely a result of a greater lipid mobilization for milk production. In addition, there was a reduction in fasting glycemia and changes in the plasma lipid profile, with an increase in HDL levels and decreases in LDL and VLDL cholesterol, in the atherogenic index and in hepatic MDA content. Maternal supplementation with avocado oil and pulp was effective in reducing the lipid fractions that present potential atherogenic risks; with the most pronounced supplementation effects achieved with avocado pulp.

As a research implication, a clinical study in humans can be designed, trying to replicate these findings and with a potential application in human nutrition, if with similar results.

Authors Contributions

This work would not have been possible without the collaboration of all. Juliana Soares, Marília Melo and designed the theme of the study. Marília Melo, Elisiane Silva and Renally Moura performed the experimental methods designed. Gerlane Guerra and Daline Araújo performed MDA content analysis; Vanessa Viera and Michelly Queiroz performed antioxidant capacity of the avocado analysis. Marília Melo and Rita Bidô performed biochemical analysis. Juliana Soares, Marília Melo, Maria Elieidy Oliveira, and Flávio Melo analyzed the data. Juliana Soares and Marília Melo interpreted the results and wrote the article.

Acknowledgements

We thank all the contributing authors of the study.

References

1. Christian P, Mullan LC, Hurley KM, Katz J, Black RE. Nutrition and maternal, neonatal, and child health. *Semin Perinatol* 2015;39:361-72.
2. Berti C, Cetin I, Agostoni C, et al. Pregnancy and infants' outcome: Nutritional and metabolic Implications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;56:82–91.
3. Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, et al. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J Nutr Biochem* 2015;26:99-111.
4. Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental Origins of Chronic Disease. *Physiol Rev* 2016;96:1509–65.
5. Sánchez J, Priego T, García AP, et al. Maternal supplementation with an excess of different fat sources during pregnancy and lactation differentially affects feeding behavior in offspring: Putative role of the leptin system. *Mol Nut Food Res* 2012;56:1715–1728
6. Gates L, Langley-Evans C, Kraft J, Lock AL, Salter AM. Fetal and neonatal exposure to trans-fatty acids impacts on susceptibility to atherosclerosis in apo E*3 Leiden mice. *Br J Nutr* 2017;117:377-85.
7. Dias-Rocha CP, Almeida MM, Santana EM, et al. Maternal high-fat diet induces sex-specific endocannabinoid system changes in newborn rats and programs adiposity, energy expenditure and food preference in adulthood. *J Nutr Biochem* 2018;51:56-68.
8. Mennitti LV, Oyama LM, Santamarina AB, Nascimento CMPO, Pisani LP. Early exposure to distinct sources of lipids affects differently the development and hepatic inflammatory profiles of 21-day-old rat offspring. *J Inflamm Res* 2018;11:11-24.
9. Crawford MA, Doyle W, Drury P. Relationship between maternal and infant nutrition. The special role of fat in energy transfer. *Trop Geogr Med* 1985;37:S5-16.
10. Cetin I, Laoreti A. The importance of maternal nutrition for health. *JPNIM* 2015;4:e040220.
11. Chavan-Gautam P, Rani A, Freeman DJ. Distribution of Fatty Acids and Lipids During Pregnancy. *Adv Clin Chem* 2018;84:209-39.
12. Fernandes FS, Sardinha FLC, Badia-Villanueva M, Carulla P, Herrera E, Tavares do Carmo MG. Dietary lipids during early pregnancy differently influence adipose tissue metabolism and fatty acid composition in pregnant rats with repercussions on pup's development. *Prostag Leuk Ess* 2012;86:167-74.
13. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Lipid Metabolism During Pregnancy and its Implications for Fetal Growth. *Curr Pharm Biotechnol* 2014;15, 24-31.
14. Herrera E, Desoye G. Maternal and fetal lipid metabolism under normal and gestational diabetic condition. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2016;26:109-27.
15. Carvalho RP, Gonzaga Lemos JR, Sale RSA, et al. The consumption of red pupunha (*bactris gasipaes kunth*) increases Hdl cholesterol and reduces weight gain of lactating and post-lactating wistar rats. *J Aging Res Clin Pract.* 2013;2:257–260.
16. Perrine CG, Nelson JM, Corbelli J, Scanlon KS. Lactation and Maternal Cardio-Metabolic Health. *Annu Rev Nutr* 2016;36:627-645.
17. Cavalcante TCF, Lima da Silva JM, Marcelino da Silva AA, et al. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. *Lipids* 2013;48:1157-68.
18. Cerf ME, Herrera E. High Fat Diet Administration during Specific Periods of Pregnancy Alters Maternal Fatty Acid Profiles in the Near-Term Rat. *Nutrients* 2016; 8:E25.

19. Albert BB, Vickers MH, Gray C, et al. Fish oil supplementation to rats fed high-fat diet during pregnancy prevents development of impaired insulin sensitivity in male adult offspring. *Sci Rep* 2017;7:1-11.
20. USDA (U.S. Department of Agriculture) (2015) Avocado, almond, pistachio and walnut Composition. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, DC. 2015.
21. Ameer K. Avocado as a Major Dietary Source of Antioxidants and Its Preventive Role in Neurodegenerative Diseases. *Adv Neurobiol* 2016;12:337-54.
22. Melo MFFT, Pereira DE, Moura RL, et al. Maternal Supplementation With Avocado (*Persea americana* Mill.) Pulp and Oil Alters Reflex Maturation, Physical Development, and Offspring Memory in Rats. *Frontiers in Neuroscience* 2019;13:1-16.
23. Dreher ML, Davenport AJ. Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013;53:738-50.
24. Carranza-Madriral J, Herrera-Abarca JE, Alvizouri-Munoz M, Alvarado-Jimenez MDR, Chavez-Carbajal F. Effects of a vegetarian diet vs. a vegetarian diet enriched with avocado in hyper-cholesterolemic patients. *Arch Med Res* 1997;28:537-41, 1997.
25. Carranza-Madriral J, Alvizouri-Munoz M, Herrera-Abarca JE, Chávez-Carbajal F. Efectos del aguacate como fuente de ácidos grasos monoinsaturados en lípidos séricos, metabolismo de la glucosa y reología en pacientes con diabetes tipo 2. *Med Int Mex* 2008;24:267-272.
26. Ortiz-Avila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba BE, Aavedramolina A, Rodriguez-Orozco AR, Cortés-Rojo C. Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. *J Diabetes Res* 2015;2015:485759.
27. Association Of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 20. ed. Washington: AOAC International, 2016, 3100 p.
28. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
29. Keen CL, Lonnnerdal B, Clegg M, Hurley LS. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J Nutr* 1981;11: 226-230.
30. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, et L. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007;41:111-9.
31. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifug. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
32. Gaziano JM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Breslow JL, Buring JE. Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:2520-5.
33. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonyldialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:, 407-21.
34. Kominarek MA, Rajan P. Nutrition Recommendations in Pregnancy and Lactation. *Med Clin North Am* 2016;100:1199-1215.
35. Pahua-Ramos ME, Garduño-Siciliano L, Dorantes-Alvarez L, et al. Reduced-calorie Avocado Paste Attenuates Metabolic Factors Associated with a Hypercholesterolemic-high Fructose Diet in Rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2014;69:18-24.
36. Naveh E, Werman MJ, Sabo E, Neema I. Defatted Avocado Pulp Reduces Body Weight and Total Hepatic Fat But Increases Plasma Cholesterol in Male Rats Fed Diets with Cholesterol. *J Nutr* 2002;132:2015-8.
37. Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, et al. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab* 2008;8:281-8.

38. Sihag J, Jones PJH. Dietary fatty acid composition impacts plasma fatty acid ethanolamide levels and body composition in golden Syrian hamster. *Obes Rev* 2018;19:178-197.
39. Amusquivar E, Rupérez FJ, Baras C, Herrera E. Low Arachidonic Acid Rather than α -Tocopherol Is Responsible for the Delayed Postnatal Development in Offspring of Rats Fed Fish Oil Instead of Olive Oil during Pregnancy and Lactation. *J Nutr* 2000;130:2855-65.
40. Piao Y, Liu Y, Xie X. Change Trends of Organ Weight Background Data in Sprague Dawley Rats at Different Ages. *J Toxicol Pathol* 2013;26:29-34.
41. Cancian CRC, Leite NC, Montes EG. Histological and Metabolic State of Dams Suckling Small Litter or MSG-Treated Pups. *Sci World J* 2016;2016:1678541.
42. McNamara JP, Huber K. Metabolic and Endocrine Role of Adipose Tissue During Lactation. *Annu Rev Anim Biosci* 2018;6:177-95.
43. Patel OV, Casey T, Dover H, Plaut K. Homeorhetic adaptation to lactation: comparative transcriptome analysis of mammary, liver, and adipose tissue during the transition from pregnancy to lactation in rats. *Funct Integr Genomics* 2011;11:193-202.
44. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol* 2012;205:194-208.
45. Burnol AF, Leturque A, Ferre P, Kande J, Girard J. Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats. *Am J Physiol* 1986;251:E537-41.
46. Trottier GVE, Koski KG, Brun T, Toufexis DJ, Richard D, Walker C. Increased Fat Intake during Lactation Modifies Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responsiveness in Developing Rat Pups: A Possible Role for Leptin. *Endocrinology* 1998;139:3704-11.
47. Nakashima Y. Fish-Oil High-Fat Diet Intake of Dams after Day 5 of Pregnancy and during Lactation Guards against Excessive Fat Consumption of Their Weaning Pups. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008;54:46-53.
48. Shin S, Ajuwon KM. Effects of Diets Differing in Composition of 18-C Fatty Acids on Adipose Tissue Thermogenic Gene Expression in Mice Fed High-Fat Diets. *Nutrients* 2018;10:e256.
49. Lim J, Gerhart-Hines Z, Dominy JE, et al. Oleic Acid Stimulates Complete Oxidation of Fatty Acids through Protein Kinase A-dependent Activation of SIRT1-PGC1 α Complex. *J Biol Chem* 2013;288:7117-76.
50. Bowen KJ, Kris-Etherton PM, Shearer GC, West SG, Reddivari L, Jones PJH. Oleic acid-derived oleoylethanolamide: A nutritional science perspective. *Prog Lipid Res* 2017;67:1-15.
51. Plaza L, Sánchez-Moreno C, Pascual-Teresa S, Ancos B, Cano MP. Fatty Acids, Sterols, and Antioxidant Activity in Minimally Processed Avocados during Refrigerated Storage. *J Agric Food Chem* 2009;57:3204-09.
52. Gorinstein S, Haruenkit R, Poovarodom S, et al. Some Analytical Assays for the Determination of Bioactivity of Exotic Fruits. *Phytochem Anal* 2010;21:355-62.
53. Rodriguez-Sanchez DG, Flores-García M, Silva-Platas C, et al. Isolation and chemical identification of lipid derivatives from avocado (*Persea americana*) pulp with antiplatelet and antithrombotic activities. *Food Funct* 2015;6:193-203.
54. Padmanabhan M, Arumugam G. Effect of *Persea americana* (avocado) fruit extract on the level of expression of adiponectin and PAR- γ in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. *J Complement Integr Med* 2014;11:107-19.
55. O'Reilly MW, Avalos G, Dennedy MC, O'Sullivan EP, Dunne F. Atlantic DIP: high prevalence of abnormal glucose tolerance post partum is reduced by breast-feeding in women with prior gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2011;165:953-59.

56. Gunderson EP, Crites Y, Chiang V, et al. Influence of Breastfeeding During the Postpartum Oral Glucose Tolerance Test on Plasma Glucose and Insulin. *Obstet Gynecol* 2012;120:136-43.
57. Toro-Equihua M, Velasco-Rodríguez R, López-Ascencio R, Vásquez C. Effect of an avocado oil-enhanced diet (*Persea americana*) on sucrose-induced insulin resistance in Wistar rats. *J Food Drug Anal* 2016;24:350–357.
58. Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2003;77:605–11.
59. Oboh G, Ademosun AO, Akinleye M, Omojokun OS, Boligon AA, Athayde ML. Starch composition, glycemic indices, phenolic constituents, and antioxidative and antidiabetic properties of some common tropical fruits. *J Ethn Foods* 2015;2:64-73.
60. Kalita D, Holm DG, LaBarbera DV, Petrash JM, Jayanty SS. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *Plos One* 2018;13:e0191025.
61. Rai V, Agrawal DK. The Role of DAMPs and PAMPs in Inflammation-mediated Vulnerability of Atherosclerotic Plaques. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95:1245-53.
62. Qureshi IA, Xi X, Limbu YR, Bin HY, Chen MI. Hyperlipidaemia during normal pregnancy, parturition and lactation, *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:217-21.
63. Ajiboye JA, Erukainure OL, Lawal BA. Comparative alteration in atherogenic indices and hypocholesteremic effect of palm oil and palm oil mill effluent in normal albino rats. *Heliyon* 2015;1:e00010.
64. Niroumand S, Khajedaluae M, Khadem-Rezaian M, et al. Atherogenic Index of Plasma (AIP): A marker of cardiovascular disease. *Med J Islam Repub Iran*. 2015;29:240.
65. Reddy KVK, Naidu KA. Maternal supplementation of α -linolenic acid in normal and protein-restricted diets modulate lipid metabolism, adipose tissue growth and leptin levels in the suckling offspring. *Eur J Nutr* 2015;54:761-70.
66. Threapleton DE, Greenwood DC, Evans CEL, et al. Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2013;347:f6879.
67. Rideout Tc, Movsesian Mc, Tsai Y, Iqbal A, Raslawsky A, Patel M. Maternal Phytosterol Supplementation during Pregnancy and Lactation Modulates Lipid and Lipoprotein Response in Offspring of apoE Deficient Mice. *J Nutr* 2015;145:1728-1734.
68. Al-Dosari MS. Hypolipidemic and antioxidant activities of avocado fruit pulp on high cholesterol fed diet in rats. *Afr J Pharm Pharmacol* 2011;5:1475–1483.
69. Ortiz Moreno A, Hernandez Navarro M, Dorantes Alvarez L, Chamorro Cevallos G, Hernandez Ortega M. Comparative study of the hypolipidemic effect induced by different monounsaturated avocado oils, *Proceedings VI World Avocado Congress (Acts VI Congreso Mundial del Aguacate)*. Vina Del Mar, Chile. pp. 12–16, 2007.
70. Wang M, Zheng Y, Khuong T, Lpovatt CJ. Developmental differences in antioxidant compounds and systems in normal and small-phenotype fruit of ‘Hass’ avocado (*Persea americana* Mill.). *Sci Hort* 2016;206:15–23.
71. Ducheix S, Montagner A, Polizzi A, et al. Dietary oleic acid regulates hepatic lipogenesis through a liver X receptor dependent signaling. *PLoS ONE* 2017;12:e0181393.
72. Mohamed MY, Rezaq AA. Hepatoprotective Effect of Avocado Fruits Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Male Rats. *WASJ* 2013;10:1445-1452.

ARTIGO II

MATERNAL SUPPLEMENTATION WITH AVOCADO (PERSEA AMERICANA MILL.)
PULP AND OIL ALTERS REFLEX MATURATION, PHYSICAL DEVELOPMENT, AND
OFFSPRING MEMORY IN RATS

(Publicado no periódico: Frontiers in Neuroscience.

Fator de impacto: 3.56 - **Qualis:** A1)



Maternal Supplementation With Avocado (*Persea americana* Mill.) Pulp and Oil Alters Reflex Maturation, Physical Development, and Offspring Memory in Rats

Marília Ferreira Frazão Tavares de Melo^{1,2*}, Diego Elias Pereira^{1,2}, Renally de Lima Moura², Elisiane Beatriz da Silva², Flávio Augusto Lyra Tavares de Melo³, Celina de Castro Querino Dias^{1,2}, Maciel da Costa Alves Silva², Maria Elieidy Gomes de Oliveira^{1,4}, Vanessa Bordin Viera⁵, Maria Manuela Estevez Pintado⁶, Sócrates Golzio dos Santos³ and Juliana Késsia Barbosa Soares^{1,2}

OPEN ACCESS

Edited by:

Adriana Ximenes da Silva,
Federal University of Alagoas, Brazil

Reviewed by:

Yinghua Yu,
Xuzhou Medical University, China
Rim Hassouna,
Paris Diderot University, France

*Correspondence:

Marília Ferreira Frazão Tavares de
Melo
mariliafrazao@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroenergetics, Nutrition and Brain
Health,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 01 October 2018

Accepted: 07 January 2019

Published: 23 January 2019

Citation:

Melo MFFT, Pereira DE, Moura RL,
Silva EB, Melo FALT, Dias CCQ, Silva
MCA, Oliveira MEG, Viera VB, Pintado
MME, Santos SG and Soares JKB
(2019) Maternal Supplementation
With Avocado (*Persea americana* Mill.)
Pulp and Oil Alters Reflex Maturation,
Physical Development, and Offspring
Memory in Rats.
Front. Neurosci. 13:9.
doi: 10.3389/fnins.2019.00009

¹ Program of Food Science and Technology, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Laboratory of Experimental Nutrition, Department of Nutrition, Universidade Federal de Campina Grande, Cuitá, Brazil, ³ Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁴ Laboratory of Bromatology, Department of Nutrition, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁵ Laboratory of Bromatology, Department of Nutrition, Universidade Federal de Campina Grande, Cuitá, Brazil, ⁶ Center for Biotechnology and Chemistry, School of Biotechnology, Catholic University of Porto, Porto, Portugal

Avocado (*Persea americana* Mill.) is an oleaginous fruit source of fatty acids with high levels of neuroprotective phytochemicals. The objective of this study was to evaluate the development of reflex and somatic maturation, fatty acid profiles in the brain, and memory in different stages of life in the offspring of dams supplemented with avocado pulp and oil during gestation and lactation. The dams were randomly divided into three groups ($n = 15$ pups/group), and received by gavage supplementation: control group (CG)—distilled water; Avocado Oil (AO)—3,000 mg avocado oil/kg animal weight, and Avocado Pulp (AP)—3,000 mg avocado pulp/kg animal weight. We performed the following tests: Analysis of Somatic Development and Ontogeny of Postnatal Reflex (T0 to T21), the Open Field Habituation Test and the Object Recognition Test (ORT) in the adolescent (T45) and adult (T90) phases. The cerebral fatty acids content was evaluated at times T0, T21, T45, and T90. The results were analyzed using the statistical program GraphPad Prism and significant statistics were considered when $p < 0.05$. Acceleration of reflex maturation and reflex ontogeny was observed in the offspring of AO and AP fed dams, with the results being more pronounced in the pulp fed group ($p < 0.05$). All groups presented a decrease in the ambulation parameter in the second exposure to the Open Field Habituation Test, at T45 and T90 ($p < 0.05$). In the ORT, the AO and AP offspring presented memory improvements in the short and long term in the adult and adolescent phases ($p < 0.05$). The results of the brain fatty acid profiles presented higher polyunsaturated fatty acids (PUFA) content in the AO and AP groups at T21, T45, and T90. The docosahexaenoic fatty acid (DHA) content was higher at T21

(AO and AP), at T45 (AO and AP), and at T90 (AP) ($p < 0.05$). The arachidonic acid (ARA) content was higher at T45 (AO and AP), and at T90 (AO) ($p < 0.05$). Maternal supplementation with avocado oil and pulp anticipates reflex maturation and somatic postnatal development, and improves memory during the adolescent and adult phases.

Keywords: avocado, cerebral fatty acids, postnatal development, memory, rats

INTRODUCTION

Adequate fetal and postnatal development is influenced by maternal nutrition (Brenna and Lapillonne, 2009; Mennitti et al., 2015). During this period, considered developmentally critical, lipids are essential to tissue construction and determination of body growth (Morgane et al., 1993; Herrera and Ortega-Senovilla, 2014). Lipids structurally compose the nervous system, stimulate its development and differentiation, and even regulate neuronal cell migration (González and Visentin, 2016; Prado et al., 2018).

The quality of lipids in the diet during gestation and lactation determines the type of fatty acid (FA) that will accumulate in the fetal tissue through placental transfer and through the breast milk after birth (Lauritzen and Carlson, 2011; Innis, 2014). Fatty acids are essential nutrients for the development and maintenance of brain functions and are closely related to learning processes and memory. They demonstrate a positive correlation to neurodevelopment in the offspring through maternal lipid intake (Apyratin et al., 2017; Melo et al., 2017; Pase et al., 2017).

The principal FAs involved in brain development are polyunsaturated fatty acids (PUFAs): linoleic acid (C18: 2 ω -6) (LA), α -linolenic acid (C18: 3 ω -3) (ALA), arachidonic acid (ARA; 20:4 ω -6), docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 ω -3), and eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5, ω -3) (Makrides et al., 2011; González and Visentin, 2016). Since they are not endogenously synthesized, they are considered essential, and their acquisition occurs only through dietary intake of sources rich in endogenous precursors; ALA and LA (Sinclair, 1975). FA accumulating in brain tissue actively participates in the formation of neuronal membranes (Yehuda, 2012), improving learning, and memory and increasing synaptic and neurogenic plasticity (Dyall, 2017). The influence of maternal PUFAs on the development of reflexes has been evaluated in experimental studies with the offspring (Souza et al., 2012).

Non-essential FA, such as oleic monounsaturated fatty acid (18: 1 ω -9) and palmitic saturated (16: 0 ω -7), can be endogenously synthesized and also transferred through the placenta during gestation; secreted into the maternal milk and accumulate in the brain and other organs during fetal development (Innis, 2004, 2005). Oleic fatty acid is one of the main constituents of myelin (Garbay et al., 2000); it is related to axonal growth and neuronal grouping (Medina and Tabernero, 2002). Palmitic fatty acid participates in the processes of palmitoylation, gliogenesis, synaptogenesis, and myelination (González and Visentin, 2016).

Several sources of fatty acids can be used for maternal supplementation. The avocado (*Persea americana* Mill.) is an

oleaginous fruit that has thus aroused scientific interest. Its lipidic composition includes monounsaturated oleic fatty acid (ω -9), saturated palmitic (ω -7), and two linoleic polyunsaturates; (ω -6), and (ω -3) at lower levels (USDA, 2011; Dreher and Davenport, 2013). Avocado is also a source of neuroprotective antioxidant phytocomplexes (phytosterols, carotenoids, flavonoids) (Ameer, 2016).

Considering associations between maternal lipid consumption and its effects on the neurodevelopment of the offspring and the scarcity of information in the literature on the effect of avocado consumption at this stage, we hypothesized that maternal supplementation with avocado might anticipate the appearance of the reflexes and somatic maturation, and improve the offspring's memory. The objective of this research was to evaluate the offspring of dams supplemented with avocado oil and pulp during gestation and lactation for somatic and reflex development, analyze fatty acid profiles in the brain, and memory function through adulthood.

MATERIALS AND METHODS

Avocado

Avocado (*Persea americana* Mill.) of the Hass variety was obtained from the commercial producer: Fazenda Jaguacy Avocado Brasil[®], located in the municipality of Bauru, São Paulo: latitude 22°19'18"S, longitude 49°04'13"W, and 526 m altitude. Part of the fruit was used to extract oil and another part was lyophilized to obtain pulp powder. The lyophilized powder was vacuum packed, and stored at -20°C. The oil and pulp were offered by gavage starting on the seventh day of gestation and throughout the lactation period until the 21st postnatal day.

Analysis of Fatty Acid Composition in Avocado Oil and Pulp

The fatty acid profiles of the oil and pulp were analyzed (Folch et al., 1957; Hartman and Lago, 1973) (Table 1).

Lipidic Extraction

Sample were weighed (2 g of each) in a beaker and added to 30 ml of chloroform:methanol mixture (2:1). After this addition, the content was transferred to a deep glass container with the side covered with aluminum foil and stirred for 2 min with the help of grinder. The trituate was filtered through qualitative filter paper into a 100 ml graduated cylinder with a polished mouth. Next, the vessel walls were washed with an additional 10 mL of chloroform:methanol which was also filtered with the previous volume. The volume of the filtered extract of the graduated cylinder was recorded with the graduated cylinder closed. Twenty

TABLE 1 | Fatty acid composition of avocado oil and lyophilized pulp (Parsa americana Mill.; Hass variety).

Acids Fat		Avocado oil	Avocado pulp
		100 g ⁻¹ lipids	
SATURATED			
Palmitic acid	C16:0	22.80	22.41
Stearic acid	C18:0	0.60	0.64
Arachidic acid	C20:0	0.07	0.06
Lignoceric acid	C24:0	0.07	0.08
Σ SFA		23.54	23.19
MONOUNSATURATED			
Palmitoleic acid	C16:1n-7	12.98	13.40
Heptadecenoic acid	C17:1n-7	0.10	0.09
Oleic acid	C18:1n-9	45.92	41.66
Gondoic acid	C20:1n-9	0.16	0.14
Σ MUFA		59.16	55.29
POLYUNSATURATED			
Linoleic acid	C18:2n-6	12.10	13.11
α -linolenic acid	C18:3n-3	0.72	0.81
Σ PUFA		12.82	13.93

percentage of the final volume of the filtered extract was added to 1.5% sodium sulfate. The mixture was stirred with the graduated cylinder closed and given time for the phases to separate. It was observed that the upper phase was ~40% and the bottom 60% of the total volume. The volume of the lower phase was recorded and then the upper phase was discarded by suction with a graduated pipette. For lipid quantification, an extracted aliquot of 5 mL (lower phase) was separated with a volumetric pipette and transferred to a previously weighed beaker. This beaker was placed in an oven at 105°C so the solvent mixture could evaporate, being careful that the fat would not be degraded by heat. After cooling in a desiccator, the beaker was weighed and the fat residue weight was obtained from the difference (Folch et al., 1957).

Transesterification of Fatty Acids

In the sample treatment, methylation of fatty acids present in the lipid extract was carried out following the methodology described by Hartman and Lago (1973). An aliquot of the lipid extract was taken, calculated for each sample according to the fat content found in the lipid measurement, and performed according to the (Folch et al., 1957), adding 1 mL of internal standard (C19:0) and a saponification (KOH) solution. This solution was subsequently brought to heating under reflux for 4 min. Esterification solution was added immediately after, returning the solution to heating under reflux for 3 more minutes. Next, the sample was allowed to cool before subsequent washings with ether, hexane and distilled water, finally obtaining an extract (with the methyl esters and solvents), which was conditioned into a properly identified amber glass until complete drying of the solvents. After drying, a suspension in 1 mL of hexane was made and packaged into a vial for further chromatographic analysis. The aliquots of saponification and esterification solutions were determined

according to the methodology described by Hartman and Lago (1973).

Gas Chromatography Analysis

A gas chromatograph (VARIAN 430-GC, California, EUA), coupled to a capillary column of fused silica (CP WAX 52 CB, VARIAN, California, EUA) with dimensions of 60 m $\times$ 0.25 mm and 0.25 mm film thickness was used with helium as carrier gas (Flow rate of 1 mL/min). The initial oven temperature was 100°C programmed to reach 240°C, increasing 2.5°C per minute for 30 min, totaling 86 min. The injector temperature was maintained at 250°C and the detector at 260°C. 1.0 μ L aliquots of esterified extract were injected in a Split/Splitless injector. The chromatograms were recorded using Galaxie Chromatography Data System software. The fatty acids results were quantified by integration the areas of the methyl esters and are expressed in percentage by area.

Analysis of Antioxidant Content of Oil and Lyophilized Avocado Pulp

The oil and pulp were analyzed for their total phenolic, flavonoid, and carotenoid components. The antioxidant capacity was also analyzed using the ABTS, FRAP, and IC₅₀ methods.

Extraction

Avocado pulp constituents were extracted with both 80:20 EtOH:H₂O v/v and evaluated for ABTS scavenging capacity, ferric reducing activity (FRAP) and total flavonoids. For total phenolic contents 100% MeOH. Oil constituents were extracted with both 80:20 MeOH:H₂O v/v and evaluated for FRAP, ABTS, total phenolic and flavonoids contents. All the extractions were performed in triplicate.

Determination of Total Phenolic Compounds (TPC)

In order to estimate the total phenolic compounds, the methodology described by Liu et al. (2002) was used with minor modifications. The absorbance of the extract was compared with a gallic acid standard curve for estimating concentration of TPC in the sample. The TPC was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of avocado oil and pulp on the basis of dry weight (DW).

Determination of Total Flavonoids

The total flavonoid content was measured using the colorimetric assay developed by Zhishen et al. (1999). The absorbance of the extract was compared with a catechin standard curve for estimating concentration of flavonoids contents in the sample. The flavonoids contents was expressed as mg of catechin equivalents (QE) per 100 g of avocado oil and pulp on the basis of dry weight (DW).

Antioxidant Activity-FRAP Method

The FRAP method was performed according to Benzie and Strain (1999), with modifications proposed by Pulido et al. (2000). The FRAP solution was used as reference reagent, and absorbance was read at 593 nm. The results were expressed in μ mol of trolox equivalents per gram of avocado pulp on dry weight (DW) basis (μ mol TE/g⁻¹).

Antioxidant Activity–ABTS Method+

The ABTS method was carried out according to the methodology described by Surveswaran et al. (2007), with modifications. The results were expressed in μmol of trolox equivalent per gram of avocado oil and pulp on dry weight (DW) basis ($\mu\text{mol TE/g}^{-1}$). Where A_0 is the absorbance of the control and as is the absorbance of the sample. The effective concentration had 50% radical inhibition activity (IC_{50}), expressed as mg extract/mL, which was determined from the graph of the free radical scavenging activity (%) against the extract concentration.

The pulp and oil, respectively, presented total phenolic contents of 64.61 and 49.50 mg GAE/100 g, total flavonoids of 39.38 and 33.75 mg CE/100 g, and total carotenoids of 87.00 and 9.87 mg/100 g. For antioxidant activity, the pulp and oil presented respective FRAP values of 0.08 and 0.03 $\mu\text{mol TE/g}$, ABTS of 2.02 and 0.17 $\mu\text{mol TE/g}$, and IC_{50} of 59.86 and 443.99 mg/mL.

Animals and Experimental Groups

Females of the Wistar lineage (90 days old/weights 250 ± 50 g) were obtained from the Laboratory of Experimental Nutrition, at the Federal University of Campina Grande-LANEX/UFCC and were bred to obtain 45 newborn rats. The females were mated while maintained at the ratio of two females to each male. After confirmation of pregnancy, the rats were housed in individual polypropylene maternity cages (60 cm in length, 50 cm wide, and 22 cm in height), under standard laboratory conditions (temperature $22 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity $65 \pm 5\%$, light/dark cycle of 12/12 h–artificial light from 6:00 to 18:00).

To obtain the offspring, 24 (Folch et al., 1957) female rats were randomly divided into three groups ($n = 15$ pups for each group): Control (CG)–supplemented with distilled water; Avocado Oil (AO)–supplemented with 3,000 mg of avocado oil/kg of animal weight; and Avocado Pulp (AP)–supplemented with 3,000 mg of avocado pulp/kg of animal weight. Gavage was administered from the 7th day of gestation until the 21st day of lactation: Standard feed (Presence Purina®, São Paulo, Brazil) and water was offered *ad libitum*. After weaning, the offspring received standard ration until adulthood. The research followed an experimental protocol in accordance with the ethical recommendations of the National Institute of Health (Bethesda,

USA), and was approved by the ethics research committee of the Federal University of Campina Grande No: 006/2017 and avocado registered in SisGen n°A737D56.

Experimental Procedures

The neonates were weighed and evaluated for reflex ontogenesis and somatic development parameters each day from birth until weaning. For fatty acid content analysis, brains were collected on the first day of life (T0), on weaning day (T21), at adolescence (T45), and as adults (T90). The memory evaluation tests were performed in adolescence and adulthood. The experimental protocol is detailed in Figure 1.

Removal of Brains and Fatty Acid Content Analysis

At T0, after sexing and manipulation for litter reduction, surplus puppies were randomly chosen for removal of the brain, which was removed upon decapitation. At T21, T45, and T90 brains were also removed and stored at -20°C until the day of analysis and quantification of fatty acid content ($n = 6$).

The fatty acid profile of the brains was determined using the (Hartman and Lago, 1973) method with transesterification and subsequent identification by gas chromatography (Varian 430GC).

Reflex Ontogeny and Somatic Response

Each day, from the 1st to the 21st day of life at from between 06:00 to 8:00 a.m. in the morning, somatic responses and reflex ontogeny were evaluated. The response was considered consolidated when the expected reaction was repeated for three consecutive days, being the 1st day of the appearance considered as the day of consolidation. The daily observation time for each parameter was 10 s. The reflex study followed the experimental model established by Smart and Dobbing (1971) (Table 2). Somatic maturation indicators were also evaluated: Aural “Pavilion” Opening (APO), Auditory Conduit Opening (ACO), Eye Opening (EO), Eruption of Upper Incisive Teeth (EUIT) and Inferior Teeth (EIIT), Appearance of Epidermal Hair (AEH), and Tail Length (TL).

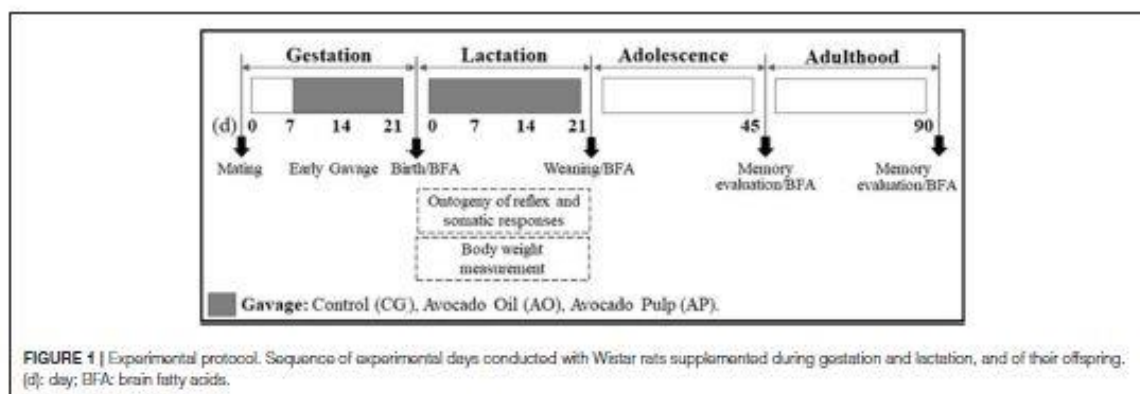


TABLE 2 | Description of the reflex test.

Reflex	Stimulus	Response
Palmer grasp (PG)	Light percussion on the palm of the right foreleg.	Quick bending of ankles.
Fighting reflex (FR)	The rat is placed in supine position on a surface.	Return to the prone position with all paws in 10 s.
Cliff avoidance (CA)	The rat is placed on a flat and high surface (table), with legs toward the extremity.	Moves to one side and walks in the opposite direction to the edge.
Vibrissa placing (VP)	The animal is suspended by the tail and its vibrissae lightly touch the edge of a flat surface.	Both front legs are placed on the table, performing march movements.
Negative geotaxis (GN)	The rat is placed at the center of an inclined ramp with head facing downwards.	Body spin at an angle of 180°, positioning head upwards.
Auditory startle response (AS)	Intense and sudden sound stimulus.	Retraction of anterior and posterior legs, with rapid and involuntary body immobilization.
Free-fall righting (FFR)	Hold by four legs at a height of 30 cm, it is released in free fall on a synthetic foam bed.	Position recovery during freefall on the surface supported by four paws.

Memory Evaluation Tests

Open Field Habituation Test

During adolescent phase and adulthood the animals were submitted to the Open Field Habituation test and the Object Recognition Test (ORT). Each animal was exposed to the open field twice, in the first stage, the habituation test was performed; and after 7 (seven) days, the same test was repeated in order to compare the locomotor activity of the animals for evaluation of non-associative learning (Rachetti et al., 2012). The parameter analyzed through this test is the amount of explorative interactions taken by the animal to the field, considering the locomotion of the four legs toward the interior of each field. The test observation time was 10 min. The procedure was performed between 06:00 and 08:00 a.m., on each test day, and the sessions were filmed with a video camera. For each animal tested, the apparatus was cleaned before starting, and after completion of the test with a 10% alcohol solution.

Object Recognition Test (ORT)

To evaluate the short and long term memory, the Object Recognition Task (ORT) was used. The test was performed in the open field apparatus (60 × 60 × 60 cm), colored black, with six lines crossing forming 6–20 × 20 cm quadrants, uniformly lit, and with black color objects, with different shapes (rectangular or pyramid), and textures (smooth or rough) (Nava-Mesa et al., 2013).

The test consisted of 4 (four) 10 min trials, taking place in 3 (three) steps: (1) Day 1–habituation for 10 min to minimize manipulation stress; (2) Day 2–performed 24 h after the habituation test, where each animal was placed in the open field

containing two objects (FO1 and FO2) with identical textures (smooth), but with different forms (triangle and prismatic rectangle), located in two randomly chosen opposite corners. On the same day, yet 1 h later, the animal was placed in the open field again to explore two objects (FO1 in its original location, and a new object–NO1, identical to FO1 but with a different texture, and located in the place where FO2 had been placed during the habituation test; and (3) Day 3–was performed 24 h after the short duration test; each animal was placed in the open field to explore two objects (FO2 in its original place) and a new object (NO2) being identical to FO2 but with different texture (Figure 2).

To evaluate short-term memory, the time spent by the animal in exploring the new differently textured object (NO1) was observed. To evaluate the long-term memory, the time spent by the animal in exploring the new differently textured object (NO2) was observed at 24 h after the first exploration, on day 2. The sessions were filmed with a video camera and for each animal tested; the device was cleaned with 10% alcohol before starting and after the test. The results for the exploration times were calculated for each animal and expressed by the ratio $TN/(TF + TN)$. TN = time spent exploring the new object; TF = time spent exploring the familiar object (Gustavsson et al., 2010; D'Avila et al., 2017).

Statistical Analysis

The results of the evaluation of reflex ontogeny and somatic development were expressed as median values for the day (Min–Max), and analyzed by Kruskal–Wallis variance analysis followed by Dunn's test ($p < 0.05$). Other results were expressed as mean $\pm$ SEM, and analyzed by ANOVA followed by Tukey ($p < 0.05$). The statistical program GraphPad Prism was used.

RESULTS

Composition of Fatty Acids in Brains of Offspring After Birth

The composition of saturated fatty acids in the AO group offspring brains on the first day of life presented reduced myristic, palmitic, and stearic fatty acids as compared to the CG and AP groups ($p < 0.05$); the AP group offspring presented lower levels of myristic and higher levels of palmitic fatty acids as compared to CG offspring ($p < 0.05$) (Table 3).

Palmitoleic, vaccenic e oleic (monounsaturates) were also found decreased in the AO group offspring as compared to the CG and AP group offspring ($p < 0.05$). However, the AP groups presented higher values for these fatty acids than the CG and AO ($p < 0.05$) (Table 3).

The total PUFA content was 15% lower in the AO group offspring (10% lower in the AP group) as compared to the CG offspring. The AO offspring presented reductions in linoleic, eicosadienoic, arachidonic, docosatetraenoic, and docosahexaenoic polyunsaturated fatty acids as compared to the CG and AP offspring ($p < 0.05$). AP offspring also presented reductions in linoleic, eicosadienoic, docosatetraenoic, and docosahexaenoic acids as compared to the CG offspring ($p < 0.05$). However, eicosatrienoic and

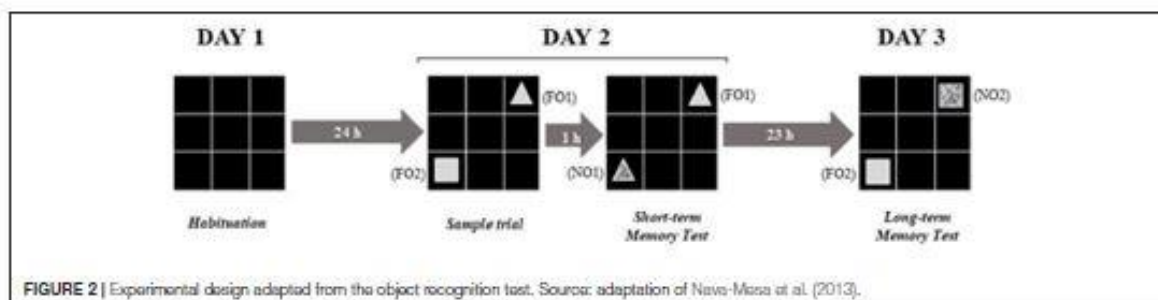


FIGURE 2 | Experimental design adapted from the object recognition test. Source: adaptation of Nave-Mass et al. (2013).

docosapentaenoic acid levels were higher in the AP and AO offspring brains compared to the CG offspring ($p < 0.05$) (Table 3).

Composition of Fatty Acids in Offspring Brains at the end of Lactation (21 Days of Life)

At 21 days of age, myristic, palmitic, stearic, and behenic saturated fatty acids levels were found decreased in the AO and AP group offspring brains when compared to the CG ($p < 0.05$). The AP group presented higher levels of these fatty acids than the AO group ($p < 0.05$) (Table 3).

Both AO and AP groups presented lower total MUFA values, with reductions in palmitoleic, vaccenic, oleic, and erucic fatty acids in AO brains compared to the CG. For palmitoleic and oleic fatty acids, the AP group brains also presented lower total values as compared to the CG and ($p < 0.05$). Gondoic acid alone was higher in the AP group as compared to the CG ($p < 0.05$) (Table 3).

The polyunsaturates (linoleic, eicosadienoic, arachidonic, and docosatetraenoic acid) were decreased in the AO and AP brains as compared to the CG ($p < 0.05$). However, total PUFAs were, respectively, 13.5 and 28% higher in the AO and AP groups as compared to the CG; due to the increased DHA and docosapentaenoic acid levels. Also the total PUFAs were higher in the AP group when compared to the AO group ($p < 0.05$) (Table 3).

Composition of Fatty Acids in Offspring's Brains in Adolescence (45 Days of Life)

Saturated fatty acid levels in the offspring brains (adolescents) were similar for all groups; except for behenic acid, which was higher in the AO and AP groups as when compared to the CG ($p < 0.05$) (Table 4).

There was no difference for monounsaturated acid contents. However, total PUFAs were 48.85% higher in the AO brains and 54.77% in the AP brains than in the CG brains. Compared to the CG brains, increased levels of DHA and docosapentaenoic fatty acid were found in the AO brains; and arachidonic, and docosahexaenoic acids were higher in the PA brains ($p < 0.05$) (Table 4).

Composition of Fatty Acids in the Adult Offspring Brain (90 Days of Life)

In adulthood, the content of saturated palmitic, stearic and behenic fatty acids in the AO offspring group brains was higher than the AP or control groups ($p < 0.05$). In relation to monounsaturated fatty acids, vaccenic acid was different between the groups, with higher levels in the AO and AP brains as compared to the CG ($p < 0.05$). Monounsaturate erucic acid was higher in the AO brain as compared to the AP group and the controls ($p < 0.05$) (Table 4).

Linoleic, eicosadienoic and eicosatrienoic polyunsaturates presented higher levels in the AP offspring than in the AP and CG offspring ($p < 0.05$). Arachidonic acid was higher in the AO groups as compared to the CG, and docosahexaenoic acid presented higher levels in the AP group as compared to the AO and control groups ($p < 0.05$) (Table 5). Total PUFAs were higher in the brains of the AP (22%) groups as compared to the controls (Table 4).

Body Weight and Tail Length

The body weight results for offspring of mothers treated with avocado oil and pulp during gestation and lactation are shown in Figure 3. The weights of the offspring of the pulp group (AP) were significantly lower than the control group (CG) during the first week of lactation (1st and 7th day), and when compared to the oil group (AO), the weights were lower from the 7th to the 21st day ($p < 0.05$). Only on the 14th day of lactation did the AO pups present significantly higher weights as compared to the CG ($p < 0.05$). By the end of lactation, the differences did not persist.

The tail lengths presented significant differences only on the first day of life, where the AP pups presented larger sizes as compared to the AO group ($p < 0.05$) (Figure 4). The difference did not remain beyond the 7th day (through the end of lactation).

Ontogenesis of Reflex, and Somatic Maturation

The offspring of mothers supplemented with pulp (AP) compared to the CG presented early disappearance of the PG, and appearance of the following reflexes: VP, CA, GN, AS, and FFR ($p < 0.05$). These same pups also anticipated the VP, GN, and AS reflexes as compared to the AO group ($p < 0.05$). The

TABLE 3 | Composition of fatty acids present in the brain puppies (T0 and T21) of dams supplemented with oil and avocado pulp.

Fatty acids	Groups					
	Brain-T0 day of life			Brain-T21 day of life		
	CG	AO	AP	CG	AO	AP
SATURATED						
Myristic acid C14:0	1.51 ± 0.05	1.15 ± 0.04*	1.40 ± 0.05 [#]	0.40 ± 0.00	0.32 ± 0.01*	0.43 ± 0.11 [#]
Palmitic acid C16:0	25.27 ± 0.30	22.57 ± 0.20*	26.16 ± 0.40 [#]	20.11 ± 0.05	17.58 ± 0.07*	18.88 ± 1.01 [#]
Stearic acid C18:0	15.63 ± 0.10	13.40 ± 0.04*	15.01 ± 0.09 [#]	17.90 ± 0.50	15.16 ± 0.64*	15.92 ± 0.84 [#]
Behenic acid C22:0	–	–	–	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.02*	0.12 ± 0.01*
Total	42.41	37.12*	42.57*	38.57	33.19*	35.35 [#]
MONOUNSATURATED						
Palmitoleic acid C16:1 ω 7c	3.74 ± 0.03	1.48 ± 0.02*	3.93 ± 0.03 [#]	0.69 ± 0.00	0.47 ± 0.01*	0.39 ± 0.02 [#]
Vaccenic acid C18:1 ω 7c	2.90 ± 0.02	2.63 ± 0.03*	3.03 ± 0.01 [#]	2.91 ± 0.10	2.54 ± 0.18*	2.76 ± 0.22 [#]
Oleic acid C18:1 ω 9	11.12 ± 0.10	9.86 ± 0.09*	11.41 ± 0.10 [#]	12.96 ± 0.20	10.83 ± 0.26*	11.74 ± 1.19 [#]
Gondoic acid C20:1 ω 9	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.01*	0.20 ± 0.02 [#]	0.52 ± 0.04	0.60 ± 0.06	0.67 ± 0.12*
Eruic acid C22:1 ω 9	–	–	–	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01*	0.07 ± 0.03
Total	17.96	14.19*	18.57 [#]	17.17	14.50*	15.56 [#]
POLYUNSATURATED						
Linoleic acid C18:2 ω 6c	1.04 ± 0.10	0.78 ± 0.07*	0.86 ± 0.09 [#]	1.37 ± 0.10	0.93 ± 0.08*	0.94 ± 0.16*
Eicosadienoic acid C20:2 ω 6	1.01 ± 0.10	0.15 ± 0.01*	0.16 ± 0.01 [#]	0.27 ± 0.02	0.20 ± 0.02*	0.20 ± 0.04*
Dihomo- γ -linolenic acid C20:3 ω 6	0.46 ± 0.20	0.58 ± 0.30*	0.61 ± 0.40 [#]	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.04	0.39 ± 0.07
Arachidonic acid C20:4 ω 6c	10.15 ± 0.10	8.67 ± 0.09*	10.14 ± 0.12 [#]	10.18 ± 0.20	8.76 ± 0.35*	9.27 ± 0.44 [#]
Docosatetraenoic acid C22:4 ω 6	3.27 ± 0.02	2.60 ± 0.28*	2.64 ± 0.20 [#]	3.48 ± 0.02	2.47 ± 0.09*	3.11 ± 0.56 [#]
Docosapentaenoic acid C22:5 ω 3	2.71 ± 0.09	4.00 ± 0.12*	3.35 ± 0.10 [#]	0.78 ± 0.10	4.17 ± 0.02*	6.99 ± 0.04 [#]
Docosahexaenoic acid C22:6 ω 3	8.19 ± 0.32	6.35 ± 0.23*	6.78 ± 0.40 [#]	10.74 ± 0.00	12.17 ± 1.69*	13.98 ± 0.9 [#]
Total	26.83	23.13*	24.27 [#]	27.31	31.00*	34.88 [#]
SUMS AND RATIOS						
PUFA/SFA	0.63	0.62*	0.57 [#]	0.47	0.93*	0.99 [#]
ω 3	11.36	10.93*	10.47 [#]	12.01	18.64*	21.36 [#]
ω 6	15.47	12.20*	13.80 [#]	15.30	12.36*	13.52 [#]
ω 9	0.20	0.22*	0.20 [#]	0.61	0.66*	0.67*
ω 6/ ω 3	1.36	1.12*	1.32*	1.27	0.67*	0.63 [#]

Data expressed as mean ± standard deviation. CG, Control Group; AO, Avocado Oil Group; AP, Avocado Pulp Group. *vs. CG. [#]vs. AO. T0, at birth; T21, at weaning (21 days of life). Statistical test used was One way Anova, followed by Tukey with a ($p < 0.05$) level of significance.

AO offspring, in relation to the CG, presented early PG onset, and the appearance of CA, GN, and FFR ($p < 0.05$) (Table 5).

For the somatic indicators, the AP neonates presented anticipation in auditory conduction opening and epidermic hair appearance, yet delayed eruption of inferior incisors as compared to the CG ($p < 0.05$). The same group (AP) when compared to the AO group presented anticipated auditory conduit opening together with superior incisor eruption ($p < 0.05$). The neonates of the AO group presented auditory conduction opening and inferior incisor eruption delays when compared to the CG ($p < 0.05$) (Table 6).

Behavioral Testing

Open Field

Open Field Habituation Test ambulatory analysis at 45 days (adolescent stage) presented differences between the first and second exposures, with a decrease in the ambulation parameter during the second exposure for all groups: CG (77.50 ± 5.75 and 55.36 ± 5.44), AO (129.92 ± 11.16 and 55.75 ± 5.44), and

AP (115.56 ± 11.13 and 56.25 ± 5.10) ($p < 0.05$) (Figure 5A). In the adult phase (T90) the same differences persisted, yet with ambulation exposure decreases in the CG (112.82 ± 10.57 and 51.67 ± 5.57), AO (95.83 ± 8.77 and 38.50 ± 4.97), and AP (99.71 ± 9.09 and 60.50 ± 5.95) ($p < 0.05$) (Figure 5B).

Object Recognition Test (ORT)

Adolescent phase

In the adolescent phase, the rate of new object exploration in the short term and in the long term tests was higher in the AO and AP groups, presenting higher exploration rates as compared to the CG ($p < 0.05$) (Figures 6A,B). The groups AO and AP presented greater time for the new object, relative to the familiar object, in both short and long periods ($p < 0.05$) (Figures 6C,D).

Adulthood

Adult offspring in the AP and AO groups also presented higher rates of new object exploration in the short and long term ($p < 0.05$) (Figures 7A,B). The groups AO and AP

TABLE 4 | Composition of fatty acids present in the brain offspring (T45 and T90) of dams supplemented with oil and avocado pulp.

Fatty acids	Groups					
	Brain-T45 day of life			Brain-T90 day of life		
	CG	AO	AP	CG	AO	AP
SATURATED						
Myristic acid C14:0	0.12 ± 0.04	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.01
Palmitic acid C16:0	15.82 ± 2.60	14.89 ± 1.14	16.22 ± 2.11	16.11 ± 0.90	17.83 ± 0.42*	16.28 ± 1.73#
Stearic acid C18:0	16.21 ± 2.91	15.29 ± 1.02	15.89 ± 1.11	16.42 ± 0.94	18.65 ± 0.21*	17.04 ± 1.62#
Behenic acid C22:0	0.19 ± 0.03	0.24 ± 0.02*	0.22 ± 0.01*	0.25 ± 0.02	0.33 ± 0.01*	0.27 ± 0.05#
Lignoceric acid C24:0	–	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01#	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Total SAT	32.34	30.68*	32.61#	33.10	37.13*	33.89#
MONOUNSATURATED						
Palmitoleic acid C16:1ω7c	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.05	0.45 ± 0.29	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.07
Vaccenic acid C18:1ω7c	3.22 ± 0.61	3.09 ± 0.07	3.32 ± 0.34	3.65 ± 0.34	4.07 ± 0.06	3.78 ± 0.66
Oleic acid C18:1ω9	13.37 ± 2.28	13.05 ± 0.19	13.95 ± 1.39	15.47 ± 1.36	17.24 ± 1.21	16.23 ± 2.52
Gondoic acid C20:1ω9	1.66 ± 0.28	1.72 ± 0.16	1.79 ± 0.02	2.72 ± 0.35	3.16 ± 0.11	2.99 ± 0.91
Eruic acid C22:1ω9	0.17 ± 0.08	0.20 ± 0.06	0.17 ± 0.07	0.29 ± 0.00	0.38 ± 0.03*	0.27 ± 0.11#
Total Monounsatur	18.69	18.36*	19.68#	22.43	25.11*	23.52#
POLYUNSATURATED						
Linoleic acid C18:2ω6c	0.59 ± 0.13	0.63 ± 0.08	0.61 ± 0.11	0.61 ± 0.00	0.67 ± 0.04*	0.53 ± 0.06#
Eicosadienoic acid C20:2ω6	0.23 ± 0.06	0.22 ± 0.00	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.00*	0.12 ± 0.02#
Dihomo-γ-linolenic acid C20:3 ω6	0.35 ± 0.07	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.00	0.28 ± 0.02	0.36 ± 0.01*	0.24 ± 0.02#
Arachidonic acid C20:4ω6c	6.41 ± 0.43	7.09 ± 0.52	8.06 ± 0.64#	7.23 ± 0.61	8.17 ± 0.74*	7.59 ± 0.10
Docosahexaenoic acid C22:4 ω6	3.20 ± 0.70	3.17 ± 1.02	3.90 ± 0.59	2.74 ± 0.23	2.79 ± 0.16	2.80 ± 0.18
Docosapentaenoic acid C22:5 ω3	3.28 ± 0.69	4.60 ± 0.89*	3.28 ± 0.85#	1.43 ± 0.13	1.40 ± 0.02	1.40 ± 0.09
Docosahexaenoic acid C22:6ω3	11.39 ± 1.37	15.86 ± 1.03*	16.76 ± 1.52*	11.45 ± 1.24	10.48 ± 0.43	15.80 ± 0.97#
Total	25.45	31.93*	33.22#	23.96	24.12*	28.48#
SUMS AND RATIOS						
PUFA/SFA	0.79	1.04*	1.02#	0.72	0.65*	0.84#
ω3	15.02	20.82*	20.43#	13.16	12.24*	17.44#
ω6	10.43	11.11*	12.79#	10.80	11.88*	11.04#
ω9	1.83	1.92*	1.96#	3.01	3.54*	3.26#
ω6/ω3	0.69	0.53*	0.63#	0.82	0.97*	0.63#

Data expressed as mean ± standard deviation. CG, Control Group; AO, Avocado oil Group; AP, Avocado Pulp Group of. *vs. CG. #vs. AO. T45, adolescent phase (45 days of life); T90, adult phase (90 days of life). Statistical test used was One Anova way followed by Tukey with a level of significance of ($p < 0.05$).

presented greater time for the new object, relative to the familiar object, in both short and long periods ($p < 0.05$) (Figures 7C,D).

DISCUSSION

Maternal fatty acids transferred via the placenta, and through the breast milk are considered critical for growth and development (Lauritzen and Carlson, 2011; Innis, 2014). Thus, during gestation and lactation, manipulation of lipids can affect the availability of fatty acids to the fetus and the infant. In the present study, avocado oil and pulp supplementation during gestation and lactation positively influenced the offspring in: (1) reflex development, (2) somatic maturation, (3) and memory acquisition (4) the fatty acid profiles of the brains of the neonates, adolescents, and adult offspring.

Maternal consumption of distinct lipids presents differing consequences for the weight, growth, and somatic parameters in their offspring. At birth, and during the first week of lactation, the results reveal that the offspring of the AP mothers had lower weights than the CG. Several studies have reported a decrease in the body weights of offspring with mothers receiving lipids from differing sources; at times presenting similar lipid profiles as compared to those used in the present research, such as cashew nuts (Melo et al., 2017), which has fiber as Avocado pulp and Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) (Medeiros et al., 2015), and olive oil (Sánchez et al., 2012; Priego et al., 2013), which are source of polyunsaturated fatty acids as the lipids used in the present research (pulp and avocado oil). The presence of fiber and polyunsaturated fatty acids in maternal diet can induce reduction of plasma triglycerides (TG). Increased maternal levels have been used as a biochemical marker to increase offspring birth weight (Barbour and Hernandez,

TABLE 5 | Reflex maturation in offspring of mothers supplemented with avocado oil and pulp during gestation and lactation.

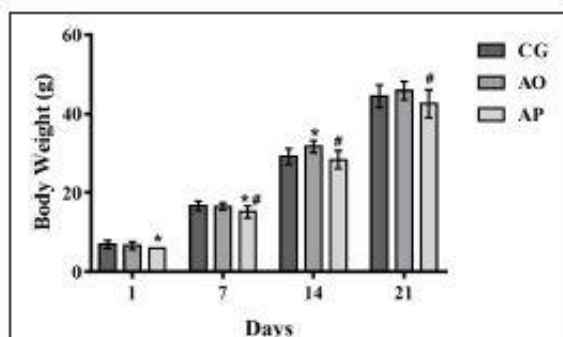
Reflexes	Groups		
	CG	AO	AP
Palmar grasp (PG) ^a	8 (6–13)	5 (3–7)*	4 (3–5)*
Fighting reflex (FR)	4 (1–9)	4 (2–7)	4 (2–6)
Vibrissa placing (VP) ^b	10 (5–13)	9 (7–10)	7 (7–10)*#
Cliff avoidance (CA) ^b	10 (6–15)	6 (5–8)*	6 (2–10)*
Negative geotaxis (GN) ^b	20 (19–21)	13 (12–14)*	10 (10–12)*#
Auditory startle response (AS) ^b	12 (11–13)	13 (12–13)	11 (10–12)*#
Free-fall righting (FFR) ^b	12 (8–15)	7 (2–14)*	5 (2–9)*

Data were expressed as mean values of the day (Min-Max) and analyzed by Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Dunn's test ($p < 0.05$).

*Compared to control group.

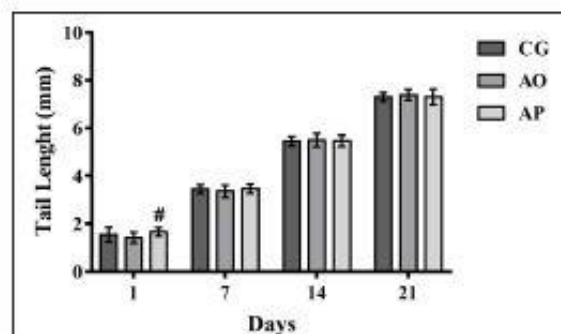
#Compared to the avocado oil group.

Considering: ^aDay of response disappearance and ^bDay of response appearance. CG (Control Group- $n = 15$), AO (Avocado Oil Group- $n = 15$), AP (Avocado Pulp Group- $n = 15$).

**FIGURE 3 |** Mean body weight in grams (g) ($\pm$ SEM) of neonatal rats whose mothers received supplementation with avocado oil and pulp (3,000 mg/kg body weight) during gestation and lactation. ANOVA followed by Tukey ($p < 0.05$). (*) statistically different as compared to CG; (#) statistically different as compared to AO. CG (Control Group- $n = 15$), AO (Avocado Oil Group- $n = 15$), AP (Avocado Pulp Group- $n = 15$).

2018) and their lower plasma levels have been associated with improved insulin sensitivity and lower caloric influx (Nolan et al., 1995). In contrast, diets with high levels of SFA induce an increase in plasma triglycerides, consequently, they also can induce increase in the offspring weight (Ferre Cavalcante et al., 2013; Soares et al., 2013; Cadena-Burbano et al., 2017). Therefore, it was observed in the present research a reduction in TG at the end of the lactation of the mothers fed with the pulp, when compared to the others groups (data not shown). These findings are in agreement with Barbour and Hernandez (2018).

Maternal supplementation with avocado promoted acceleration in the postnatal appearance of several somatic parameters. Lipids are recognized for promoting somatic growth in the offspring (Del Prado et al., 1997). Both avocado oil and

**FIGURE 4 |** Tail lengths of the offspring of mothers supplemented with avocado oil and pulp (3,000 mg/kg body weight) during gestation and lactation. Data expressed as mean $\pm$ SEM and analyzed by ANOVA followed by Tukey ($p < 0.05$). (#) statistically different as compared to the AO group. CG (Control Group- $n = 15$), AO (Avocado Oil Group- $n = 15$), AP (Avocado Pulp Group- $n = 15$).**TABLE 6 |** Somatic development in offspring of mothers supplemented with avocado oil and pulp during gestation and lactation.

Physical characteristics	Groups		
	CG	AO	AP
Ear unfolding	3 (2–4)	3 (2–4)	3 (2–4)
Auditory conduit opening	14 (13–15)	13 (12–13)*	11 (10–12)*#
Eye opening	14 (12–15)	13 (12–15)	14 (12–15)
Eruption of superior incisors	10 (8–12)	11 (9–12)	9 (8–11)*#
Eruption of inferior incisors	4 (2–5)	8 (8–9)*	7 (7–8)*
Epidemic hair appearance	3 (2–4)	3 (3–3)	3 (2–3)*

Data were expressed as mean values of the day (Min-Max), analyzed by Kruskal-Wallis analysis of variance, followed by Dunn's test ($p < 0.05$).

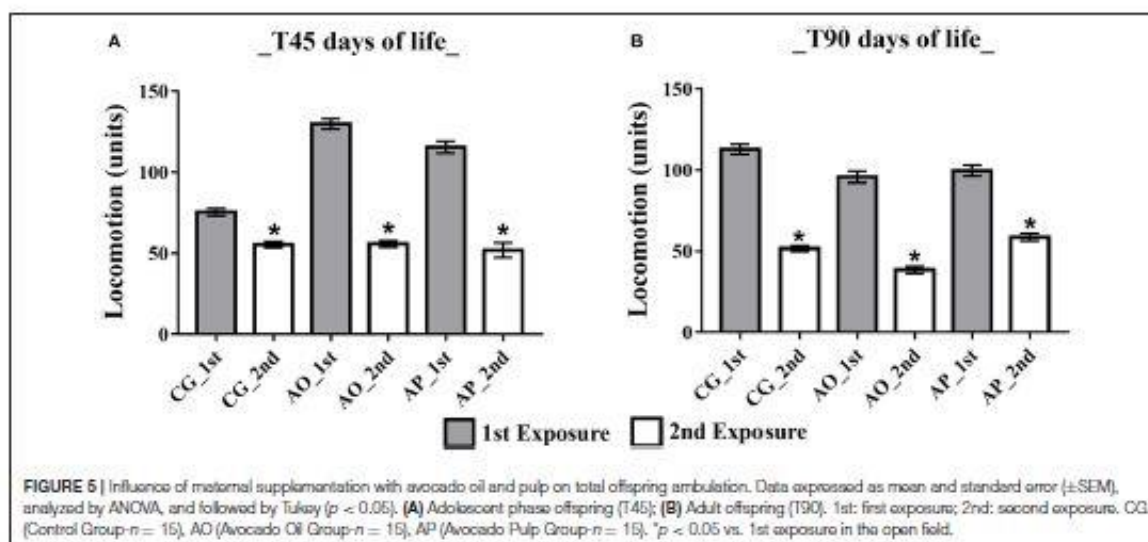
*Compared to the control group.

#Compared to the avocado oil group.

CG (Control Group- $n = 15$), AO (Avocado Oil Group- $n = 15$), AP (Avocado Pulp Group- $n = 15$).

pulp, despite having high amounts of oleic and palmitoleic acids in their composition, have ω -6 and ω -3 fatty acids, which have been associated with physical growth in rat progeny (Santillán et al., 2010; Ferro Cavalcante et al., 2013). These results are consistent with experiments that used PUFA and MUFA in the source foods (Ferre Cavalcante et al., 2013; Melo et al., 2017), and the same for avocado lipids, yet results diverge for SFA-source diets (Soares et al., 2009). The findings confirm that both the quality and amount of lipids in the maternal diet directly influence physical development in the offspring (Hausman et al., 1991). DHA and ARA (in combination) are essential for optimal growth and development early in life (Harauma et al., 2017).

During the critical developmental phase, essential fatty acids are needed for physical growth and good brain development. The brain goes through processes that include neural network organization; accumulation of DHA and ARA occurs to support active neurogenesis and neuronal growth (Lauritzen and Carlson,

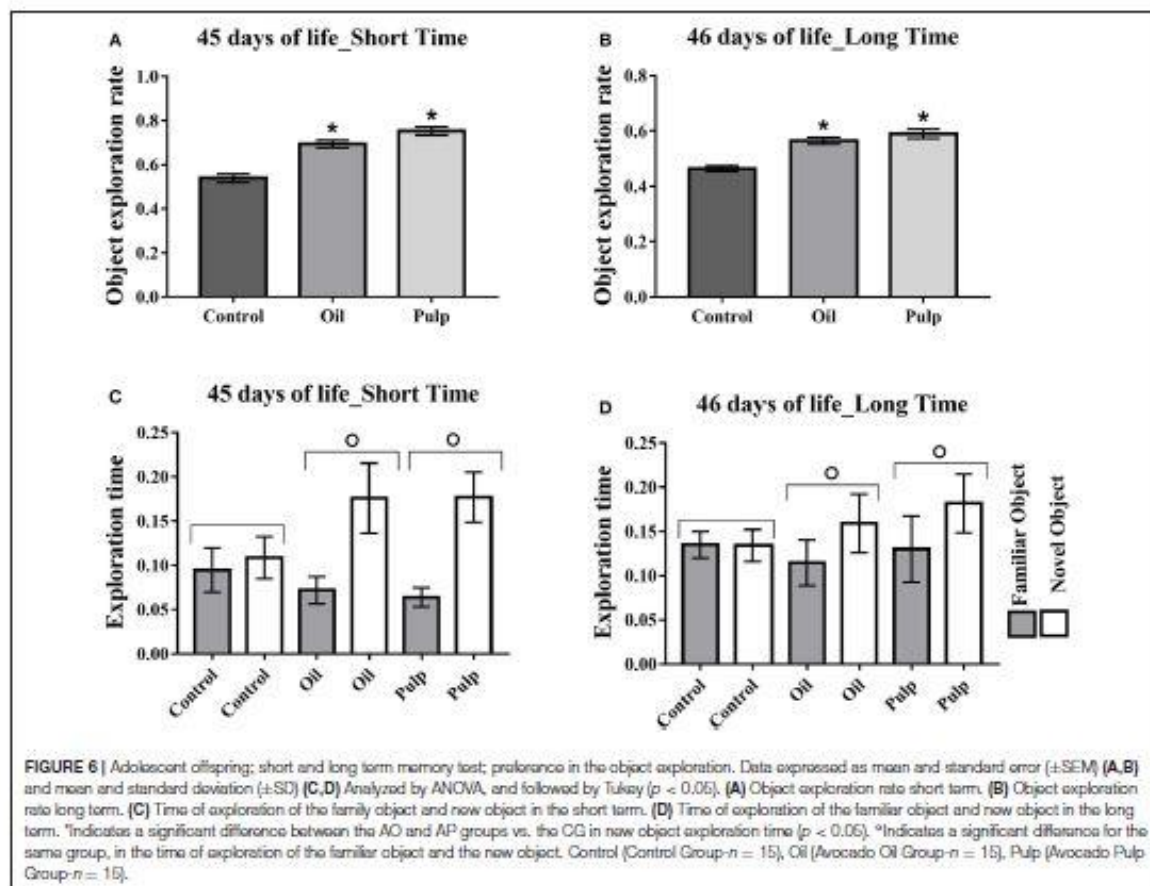


2011; Innis, 2014), while modifying the fluidity and signaling of neuronal membranes (Bazinet and Layé, 2014). In this period, specific brain regions, including the hippocampus, striatum, visual and auditory cortices respond similarly to nutritional insults (Kretchmer et al., 1996), leading to long-term effects (Morgane et al., 1993; Arcego et al., 2017).

Our results showed that at the end of gestation, or at the beginning of the postnatal phase (T0), there was less incorporation of DHA (C22: 6n3) in the brains of the AO and AP offspring. However, by the end of lactation, levels of DHA had increased in brains of the AO and AP offspring as compared to the control groups. In rodents, fetal demand for fatty acid incorporation occurs from the last week of gestation to the end of lactation (Morgane et al., 2002). This explains the observed increase in DHA incorporation in the T21 brain levels, as compared to T0 levels. Accumulation of fatty acids in the offsprings' brains is influenced by pre-fetal and post-fetal maternal supply (Innis, 2011). Avocado oil and pulp present low linolenic acid content (ALA); a DHA precursor. The increases observed in the brain levels for this fatty acid in the offspring of mothers who consumed avocado oil and pulp oppose studies that have found a positive relation between low ALA content and low proportions of DHA in offspring brain tissue (Amusquivar et al., 2000; Melo et al., 2017; Lopez-Soldado et al., 2018). However, avocado presents high phospholipid (PL) content, present in the lipid fraction of its pulp (Cowan and Wolstenholme, 2016; Pacetti et al., 2017) and oil (Takenaga et al., 2008). Increases in DHA uptake in the brains of the AO and AP offspring can be explained by the presence of phospholipids in avocado. DHA is synthesized by ALA desaturation and stretching reactions (Pereira et al., 2003; Novak et al., 2008), and when esterified into PLs, is more efficiently incorporated into brain tissue (Murru et al., 2013; Kitson et al., 2016; Destailats et al., 2018). Of the phospholipids, lyso-phosphatidylcholine (LPC) as esterified

to DHA (LPC-DHA) is the most efficient way to cross the blood-brain barrier inducing a greater deposition of DHA in the brain (Nguyen et al., 2014). In the fetal brain formation and postnatal development periods, LPC-DHA is associated with an increase in exogenous PUFA uptake and deposition in the membranes of brain tissue, which promotes higher DHA deposition (Chan et al., 2018). One study reveals that offspring of mothers fed LPC from DHA-enriched eggs present higher levels of this FA in certain brain regions (Valenzuela et al., 2010). These findings are similar to the data found in the present study.

Reflex ontogeny is another parameter used to evaluate development because it measures maturation and central nervous system function early in life (Fox, 1965; Smart and Dobbins, 1971). It also reflects the integrity of cerebellar and sensorimotor development, and of vibrissae integration (Zhang et al., 2010). Adequate reflex development depends on myelination and synapse processes, and the action of neurotransmitters (Bourre et al., 1987; Morgane et al., 1993). The anticipation of the negative geotaxis demonstrates positive evolution in labyrinth and/or vestibule function, while anticipation of cliff avoidance reflects sensorimotor function maturity (Santillán et al., 2010). Righting reflex involves both motor and visual functions (Boyle, 2001) and confirms the nervous system's maturation. Our results showed that avocado oil and pulp promoted acceleration of neonate reflex maturation. A number of experimental studies support the results of the present study for animals treated with cashew nuts (Melo et al., 2017), soybean and fish oil (Santillán et al., 2010), and goat's milk fat (Soares et al., 2013). However, our results verify that consumption of avocado pulp promotes a more pronounced acceleration in reflex; by anticipating six of the seven observed parameters. At the end of lactation, SFA and MUFA levels were lower in the brains of the animals treated with oil and pulp than in the control group; while PUFA levels were higher in the



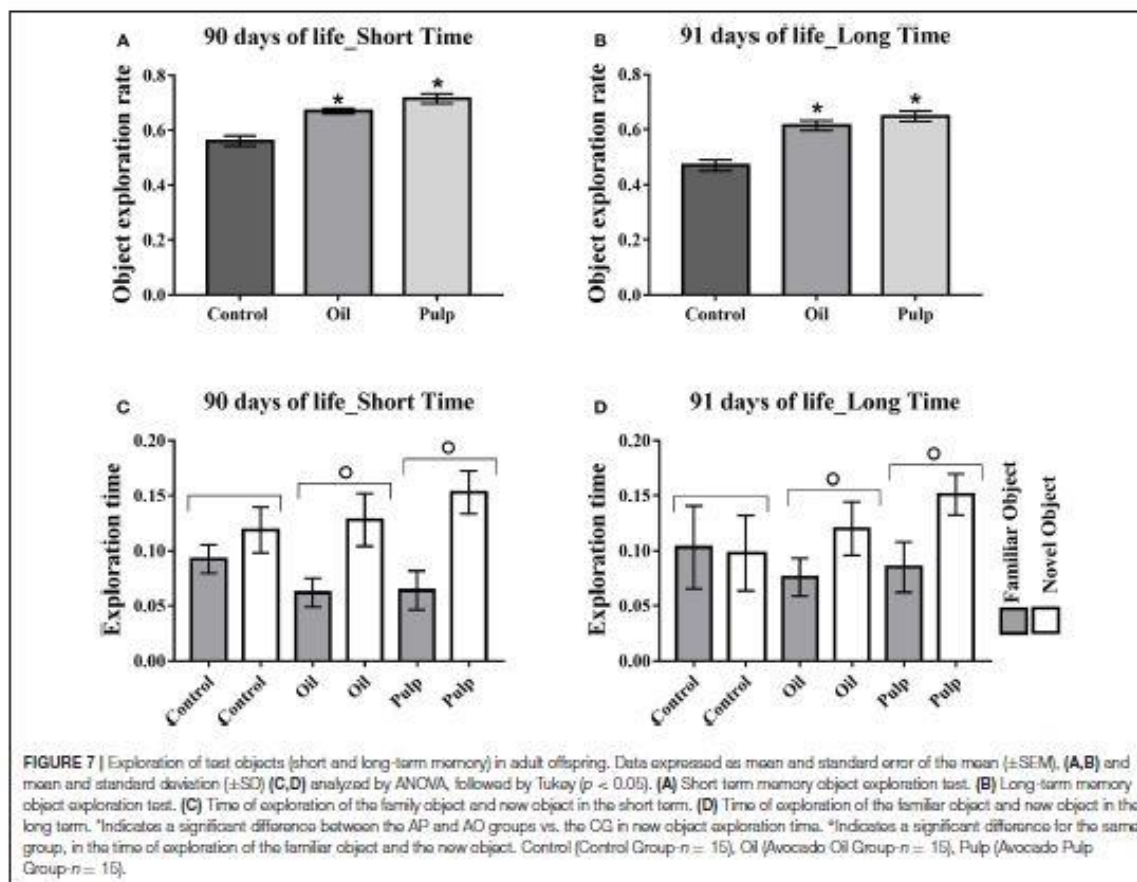
brains of the animals treated with oil (13.5%) and pulp (28%). These results suggest that high levels of PUFA may be directly related to the offspring's reflex development and the higher consumption of pulp justifies the better result observed in these groups.

The avocado used in the present research is a source of bioactive components such as phenolics, flavonoids, and carotenoids (Ameer, 2016), and the pulp has more of these compounds than the oil. These substances cross the placental barrier reaching the fetal tissue (Todaka et al., 2005), accumulating in the retina (carotenoids) and playing an important role in the development of vision and the nervous system (Hammond, 2015; Zielinska et al., 2017). Thus, neonate neuroprotection (polyphenols) (Loren et al., 2005) can induce acceleration of somatic development and reflex in the offspring (phenolics and flavonoids) (Ajarem et al., 2017). As well as observed in the present work, where both avocado oil and pulp promoted such acceleration in the development of the offspring; the results for pulp being more pronounced. An opposing result was found by Medeiros et al. (2015) D'ávila et al. (2017), where

the offspring of mothers supplemented with Buriti oil (rich in carotenoids), presented delayed onset for palm grasp, righting reflex and cliff avoidance reflexes.

In addition, we investigated long-lasting effects of maternal supplementation on adolescent (T45) and adult (T90) offspring, evaluating the influence of avocado consumption on animal memory. At different stages of the cycle, neurons are continuously produced in the dentate gyrus of the hippocampus, but the ontogenetic stage in which the neurogenesis occurs is crucial for memory processing. Neurons in the neonatal phase are activated through different memory processes (Tronel et al., 2015). Learning and memory processes are performed in the hippocampus dentate gyrus in cooperation with the cerebral cortex (Eichenbaum and Lipton, 2008; Coutureau and Di Scala, 2009), and PUFAs, through metabolic imprinting mechanisms affect brain functions during the development phase and promote permanent effects (van Dijk et al., 2011; Yehuda, 2012).

ARA and DHA are important constituents of membranes, especially brain tissue (Martinez, 1992; Innis, 2007) and are involved in different mechanisms that affect animal memory.



DHA is involved in the expression of BDNF (brain derived neurotrophic factor), NMDA receptor (N-methyl-D-aspartate) synthesis, induction of LTP (long-term potential), and liberating glutamate in glutamatergic functions. Deficiency of ω -3 PUFA alters the fatty acid composition of the fetal brain with repercussions in the adult phase, increases fetal inflammatory processes, and induces deficits in development and memory (Labrousse et al., 2018). ARA is involved in the regulation of the cholinergic neurotransmission system and in the GABA/Glu regulatory system decreasing oxidative damage, and cellular apoptosis (Li et al., 2015). These two PUFAs were incorporated into the offsprings' brains through maternal supplementation with avocado, and ARA presented higher levels in the brains of the AO group in adolescence and the AP group as adults, while DHA presented higher levels in the AP and AO groups in adolescence and only in AP animals in adulthood.

In the present study we used the Open Field Habituation test and the Object Recognition Test (ORT) for evaluation of non-associative learning of the adolescent and adult offspring. In the Open Field Habituation test, repeated exposure to the

same environment tends to cause a decrease in locomotion, recognized as a form of non-associative learning (Rachetti et al., 2012). Our results showed that in the adolescent and adult offspring, maternal supplementation with avocado oil and pulp reduced locomotion in the second exposure. The same effect has also observed in the animals fed a diet containing cashew nuts (Melo et al., 2017) and fish oil (Rachetti et al., 2012). Increased habituation, yet with memory impairment has occurred with peanut oil, containing little LA (Frances et al., 1996), but with an excess in saturated fat (Page et al., 2014).

The Object Recognition Test (ORT) involves an acquisition phase, where the rodent explores a chamber containing two similar objects and a recall phase, which occurs after a time interval in which one object is replaced by a new one. From the time interval used between the exposures, and from the ratio of time spent on the exploration of the new vs. the familiar object, and from the greater interaction with the new object, we may observe facilitation of short and long term memory (Corder and Tamashiro, 2015); recognition of place, that involves the hippocampus (Barker and Warburton, 2011) and preference for

the new object, which involves the prefrontal cortex (Mumby and Pinel, 1994; Bussey et al., 2000). Our results demonstrated that maternal supplementation with avocado oil and pulp facilitated acquisition of recognition memory in the adolescent and adult offspring, evidenced by a higher exploration rate (of the new object), both short and long term. Melo et al. (2017) has demonstrated that a maternal diet containing cashew nuts yields good short-term memory performance in the offspring. The offspring of mothers supplemented with fish oil has been shown to present good long-term memory performance (Rachetti et al., 2012). Other studies have demonstrated improvements in cognitive performance in offspring in relation to maternal consumption of olive (Pase et al., 2015) and linseed oils (Fernandes et al., 2011). However, maternal consumption of high ω -6/ ω -3 ratio (Lépinay et al., 2015); saturated fats (Frances et al., 1996; Souza et al., 2012; Arcego et al., 2017), hydrogenated vegetable fat (Pase et al., 2017) and interesterified fat (D'Avila et al., 2017) caused damage to the animals' memory. The results obtained in our study demonstrate that increased ARA and DHA levels in the brains of the offspring of the supplemented groups interfered directly in memory development. Yet both DHA and ARA are responsible for maintaining optimal growth and functional behavior of the offspring (Harauma et al., 2017). DHA, in particular, is capable of protecting the hippocampus against oxidative stress and apoptosis; preventing memory deficits (Gao et al., 2016).

The positive effects of maternal supplementation with avocado oil and pulp on the memory of from adolescents to adult offspring can also be explained by its antioxidant potential. Experimentally, the antioxidant action of this fruit has been proven in diabetic rats supplemented with its oil (Ortiz-Avila et al., 2015). Studies have shown that the effect of maternal consumption of flavonoids on offspring memory is associated with decreased oxidative brain damage; due to reductions in lipid peroxidation levels, and generation of reactive species, and an increase in the antioxidant defense system as well as BDNF in the adult rat pre-frontal cortex (Bussey et al., 2000), and modulation of hippocampal signaling (Corona et al., 2013).

In the present study, the fatty acid profile in the brains of the offspring of mothers supplemented with avocado oil and pulp during gestation and lactation was measured at different

stages of the life cycle. The animals of the two experimental groups, oil and pulp showed better somatic maturation, an anticipation of reflexes and improvement in memory. These findings demonstrate the benefits that maternal supplementation with a source of monounsaturated fatty acids and antioxidant compounds can bring to the development of the brain, persisting into adulthood.

As a limitation of this study, the groups treated with avocado were not compared with animals treated with lipid source deficient in essential fatty acids. On the other hand, we objected with the present study to define whether maternal supplementation with pulp and avocado oil could have a distinct effect on neurodevelopment of the offspring.

CONCLUSION

Maternal supplementation with avocado oil and pulp influences the development of the nervous system of the offspring in the short and long term, accelerating somatic development and reflex maturation while improving memory in the adolescent and adult phases.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

This research was carried out by all authors. JS, MP, and MM designed the theme of the study. MM, RM, ES, DP, and MC performed the experimental methods designed. SS and CD performed fatty acid analysis and VV carried out analysis of the antioxidant components. JS, MO, FM, and MM analyzed the data. JS and MM interpreted the results and wrote the article.

FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES)–Finance Code 001.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the contributing authors of the study.

REFERENCES

- Ajarem, J., Al Rashed, G., Mohany, M., and Allam, A. (2017). Neurobehavioral changes in mice offspring exposed to green tea during fetal and early postnatal development. *Behav. Brain Funct.* 13:10. doi: 10.1186/s12993-017-0128-1
- Ameer, K. (2016). Avocado as a major dietary source of antioxidants and its preventive role in neurodegenerative diseases. *Adv. Neurobiol.* 12, 337–354. doi: 10.1007/978-3-319-28383-8_18
- Amasquivar, E., Ruperez, F. J., Barbas, C., and Herrera, E. (2000). Low arachidonic acid rather than alpha-tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. *J. Nutr.* 130, 2855–2865. doi: 10.1093/jn/130.11.2855
- Apriyatin, A. S., Sidorova, Y. S., Shipelin, V. A., Balakina, A., Trusov, N. V., and Mazo, V. K. (2017). Neuromotor activity, anxiety and cognitive function in the in vivo model of alimentary hyperlipidemia and obesity. *Bull. Exp. Biol. Med.* 163, 37–41. doi: 10.1007/s10517-017-3732-z
- Arcego, D. M., Toniazio, A. P., Krolow, R., Lampert, C., Berlitz, C., dos Santos Garcia, E., et al. (2017). Impact of high-fat diet and early stress on depressive-like behavior and hippocampal plasticity in adult male rats. *Mol. Neurobiol.* 55, 2740–2753. doi: 10.1007/s12035-017-0538-y
- Barbour, L. A., and Hernandez, T. L. (2018). Maternal lipids and fetal overgrowth: making fat from fat. *Clin. Ther.* 40, 1638–1647. doi: 10.1016/j.clinthera.2018.08.007
- Barker, G. R., and Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *J. Neurosci.* 31, 10721–10731. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6413-10.2011
- Bazinet, R. P., and Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease (1996). *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 771–785. doi: 10.1038/nrn3820
- Benzie, I. F., and Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant

- power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299, 15–27. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99005-5
- Bourne, J. M., You, Y., Durand, G., and Pascal, G. (1987). Slow recovery of the fatty acid composition of sciatic nerve in rats fed a diet initially low in ω -3 fatty acids. *Lipids* 22, 535–538. doi: 10.1007/BF02540371
- Boyle, R. (2001). Vestibulospinal control of reflex and voluntary head movement. *Ann. NY. Acad. Sci.* 942, 364–380. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03760.x
- Brenna, J. T., and Lapillonne, A. (2009). Background paper on fat and fatty acid requirements during pregnancy and lactation. *Ann. Nutr. Metab.* 55, 97–122. doi: 10.1159/000228998
- Bussey, T. J., Duck, J., Muir, J. L., and Aggleton, J. P. (2000). Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav. Brain Res.* 111, 187–202. doi: 10.1016/S0166-4328(00)00155-8
- Cadena-Burbano, E. V., Cavalcanti, C. C. L., Lago, A. B., Benjamim, R. A. C., Oliveira, T. R. D. P., Silva, J. M., et al. (2017). A maternal high-fat/high-calorie diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. *Nutr. Neurosci.* 28, 1–12. doi: 10.1080/1028415X.2017.1354958
- Chan, J. P., Wong, B. H., Chin, C. F., Galam, D. L. A., Foo, J. C., Wong, L. C., et al. (2018). The lysolipid transporter Mfsd2a regulates lipogenesis in the developing brain. *PLoS Biol.* 16:e2006443. doi: 10.1371/journal.pbio.2006443
- Cordner, Z. A., and Tamashiro, K. L. K. (2015). Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol. Behav.* 152, 363–371. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.06.008
- Corona, G., Vanzour, D., Herceles, J., Williams, C. M., and Spencer, J. P. (2013). Phenolic acid intake, delivered via moderate champagne wine consumption, improves spatial working memory via the modulation of hippocampal and cortical protein expression/activation. *Antiox. Redox Signal.* 10, 1676–1689. doi: 10.1089/ars.2012.5142
- Coutureau, E., and Di Scala, G. (2009). Entorhinal cortex and cognition. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 753–761. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.03.038
- Cowan, A. K., and Wolstenholme, B. N. (2016). "Avocado," in *Encyclopedia of Food and Health*, eds B. Caballero, P. Finglas, F. Toldra (San Diego, CA: Academic Press), 294–299. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00049-0
- D'Avila, L. F., Dias, V. T., Vey, L. T., Milanesi, L. H., Roversi, K., Emanuelli, T., et al. (2017). Toxicological aspects of interesterified fat brain damages in rats. *Toxicol. Lett.* 5, 122–128. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.020
- Del Prado, M., Delgado, G., and Villalpando, S. (1997). Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J. Nutr.* 127, 458–462. doi: 10.1093/jn/127.3.458
- Destailats, F., Oliveira, M., Bastic Schmidt, V., Masserey-Elmelegy, L., Giuffrida, F., Thakkar, S. K., et al. (2018). Comparison of the incorporation of DHA in circulatory and neural tissue when provided as Triacylglycerol (TAG), Monoacylglycerol (MAG) or phospholipids (PL) provides new insight into fatty acid bioavailability. *Nutrients* 10:E620. doi: 10.3390/nu10050620
- Dreher, M. L., and Davenport, A. J. (2013). Hass avocado composition and potential health effects. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 53, 738–750. doi: 10.1080/10408398.2011.556759
- Dyall, S. C. (2017). Interplay between n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids and the endocannabinoid system in brain protection and repair. *Lipids* 52, 885–900. doi: 10.1007/s11745-017-4292-8
- Eichenbaum, H., and Lipton, P. A. (2008). Towards a functional organization of the medial temporal lobe memory system: role of the parahippocampal and medial entorhinal cortical areas. *Hippocampus* 18, 1314–1324. doi: 10.1002/hipo.20500
- Fernandes, F. S., Souza, A. S., Carmo, M. D., and Boaventura, G. T. (2011). Maternal intake of flaxseed-based diet (*Linum usitatissimum*) on hippocampus fatty acid profile: implications for growth, locomotor activity and spatial memory. *Nutrition* 27, 1040–1047. doi: 10.1016/j.nut.2010.11.001
- Ferre Cavalcante, T. C., Lima da Silva, J. M., da Marcelino da Silva, A. A., Muniz, G. S., da Luz Neto, L. M., Lopes de Souza, S., et al. (2013). Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. *Lipids* 48, 1157–1168. doi: 10.1007/s11745-013-3833-z
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fox, W. M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 13, 234–241. doi: 10.1016/0003-3472(65)90041-2
- Frances, H., Monier, C., Clement, M., Lecorsier, A., Debray, M., and Bourne, J. M. (1996). Effect of dietary alpha-linolenic acid deficiency on habituation. *Life Sci.* 58, 1805–1816. doi: 10.1016/0024-3205(96)00164-6
- Gao, J., Wu, H., Cao, Y., Liang, S., Sun, C., Wang, P., et al. (2016). Maternal DHA supplementation protects rat offspring against impairment of learning and memory following prenatal exposure to valproic acid. *J. Nutr. Biochem.* 35, 87–95. doi: 10.1016/j.jnuthio.2016.07.003
- Garbay, B., Heape, A. M., Sargueil, F., and Cassagne, C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* 61, 267–304. doi: 10.1016/S0304-0082(99)00049-0
- González, H. F., and Visentin, S. (2016). Nutrients and neurodevelopment: lipids. *Arch. Argent. Pediatr.* 114, 472–476. doi: 10.5546/aap.2016.eng.472
- Gustavsson, M., Hodgkinson, S. C., Fong, B., Norris, C., Guan, J., Krageloh, C. U., et al. (2010). Maternal supplementation with a complex milk lipid mixture during pregnancy and lactation alters neonatal brain lipid composition but lacks effect on cognitive function in rats. *Nutr. Res.* 30, 279–289. doi: 10.1016/j.nutres.2010.04.005
- Hammond, B. R. (2015). Dietary carotenoids and the nervous system. *Foods* 4, 698–701. doi: 10.3390/foods4040698
- Haraizumi, A., Hatanaka, E., Yasuda, H., Nakamura, M. T., Salem, N., and Moriguchi, T. (2017). Effects of arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on brain development using artificial rearing of delta-6-desaturase knockout mice. *Prostaglandins Leuk. Essent. Fatty Acids* 127, 32–39. doi: 10.1016/j.plefa.2017.10.001
- Hartman, L., and Lago, R. C. A. (1973). Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Lab. Pract.* 22, 475–476.
- Hausman, D. B., McCloskey, H. M., and Martin, R. J. (1991). Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weanling rats. *J. Nutr.* 121, 1917–1923. doi: 10.1093/jn/121.12.1917
- 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
- Innis, S. M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 554, 27–43. doi: 10.1007/978-1-4757-4242-8_5
- Innis, S. M. (2005). Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 26, S70–S75. doi: 10.1016/j.placenta.2005.01.005
- Innis, S. M. (2007). Fatty acids and early human development. *Early Hum. Dev.* 83, 761–766. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2007.09.004
- Innis, S. M. (2011). Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. *Matern. Child. Nutr.* 7, S112–S123. doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00318.x
- Innis, S. M. (2014). Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 734S–741S. doi: 10.3945/ajcn.113.072595
- Kitson, A. P., Metherell, A. H., Chen, C. T., Domenichello, A. F., Trépanier, M. O., Berger, A., et al. (2016). Effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) in phospholipids or triglycerides on brain DHA uptake and accretion. *J. Nutr. Biochem.* 33, 91–102. doi: 10.1016/j.jnuthio.2016.02.009
- Kretschmer, N., Beard, J. L., and Carlson, S. (1996). The role of nutrition development of normal cognition. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 997–1001. doi: 10.1093/ajcn/63.6.997
- Labrousse, V. F., Leyrolle, Q., Amadiou, C., Aubert, A., Serea, A., Coutureau, E., et al. (2018). Dietary omega-3 deficiency exacerbates inflammation and reveals spatial memory deficits in mice exposed to lipopolysaccharide during gestation. *Brain Behav. Immun.* 73, 427–440. doi: 10.1016/j.bbi.2018.06.004
- Lauritzen, L., and Carlson, S. E. (2011). Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. *Matern. Child. Nutr.* 7, 41–58. doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00303.x
- Lépinay, A. L., Larrieu, T., Joffe, C., Acar, N., Gárate, I., Castanon, N., et al. (2015). Perinatal high-fat diet increases hippocampal vulnerability to the adverse effects of subsequent high-fat feeding. *Psychoneuroendocrinology* 53, 82–93. doi: 10.1016/j.psychneu.2014.12.008
- Li, C., Wang, Q., Li, L., Liu, Y., and Diao, H. (2015). Arachidonic acid attenuates learning and memory dysfunction induced by repeated isoflurane anesthesia in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 12365–12373.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., and Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of

- rasberries. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2926–2930. doi: 10.1021/jf0111209
- Lopez-Soldado, I., Ortega-Senovilla, H., and Herrera, E. (2018). Maternal adipose tissue becomes a source of fatty acids for the fetus in fasted pregnant rats given diets with different fatty acid compositions. *Eur. J. Nutr.* 57, 2963–2974. doi: 10.1007/s00394-017-1570-4
- Loren, D. J., Seeram, N. P., Schulman, R. N., and Holtzman, D. M. (2005). Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr. Res.* 57, 858–864. doi: 10.1203/01.PDR.0000157722.07810.15
- Makrides, M., Collins, C. T., and Gibson, R. A. (2011). Impact of fatty acid status on growth and neurobehavioral development in humans. *Matern. Child. Nutr.* 7, 80–88. doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00304.x
- Martinez, M. (1992). Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J. Pediatr.* 120, 129S–138S. doi: 10.1016/S0022-3476(05)81247-8
- Medeiros, M. C., Aquino, J. S., Soares, J., Figueiroa, E. B., Mesquita, H. M., Pessoa, D. C., et al. (2015). Buri oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 46, 7–13. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2015.05.001
- Medina, J. M., and Tabernero, A. (2002). Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *J. Physiol. Paris* 96, 265–271. doi: 10.1016/S0928-4257(02)00015-3
- Melo, M. F. F. T., Pereira, D. E., Sousa, M. M., Medeiros, D. M. F., Lemos, L. T. M., Madruga, M. S., et al. (2017). Maternal intake of cashew nuts accelerates reflex maturation and facilitates memory in the offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 61, 58–67. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.06.006
- Mennitti, L. V., Oliveira, J. L., Moraes, C. A., Estadella, D., Oyama, L. M., Oller do Nascimento, C. M., et al. (2015). Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J. Nutr. Biochem.* 26, 99–111. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.10.001
- Morgane, J. P., Mokler, D. J., and Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 471–483. doi: 10.1016/S0149-7634(02)00012-X
- Morgane, J. P., Austin-LaFrance, R., Bonzio, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., et al. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128. doi: 10.1016/S0149-7634(05)80234-9
- Mumby, D. G., and Pinel, J. P. (1994). Rhinal cortex lesions and object recognition in rats. *Behav. Neurosci.* 108, 11–18. doi: 10.1037/0735-7044.108.1.11
- Murru, E., Banni, S., and Carta, G. (2013). Nutritional properties of dietary omega-3-enriched phospholipids. *Biomed. Res. Int.* 2013:965417. doi: 10.1155/2013/965417
- Nava-Mesa, M. O., Lamprea, M. R., and Múnera, A. (2013). Divergent short- and long-term effects of acute stress in object recognition memory are mediated by endogenous opioid system activation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 185–192. doi: 10.1016/j.nlm.2013.09.002
- Nguyen, L. N., Ma, D., Shu, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., et al. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503–506. doi: 10.1038/nature13241
- Nolan, C. J., Riley, S. F., Sheedy, M. T., Walstab, J. E., and Beischer, N. A. (1995). Maternal serum triglyceride, glucose tolerance, and neonatal birth weight ratio in pregnancy. *Diabetes Care* 18, 1550–1556. doi: 10.2337/diacare.18.12.1550
- Novak, E. M., Dyer, R. A., and Innis, S. M. (2008). High dietary ω -6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. *Brain Res.* 1237, 136–145. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.107
- Ortiz-Avila, O., Esquivel-Martinez, M., Olmos-Orizaba, B. E., Sazvedra-Molina, A., Rodriguez-Orozco, A. R., and Cortés-Rojas, C. (2015). Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *J. Diabetes Res.* 2015:485759. doi: 10.1155/2015/485759
- Pacetti, D., Boselli, E., Lucchi, P., and Frega, N. G. (2017). Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado fruit. *J. Chromatogr. A* 1150, 241–251. doi: 10.1016/j.chroma.2006.10.022
- Page, K. C., Jones, E. K., and Anday, E. K. (2014). Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R527–R537. doi: 10.1152/ajpregu.00319.2013
- Pase, C. S., Roversi, K., Roversi, K., Vey, L. T., Dias, V. T., Veit, J. C., et al. (2017). Maternal trans fat intake during pregnancy or lactation impairs memory and alters BDNF and TrkB levels in the hippocampus of adult offspring exposed to chronic mild stress. *Physiol. Behav.* 169, 114–123. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.11.009
- Pase, C. S., Teixeira, A. M., Roversi, K., Dias, V. T., Calabrese, F., Molteni, R., et al. (2015). Olive oil-enriched diet reduces brain oxidative damages and ameliorates neurotrophic factor gene expression in different life stages of rats. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1200–1207. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.05.013
- Pereira, S. L., Leonard, A. E., and Mukerji, P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68, 97–106. doi: 10.1016/S0952-3278(02)00259-4
- 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
- Priego, T., Sánchez, J., García, A. P., Palou, A., and Picó, C. (2013). Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. *Lipids* 48, 481–495. doi: 10.1007/s11745-013-3764-8
- Pulido, R., Bravo, L., and Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 48, 396–402. doi: 10.1021/jf9913458
- Rachetti, A. L. F., Arida, R. M., Patti, C. L., Zanin, K. A., Fernandes Santos, L., Frussa-Filho, R., et al. (2012). Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks. *Behav. Brain Res.* 237, 283–289. doi: 10.1016/j.bbr.2012.09.048
- Sánchez, J., Priego, T., García, A. P., Llopis, M., Palou, M., Picó, C., et al. (2012). Maternal supplementation with an excess of different fat sources during pregnancy and lactation differentially affects feeding behavior in offspring: putative role of the leptin system. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 1715–1728. doi: 10.1002/mnfr.201200211
- Santillán, M. E., Vincenti, L. M., Martini, A. C., Cuneo, M. F., Ruiz, R. D., Mangeaud, A., et al. (2010). Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different n-6:n-3 ratios in mice. *Nutrition* 26, 423–431. doi: 10.1016/j.nut.2009.06.005
- Sinclair, A. J. (1975). Long-chain polyunsaturated fatty acids in the mammalian brain. *Proc. Nutr. Soc.* 34, 287–291. doi: 10.1079/PNS19750051
- Smart, J. L., and Dobbing, J. (1971). Vulnerability of developing brain II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.* 28, 85–95. doi: 10.1016/0006-8993(71)90526-9
- Soares, A. K., Guerra, R. G., de Castro, M. L., Amancio-dos-Santos, A., Guedes, R. C. A., Cabral-Filho, J. E., et al. (2009). Somatic and reflex development in suckling rats: effects of mother treatment with ketogenic diet associated with lack of protein. *Nutr. Neurosci.* 12, 260–266. doi: 10.1179/147683009X423427
- Soares, J. K. B., de Melo, A. P., Medeiros, M. C., Queiroga, R. C. E., Bomfim, M. A., Santiago, E. C., et al. (2013). Anxiety behavior is reduced, and physical growth is improved in the progeny of rat dams that consumed lipids from goat milk: an elevated plus maze analysis. *Neurosci. Lett.* 552, 25–29. doi: 10.1016/j.neulet.2013.07.028
- Souza, A. S., Rocha, M. S., and Tavares do Carmo, M. D. (2012). Effects of a normolipidic diet containing trans fatty acids during perinatal period on the growth, hippocampus fatty acid profile, and memory of young rats according to sex. *Nutrition* 28, 458–464. doi: 10.1016/j.nut.2011.08.007
- Surveswaran, S., Cai, Y. Z., Corke, H., and Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 102, 938–953. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.033
- Takenaga, F., Matsuyama, K., Abe, S., Torii, Y., and Itoh, S. (2008). Lipid and fatty acid composition of mesocarp and seed of avocado fruits harvested at northern range in Japan. *J. Oleo Sci.* 57, 591–597. doi: 10.5650/jos.57.591
- Todaka, E., Sakurai, K., Fukata, H., Miyagawa, H., Uzuki, M., Omori, M., et al. (2005). Fetal exposure to phytoestrogens—The difference in phytoestrogen status between mother and fetus. *Environ. Res.* 99, 195–203. doi: 10.1016/j.envres.2004.11.006
- Tronel, S., Lemaire, V., Charrier, V., Montaron, M. F., and Ahroun, D. N. (2015). Influence of ontogenetic age on the role of dentate

- granule neuron. *Brain Struct. Funct.* 220, 645–661. doi: 10.1007/s00429-014-0715-y
- USDA (U.S. Department of Agriculture) (2011). *Avocado, Almond, Pistachio and Walnut Composition*. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.
- Valenzuela, A., Nieto, S., Sanhueza, I., Morgado, N., Rojas, I., and Zanartu, P. (2010). Supplementing female rats with DHA-lysophosphatidylcholine increases docosahexaenoic acid and acetylcholine in the brain and improves the memory and learning capabilities of the pups. *Grasas Aceites* 61, 16–23. doi: 10.3989/gya.053709
- van Dijk, G., Kacsinski, A., Köbor-Nyakas, D. E., Högges, E., and Nyakas, C. (2011). Perinatal polyunsaturated fatty acids supplementation causes alterations in fuel homeostasis in adult male rats but does not offer resistance against STZ-induced diabetes. *Horm. Metab. Res.* 43, 938–943. doi: 10.1055/s-0031-1291334
- Yehuda, S. (2012). Polyunsaturated fatty acids as putative cognitive enhancers. *Med. Hypotheses* 79, 456–461. doi: 10.1016/j.mehy.2012.06.021
- Zhang, Y., Li, N., Yang, J., Zhang, T., and Yang, Z. (2010). Effects of maternal food restriction on physical growth and neurobehavior in newborn wistar rats. *Brain. Res. Bull.* 83, 1–8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.06.005
- Zhishen, L., Mengcheng, T., and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2
- Zielinska, M. A., Wesolowska, A., Pawlus, B., and Hamulka, J. (2017). Health effects of carotenoids during pregnancy and lactation. *Nutrients* 9:E838. doi: 10.3390/nu9080838

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Melo, Pereira, Moura, Silva, Melo, Dias, Silva, Oliveira, Viera, Pintado, Santos and Soares. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

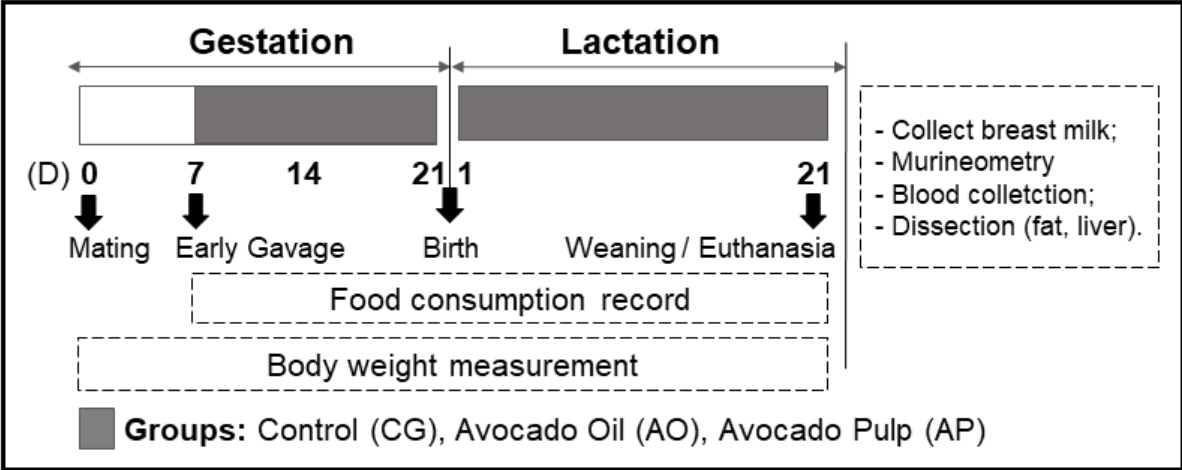
A suplementação materna com óleo e polpa de abacate mostrou potencial efeito na melhora do perfil lipídico e redução do índice aterogênico, ao final da lactação, diminuindo o risco de doenças metabólicas. Em adição, os níveis de TGO, TGP e MDA hepáticos apresentaram-se reduzidos, refletindo diminuição na peroxidação lipídica. Os resultados mais pronunciados da polpa, em relação ao óleo, na diminuição do risco aterogênico, nos menores níveis de MDA hepático e maior redução da gordura corporal podem estar associados ao alto conteúdo de fibras dietéticas e maior atividade antioxidante.

Na fase pós natal da prole, a suplementação com óleo e polpa também promoveu aceleração na ontogenia reflexa e no desenvolvimento somático. Nas fases adulta e adolescente, a melhor aquisição da memória em curto e longo prazo foi associada ao aumento dos ácidos graxos poliinsaturados nos cérebros e indicou o efeito duradouro do consumo materno do abacate, que repercutiu no comportamento da prole em distintas fases do ciclo. Supõe-se que a melhora da composição de ácidos poliinsaturados nos cérebros T21, T45 e T90, com destaque para DHA, relacionam-se com os fosfolipídios do abacate por serem facilitadores da incorporação.

Sugere-se pesquisas futuras avaliando os efeitos do consumo continuado do óleo e polpa, pós desmame até a fase adulta e seus efeitos bioquímicos e comportamentais na senescência.

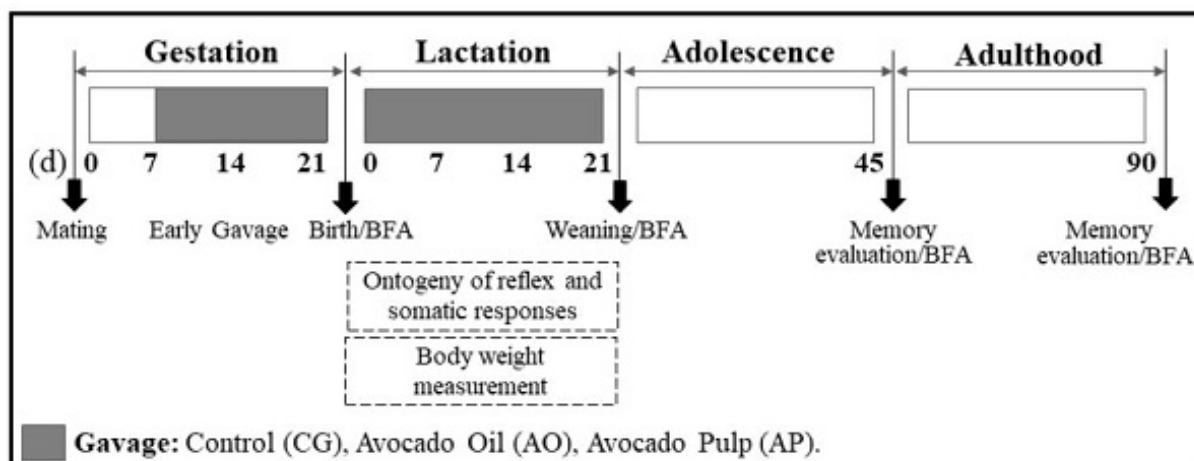
APÊNDICE A

EXPERIMENTAL PROTOCOL – ARTIGO I



APÊNDICE B

EXPERIMENTAL PROTOCOL – ARTIGO II



ANEXOS

ANEXO A: Certidão de Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comissão de Ética em Pesquisa
Av. Sta Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3045



A: Marília Ferreira Frazão Tavares (Coordenadora)

Protocolo CEP nº006-2017

CERTIDÃO

Certificamos a V.Sa. que seu projeto intitulado "IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM OLÉO E POLPA DE ABACATE (Persea americanaMill) SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO, COMPORTAMENTAL E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS" teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno deste comitê e foi Aprovado, em reunião Ordinária nº 01/2017 em 16 de Maio, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações para a pesquisa científica.

Patos, 10 de Julho de 2017.

Maria de Fátima de Araujo Lucena
Coordenadora do CEP

ANEXO B: Comprovante de Tradução do Artigo I

Declaration of Translation and/or Corrections

David Peter Harding - North American - U.S.A.
Independent Native American English Author and Translator



Manuscriptual Areas Verified

Language & Grammar and Punctuation

1. Sentence construction, English word choice, clarity, parallel structure, tone, voice, redundancy
2. Subject-verb agreement, article usage, spellings, tense, prepositions, pronouns and determiners, adverbs and adjectives, relative clauses
3. Commas, colons, semicolons, dashes, quotation marks, apostrophes

Style and Consistency

1. Writing Style
1. Logical Flow - Ensuring logical flow between sentences and paragraphs

Figures and Tables

2. Technical word choice
3. Subject-specific nomenclature
4. Appropriate units of measurement, symbols, and variables

Clarity and coherence

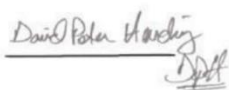
1. Eliminate repetitive and redundant content
2. Ensure clear unambiguous statements

ANEXO B: Comprovante de Tradução do Artigo I**Document Translated and/or Corrected**

**Supplementation with *Persea americana* Mill. (Avocado) oil and/or fruit pulp to assess
adipose tissue deposition, biochemical profiles, and hepatic lipid peroxidation reductions in
lactating rats**

Date 12/02/2019

David Peter Harding

A handwritten signature in cursive script, reading "David Peter Harding", is written over a horizontal line. Below the signature, the letters "DPH" are written in a stylized, blocky font.

ANEXO B: Comprovante de Tradução do Artigo II

Declaration

David Peter Harding North American U.S.A.



Independent English Author and Translator

Translated

Maternal supplementation with avocado (*Persea americana* Mill.) pulp and oil alters reflex maturation, physical development, and offspring memory in rats

David Peter Harding 11/09/2018

David Peter Harding
DPH

ANEXO C: Comprovante de Submissão de Artigo I

Elsevier Editorial System(tm) for American
Journal of Obstetrics and Gynecology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Biochemical profiles and hepatic lipid peroxidation of lactating rats supplemented with avocado

Article Type: Original Research

Section/Category: Obstetrics

Corresponding Author: Ms. Marilia Ferreira Frazao Tavares de Melo, MSc.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal da Paraíba

First Author: Marilia Ferreira Frazao Tavares de Melo, MSc.

Order of Authors: Marilia Ferreira Frazao Tavares de Melo, MSc.; Maria Elieidy Oliveira, PhD; Elisiane Silva; Renally Moura; Rita de Cássia Bidô, MSc.; Gerlane Guerra, PhD; Daline Araújo, PhD; Flavio Melo, Md.; Michelly Queiroz, MSc.; Vanessa Viera, PhD; Juliana Kessia Soares

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Background: Nutrition can influence the maintenance of healthy nutrient transport necessary for optimal fetal development. It has long term implications for maternal health, pregnancy outcomes, and metabolic disease risks. Avocado (*Persea americana* Mill.), an oleaginous fruit source of fatty acids and phytochemicals present various metabolic effects.

Objective: The objective of this study was to evaluate the impact of supplementation with avocado oil and pulp on murinometric and biochemical parameters, on retroperitoneal fat, and lipid peroxidation in lactating dams.

Materials and Methods: The rats were randomly divided into three groups (n = 8 dams/group) in accordance with gavage supplementation during gestation and lactation: Control group (CG) - distilled water; Avocado Oil group (AO) - 3000 mg avocado oil/kg animal weight, and Avocado Pulp group (AP) - 3000 mg avocado pulp/kg animal weight. Food intake, body weight, length, BMI, abdominal and thoracic circumference, organ and adipose tissue weights, and liver and breast milk lipid percentages were evaluated. Glycemia levels (TLIC), triglycerides (TGC), total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), glutamic oxalacetic transaminase (AST), glutamic pyruvic transaminase (ALT) and atherogenic index (IA) were evaluated. Hepatic malonaldehyde (MDA) was also analyzed.

Results: The results were analyzed using the statistical program GraphPad Prism and significant differences considered at $p < 0.05$. The AO and AP lactating dams presented reductions in food intake during gestation and lactation, with no change in body weight ($p < 0.05$). The murine parameters and the weights of the organs presented no significant differences ($p < 0.05$). Mesenteric fat increased in the AO as compared to the AP and CG dams ($p < 0.05$). Retroperitoneal fat decreased in the AP and AO dams as compared to the CG, however, the AP group presented a greater reduction than the AO group ($p < 0.05$). Both the pulp and oil groups presented reductions in GLIC, TGC, LDL, AST, and ALT biochemical parameters ($p < 0.05$). In the AO and AP groups HDL increased and AI decreased, with a reduction hepatic MDA as well ($p < 0.05$).

Conclusions: Maternal avocado supplementation maximized lipidic modulation throughout lactation, with positive results towards maintaining maternal health and reducing the risk of metabolic disease.