



CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO

NATÁLIA DANTAS DE OLIVEIRA

EFEITOS DO CONSUMO DA FARINHA DE CASTANHOLA

(Terminalia catappa Linn) **SOBRE PARÂMETROS DE**
ANSIEDADE, MEMÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS IDOSOS

JOÃO PESSOA – PB

2022

NATÁLIA DANTAS DE OLIVEIRA

EFEITOS DO CONSUMO DA FARINHA DE CASTANHOLA (*Terminalia catappa* Linn) SOBRE PARÂMETROS DE ANSIEDADE, MEMÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS IDOSOS

JOÃO PESSOA – PB

2022

NATÁLIA DANTAS DE OLIVEIRA

EFEITOS DO CONSUMO DA FARINHA DE CASTANHOLA (*Terminalia catappa* Linn) SOBRE PARÂMETROS DE ANSIEDADE, MEMÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS IDOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dr^a. Juliana Késsia Barbosa Soares
Coorientadora: Dr^a. Vanessa Bordin Viera

JOÃO PESSOA – PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

048e Oliveira, Natália Dantas de.
Efeitos do consumo da farinha de castanhola
(Terminalia catappa Linn) sobre parâmetros de
ansiedade, memória e estresse oxidativo em ratos idosos
/ Natália Dantas de Oliveira. - João Pessoa, 2022.
92 f. : il.

Orientação: Juliana Késsia Barbosa Soares.
Coorientação: Vanessa Bordin Viera.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Antioxidantes. 2. Amendoeira-da-praia. 3.
Flavonoides. 4. Perda de memória. 5. Ansiedade. I.
Soares, Juliana Késsia Barbosa. II. Viera, Vanessa
Bordin. III. Título.

UFPB/BC

CDU 678.048(043)

NATÁLIA DANTAS DE OLIVEIRA

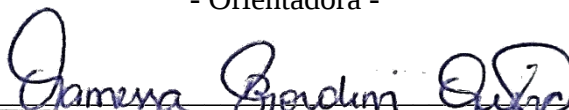
**EFEITOS DO CONSUMO DA FARINHA DE CASTANHOLA (*Terminalia catappa*
Linn) SOBRE PARÂMETROS DE ANSIEDADE, MEMÓRIA E ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS IDOSOS**

Dissertação Aprovada em 04/03/2022.

BANCA EXAMINADORA



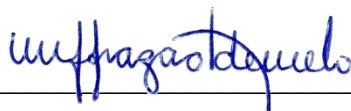
Prof.ª. Dr.ª. Juliana Késsia Barbosa Soares
UAS/CES/UFCG
- Orientadora -



Prof.ª. Dr.ª. Vanessa Bordin Viera
UAS/CES/UFCG
- Coorientadora –



Prof.ª. Dr.ª. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
DN/CCS/UFPB
- Membro Interno -



Prof.ª. Dr.ª. Marília Ferreira Frazão Tavares de Melo
UAS/CES/UFCG
- Membro Externo -

Aos meus pais, Marinalda Dantas e Anaelson
Oliveira, e avós, M^a de Lourdes e Mário Belo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me ajudou em todos os momentos, me deu forças diante das dificuldades. Graças a Ele caminho para a realização desse sonho que ele plantou em meu coração. Não foi fácil iniciar e terminar a pesquisa diante do cenário de uma pandemia, mas Deus me abençoou.

Aos meus pais, Marinalda e Anaelson, que sempre apoiaram os meus sonhos e investiram na minha educação. Em especial, a minha “mainha”, minha melhor amiga que, mesmo com toda a batalha que enfrenta junto da minha avó, nunca deixou de me apoiar nessa conquista (que é nossa).

À minha orientadora, Juliana Késsia, por toda a paciência, assistência e atenção. Pelas inúmeras vezes que me ouviu, ajudou e esclareceu minhas diversas dúvidas. Por sempre encontrar uma solução para todos os problemas que surgiram (rs). Obrigada por tudo, estou muito feliz que deu tudo certo!

À minha coorientadora, Vanessa Bordin, que me acompanha desde a graduação. Obrigada por cada conversa, ajuda, por me dizer que tudo daria certo, por sempre me incentivar na vida acadêmica. A senhora caminha comigo há anos e sempre me estendeu a mão, minha eterna gratidão!

Ao meu parceiro de pesquisa, Bruno Dantas, que batalhou comigo do começo ao fim, e que com a sua calma tornou o processo mais leve! Diante das dificuldades eu só pensava que sozinha eu não daria conta. Valeu a pena os domingos e feriados coletando castanhola em terrenos alheios. Meu muito obrigada por TUDO! Um sonho que se sonha sozinho é só um sonho, mas quando sonhamos juntos, é realidade.

À Larissa Dutra, minha consultora (rs) que me ajudou inúmeras vezes. Fez dessa pesquisa dela também, afinal, participou de todas as etapas, sempre nos trazendo “a luz” diante da escuridão (rs). Obrigada por toda empatia, cuidado e por sempre ajudar com tanto carinho.

À minha companheira de laboratório, Arielly Cristina, que me ajudou ao longo de todos os testes comportamentais. Sem você eu não conseguiria! Você foi um anjo que Jaciel colocou no meu caminho.

A Jaciel Galdino, por toda a paciência e ensinamentos repassados. Por ser essencial nessa pesquisa, ajudando diariamente – inclusive, nos finais de semana e feriado. Por trazer a solução quando eu chegava com o problema, fazendo milagre com o extrato da castanhola. Essa pesquisa não teria ocorrido sem você, obrigada por toda prestatividade e por nunca ter me deixado na mão.

A Gabriel, meu companheiro que me auxiliava diariamente na realização dessa pesquisa, obrigada por tanto apoio e por sonhar esse sonho comigo! À minha sogra, Nalva, por toda a assistência e cuidado.

À banca de qualificação e defesa, as queridas professoras Elieidy e Marília, muito obrigada por todas as contribuições e sugestões fundamentais para a conclusão desse trabalho.

Às minhas colegas de turma Dayane e Rebeka que me acompanharam durante todo o Mestrado, quando a vida nos deu limões, fizemos limonada! Gratidão por cada experiência, juntas nós vencemos!

À Rita de Cássia (Ritinha) e Gezaildo (Gil) que sempre esclareciam minhas dúvidas, me ajudaram por diversas vezes. Mesmo diante de tanta correria, sempre davam um jeito de me ajudar na mesma hora. Muito obrigada!

Aos funcionários da UFCG que pausaram as obras para a realização dos testes comportamentais. Meu muito obrigada!

Às Instituições UFPB e UFCG, que contribuíram para realização desta pesquisa.

A CAPES pelo apoio através do financiamento.

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

[Madre Teresa de Calcutá]

RESUMO

A ansiedade pode ocorrer em qualquer fase da vida, mas o número de casos em idosos apresentou aumento. Como os antioxidantes já foram capazes de reduzir processos inflamatórios e oxidativos, são considerados como uma alternativa para minimizar a ansiedade. Esses compostos são encontrados em matrizes naturais, como a *Terminalia catappa* Linn. conhecida por castanhola, uma planta medicinal fonte de compostos bioativos que já promoveu efeitos benéficos em modelos experimentais submetidos a processos inflamatórios. Logo, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos do consumo da farinha da castanhola no comportamento de ansiedade, memória e peroxidação lipídica no cérebro de ratos idosos tratados com a farinha da castanhola por via orogástrica. Os animais foram divididos em 3 grupos: GC (Grupo Controle), que recebeu apenas água destilada; F500 (Grupo administrado diariamente com 500 mg da farinha da castanhola/kg de peso do animal) e F1000 (Grupo administrado diariamente com 1000 mg de farinha da castanhola/kg de peso do animal). Após cinco semanas de administração, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro/escuro para análise da ansiedade; teste de campo aberto e *water maze* para a memória. Por fim, foi realizada a eutanásia e o cérebro foi removido para medir os níveis de malondialdeído. Os dados foram analisados utilizando ANOVA *one-way* levando-se em consideração o nível de significância de $p < 0,05$. A maior taxa de locomoção no campo aberto foi observada para os grupos F500 (104,2 cruzamentos) e F1000 (100,85 cruzamentos); o menor número de levantadas e comportamento de autolimpeza para F1000: 5,6 e 23,12, respectivamente. O maior número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado foi obtido pelo F500 (4) e F1000 (4,2); o maior tempo na região foi obtido pelo F1000 (20,13 s); o maior número de mergulhos de cabeça pelo F500 (10,67). Na caixa claro-escuro a maior permanência no lado claro da caixa foi registrada para o F500 (1,20 s) e F1000 (1,28 s). No teste de reconhecimento de objetos, a maior exploração do objeto novo foi apresentada pelo F1000 (0,75) na memória a curto prazo; e pelo F500 (0,72) e F1000 (0,74) na memória a longo prazo. Para os níveis e MDA, F500 (80,08 nmol/g) e F1000 (86,33 nmol/g) apresentaram as menores concentrações. O resultado do perfil de ácidos graxos do cérebro apresentou maior conteúdo de AGMI para o F500 (28,88%) e de AGPI para o F1000 (13,50%). Diante do exposto, observou-se que a farinha da castanhola nas duas dosagens suplementadas (500 mg e 1000 mg) promoveu efeito ansiolítico, preservou a memória e minimizou o processo

de peroxidação lipídica no cérebro dos ratos idosos. Portanto, a castanhola poderia promover benefícios na ansiedade e redução da memória, alterações comuns no envelhecimento.

Palavras-chave: amendoeira-da-praia; ansiedade; flavonoides; perda de memória; ratos.

ABSTRACT

Anxiety can occur at any stage of life, but the number of cases in the elderly has increased. As antioxidants have already been able to reduce inflammatory and oxidative processes, they are considered as an alternative to minimize anxiety. These compounds are found in natural matrices such as *Terminalia catappa* Linn. known as castanhola, a medicinal plant source of bioactive compounds that has already promoted beneficial effects in experimental models subjected to inflammatory processes. Therefore, the objective was to evaluate the possible effects of the consumption of castanhola flour on anxiety behavior, memory and lipid peroxidation in the brain of elderly rats treated with castanhola flour by orogastric route. The animals were divided into 3 groups: GC (Control Group), which received only distilled water; F500 (Group administered daily with 500 mg of castanhola meal/kg of animal weight) and F1000 (Group administered daily with 1000 mg of castanhola meal/kg of animal weight). After five weeks of administration, the animals were submitted to behavioral tests: open field, elevated plus maze and light/dark box for anxiety analysis; open field test and water maze for memory. Finally, euthanasia was performed and the brain was removed to measure malondialdehyde levels. Data were analyzed using one-way ANOVA taking into account a significance level of $p < 0.05$. The highest locomotion rate in the open field was observed for groups F500 (104.2 crossings) and F1000 (100.85 crossings); the lowest number of lifts and self-cleaning behavior for F1000: 5.6 and 23.12, respectively. The highest number of open arms entries in the elevated plus maze was obtained by F500 (4) and F1000 (4.2); the longest time in the region was obtained by the F1000 (20.13 s); the highest number of head dives by the F500 (10.67). In the light-dark box, the longest stay on the light side of the box was recorded for the F500 (1.20 s) and F1000 (1.28 s). In the object recognition test, the greatest exploration of the new object was presented by the F1000 (0.75) in short-term memory; and by F500 (0.72) and F1000 (0.74) in long-term memory. For levels and MDA, F500 (80.08 nmol/g) and F1000 (86.33 nmol/g) showed the lowest concentrations. The result of the brain fatty acid profile showed the highest MUFA content for F500 (28.88%) and PUFA for F1000 (13.50%). In view of the above, it was observed that castanhola flour in the two supplemented doses (500 mg and 1000 mg) promoted anxiolytic effect, preserved memory and minimized the process of lipid peroxidation in the brain of elderly rats. Therefore, castanhola could promote benefits in anxiety and memory reduction, common changes in aging.

Keywords: beach almond; anxiety; flavonoids; memory loss; rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– <i>Terminalia catappa</i> Linn (castanhola)	25
Figura 2 – Delineamento experimental	28
Figura 3 – Fluxograma de obtenção da farinha	29
Figura 4 – Etapas do processamento da farinha da castanhola.....	30
Figura 5 – Esquema de tratamento e testes comportamentais	34
Figura 6 – Cronograma da administração e dos testes	35
Figura 7 – Aparato do campo aberto	36
Figura 8 – Teste labirinto em cruz elevado	37
Figura 9 – Caixa Claro-Escuro (CCE).....	38
Figura 10 – Visão externa (A) e interna (B) do Campo Aberto	39
Figura 11 – Desenho experimental do teste de reconhecimento de objetos.....	40
Figura 12 – Labirinto aquático de Morris usado no experimento visto externamente (A) e pelo programa Any Maze (B).....	41
Figura 13– Labirinto aquático de Morris adaptado usado no experimento visto externamente (A) e pelo programa Any Maze (B).....	41

ARTIGO

Figure 1 – Effect of <i>Terminalia catappa</i> Linn flour on aged rats in the CA test: ambulation (A), rearing (B), self-cleaning (C), number of entries in the central area (D), time spent in the central area (E)	62
Figure 2 – Effect of <i>Terminalia catappa</i> Linn flour on ECL: number of entries in the open arms (A), time spent in the open arms (B), number of head diapping (C), time spent in the central area (D).....	64
Figure 3 – Effect of <i>Terminalia catappa</i> Linn flour on aged rats in OHC: time in the light area of the box (A), time in the dark area of the box (B), number of transitions (C)	65
Figure 4 – Effect of <i>Terminalia catappa</i> Linn flour on aged rats in CA: rate of exploration of the new and familiar object in short-term (A) and long-term (B) memory	66
Figure 5 – Effect of <i>Terminalia catappa</i> Linn flour on aged rats in WM: Time to find plataform (s).....	67
Figure 6 – Effect of <i>Terminalia catappa</i> Linn flour on aged rats in WM: Escape latency to target entry (s), Total distance traveled (m)	68

Figure 7 – MDA levels in the brain of aged rats treated with *Terminalia catappa* Linn68

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Total phenolics content, total flavonoids, and antioxidant activity of castanhola flour	61
Table 2 – Composition of fatty acids present in the elderly brain treated with Terminalia catappa Linn flour.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AGPI	Ácido graxo polinsaturado
CA	Campo Aberto
CCE	Caixa claro escuro
CES	Centro de Educação e Saúde
GC	Grupo Controle
cm	Centímetros
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EC	Equivalente Catequina
OF1	Objeto familiar 1
OF2	Objeto familiar 2
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power
g	Grama
h	Hora
Kg	Kilograma
LABROM	Laboratório de Bromatologia
LANEX	Laboratório de Nutrição Experimental
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTA	Laboratório de Tecnologia de Alimentos
M	Metro
MDA	Malondialdeído
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
ON1	Objeto novo 1
ON2	Objeto novo 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico

F500	Grupo Farinha 500 mg de castanhola
F1000	Grupo Farinha 1000 mg de castanhola
ppm	Partes por milhão
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
°C	Graus Celsius
%	Percentual
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	ENVELHECIMENTO E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS	17
2.2	ANSIEDADE	18
2.3	ANTIOXIDANTES	20
2.4	PAPEL DOS ANTIOXIDANTES NA ANSIEDADE	21
2.5	FRUTAS E COMPOSTOS BIOATIVOS	22
2.7	<i>Terminalia catappa</i> Linn	24
3	ABORDAGEM METODOLÓGICA	27
3.1	LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
3.2	AMOSTRA E OBTENÇÃO DA FARINHA DA POLPA DE CASTANHOLA	28
3.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DA CASTANHOLA	30
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA FARINHA DA CASTANHOLA	31
3.4.1	Determinação de compostos fenólicos totais (CFT)	31
3.4.2	Determinação de flavonoides totais	32
3.4.3	Atividade antioxidante - método FRAP	32
3.4.4	Atividade antioxidante - método ABTS ^{•+}	32
3.5	ELABORAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ADMINISTRAÇÃO PARA OS ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	33
3.6	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	33
3.6.1	Animais e Dieta	33
3.6.3	Aferição dos Parâmetros de Ansiedade	35
3.6.3.1	Teste realizado no Campo Aberto	35
3.6.3.2	Labirinto em cruz elevado (LCE)	36
3.6.3.3	Caixa claro-escuro (CCE)	37
3.6.4	Aferição dos Parâmetros de Memória	38
3.6.6	Aferição do Estresse Oxidativo – Malondialdeído (MDA) do cérebro	42
3.6.7.1	Coleta do cérebro	43
3.6.7.2	Extração lipídica	43
3.7	ASPECTOS ÉTICOS	43

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
REFERÊNCIAS	45
RESULTADOS.....	54
Artigo I.....	54
CONCLUSÃO	74
ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas foi observado um aumento da expectativa de vida. Estima-se que em 2050 haverá dois bilhões de pessoas com mais de sessenta anos de idade nos países em desenvolvimento (MURRAY *et al.*, 2002; ONU 2014). Entretanto, isso não indica que há uma melhora na qualidade dos anos vividos, pois é comum com o envelhecimento, ocorrer alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais que podem comprometer a vida dos idosos (MACENA; HERMANO; COSTA 2018). A redução da memória é um dos declínios cognitivos mais comuns (PERITO; FORTUNATO, 2012) e acontece de modo mais acentuado em pacientes ansiosos (ABDULRAB; HEUN, 2008).

A ansiedade é um distúrbio psicológico e cada vez mais prevalente na população idosa. Normalmente, é tratada pela via medicamentosa (HOGE *et al.*, 2020; SHAFIEE *et al.*, 2018); todavia, com a redução cognitiva ocorrida em idosos (MACENA; HERMANO; COSTA 2018), torna-se difícil o manejo de medicamentos (MILLS; MACLURE, 2021). Além disso, como nessa população, já é comum a polifarmácia (MILLS; MACLURE, 2021), seria interessante buscar novas formas de intervir na prevenção e/ou tratamento da ansiedade (HOGE *et al.*, 2020; SHAFIEE *et al.*, 2018).

A dietoterapia é utilizada desde os tempos antigos para prevenção ou tratamento de patologias (JACKSON, 2015). As matrizes alimentares naturais são fontes de antioxidantes (PICCIRILLO; AMARAL; 2018), que poderiam ser uma alternativa para o tratamento da ansiedade, visto que, esses compostos são capazes de reduzir espécies reativas de oxigênio, minimizando o estresse oxidativo (DANESHZAD *et al.*, 2020). Por isso, há um interesse em analisar o papel protetor de componentes bioativos presentes em Plantas Alimentícias não Convencionais (PANC), especificamente, quanto à importância do consumo dietético dessas matrizes, considerando sua riqueza em flavonoides e outros compostos relacionados com a prevenção e/ou tratamento de inúmeras doenças (RODRIGUEZ-MATEOS *et al.*, 2014).

Dentre as inúmeras PANCs encontradas, a *Terminalia catappa* Linn ou “castanhola” já exibiu diversas propriedades medicinais e possui agregado valor nutricional nas folhas, amêndoa e fruto (KATIKI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que a suplementação com folha e casca do caule da castanhola promoveu plasticidade neural e supressão da depressão induzida em camundongos (CHANDRASEKHAR *et al.*, 2017; HIRSHLER; DORON; 2017).

O fruto, por sua vez, ainda possui pouca aplicação (TEIXEIRA, 2010), mas já demonstrou potencial antioxidante e apresenta significativo conteúdo de quercetina, rutina, miricetina, ácido elágico, antocianinas (MA *et al.*, 2015; SEMWAL *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2016; UHIDA *et al.*, 2014). Esses compostos já foram capazes de promover efeito ansiolítico (AGUIRRE-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016; GIRISH *et al.*, 2013; MEDINA *et al.*, 1998) e minimizar o dano oxidativo ocorrido em ratos induzidos ao processo de envelhecimento (SHAN *et al.*, 2009). Apesar disso, até o momento, o fruto da castanhola, ainda não foi investigado quanto ao seu possível efeito ansiolítico em idosos. Desse modo, neste estudo nós objetivamos avaliar as repercussões do consumo da *Terminalia catappa* Linn sobre parâmetros de ansiedade, desempenho da memória e estresse oxidativo em ratos idosos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENVELHECIMENTO E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS EM IDOSOS

A expectativa de vida cresceu em todo mundo estima-se que em 2050 haverá 2 bilhões de idosos. Logo, como a longevidade tem ganhado destaque, é importante a valorização do envelhecimento saudável de modo a propiciar uma melhor qualidade de vida e bem-estar à população idosa (SUZANA, 2005), visto que é uma fase que ocorrer alterações fisiológicas, morfológicas, funcionais, histológicas (CARDOSO *et al.*, 2007; SANTOS; ANDRADE; BUENO 2009).

Dentre essas modificações, a degeneração cerebral é uma das mais comuns e possui fisiopatologia complexa, mas algumas teorias são discutidas: acúmulo de erros nos ácidos nucleicos (RNA, DNA), falhas na programação genética, etc. Apesar da complexidade da sua etiologia, as alterações que ocorrem normalmente costumam envolver perda de células nervosas e/ou retração neuronal, por conseguinte, surgem alterações nas sinapses. Assim, há modificações motoras; sensoriais; comportamentais/psicológicas, como a depressão que pode ocorrer em conjunto com a ansiedade em idosos e cognitivas, como redução da memória (CARDOSO *et al.*, 2007; SANTOS; ANDRADE; BUENO 2009).

Estima-se que 40% da população idosa apresenta comprometimento da memória (MURMAN *et al.*, 2015). A fisiopatologia dessa alteração é multifatorial, mas do ponto de vista biológico, pode estar relacionada às irregularidades no metabolismo de cálcio e colesterol e baixa concentração de antioxidantes. De modo geral, o prejuízo na memória ocorre em virtude de danos ou redução de células neuronais no hipocampo (UNNI; PILLAI; SAJITHALULU 2021).

Logo, o comprometimento da memória relaciona-se com redução de: neurotransmissores, da expressão de receptores e dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), afetando desse modo, a plasticidade neural (UNNI; PILLAI; SAJITHALULU 2021). Além disso, a diminuição da memória também foi mais acentuada em idosos acometidos por problemas psicológicos, como a ansiedade (GRUT *et al.*, 1993). Portanto, há associação entre o maior número de esquecimentos à sintomas de ansiedade (PAULO; YASSUDA 2010).

2.2 ANSIEDADE

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Panamericana da Saúde (OPAS), há cerca de 1 bilhão de pessoas com algum tipo de transtorno mental e, mesmo assim, essa é uma área muito esquecida. Ainda, conforme a OMS, o Brasil possui 18,6 milhões de pessoas ansiosas, sendo enquadrado como o país com a população mais ansiosa do mundo (QUEIROZ, 2021).

A ansiedade ocorre em todas as fases da vida, contudo, a sua prevalência em idosos tem aumentado (SIRIN *et al.*, 2021). Logo, esse distúrbio psicológico pode prejudicar, ainda mais, a qualidade de vida dessa população e comprometer sua independência (ANTUNES *et al.*, 2005), além de levar ao surgimento de outras condições clínicas: depressão, alterações cardíacas e respiratórias (MACHADO; QUEVEDO 2016).

Segundo a Oxford University Press (2019), a definição da ansiedade está associada com outros comportamentos, tais como nervosismo, preocupação e aflição. É uma condição muito comum e que possui múltiplas causas, entretanto, ela difere da transitória e normativa, por apresentar caráter persistente e afetar atividades diárias (STEIN; CRASKE, 2017; TAYLOR *et al.*, 2020).

Quando o sentimento de medo, desconforto e antecipação do perigo tornam-se comuns, tem-se então, o distúrbio. Caso não haja tratamento, pode evoluir e/ou apresentar-se de maneira crônica. De modo geral, os sintomas incluem sudorese, formigamento, impressão de nó na garganta, tonturas, palpitações. E estão relacionados ao estresse, insônia, e ameaças corporais (FRANCO, 2018). Por conseguinte, podem ocorrer repercussões na saúde e bem-estar, como o surgimento de comorbidades. Entre elas, novos distúrbios psiquiátricos, problemas renais e cardiovasculares. De acordo com a psicologia, ela pode ser analisada do ponto de vista comportamental ou cognitivo em contraposição ao patológico (COSTA *et al.*, 2019; SIMPSON; SAWATZY, 2020).

Vale destacar que, embora pessoas ansiosas, normalmente, sejam extremamente medrosas; esse distúrbio difere do medo por ser marcado por um sentimento de antecipação exacerbado. Logo, os indivíduos tendem a responder a uma situação de forma desequilibrada e com persistência, o que acaba interferindo em outras áreas da vida (STEIN; CRASKE, 2017; TAYLOR *et al.*, 2020).

Dessa maneira, é importante observar a intensidade, gravidade, duração e frequência dos sintomas, os quais surgem em detrimento de respostas inadequadas mediadas pelo sistema

nervoso, mais precisamente, com ativação do sistema nervoso simpático. O hipotálamo libera corticotrofina por meio da hipófise, aumentando dessa forma, o adrenocorticotrófico que, por sua vez, estimula às glândulas adrenais a secretarem o cortisol (FRANCO, 2018).

A ansiedade reflete estímulos em diversas estruturas do organismo, principalmente na amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. Sabe-se também, que a fisiopatologia desse distúrbio está relacionada com a modulação de noradrenalina, serotonina, dopamina e com os hormônios do estresse (SILVEIRA, 2015). A amígdala e o hipocampo são responsáveis pela regulação dos neurônios que secretam a corticotrofina, portanto, controlam a resposta do eixo hipotálamo-hipófise (pituitária) – adrenal (ALVES, 2015). Dessa forma, quando exposto a uma situação desconfortável, o indivíduo apresenta uma hiperatividade da amígdala e redução da ação do hipocampo em controlar os hormônios. Por conseguinte, surgirão os sintomas característicos que podem ter duração de dez a trinta minutos (FRANCO, 2018).

Desse modo, o transtorno de ansiedade é um problema de saúde pública que ocasiona redução do rendimento individual em atividades corriqueiramente realizadas. Apesar de diversos tratamentos, algumas vezes, não há progresso com os recursos terapêuticos normalmente utilizados (STRAWN *et al.*, 2015; STRAWN; LEVINE 2020).

Quando a ansiedade não é tratada ou não há eficácia na terapia utilizada, podem surgir alterações metabólicas, obesidade, diabetes, aumento da gordura abdominal, elevação da pressão arterial; doenças cardiovasculares, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral; dificuldade de concentração e de deglutição; tensão muscular; fadiga; dores de cabeça; micção frequente; redução da imunidade e até maior risco de suicídio (FERNANDES *et al.*, 2017; GUERRA, 2019).

Ademais, a ansiedade também se relaciona com a ativação da compulsão alimentar contribuindo para maior acúmulo de gordura e, conseqüente, suscetibilidade ao desenvolvimento da obesidade. Como também, os hábitos alimentares inadequados, a exemplo da ingestão de altos teores de glicídios, lipídeos e calorias podem favorecer a ocorrência de ansiedade. Possivelmente, porque esses alimentos alteram os marcadores inflamatórios (AROUCA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2020; KHAN; UDDIN 2020).

Resultados de alguns estudos mostram que a ansiedade pode ser minimizada através do consumo de antioxidantes (DANESHZAD *et al.*, 2020). Visto que essas substâncias agem sobre o estresse oxidativo, processo relacionado com patologias neuropsiquiátricas. Desse modo, a capacidade antioxidante total da dieta relaciona-se de forma inversa com a ansiedade (FARHADNEJAD *et al.*, 2020).

2.3 ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são gerados no nosso corpo como um mecanismo natural, entretanto, o excesso na sua produção afeta a homeostase corporal. Diante disso, o estresse oxidativo caracteriza-se pelo aumento do número de radicais livres, ou ainda, à diminuição da concentração de antioxidantes, interferindo na estabilidade das moléculas pró-oxidantes e antioxidantes (MOSCA *et al.*, 2017; SOBRINHO *et al.*, 2020). Além do que, o estresse oxidativo pode ocasionar danos às células do organismo, pois, atua agredindo o DNA, as membranas e proteínas. E, portanto, altera o funcionamento normal do corpo levando ao surgimento de diversas patologias (TURECK *et al.*, 2017). Dessa forma, os antioxidantes desempenham papel fundamental no processo de neutralização do efeito dos radicais livres, garantindo maior estabilidade e prevenção de doenças (MOSCA *et al.*, 2017).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, quando eles são doadores de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres e são responsáveis pela estabilização, pois interferem nas reações oxidativas. Há também os secundários que realizam a decomposição de hidroperóxidos e, por conseguinte, minimizam a oxidação (DERNARDIN *et al.*, 2015). Apresentam estrutura química muito variável o que promove diversidade em sua atividade biológica. Logo, podem ter diferentes mecanismos de ação e efeitos fisiológicos; mas, de forma geral, são capazes de manter o equilíbrio redox celular (BARBOSA; FERNANDES, 2014). Também podem ser classificados em antioxidantes sintéticos e naturais, aqueles apresentam maior estabilidade, entretanto, podem ocasionar prejuízo à saúde do consumidor (TIVERON, 2010).

Considerando as lesões que podem ocorrer no organismo, é de extrema importância a existência dos sistemas enzimáticos antioxidantes. Logo, as enzimas catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutatona atuam na prevenção desses processos oxidativos; entretanto, elas não evitam a formação de novos radicais (MITRA *et al.*, 2019). Dessa maneira, é imprescindível obter antioxidantes através da alimentação que é utilizada para fins terapêuticos desde a antiguidade (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Tais compostos podem ter caráter de agente redutor e quelante de metais e atuam, ainda, na desativação do oxigênio singlete e como sequestrador de radicais livres (WANNEE; LUCHAI 2020; WANI *et al.*, 2020). Contudo, para prevenção de doenças referentes ao estresse oxidativo, os compostos bioativos devem estar presentes em quantidades expressivas na alimentação (MAIA, 2020), para que consigam, então, repercutir efeitos na modulação do metabolismo de homens e animais

(DIAS, 2017). Diante do exposto e considerando os possíveis malefícios dos antioxidantes sintéticos, surge o interesse de analisar o papel dos antioxidantes obtidos das fontes naturais (TIVERON 2010).

2.4 PAPEL DOS ANTIOXIDANTES NA ANSIEDADE

Os distúrbios emocionais quando se apresentam de forma crônica podem afetar a homeostase corporal e, por conseguinte, o sistema antioxidante (DING *et al.*, 2014). Dentre os distúrbios, há a ansiedade que é considerada uma doença caracterizada por diferentes fatores e particularidades. Mas, normalmente, envolve uma resposta a um estímulo estranho que gera um comportamento de medo e preocupação (GONÇALVES *et al.*, 2020).

É importante buscar medidas de intervir na ansiedade, pois ela afeta aspectos cognitivos, comprometendo a memória (FERNANDES *et al.*, 2018). Dentre as alternativas, já foi destacado o papel de uma dieta rica em antioxidantes para prevenção de doenças induzidas pela ansiedade oxidativa. Entretanto, como a suplementação com antioxidantes não é muito eficaz, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, é interessante estudar os antioxidantes naturais; já que, além desses fatores, eles são ainda, responsáveis por conservar as propriedades sensoriais e químicas dos alimentos (FERRERA *et al.*, 2016).

De acordo com Gonçalves *et al.* (2020), os fármacos utilizados para o tratamento de ansiedade podem apresentar efeitos colaterais. Assim sendo, é crucial descobrir novos ansiolíticos e, de acordo com esses pesquisadores, substâncias antioxidantes possuem efeitos quelantes de metais e potencial para a redução da ansiedade, visto que atuam sobre o sistema serotoninérgico.

Antioxidantes, a exemplo da melatonina, vitamina C e vitamina E são substâncias terapêuticas no que diz respeito às doenças neurodegenerativas. Apresentam potencial ansiolítico, reduzindo o estresse oxidativo e neuro-inflamação em ratos, portanto, demonstraram potencial antioxidante e anti-inflamatório (CUI; CHE; WANG 2020). Notou-se também, efeito de restauração da atividade de enzimas antioxidantes e atenuação da peroxidação lipídica (KHOSHNAZAR *et al.*, 2019). Ainda, no estudo de Fraga *et al.* (2018) foi avaliado o efeito ansiolítico de antioxidantes, foi observado que administração de 1, 3 e 10 mg/kg/peso animal de ácido ascórbico agiu como modulador do sistema glutamatérgico, reduzindo a ansiedade em camundongos. Diante disso, os antioxidantes que estão presentes

naturalmente em vegetais e frutos, podem atuar em complicações relacionadas aos distúrbios psicológicos (DANESHZAD *et al.*, 2020; MILAJERDI *et al.*, 2019).

2.5 FRUTAS E COMPOSTOS BIOATIVOS ANTIOXIDANTES

As frutas são matrizes ricas em compostos bioativos, contudo, o potencial antioxidante delas, dependerá da sua composição variando conforme suas vitaminas e compostos fenólicos. Resultados de estudos recentes mostraram que o expressivo consumo de frutas pode minimizar a ocorrência de doenças neurodegenerativas, pois os seus compostos possuem atividade anti-inflamatória e atuam contra a oxidação (LIU; WANG; WANG, 2018; VERRUCK; PRUDENCIO; SILVEIRA, 2018).

Dentre os compostos bioativos encontrados em frutas, há o grupo de flavonoides, a exemplo das antocianinas, que é o segundo pigmento de origem vegetal mais importante, possui rico valor nutricional e demonstra atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e de proteção neural (OLIVEIRA, 2014; QIN, *et al.*, 2020). As antocianinas são compostos bioativos ou fitoquímicos que apresentam hidrossolubilidade. Sua coloração varia de acordo com o pH e a atividade biológica desempenhada também sofrerá alterações em virtude da complexidade de interações químicas (PERUZZO, 2014; VERRUCK; PRUDENCIO; SILVEIRA, 2018). Estes compostos apresentam estrutura química de glicosídeo (ligadas a uma porção de açúcar) de antocianidinas. Agem como pigmentos naturais e são muito estudados, devido suas propriedades que conferem benefícios à saúde (LAMA *et al.*, 2020; OLIVEIRA, 2014). São encontradas em frutas de cor escura, como morangos, uvas roxas e mirtilos (GUO *et al.*, 2020).

As antocianinas têm potencial para serem utilizadas de diversas formas em tecnologia de alimentos. Podem ser incorporadas como aditivos e corantes em produtos no processo de fabricação para proporcionar maior atividade antioxidante (ANUYAHONG; CHUSAK; ADISAKWATTANA, 2020). Ainda, podem ser adicionadas na elaboração de filmes de embalagens ativas e inteligentes e ser indicativo de deterioração de alimentos (ETXABIDE *et al.*, 2017; YONG, *et al.*, 2019).

Outro composto bioativo encontrado em frutos é a vitamina C que apresenta caráter hidrossolúvel, sendo o ácido L-ascórbico sua forma mais biologicamente ativa (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Quando está na sua forma oxidada é conhecido por ácido deidroascórbico e ácido

ascórbico quando reduzida. Este último pode doar e receber elétrons, tornando importante o seu papel no sistema de defesa antioxidante. Além disso, atua na reciclagem da vitamina E, outro composto capaz de minimizar a oxidação (FERREIRA *et al.*, 2015). Ademais, esse composto bioativo protege as células de peroxidação lipídica, proteica, evita danos ao DNA e RNA (HUANG *et al.*, 2020).

Apesar de todos esses benefícios, a vitamina C não é sintetizada pelo organismo humano (PENTEADO, 2003). Logo, é imprescindível obtê-la através de fontes alimentares, como frutas que são conhecidas por ofertar significativos níveis desse composto (HOEHNE; MARMITT; 2020). As antocianinas e a vitamina C estão presentes na *Terminalia catappa* Linn que é alvo de diversas pesquisas (PRAVEENA *et al.*, 2014; RAPHAEL *et al.*, 2019; RIE; AKIKO, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2019). Entretanto, apesar das propriedades já registradas na literatura, é de suma importância o desenvolvimento de novos estudos para abordar o potencial antioxidante *in vivo* e *in vitro* desta fruta, buscando demonstrar os benefícios que uma fonte natural pode desempenhar no organismo humano e animal (MARQUES *et al.*, 2012).

2.6 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANCs)

O estilo de vida vem mudando e, cada vez mais, alimentação saudável faz parte da rotina da população. Por conseguinte, é de suma importância o desenvolvimento de alternativas para estimular esses hábitos. Diante disto, em 2008 foi criada a terminologia para PANC (plantas alimentícias não convencionais) para caracterizar todas as plantas que dispõem de alguma ou diversas partes comestíveis (KELEN *et al.*, 2015; LIBERATO; LIMA; SILVA, 2019).

O consumo de plantas acontece desde a pré-história e representa uma forma de desenvolvimento da economia rural e local. As PANC já foram muito utilizadas, mas devido à modernização da agricultura e conhecimento empírico não difundido elas são, ainda, pouco consumidas (BARREIRA *et al.*, 2015; BEZERRA *et al.*, 2017).

Dessa maneira, embora seu consumo como alimento possa ser negligenciado, é importante ressaltar que o Brasil possui uma rica biodiversidade. Logo, essas plantas podem ser cultivadas em todas as regiões do país, pois apresentam grande potencial adaptativo. Outrossim, não necessitam advir diretamente do cultivo, podem ser mantidas e manejadas, a depender de cada tipo de solo (TERRA; VIERA 2019; TULER; PEIXOTO; SILVA, 2019).

As PANC são vegetais nutritivos que apresentam significativa funcionalidade. Entretanto, muitas vezes, não são incluídos na alimentação humana, em virtude da escassez de informações a respeito de suas propriedades. Por isso, é importante dar atenção ao estudo dessas plantas que possuem potencial valor nutritivo, cultural e econômico (TERRA; VIERA, 2019; OLIVEIRA SAMPAIO *et al.*, 2019), pois já foram capazes de promover redução da ansiedade e da neurodegeneração em ratos (LEE *et al.*, 2013).

Diante do exposto, é válido ressaltar a utilização de plantas como alimento, que costumavam ser aplicadas para o tratamento de diversas patologias humanas, por ser fonte de compostos bioativos. Logo, podem ofertar minerais, vitaminas, compostos fenólicos, carotenoides, lipídeos, carboidratos e proteínas com diversos benefícios nutricionais (ENRIQUEZ-OCHOA *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020).

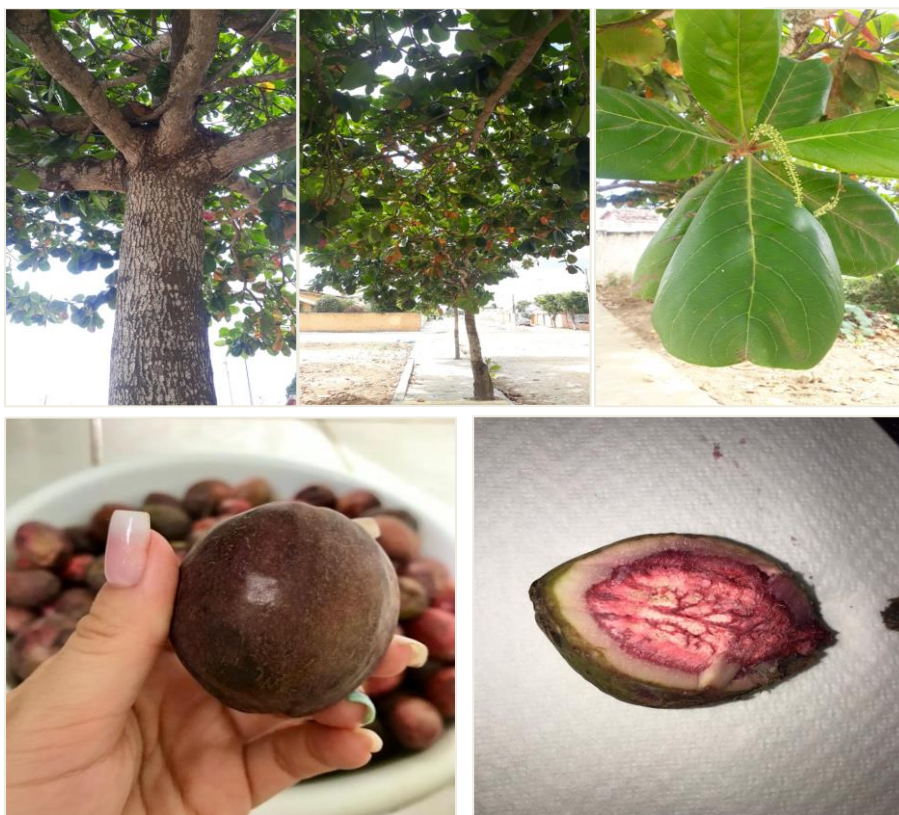
2.6.1 *Terminalia catappa* Linn

O Brasil possui uma rica biodiversidade o que favorece o cultivo de frutas, entretanto, há inúmeras espécies existentes que não são utilizadas, apesar de que poderiam contribuir para o desenvolvimento local e econômico. Além disso, dispõem de um significativo valor nutricional, pois apresentam em sua matriz compostos fenólicos, minerais, vitaminas, fibras e carotenoides (SCHIASSI *et al.*, 2018).

Entre as espécies subexploradas, tem-se a *Terminalia catappa* (Figura 1) pertencente à família Combretaceae, típica de regiões tropicais e subtropicais e é utilizada na zona urbana para arborizar ambientes. Embora seu país de origem seja a Índia, chegou à América do Sul com propósitos de reflorestamento e, atualmente, é comum na região do litoral brasileiro. O seu tronco pode ter formato reto ou torto, podendo variar de 25 a 45 m de altura e 50 a 150 cm de diâmetro (KATIKI *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2012). No Brasil, a frutificação ocorre costumeiramente entre os meses de novembro a março (SANTOS *et al.*, 2008).

Pode ser conhecida por várias denominações como: amendoeira, cuca, guarda sol, castanheira da Índia, chapéu-de-Sol, amendoeira-da-praia e da Índia; sendo mais conhecida, no Brasil, por “castanhola”. É uma árvore que se adapta e se propaga facilmente, resistindo às condições salinas e ventos fortes (KATIKI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

Figura 1– *Terminalia catappa* Linn (castanhola)



Fonte: Próprio autor (2020).

O fruto engloba três componentes: exocarpo ou epicarpo (parte externa); mesocarpo (polpa) e o caroço (corresponde à amêndoa) encontrada no endocarpo. Possui formato redondo, achatado e apresenta variações de coloração dependendo do estágio de maturação: verde quando imaturo, na fase intermediária demonstra cor amarelada; e, maduro expõe cor que varia de vermelho a roxo (ABDULKADIR, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2019). Ademais, o fruto possui em sua composição, conteúdo de fenólicos, vitaminas, taninos, saponinas, fitoesteróis, alcaloides, triterpenos e glicosídeos esteroidais (YAKUBU *et al.*, 2020) e a amêndoa é rica em fibras e ácidos graxos insaturados. Dessa forma, são associadas a diversos efeitos benéficos à saúde, como tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes, além de possuir atividades contra a inflamação (ABDULKADIR, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2019).

Ademais, caracteriza-se como uma planta medicinal demonstrando atividade anti-helmíntica, anti-inflamatória, imunomoduladora e antioxidante. Diferentes partes como folha, casca e fruto possuem atividades biológicas e são utilizadas no tratamento de doenças hepáticas e inflamações da pele (KATIKI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015). A *Terminalia catappa*

demonstra, também, propriedades gastroprotetoras. Possuindo registro na Farmacopeia Caribenha, para tratar gastrites e infecções do trato urinário (GERMOSÉN-ROBINEAU, 2014). A planta é utilizada também, para amenizar sintomas como diarreia e disenteria (OHARA *et al.*, 2020).

Segundo Merele *et al.* (2017) os frutos apresentam variações nos parâmetros nutricionais, dependendo da época que seja colhido, das condições do clima e do solo. Marques *et al.* (2012); Dos Santos; Lorenzo e Lannes (2016) analisaram a composição de 100 g do fruto que apresentou aproximadamente 62,52 – 76,88% de carboidratos; 2,30 – 2,54% de proteínas; 2,79 de lipídios. Ainda, demonstrou teor de 142,84 e 244,33 mg GAE/100 g. Adefegha *et al.* (2016) por sua vez, enfatizam o caráter antioxidante do fruto, ao detectar concentrações expressivas de compostos fenólicos presentes na castanhola, como fenólicos (ácido elágico, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico) e flavonoides (isoquercitina, caempferol, quercetina, rutina, epicatequina e catequina). E, ainda quantidades significativas de β -caroteno (DIKSHIT; SAMUDRASOK, 2011).

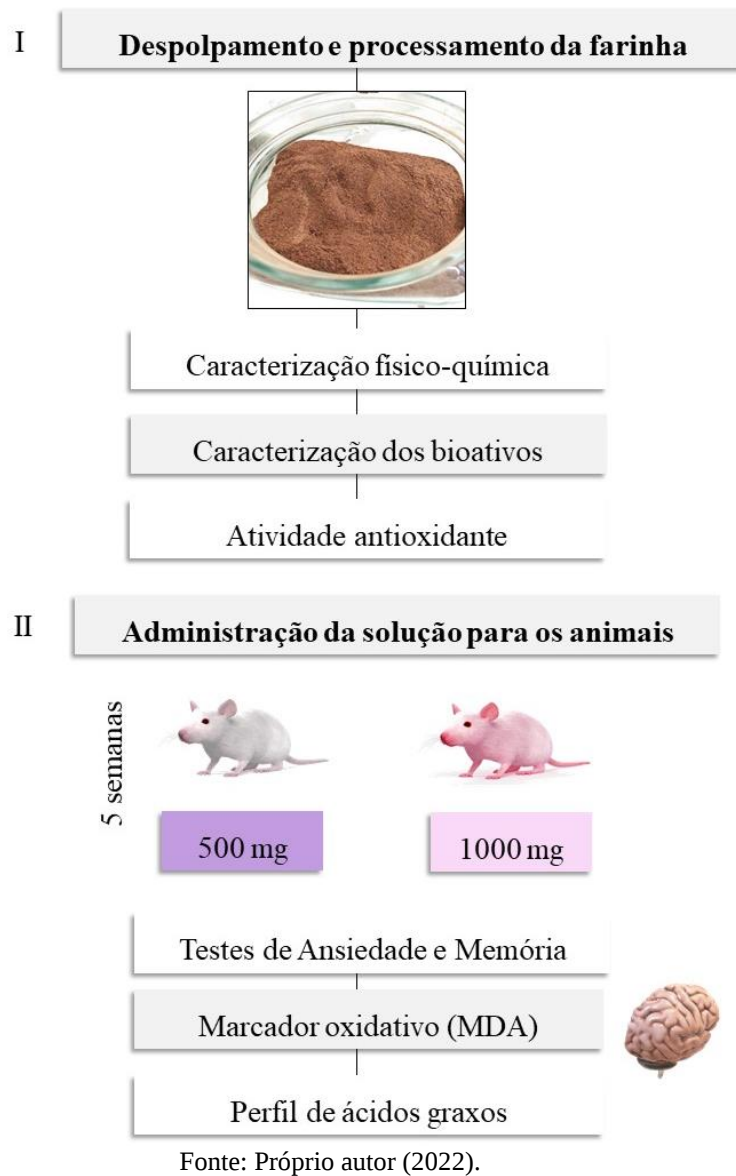
O fruto da castanhola apresenta potencial para aplicação na dieta humana, devido à sua composição nutricional: Fenólicos totais ($142,33 \pm 15,5$ mg GAE/g), Vitamina C ($78,83 \pm 19,5$ mg/100ml), Flavonoides totais ($43,52 \pm 0,37$ mg/100g) e Antocianinas ($16,29 \pm 0,50$ mg/100ml), valores referentes ao estágio maduro (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Já apresentou conteúdo de fenólicos totais superior a outras conhecidas e consumidas, como do pseudofruto do caju e teores semelhantes a composição de fenólicos de uvas das variedades Niagara e Isabella (SOARES *et al.*, 2008). Com relação a sua capacidade antioxidante, o extrato aquoso da polpa apresentou maiores concentrações de frutas consideradas fonte de antioxidantes, como o pequi (MARQUES *et al.*, 2012). Portanto, o fruto possui elevados teores de compostos bioativos e baixa acidez o que dificulta o desenvolvimento de boa parte dos microrganismos (RIBEIRO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019). Entretanto, vale destacar que o teor de antioxidante é maior no estágio de maturação do fruto quando comparado ao ainda verde (ABDULKADIR, 2015).

A castanhola já vem sendo analisada e utilizada para promover efeitos anti-inflamatórios, em virtude de suas propriedades antioxidantes que estão relacionadas aos flavonoides, polifenóis e taninos (SILVA *et al.*, 2015). Sendo reportados efeitos antimicrobianos, anticâncer, anti-idade (PANDYA *et al.*, 2013; TAGANNA *et al.*, 2011; WEN *et al.*, 2011). Além da redução de glicemia e aumento dos níveis de insulina em ratos tratados com extrato da folha (DIVYA *et al.*, 2019). Todavia, não existem estudos que avaliam o consumo da farinha da polpa de castanhola durante o envelhecimento e seu impacto em parâmetros comportamentais em ratos idosos.

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, *Campus* Cuité/PB. A obtenção da polpa e farinha da castanhola foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA)/CES/UFCG, as análises físico-químicas no Laboratório de Bromatologia (LABROM)/CES/UFCG e os testes comportamentais e demais ensaios com os animais foram desenvolvidos no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX)/CES/UFCG. O delineamento experimental da pesquisa está exposto na Figura 2.

Figura 2 – Delineamento experimental

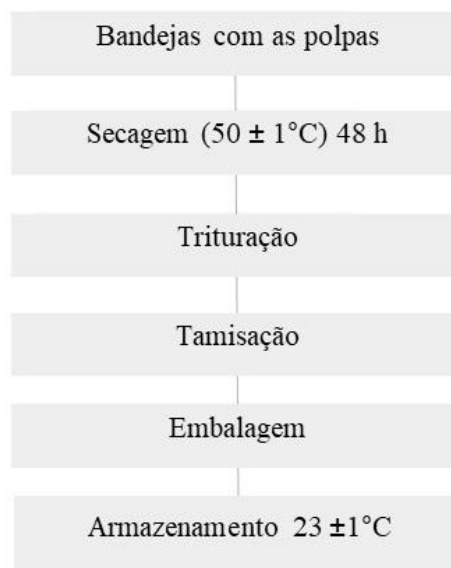
3.2 AMOSTRA E OBTENÇÃO DA FARINHA DA POLPA DE CASTANHOLA

Os frutos da castanhola (*Terminalia catappa* Linn) foram obtidos na cidade de Cuité/PB (Latitude: -6.48173, Longitude: -36.1496; 6° 28' 54" Sul, 36° 8' 59" Oeste) durante os meses de fevereiro e março de 2021. Esses frutos foram coletados no estágio maduro, com aspecto brilhante e coloração avermelhada, em seguida transportados em sacos plásticos e depois

higienizados em solução clorada de 200 ppm por cerca de 30 min e, após, enxaguados com água potável. Em seguida, foram secos com papel toalha e com auxílio de uma faca em aço inox separou-se manualmente a polpa do caroço.

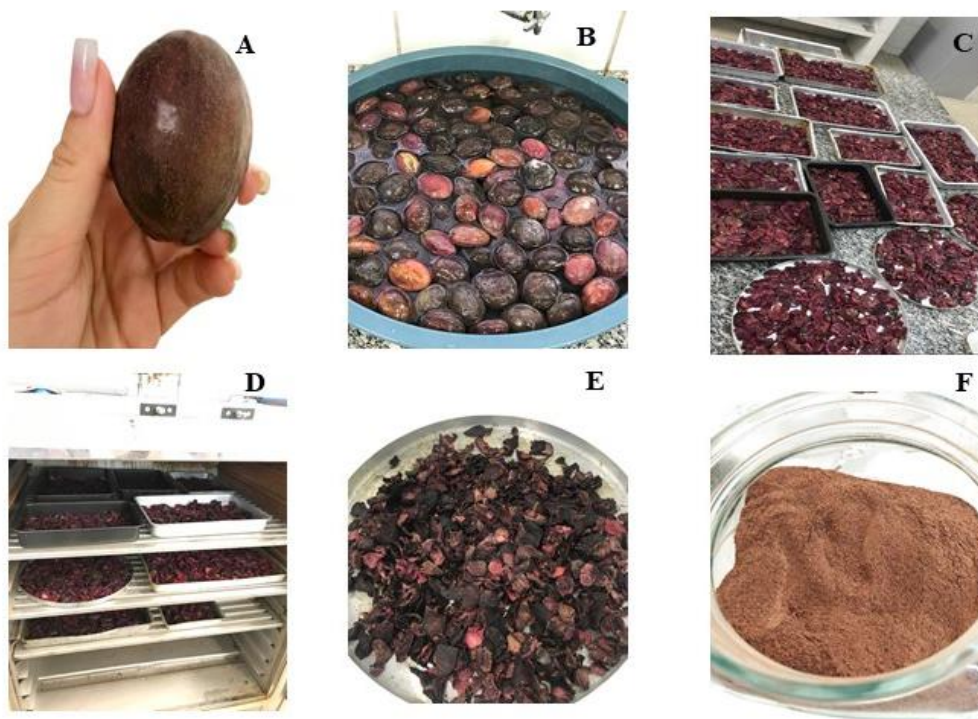
As polpas foram dispostas sobre bandejas de aço inox contendo papel manteiga na base. Em seguida, foram levadas para secagem em estufa de circulação de ar forçada (Biopar, modelo S480 AD, Porto Alegre – RS, Brasil) com temperatura padronizada para 50 ± 1 °C, durante 48 horas. Posteriormente, as polpas foram trituradas em liquidificador (Philco, modelo LQ PH900 PR, Brasil) e tamisadas com auxílio de uma peneira de plástico (tela de 0,5 mm) para obtenção de uma farinha fina. A farinha foi pesada e embalada à vácuo em saco de polipropileno estéril na embaladora a vácuo (GSVAC, modelo: GS 420, Santo André - SP, Brasil) e armazenou-se em temperatura ambiente (23 ± 1 °C). O processo de obtenção da farinha da polpa pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma de obtenção da farinha



Fonte: Próprio autor (2021).

Figura 4 – Etapas do processamento da farinha da castanhola



Fonte: Próprio autor (2021). 4A: coloração do fruto coletado; 4B: processo de higienização dos frutos; 4C: polpas antes da secagem; 4D: polpas submetidas ao processo de secagem; 4E: polpas após 48 h de secagem; 4F: polpas após trituração e tamisação.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DA CASTANHOLA

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata e constaram na determinação da atividade de água utilizando AQUALAB (DECAGON, modelo AQUALAB 4TE, USA), do pH usando pHmetro digital (GEHAKA, modelo PG1800, São Paulo - SP, Brasil), do teor de cinzas por carbonização seguido de incineração em forno mufla (JUNG, modelo 0612, Blumenau - SP, Brasil) estabilizado a 550 °C, da umidade a partir da secagem em estufa (Medclave, modelo n° 4, São Paulo, Brasil) estabilizada a 105 °C, da determinação de lipídeos conforme a metodologia de Folch, Less e Stanley (1957) e da acidez, que foi determinada pelo método de titulação de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (2019).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA FARINHA DA CASTANHOLA

Para determinação do teor de polifenóis totais, flavonoides totais e da atividade antioxidante *in vitro* (FRAP e ABTS), a farinha da castanhola foi submetida a extração dos constituintes bioativos, o extrato obtido foi utilizado para todos os ensaios. A extração foi realizada conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2021), com algumas modificações. Inicialmente, foram pesados 1 g de polpa de castanhola em um tubo Falcon e adicionaram-se 10 mL de álcool etílico a 80%. Em seguida, o tubo com a mistura foi agitado em vórtex (Logen Scientific, modelo LSM56-II-VM, Fortaleza/Ceará, Brasil) por 60 segundos e, posteriormente, deixado em repouso na ausência da luz em temperatura ambiente (23 ± 1 °C) por 24 horas. Após, a mistura foi filtrada em papel filtro Whatman, de 125 mm, sendo o volume completado para 10 mL com o solvente de extração. O extrato foi recolhido em frasco âmbar e armazenado em freezer a -18 °C até o momento das análises. As extrações e respectivas análises foram realizadas em triplicatas.

3.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais (CFT)

Para determinação dos compostos fenólicos totais da farinha da polpa de castanhola foi utilizada a metodologia descrita por Liu *et al.* (2002), com algumas alterações. De forma geral, 250 µL do extrato foi misturado em tubo de ensaio com 1250 µL do reagente Folin-Ciocalteu a 10%. As soluções foram agitadas em vórtex (Logen Scientific) e armazenadas em temperatura ambiente (23 ± 1 °C) na ausência da luz por 6 min. Após, adicionaram-se 1000 µL da solução de carbonato de sódio a 7,5%. Levou-se a mistura ao banho maria (Novatecnica®, modelo NT232, Piracicaba – SP, Brasil) a uma temperatura de 50 °C, durante 5 min. Após, mediu-se a absorbância 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 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cem gramas amostra seca (mg EAG/100 g).

3.4.2 Determinação de flavonoides totais

O teor total de flavonoides foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). Uma alíquota de 0,5 mL do extrato da farinha de castanhola foi adicionado à 2 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionaram-se 150 µL de nitrito de sódio a 5%. Depois de 5 min, 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. Mediu-se a absorbância da amostra a 510 nm usando um espectrofotômetro (BEL Photonics) contra um branco na ausência dos extratos. Determinou-se o teor de flavonoides totais da polpa usando uma curva padrão de equivalentes de catequina (EC) - Sigma. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (EC) por cem gramas de farinha de castanhola com base no peso seco (mg EC/100 g).

3.4.3 Atividade antioxidante - método FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP, que avalia a redução do ferro, foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1999), adaptada por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). O preparo do reagente ocorreu apenas na fase da análise, que consistiu da mistura de 11 mL de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6), 1,1 mL de solução TPTZ (2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine) (10 mM em HCl 40 mM) e 1,1 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Para a averiguação, foram adicionados 200 µL do extrato da farinha da castanhola em 1800 µL do reagente FRAP em um tubo de ensaio e, posteriormente, a mistura foi submetida ao banho Maria (Novatecnica®) a 37 ± 1 °C por 30 min. “Um branco” foi preparado nas mesmas condições, mas sem adição do extrato. Em seguida, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (BEL Photonics) a 593 nm. Para determinação da atividade antioxidante (FRAP) da farinha polpa de castanhola foi utilizada a curva de calibração com Trolox e os resultados expressos em µmol de trolox por grama de amostra (µmol de trolox /g de amostra).

3.4.4 Atividade antioxidante - método ABTS^{•+}

Para determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS empregou-se a metodologia de Surveswaran *et al.* (2007), com algumas alterações. Primeiramente, foi formado o radical ABTS^{•+} por meio da reação da solução ABTS a 7 mM com a solução de persulfato de

potássio 140 mM incubados a temperatura de 25 °C, no escuro, durante 12-16 h. Após a formação do radical, este foi diluído em água destilada para a obtenção do valor de absorbância de 0,800 ($\pm 0,020$) a 734 nm. A partir da amostra do extrato da farinha da castanhola foram preparadas quatro diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro foi transferida para um tubo de ensaio uma alíquota de 100 μ L do extrato e adicionados 500 μ L do radical ABTS^{•+}. Posteriormente, os tubos de ensaio ficaram mantidos na ausência de luz por 6 min. Em seguida, foi feita a leitura a 734 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics). Também foi preparada uma solução “controle” que consistia de 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, o Trolox foi utilizado e os resultados expressos em μ mol de trolox por grama de amostra (μ mol de trolox/g de amostra).

3.5 ELABORAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ADMINISTRAÇÃO PARA OS ENSAIOS *IN VIVO*

A proporção utilizada foi inicialmente testada para averiguar a passagem da solução pela sonda. Assim, a farinha de castanhola diluída na proporção 2:1 (água:farinha). A solução ficou armazenada em freezer -18 °C durante todo o protocolo experimental.

3.6 ENSAIOS *IN VIVO*

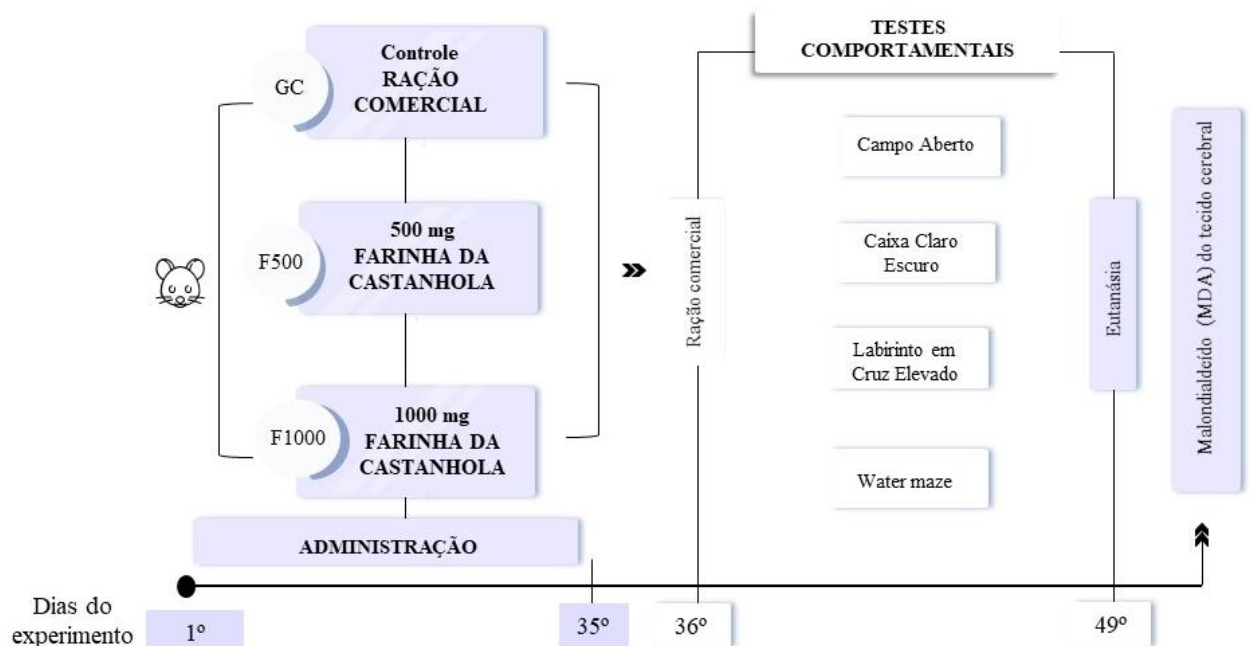
3.6.1 Animais e Dieta

Para a realização dos ensaios, foram utilizados 35 ratos idosos machos da linhagem *Wistar*, com 17 meses e peso médio de 368 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pertencente ao Departamento de Nutrição. Os animais foram dispostos em gaiolas coletivas de polietileno no Laboratório de Nutrição Experimental do Centro de Educação e Saúde (CES) da UFCG – *Campus* Cuité, mantendo um padrão de peso uniforme por cada grupo. Dispondo de monitoramento de temperatura (22 ± 1 °C), umidade $65 \pm 5\%$, sistema de exaustão de ar, ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00min às 18h00min, recebendo ração (Presence[®], Paulínia, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo Controle (GC) – recebeu água destilada; Grupo Farinha 500 (F500) – tratado com 500 mg de farinha da castanhola/kg

de peso do animal e Grupo Farinha 1000 (F1000) – tratado com 1000 mg da farinha da castanhola/kg de peso do animal. Esse tratamento foi feito para permitir a comparação entre o consumo de diferentes dosagens da farinha da castanhola, que representa a adição de uma fonte de antioxidantes, em relação ao grupo controle. Todos os animais receberam a administração por gavagem. A duração do tratamento de 5 semanas foi baseada no estudo de Soares *et al.* (2020), que observaram a redução do estresse oxidativo nos ratos administrados com extrato da semente de açaí. A dosagem foi definida a partir de estudos que também administraram matrizes fontes de compostos fenólicos: o estudo de Pereira (2019) que suplementou 500 mg da polpa de açaí/kg de peso do animal em ratos machos e obteve efeitos ansiolíticos quando associados ao exercício. E com base no estudo de El Morsy, Ahmed e Ahmed (2015), que administraram 1000 mg de extrato de açaí e observaram redução dos níveis de malondialdeído e efeito anti-inflamatórios em ratos. O cálculo para administração da solução (água destilada + farinha) foi realizado diariamente de acordo com o peso que o animal se encontrava, obedecendo 3 mL dessa solução/kg de peso do animal (F1000) e 1,5 mL/kg de peso (F500). O delineamento do experimento está detalhado na Figura 4.

Figura 5 – Esquema de tratamento e testes comportamentais



Fonte: Próprio autor (2021).

3.6.2 Testes Comportamentais

Após cinco semanas de administração, foram realizados o Teste de campo aberto que objetiva verificar parâmetros de ambulação, comportamentos de levantar, tempo de autolimpeza e defecação (PELLOW; CHOPIN; FILE; BRILEY, 1985); Teste do Labirinto em Cruz Elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW; FILE, 1986) e Caixa Claro-escuro (COSTALL *et al.*, 1989).

Para avaliar a memória, utilizou-se o Teste de Habituação do Campo Aberto (RACHETTI *et al.*, 2013); Teste de Reconhecimento de Objetos, para verificar memória em curto e longo prazo (NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013) e o Labirinto Aquático de Morris, para avaliação da memória espacial dos roedores. O cronograma dos experimentos de ansiedade e memória, após as 5 semanas de tratamento experimental, está esquematizado na Figura 5.

Figura 6 – Cronograma da administração e dos testes

CRONOGRAMA EXPERIMENTAL						
01	02	03	04	05	06	07
08	09	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31	32	33	34	35
36	37	38	39	40	41	42
43	44	45	46	47	48	49

Período de administração

Testes de ansiedade: 36: Campo aberto, 37-LCE, 38-CCE

Testes de memória:
 43- Habituação | 44- MCP | 45- MLP
 46- WT | 47- WT | 48-WT | 49- WT

MCP: memória a curto prazo, MLP: memória a longo prazo,
 WT: water maze

Fonte: Próprio autor (2021).

3.6.3 Aferição dos Parâmetros de Ansiedade

3.6.3.1 Teste de Campo Aberto

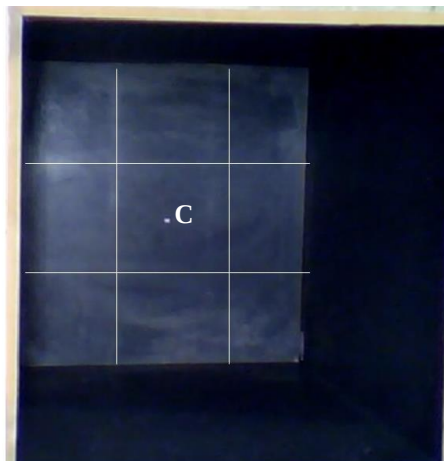
O campo aberto desenvolvido por Hall (1934) consiste em um instrumento utilizado para analisar o comportamento de ansiedade do roedor quando exposto a um ambiente novo, o qual tende a explorar esse lugar. A menor exploração do aparato pelo animal é tido como

comportamento similar à ansiedade (ROJAS-CARVAJAL *et al.*, 2020; NAKAGAWA, *et al.*, 2020).

O aparelho consiste em uma arena quadrada (60 x 60 x 60 cm), com seis linhas cruzadas formando 9 quadrantes de 20 x 20 cm. Cada animal foi inserido no centro da arena do campo aberto para explorar o ambiente por 10 minutos. Os experimentos foram filmados com uma câmera de vídeo instalada no teto para capturar os parâmetros de: ambulação (número de cruzamentos realizados pelo animal com as 4 patas pelos segmentos) - representados pelas linhas na Figura 6, sendo a área central identificada pela letra C; número de comportamentos de levantar (*rearing*), tempo de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) (MONTGOMERY, 1955; SANTOS, 2008; RACHETTI *et al.*, 2012).

Após 7 dias, o procedimento foi realizado novamente para observar se o animal apresentaria habituação, que é identificada a partir da redução da ambulação nesta segunda exposição. Finalizada cada sessão de comportamento, o aparelho foi higienizado com uma solução de álcool a 10%.

Figura 7 – Aparato do campo aberto



Fonte: Acervo de fotos do LANEX (2020).

3.6.3.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (Figura 7) é, costumeiramente, utilizado como modelo não condicionado de ansiedade em roedores (PELLOW *et al.*, 1985). É constituído por um aparato formado por dois braços fechados e dois abertos perpendiculares aos primeiros; uma área central, que se encontra elevada do solo. O animal foi inserido no centro do aparelho, sempre

pelo mesmo pesquisador, com o focinho voltado para o braço fechado direito. No período de 5 minutos, foi avaliada a frequência de entradas do animal nos braços fechados e abertos, o tempo gasto em cada um e no centro do aparelho. Ademais, foi contabilizado o número de mergulhos de cabeça do animal nos braços abertos. Após cada teste individual, o labirinto foi higienizado com álcool a 10%. As sessões foram filmadas e, sucessivamente, analisadas.

Figura 8 – Teste labirinto em cruz elevado

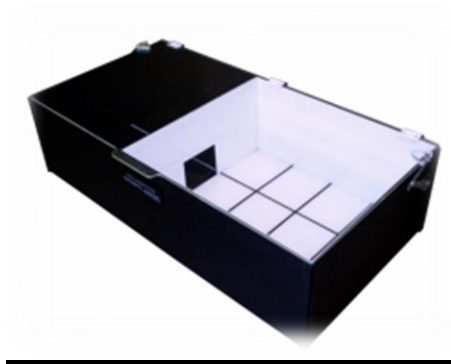


Fonte: Acervo de fotos do LANEX (2020).

3.6.3.3 Caixa claro-escuro (CCE)

A caixa de transição claro-escuro (Figura 8) mensura a ansiedade incondicionada e comportamento exploratório em roedores (BOURIN; HASCOËT, 2003). O aparato feito de acrílico (45 x 27 x 27 cm) é dividido em dois compartimentos, sendo um escuro (18 x 27 cm) e outro claro (27 x 27cm). Os animais foram colocados no centro do compartimento claro, com o focinho voltado para o compartimento escuro e ficaram no aparelho durante 5 minutos para livre exploração. Todas as sessões eram filmadas e, posteriormente, analisadas, a fim de avaliar o tempo de permanência do animal em cada um dos compartimentos. Encerrada cada sessão, o aparelho foi higienizado com uma solução de álcool a 10%.

Figura 9 – Caixa Claro-Escuro (CCE)



Fonte: Acervo de fotos do LANEX (2020).

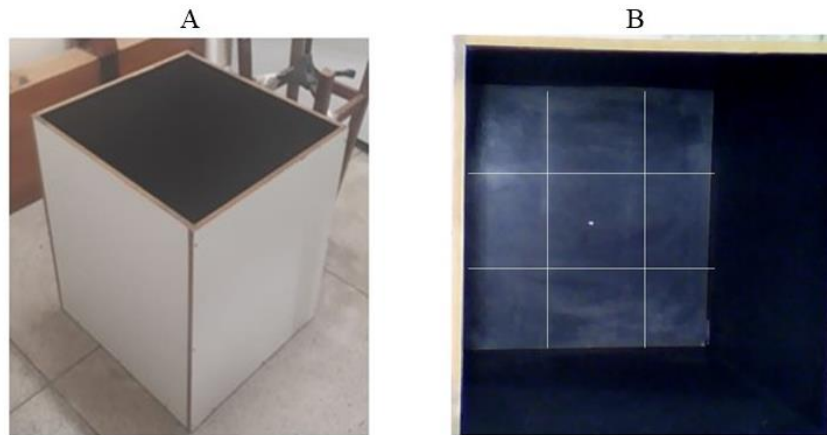
3.6.4 Aferição dos Parâmetros de Memória

3.6.4.1 Usando o Teste de Habituação ao Campo Aberto

Foi realizado o Teste de Habituação ao Campo Aberto (Figura 9) que analisa a capacidade de habituação a longo prazo do animal. Conforme Rachetti *et al.* (2013), a atividade locomotora do animal relaciona-se à sua capacidade de aprendizagem, assim, a habituação do animal após exposição repetida ao campo aberto é considerado um indicativo de aprendizagem não associativa.

Os animais foram expostos ao campo aberto em dois momentos, no primeiro, para avaliar a memória a curto prazo e o segundo realizado após sete dias, para verificar a memória a longo prazo (RACHETTI *et al.*, 2013). Cada animal explorou o ambiente por 10 minutos e o ensaio foi realizado sempre no mesmo horário (06:30-08:30 h). As sessões foram registradas com auxílio de uma câmera de vídeo acoplada ao teto do laboratório e o aparelho foi higienizado com álcool a 70% ao final de cada sessão individual. Os parâmetros analisados foram: tempo de ambulação, número de cruzamentos, número de entradas e tempo de permanência na zona interna. Por fim, os vídeos foram analisados por um único pesquisador.

Figura 10 – Visão externa (A) e interna (B) do Campo Aberto



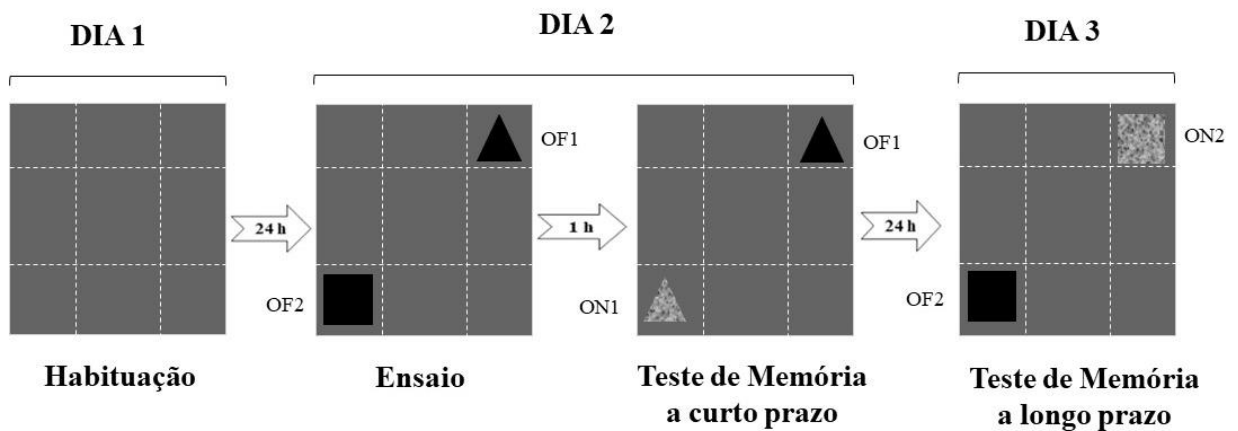
Fonte: Acervo de fotos do LANEX (2020).

3.6.4.2 Avaliação da memória utilizando o Teste de Reconhecimento de Objetos

Para avaliar a memória em curto e longo prazo foi utilizada o Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) (NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013). Consiste em um campo aberto preto (60 x 60 x 60 cm), com quatro linhas cruzadas formando 9 quadrantes de 20 x 20 cm, uniformemente iluminado e com objetos na cor preta, com formatos (pirâmide, prisma retangular) e texturas (liso ou áspero) diferentes. O teste possui quatro ensaios de 10 minutos que aconteceram em três etapas: 1) Dia 1 – realizado para promover a habituação do animal ao ambiente, minimizando o estresse da manipulação. Nessa etapa, não há presença de nenhum objeto; 2) Dia 2 – realizado 24 h após o ensaio de habituação, o animal é inserido no campo aberto contendo dois objetos (OF1 e OF2) de textura idêntica (lisa), mas com formatos diferentes (triângulo e prisma retangular) e localizados perto de dois cantos opostos escolhidos aleatoriamente, conforme a Figura 10.

Após 1 hora da finalização desse procedimento, iniciou-se a próxima etapa para mensuração da memória à curto prazo. O animal foi inserido novamente no campo para explorar dois objetos (OF1 em sua localização original e um novo objeto - ON1), de forma idêntica, textura diferente do OF1 e localizado onde OF2 se encontrava durante o ensaio amostral; e 3) Dia 3 – realizado 24 h após o ensaio de curta duração, o animal foi inserido no campo aberto para explorar novamente dois objetos (OF2 em seu lugar original) e um novo objeto (ON2), de forma idêntica, com diferente textura (Figura 10).

Figura 11 – Desenho experimental do teste de reconhecimento de objetos



Fonte: adaptado de Nava-Mesa; Lamprea e 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 foram observados os mesmos parâmetros, mas para o ON2 (dia 3). As sessões foram filmadas com uma câmera de vídeo e, a cada animal testado, o aparelho foi limpo com álcool a 10%, antes de iniciar e depois de concluído o teste, o aparato foi limpo com álcool a 70%. O resultado da taxa de exploração foi calculado para cada animal e expresso pela razão $TN / (TF + TN)$, onde TN = tempo gasto explorando o objeto novo e TF = tempo gasto explorando o objeto familiar (GUSTAVSSON *et al.*, 2010; D'ÁVILA, 2017).

3.6.4.3 Avaliação da memória espacial utilizando o Labirinto aquático de Morris

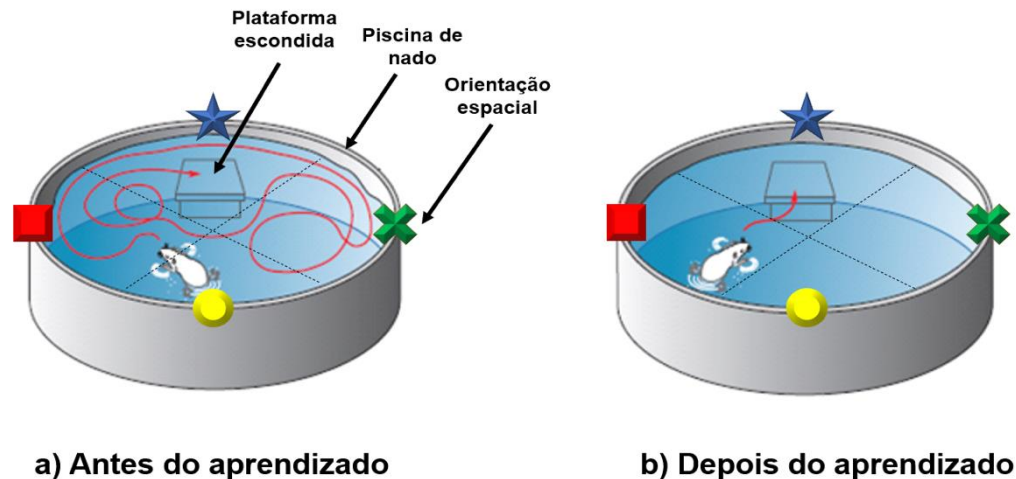
O labirinto aquático de Morris – *water maze* (Figura 11) foi utilizado para avaliação da memória espacial dos animais (VORHEES; WILLIAMS, 2006). O teste foi desenvolvido em uma piscina redonda (Figura 12), fabricada com material plástico, com diâmetro de 1,60 m e 82 cm de altura, dividida em quatro quadrantes representados pelos pontos cardiais (norte, sul, leste e oeste), com a plataforma na posição noroeste, cujas dimensões corresponderam a 10 cm x 13 cm. A piscina foi cheia com água até a altura de 54 cm e a plataforma foi submersa a 1 cm.

A execução foi baseada no estudo anterior de Soares *et al.* (2013), com duração de quatro dias. Nos três primeiros foram realizados os treinos, que consistiam de quatro ensaios de 60 segundos, com intervalo de 20 segundos entre cada um, momento em que o animal

permanecia individualmente em uma caixa. O primeiro rato foi posicionado de modo aleatório nos quadrantes e, sucessivamente, os demais foram inseridos do mesmo modo. Os treinos permitiram que o animal encontrasse a plataforma e permanecesse nela por 10 segundos. Caso isso não ocorresse, o mesmo era gentilmente conduzido. Nessa etapa dos três dias, observou-se a latência de escape.

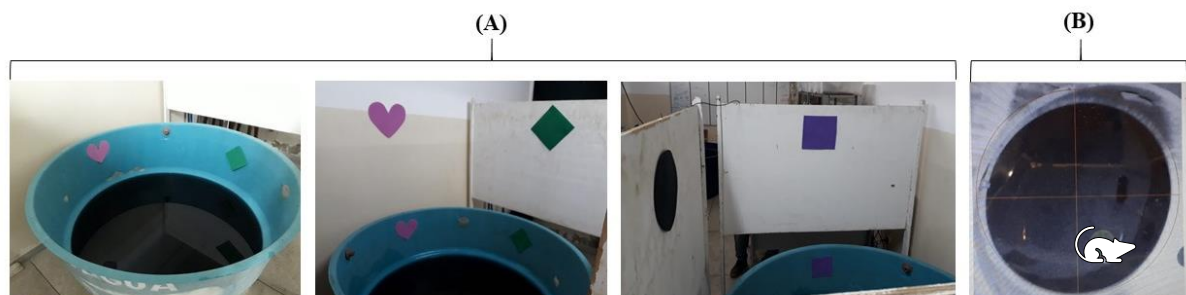
No quarto dia, o dia de treino, a plataforma foi retirada e os animais nadaram durante 60 segundos. Foram analisadas as variáveis: velocidade média, distância total percorrida, número de entradas no alvo (que seria a plataforma), tempo na zona da plataforma e latência para primeira entrada no alvo.

Figura 12 – Labirinto aquático de Morris usado no experimento visto externamente (A) e pelo programa Any Maze (B)



Fonte: adaptado de Nava-Mesa; Lamprea e Múnica (2013)

Figura 13– Labirinto aquático de Morris adaptado usado no experimento visto externamente (A) e pelo programa Any Maze (B)



Fonte: Acervo de fotos do LANEX (2020).

3.6.5 Eutanásia

Após a conclusão de todos os testes comportamentais, os animais foram submetidos a 8 horas de jejum e, posteriormente, eutanasiados por decapitação para a retirada do cérebro. Para análise do conteúdo de malondialdeído (MDA) cerebral, o órgão foi dividido manualmente em uma tira, com utilização de uma lâmina de bisturi. Foi utilizado o hemisfério direito do cérebro em um corte longitudinal no sentido ântero posterior. Após este procedimento, o tecido foi pesado e colocado em uma superfície com gelo e em seguida, mantido em - 18 °C até o momento da análise.

3.6.6 Aferição do Estresse Oxidativo – Malondialdeído (MDA) cerebral

Foi realizada pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). A amostra do tecido cerebral foi descongelada e, posteriormente, pesada para o cálculo da quantidade de tampão Tris HCl para amostra, utilizando-se a proporção de 1:5 (p/v). Posteriormente, o tecido foi picado com uma tesoura por cerca de 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 x g, 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 a 37%). Em seguida, o material foi colocado em banho-maria (Novatecnica®) com agitação a 45 °C, durante 40 min e, posteriormente, centrifugado (Centribio, modelo 80-2B, China) a 2500 x g, 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.

3.6.7 Determinação do Perfil de Ácidos Graxos no Cérebro

3.6.7.1 Coleta do cérebro

O cérebro foi removido e pesado com o auxílio da balança semi-analítica (RADWAG, modelo AS 220/C/2, Radom, Polônia). Posteriormente, acondicionado em potes coletores esterilizados e, em seguida, armazenado em freezer a -18° C até o momento da análise.

3.6.7.2 Extração lipídica e quantificação dos ácidos graxos do cérebro

Primeiramente, foi obtido o extrato lipídico do tecido cerebral pelo método de Folch, Less e Stanley (1957). A partir dele, foram adquiridos os ésteres metílicos por meio da esterificação realizada de acordo com a metodologia de Hartman e Lago (1973). Realizou-se a identificação e quantificação dos ésteres metílicos em cromatógrafo a gás de marca Ciola & Gregori Ltda (modelo CG-Master), com detector de ionização por chama.

As condições do cromatógrafo foram: coluna de polietilenoglicol (Carbowax 20M), de sílica fundida, com 30 m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura da película de fase estacionária. As temperaturas utilizadas: 150 °C para o vaporizador e 200 °C para o detector. A programação do forno consistiu em: 80 °C por 30 minutos, aumentando-se de 10 °C/min até 180 °C. A fase móvel foi o hidrogênio com uma vazão de 5 mL/min; o volume injetado de 1 µl, com uma razão de divisão de 1:25.

A caracterização dos ácidos graxos foi realizada por comparação do espectro de massas obtido com de padrões que também foram injetados no CG-MS. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo experimental obedeceu às recomendações éticas do *National Institute of Health Bethesda* (Bethesda, USA), sendo conduzido conforme as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais e foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR/UFCG, CEP 108/2017, Protocolo nº 53/2020 (Anexo A). Foi levado em consideração o bem-estar dos animais no

laboratório, de modo a minimizar o sofrimento e o estresse dos modelos experimentais. Por fim, os animais foram eutanasiados com a utilização de guilhotina.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (erro padrão da média) analisados pelo ANOVA *one-way*, seguido de teste de Tukey, para comparação entre os grupos. Foi considerado o nível de significância para rejeição da hipótese nula de $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

ABDULKADIR, A. R. In Vitro Antioxidant Activity of Ethanolic Extract from *Terminalia Catappa* (L.) Leaves and Fruits: Effect of Fruit Ripening. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v. 4, n. 8, p. 1244-1249, 2015.

ADEFEGHA, S. A. *et al.* Erectogenic, antihypertensive, antiabetic, antioxidative properties and phenolic compositions of almond fruit (*Terminalia catappa* L.) parts (hull and drupe) – in vitro. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 01-11, 2016.

ALEGRE, L. Brasil é o país mais ansioso do mundo. **Jornal da USP**, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://jornal.usp.br/atualidades/brasil-e-o-pais-mais-ansioso-do-mundo/>. Acesso em: 01 jul. 2020.

ALVES, L. M. S. Eixo HPA. **Participação de receptores ER e ER na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por estresse hemorrágico**. 2015, f. 14-16. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

ANTUNES, H. K. M. *et al.* Depression, anxiety and quality of life scores in seniors after an endurance exercise program. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 27, p. 266-271, 2005.

ANUYAHONG, T.; CHUSAK, C.; ADISAKWATTANA, S. Incorporation of anthocyanin-rich riceberry rice in yogurts: Effect on physicochemical properties, antioxidant activity and in vitro gastrointestinal digestion. **LWT**, p. 109571, 2020.

AROUCA, A. B. *et al.* Diet as a moderator in the association of sedentary behaviors with inflammatory biomarkers among adolescents in the Helena study. **European Journal of Nutrition**, 2018.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 21th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International, 2019. 3000 p.

AQUALAB. Analisador de atividade de água para avaliar biodegradação (alimentos e fármacos): Modelo CX-2. Decagon Devices, Inc. 950 NE Nelson Court Pullman, WA 99163 USA, 2001.

BARBOSA, T. N. R. M.; FERNANDES, D. C. Compostos Bioativos e Doenças Cardiovasculares: revisando as evidências científicas. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 41, n. 2, p. 181-192, 2014.

BENZIE, I. F. 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**, v. 299, p.15-27, 1999.

BEZERRA, A. S. *et al.* Composição nutricional e atividade antioxidante de plantas alimentícias não convencionais da região sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Alimentação**, v. 2, n. 3, p. 182-188, 2017.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse ligh/dark box test. **European Journal Pharmacology**, v. 463, p. 55-65, 2003.

CHANDRASEKHAR, Y. *et al.* Antidepressant like effects of hydrolysable tannins of *Terminalia catappa* leaf extract via modulation of hippocampal plasticity and regulation of monoamine neurotransmitters subjected to chronic mild stress (CMS). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 414-425, 2017.

CHEN, L. *et al.* Ventral tegmental area GABAergic neurons induce anxiety-like behaviors and promote palatable food intake. **Neuropharmacology**, p. 108114, 2020.

COSTA, C. O. *et al.* Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, n. 2, p. 92-100, 2019.

COSTALL, B. *et al.* Exploration of mice in a black and White test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.32, n.3, p.777-785, 1989.

CUI, Y.; CHE, Y.; WANG, H. Bergamot essential oil attenuate aluminum-induced anxiety-like behavior through antioxidation, anti-inflammatory and GABA regulation in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 145, p. 111766, 2020.

DANESHZAD, E. *et al.* Dietary total antioxidant capacity and its association with sleep, stress, anxiety, and depression score: A cross-sectional study among diabetic women. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 37, p. 187-194, 2020.

D'AVILA, L. F. *et al.* Toxicological aspects of interesterified fat: brain damages in rats. **Toxicology Letters**, v. 276, p. 122-128, 2017.

DENARDIN, C. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.

DIAS, M. I. M. F. **Cultura in vitro e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais**. 2017. 366 f. Dissertação (Doutorado em Química Sustentável) – Faculty of Science from Porto University, Porto, 2017.

DIKSHIT, M.; SAMUDRASOK, R. K. Nutritional evaluation of outer fleshy coat of *Terminalia catappa* fruit in two varieties. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 1, p. 47 – 51, 2011.

DING, L. *et al.* Protective effects of phosphodiesterase 2 inhibitor on depression-and anxiety-like behaviors: involvement of antioxidant and anti-apoptotic mechanisms. **Behavioural brain research**, v. 268, p. 150-158, 2014.

DOS SANTOS, O. V. *et al.* Propriedades antioxidativas e morfológicas da *Terminalia catappa* linn em diferentes estágios de maturação. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 30315-30326, 2019.

DOS SANTOS, O. V.; LORENZO, N. D.; LANNES, S. C da S. Chemical, morphological, and thermogravimetric of *Terminalia catappa* Linn. *Food Science and Technology*, Campinas, v. 36, n.1, p. 151 – 158, Jan-Mar, 2016.

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

ETXABIDE, A. *et al.* Development of active gelatin films by means of valorization of food processing waste: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 192-198, 2017.

FARHADNEJAD, H. *et al.* Antioxidant vitamin intakes and risk of depression, anxiety and stress among female adolescents. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 40, p. 257-262, 2020.

FERNANDES, M. A. *et al.* Transtornos de ansiedade: vivências de usuários de um ambulatório especializado em saúde mental. **Journal of Nursing UFPE**, p. 3836-3844, 2017.

FERREIRA, C. D. *et al.* **Fundamentos da Nutrição**. Salvador: Sanar, 2015. 262p. (Manuais da Nutrição, v. 1). Bibliografia: p.136. ISBN: 978-85-67806-27-3.

FERRERA, T. S. *et al.* Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE-STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRAGA, D. B. *et al.* Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 100, p. 16-23, 2018.

FRANCO, L. Entendendo os Transtornos de Ansiedade: Estruturas Cerebrais Envolvidas. **Mundo da Psicologia**, 2018. Disponível em: <http://mundodapsi.com/entendendo-os-transtornos-de-ansiedade-estruturas-cerebrais-envolvidas/>. Acesso em: 05 jul. 2020.

GERMOSEN-ROBINEAU, L. Farmacopea Vegetal Carbeña. **CICY editorial**, Yucatán, México p. 360, 2014.

GONÇALVES, N. G. G. *et al.* Protein fraction from *Artocarpus altilis* pulp exhibits antioxidant properties and reverses anxiety behavior in adult zebrafish via the serotonergic system. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 103772, 2020.

GUERRA, M. **Ansiedade: mal do século**. Maio de 2019. Disponível em: [https://mariangelaguerra.com.br/ansiedade/#:~:text=Os%20transtornos%20de%20ansiedade%20Al%C3%A9m,do%20estado%20de%20cada%20pessoa](https://mariangelaguerra.com.br/ansiedade/#:~:text=Os%20transtornos%20de%20ansiedade%20Al%C3%A9m,do%20estado%20de%20cada%20pessoa.). Acesso em: 04 jul. 2020.

GUSTAVSSON, M. *et al.* 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, n. 4, p. 279-289, 2010.

HANDLEY S. L.; MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear"- motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg"s. **Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1–5, 1985.

HARTMAN L.; LAGO R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, London, 22, 475–476, 1973.

HIRSHLER, Y.; DORON, R. Neuroplasticity-related mechanisms underlying the antidepressant-like effects of traditional herbal medicines. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 10, p. 945-958, 2017.

HOEHNE, L.; MARMITT, L. G. Métodos para a determinação de vitamina C em diferentes amostras. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 11, n. 4, 2020.

HOGUE, E. A. *et al.* Treatment for anxiety: Mindfulness meditation versus escitalopram (TAME): Design of a randomized, controlled non-inferiority trial. **Contemporary Clinical Trials**, v. 91, p. 105965, 2020.

HUANG, C. W. *et al.* Prevalence and risk factors for elevated anxiety symptoms and anxiety disorders in chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. **General Hospital Psychiatry**, 2015.

KATIKI, L. M. *et al.* Terminalia catappa: chemical composition, in vitro and in vivo effects on Haemonchus contortus. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 118-123, 2017.

KHAN, A.; UDDIN, R. Is consumption of fast-food and carbonated soft drink associated with anxiety-induced sleep disturbance among adolescents? A population-based study. **Clinical Nutrition ESPEN**, 2020.

KHOSHNAZAR, M. *et al.* Attenuating effect of α -pinene on neurobehavioural deficit, oxidative damage and inflammatory response following focal ischaemic stroke in rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 11, p. 1725-1733, 2019.

LAMA, K. *et al.* Anthocyanin accumulation is initiated by abscisic acid to enhance fruit color during fig (Ficus carica L.) ripening. **Journal of Plant Physiology**, p. 153192, 2020.

LEE, Y. *et al.* Anti-inflammatory and neuroprotective effects of constituents isolated from Rhodiola rosea. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p.100-108, 2013.

LIU, F.; WANG, M.; WANG, M. Phenolic compounds and antioxidant activities of flowers, leaves and fruits of five crabapple cultivars (Malus Mill. species). **Scientia Horticulturae**, v. 235, p. 460-467, 2018.

LIU, M. *et al.* Antioxidant and anteproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, 2926–2930, 2002.

MA, Z. *et al.* Myricetin attenuates depressant-like behavior in mice subjected to repeated restraint stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28377-28385, 2015.

- MACHADO, M.; QUEVEDO, J. Prevalência de transtornos ansiosos e algumas comorbidades em idosos: um estudo de base populacional. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 65, p. 28-35, 2016.
- MARQUES, M. R. *et al.* An in vitro analysis of the total phenolic content, antioxidant power, physical, physicochemical, and chemical composition of *Terminalia Catappa* Linn fruits. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 209-213, 2012.
- MERELLO, P. *et al.* Cell wall remodeling in abscission zone cells during ethylene-promoted fruit abscission in citrus. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 126, 2017.
- MILAJERDI, A. *et al.* Dietary total antioxidant capacity in relation to depression and anxiety in Iranian adults. **Nutrition**, v. 65, p. 85-90, 2019.
- MILLS, P.; MACLURE, K. A pilot study to identify elderly patients with cognitive impairment for clinical pharmacist polypharmacy review in General Practice. **Exploratory Research in Clinical and Social Pharmacy**, v. 3, p. 100065, 2021.
- MITRA, S. *et al.* Activities of antioxidant enzymes in three species of *Ludwigia* weeds on feeding by *Altica cyanea*. **Journal of King Saud University**, v.31, p. 1522-1527, 2019.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n.4, 1955.
- MOSCA, S. S.; SANCHES, R. A.; COMUNE, A. C. A importância dos antioxidantes na neutralização dos radicais livres: uma revisão. **Revista Saúde em Foco**, n. 9, p. 563-574, 2017.
- MURRAY, C. J. L *et al.* **Summary measures of population health: concepts, ethics, measurement and applications**. World Health Organization, 2002.
- NAKAGAWA, H.; MATSUNAGA, D.; ISHIWATA, T. Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field. **Journal of Thermal Biology**, v. 87, p. 102458, 2020.
- NAVA-MESA, M. O., LAMPREA, M. R., MÚNERA, A. Divergent short-and longterm 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.
- OHARA, R. *et al.* *Terminalia catappa* L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 256, p. 112793, 2020.
- OLIVEIRA, T. C. S. *et al.* **Principais compostos bioativos e capacidade antioxidante da polpa do camu-camu (*Myrciaria dubia*) em diferentes estádios de maturação**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

OLIVEIRA, V. S. Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and in vitro and in vivo antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 315, p. 126274, 2020.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p. 149-167, 1985.

PENTEADO, M. V. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. In: **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**, p. 612-612, 2003.

PEREIRA, E. da S. **Efeito do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PERUZZO, L. C. **Extração, purificação, identificação e encapsulação de compostos bioativos provenientes do resíduo do processamento da indústria vinícola**. 2014. 231 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PRAVEENA, K. Phytochemical, Anti-microbial and In-vitro Antioxidant activity of *Terminalia catappa*. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 5, n. 2, 2014.

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.

QIN, Y. *et al.* Comparison of the physical and functional properties of starch/polyvinyl alcohol films containing anthocyanins and/or betacyanins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

QUEIROZ, L. Realidade imposta pela pandemia pode gerar transtornos mentais e agravar quadros existenciais. **Ministério da Saúde**, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021-1/outubro/realidade-imposta-pela-pandemia-pode-gerar-transtornos-mentais-e-agravar-quadros-existentis>. Acesso em: 24 nov. 2021.

RACHETTI, A. L. F. *et al.* Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 283-289, 2012.

RAPHAËL, B. *et al.* Phytochemical study and antioxidant activities of *Terminalia catappa* L. and *Mitragyna ciliata* Aubrev and Pellegr medicinal plants of Gabon. **Journal of Medicinal Plants**, v. 7, n. 1, p. 33-38, 2019.

RIBEIRO, C. D. F. *et al.* **Alimentação coletiva e microbiologia de alimentos**. Salvador: Sanar, 2017. 290p. (Manuais da Nutrição). Bibliografia: p. 213-217. ISBN 978-85-5462-000-4.

RODRIGUEZ-MATEOS, A. *et al.* Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 10, p. 1803-1853, 2014.

ROJAS-CARVAJAL, M.; BRENES, J. C. Acute stress differentially affects grooming subtypes and ultrasonic vocalisations in the open-field and home-cage test in rats. **Behavioural Processes**, p. 104140, 2020.

SANTOS, C. C. M. P. **Estudo psicofarmacológico comparativo da forma racêmica, (rs)-(±)-linalol, e seus enantiômeros, (S)-(+)-linalol e (R)-(-)-linalol em camundongos**. 2008. 109 f. Tese (Mestrado em Produtos naturais e sintéticos Bioativos: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa

SANTOS, J. T. *et al.* Os efeitos da Suplementação com Vitamina c. Revista conhecimento online. Novo Hamburgo, v.1, n.1, p.139-163, 2019.

SCHIASSI, M. C. E. V. *et al.* Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, p. 305-311, 2018.

SEMWAL, Deepak Kumar *et al.* Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 90, 2016.

SILVA, G. S. **Desenvolvimento e caracterização de iogurte caprino probiótico adicionado do extrato do fruto da castanhola (*Terminalia catappa* Linn): avaliação do potencial antioxidante do extrato sobre o iogurte durante o armazenamento**. 2020. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, 2020.

SILVA, L. P. *et al.* *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-295, 2015.

SILVA, R. C. *et al.* Evaluation of the effectiveness of macaíba palm seed kernel (*Acrocomia intumescens* drude) on anxiolytic activity, memory preservation and oxidative stress in the brain of dyslipidemic rats. **Plos one**, v. 16, n. 3, p. e0246184, 2021.

SILVEIRA, C. C. S. M. **Efeitos neurocomportamentais e no estresse oxidativo em ratos tratados com extrato etanólico de própolis amarela**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

SIMPSON, M. C. G.; SAWATZKY, J. V. Clinical placement anxiety in undergraduate nursing students: A concept analysis. **Nurse Education Today**, v. 87, p. 104329, 2020.

SIRIN, H. *et al.* Assessment of anxiety in elderly population during the COVID-19 pandemic and the impact of compulsory home-stay in the central districts of Ankara, Turkey: A quantitative, qualitative mixed method study. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 36, n. 11, p. 1785-1794, 2021.

SOARES, M. *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 59-64, 2008.

SOBRINHO, A. C. G. *et al.* Determinação de compostos bioativos e capacidade sequestradora de radicais livres em extratos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 34954-34969, 2020.

STRAWN, J. R. *et al.* Efficacy and tolerability of antidepressants in pediatric anxiety disorders: A systematic review and meta-analysis. **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 3, p. 149-157, 2015.

STRAWN, J. R.; LEVINE, A. Treatment Response Biomarkers in Anxiety Disorders: From Neuroimaging to Neuronally-Derived Extracellular Vesicles and Beyond. **Biomarkers in Neuropsychiatry**, p. 100024, 2020.

SUZANA, G. OMS/WHO. Envelhecimento ativo: uma política de saúde/World Health Organization. 2005.

TEIXEIRA, H. L. **Composição química e perfil de ácidos graxos da castanha do fruto da castanhola (*Terminalia catappa* Linn)**. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, 2010.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2010.

TURECK, C. *et al.* Avaliação da ingestão de nutrientes antioxidantes pela população brasileira e sua relação com o estado nutricional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, p. 30-42, 2017.

SHAFIEE, M. *et al.* Depression and anxiety symptoms are associated with prooxidant-antioxidant balance: A population-based study. **Journal of Affective Disorders**, v. 238, p. 491-498, 2018.

SOARES, J. K. *et al.* 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.

SOUZA, A. L. G. *et al.* Aproveitamento nutricional e tecnológico dos frutos da castanhola (*Terminalia catappa* Linn.). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 3, p. 7-7, 2016.

STEIN, M. B.; CRASKE, M. G. Treating anxiety in 2017: optimizing care to improve outcomes. **Jama**, v. 318, n. 3, p. 235-236, 2017.

SURVESWARAN, S. *et al.* Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

TAYLOR, C. T.; PEARLSTEIN, S. L.; STEIN, M. B. A tale of two systems: Testing a positive and negative valence systems framework to understand social disconnection across anxiety and depressive disorders. **Journal of Affective Disorders**, v. 266, p. 207-214, 2020.

- TOMAZ, M. B. **Relação entre a afetividade, depressão e ansiedade com a memória a curto prazo no idoso**. 2012. 40 p. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior Miguel Torga, Coimbra, 2012.
- TULER, A. C.; PEIXOTO, A. L.; SILVA, N. C. B. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) na comunidade rural de São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, 2019.
- VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S.; DA SILVEIRA, S. M. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. In: **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v.4, n.1, 2018.
- VORHEES, C.V.; WILLIAMS, M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature Protocols**, v.1, n.2, p. 848-854, 2006.
- WANI, S. M. *et al.* Influence of processing methods and storage on phenolic compounds and carotenoids of apricots. **LWT**, v. 132, p. 109846, 2020.
- WANNEE, S.; LUCHAI, B. 1-Deoxynojirimycin and polyphenolic composition and antioxidant activity of different native Thai silkworm (*Bombyx mori*) larvae. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 6, p. 2762-2766, 2020.
- YAKUBU, Y. *et al.* Effect of *Terminalia catappa* methanol leaf extract on nonspecific innate immune responses and disease resistance of red hybrid tilapia against *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100555, 2020.
- YONG, H. *et al.* Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 93-104, 2019.
- 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 nessa dissertação estão apresentados em forma de Artigo Científico de acordo com as normas da revista:

Artigo I

Título: EFFECTS OF (*Terminalia catappa* Linn) CASTANHOLA NUT FLOUR ON ANXIETY, MEMORY, AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN ELDERLY RATS

(Submetido ao periódico: The Journal of Nutritional Biochemistry. Fator de impacto: FI 6.048 – Qualis A1).

EFFECTS OF (*Terminalia catappa* Linn) CASTANHOLA NUT FLOUR ON ANXIETY, MEMORY, AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN ELDERLY RATS

ABSTRACT

Terminalia catappa Linn has anthocyanins, rutin, quercetin and gallic acid, these substances present antioxidant activity, which can promote anxiolytic effect. The aim of this study was to analyze the effects of consumption of castanhola flour in rats. The animals were divided into in: Control; 500 mg e 1000 mg of castanhola/kg of animal. In the open field, F500 and F1000 presented greater locomotion; F1000 presented the highest number of head rearings and the least grooming behavior. In the elevated plus maze, F500 and F1000 exhibited a greater number of entries in the open arms; in addition, the F1000 group remained longer in the region, and the F500 presented a greater number of head dips. In the light/dark box, the longer stays in the lighted side of the box were observed for the F500 and F1000. As to rodent memory, in the object recognition test, the F1000 presented the highest exploration index for the new object in short-term memory; in long-term memory, greater exploration times were observed for the F500 and the F1000. In the determination of MDA levels, the F500 and F1000 again presented the lower concentrations. For the fatty acid profile, the highest MUFA content was obtained for the F500 and PUFA for the F1000. Castanhola flour promoted anxiolytic effects and preserved memory, and minimized the lipid peroxidation. Thus, it can be inferred that *castanhola* may act in prevention and/or treatment of anxiety and memory loss.

Keywords: anxiolytic; anthocyanins; aging; neurodevelopment, oxidative stress.

INTRODUCTION

Anxiety can occur at any stage of an individual's life, however, its prevalence as a public health problem in the elderly has been increasing [1, 2, 3]. This deserves attention, since changes that already affect the quality of life also occur in the aging process [4]. Anxiety can lead to the emergence of other conditions, such as cardiac and respiratory dysfunction, depression [5], and memory impairment [6].

Repercussions affecting memory are common in the aging process, and it is also important to seek alternatives to minimize the evolution of anxiety [7, 8, 9]. That anxious individuals consume fewer sources of antioxidants has already demonstrated, and thus, they present an excess of free radicals in the body [8, 9, 10]. A high dietary antioxidant capacity may minimize oxidative and inflammatory processes, such as those involved in anxiety [10].

Antioxidants act on the serotonergic system, and thus present anxiolytic effects [11]. It is important to encourage their consumption, and since supplements are not the best option [12],

natural sources of these compounds should be encouraged and valued, fruits and vegetables capable of providing phytochemicals, fiber, and flavones [10].

In view of the above, plants can be applied to treat many human pathologies, as a source of bioactive compounds [10, 13]. *Terminalia catappa* Linn or “castanhola”, is an unconventional food plant, originating in India, presents: anticancer, antidiabetic, gastroprotective, antifibrotic, and anti-inflammatory properties [14, 15, 16].

Despite its rich composition in phenolics, flavonoids, tannins, saponins and phytosterols [17] *Terminalia catappa* Linn is still little explored [18, 19, 20]. Studies developed by Chandrasekhar *et al.* [18] and Hirshler, Doron [14]; have demonstrated that supplementation with the leaves and bark of the castanhola tree promote neuro-modulatory effect and minimize depression in mice.

The fruit has not yet been associated with behavioral effects in rats, and since it possesses antioxidants in its composition [21], these substances might help alleviate neuronal changes that occur during aging, such as anxiety and memory loss. Our aim was to evaluate the effects of *Terminalia catappa* Linn consumption on anxiety, memory performance, and oxidative stress parameters in aged rats.

MATERIAL AND METHODS

OBTAINING CASTANHOLA FRUIT FLOUR

The fruits of the castanhola tree (*Terminalia catappa* Linn) were obtained in the city of Cuité/PB (Latitude: 6° 28' 54" S, Longitude: 36° 8' 59" W) in the months of February and March of 2021, in their mature stage, with a bright appearance and reddish color. The samples were sanitized (200 ppm chlorinated solution/30 min), and using a stainless steel knife, the pulp was removed, separating it from the pit. The pulps were dried in a forced-air oven (Biopar, Model S480 AD, Porto Alegre - RS, Brazil) at a temperature of 50 ±1°C for 48 hours. The dried pulp was ground in a blender (Philco, model LQ PH900 PR, Brazil), and sieved through a plastic sieve (0.5 mm screen) to obtain a fine flour, which was then weighed and vacuum packed in a sterile polypropylene bag by a vacuum packaging machine (GSVAC, model: GS 420, Santo André - SP, Brazil). The flour remained thus at room temperature until the time of analysis and preparation of the administration solution for the animals.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF CASTANHOLA FLOUR

Physical-chemical analyses were performed on the castanhola fruit flour to evaluate: water activity using an AQUALAB (DECAGON, model AQUALAB 4TE, USA) [22]; pH using a digital pH meter (GEHAKA, model PG1800, São Paulo - SP, Brazil); ash content using incineration in a muffle furnace (JUNG, model 0612, Blumenau - SP, Brazil) stabilized at 550°C; humidity as determined by oven drying (Medclave, model n° 4, Brazil) stabilized at 105°C; lipids according to the methodology of Folch [23], and acidity as determined by titration according to the *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC [24]. The composition of the castanhola flour was as follows: Moisture (%): 14.12 $\pm$ 0.180; Lipids (%): 1.38 $\pm$ 0.293; Ashes (%): 5.92 $\pm$ 0.024; Acidity (%): 2.27 $\pm$ 0.016; pH: 4.20 $\pm$ 0.082; Water activity: 0.519 $\pm$ 0.003.

CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN CASTANHOLA FLOUR

The castanhola flour was subjected to bioactive constituent extraction according to the methodology described by Silva *et al.* [25] with some modifications. Initially, 1 g of castanhola flour was weighed into a Falcon tube and 10 mL of 80% ethyl alcohol was added. Then, the tube with the mixture was vortexed (Logen Scientific, model LSM56-II-VM, Fortaleza/Ceará, Brazil) for 60 seconds and then left to rest in the absence of light at room temperature (23 $\pm$ 1 °C) for 24 hours. Afterwards, the mixture was filtered through 125 mm Whatman filter paper, and the volume was made up to 10 mL with the extraction solvent. The extract was collected in an amber bottle and stored in a freezer at -18 °C until the time of analysis. The extractions and respective analyzes were performed in triplicate.

Determination of total phenolics

For the determination of phenolics, the colorimetric method described by Liu *et al.* [26] was used with some changes: 250 μ L of extract was mixed with 1250 μ L of 10% Folin-Ciocalteu reagent, vortexed (Logen Scientific), and stored at room temperature (23 $\pm$ 1°C) in the absence of light for 6 min. 1000 μ L of 7.5% sodium carbonate solution was then added. The mixture was taken to a water bath (Novatecnica[®]) at 50°C for 5 min. The absorbance was read at 765 nm using a spectrophotometer (BEL Photonics). The total phenolic compound content of the

samples was determined using a standard curve prepared with gallic acid (Sigma). Results were expressed in mg equivalent of gallic acid (EGA) per hundred grams of dry sample (mg EGA/100 g).

Determination of total flavonoids

Determination of total flavonoids was performed according to the colorimetric method proposed by Zhishen; Mengcheng; and Jianming [27]. The total flavonoid content of the flour extract was determined using a standard curve of catechin equivalents (EC) - Sigma. Results were expressed as mg equivalent of catechin (EC) per hundred grams of castanhola flour based on dry weight (mg EC/100 g).

Antioxidant activity - FRAP method

The methodology described by Benzie; Strain [28], adapted by Pulido, Bravo and Saura-Calixto [29] was used. The absorbances were read in a spectrophotometer (BEL Photonics) at 593 nm. To determine the antioxidant activity (FRAP) of the castanhola extract, a calibration curve with Trolox was used and the results expressed in μmol of Trolox /g of sample.

Antioxidant activity: ABTS^{•+} method

The methodology of Surveswaran *et al.* [30] was used with some changes. First, the ABTS radical was formed through the reaction of ABTS^{•+} solution at 7 mM with 140 mM potassium persulfate solution while incubated at 25°C in the dark for 12-16 h. After the formation of the radical, it was diluted in distilled water to obtain an absorbance value of 0.800 (± 0.020) at 734 nm. From the castanhola extract sample, four different dilutions were prepared, in triplicate. In a dark environment, an aliquot of 100 μL of the extracts was transferred to a test tube, and 500 μL of the ABTS radical was added. Subsequently, the test tubes were kept in the absence of light for 6 min and the reading was taken at 734 nm in a spectrophotometer (BEL Photonics). As a reference, Trolox was used and the results expressed in μM trolox /g of sample.

IN VIVO TESTS

Animals and diet

The experimental protocol used complied with the Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals, and was submitted and approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals - CEUA of the Center for Rural Health and Technology - CSTR/UFCG, CEP 108/2017, Protocol nº 53/2020.

Thirty-five older male Wistar rats, aged 1 year and 5 months, with an average weight of 368 g, from the Animal Facility of the Federal University of Pernambuco (UFPE) - Department of Nutrition were used. The animals were placed in collective polyethylene cages at the Experimental Nutrition Laboratory of the Center for Education and Health (CES) at UFCG - Cuité campus, maintaining a uniform weight standard for each group, and with monitored temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), humidity $65 \pm 5\%$, air, and 12-hour light/dark cycle, the light phase being from 6:00 am to 6:00 pm, and feed (Presence[®], Paulínia, São Paulo, Brazil) and water *ad libitum*.

The animals were divided into 3 groups (all receiving water and feed *ad libitum*): the Control Group (CG) received distilled water (without castanhola flour); Flour 500 (F500) – received by gavage 500 mg of a castanhola/kg of weight animal and Flour 1000 (F1000) – received 1000 mg of a castanhola/kg of weight animal. This treatment was carried out to allow the comparison between the consumption of different doses of castanhola flour, which represents the addition of a source of antioxidants, in relation to the control group. The five-week treatment duration was based on the study by Soares *et al.* [31] who observed a reduction in oxidative stress in rats administered açai seed extract. The dosage was defined from studies also administering source matrices of phenolic compounds: Pereira [32] that supplemented 500 mg/kg of açai pulp in male rats and obtained anxiolytic effects when associated with exercise; and El Morsy, Ahmed, and Ahmed [33], who administered 1000 mg of açai extract and observed a reduction in malondialdehyde levels and an anti-inflammatory effect in rats. The calculation for administration of the solution was performed daily according to the animal's weight, obeying 3 mL /kg of animal weight (F1000) and 1.5 mL/kg of weight (F500).

Behavioral Tests

After five weeks of administration of diet, anxiety and memory behaviors were evaluated. First, the open field test (OF) was performed, this aims to verify ambulation parameters, rearing behavior, grooming, and defecation time [34]; then the Elevated Cross Maze test (ECM) [35] and Light Dark Box test (LDB) [36] were applied.

To assess memory, the Open Field Habituation test was used [37]; to test short and long-term memory the Object Recognition test was used [38], and to assess the spatial memory of the rodents, the Morris Water Maze test was used.

Euthanasia

After completion of all behavioral tests, the animals were fasted for 8 hours and subsequently euthanized by decapitation for brain removal. For analysis of brain malondialdehyde (MDA) content, the organ was manually divided into a strip, using a scalpel blade. The right hemisphere of the brain was used in a longitudinal section in the anteroposterior direction. After this procedure, the tissue was weighed and placed on a surface with ice and then kept at -18 °C until analysis.

Oxidative Stress - Malondialdehyde (MDA)

To assess oxidative stress, malondialdehyde levels were measured in the brains of the aged rats. The MDA content was performed by the method described by Esterbauer and Cheeseman [39] and the results expressed in nmol /g tissue.

Determination of the Fatty Acids Profile in the Brain

The lipid extract was obtained using the Folch *et al.* [23] method, and from this extract, methyl esters were acquired through esterification according to the methodology of Hartman and Lago [40]. Identification and quantification of methyl esters was then performed in a Ciola & Gregori Ltda gas chromatograph (CG-Master model) with a flame ionization detector, and characterization of the fatty acids was performed by comparing the spectra obtained with standards that were also injected into the GC-MS.

STATISTICAL ANALYSIS

Results were expressed as mean $\pm$ SEM (standard error of the mean) analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. Significance level for rejection of the null hypothesis of $p < 0.05$ was considered.

RESULTS

CASTANHOLA FLOUR: PHENOLIC COMPOUNDS, FLAVONOIDS AND TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY

The results for determination of phenolic compounds, flavonoids, and total antioxidant activity of castanhola flour can be seen in Table 1.

Table 1 – Total phenolics content, total flavonoids, and antioxidant activity of castanhola flour

Parameter	Castanhola Flour
Total phenolics (mg EGA/100 g)	106.60 $\pm$ 0.01
Total Flavonoids (mg EC/100 g)	4.60 $\pm$ 0.03
ABTS (μ mol TEAC/g)	13.06 $\pm$ 0.01
FRAP (μ mol TEAC/g)	2.07 $\pm$ 0.02

Values are expressed as mean and standard deviation. EGA: equivalent of gallic acid; CE: Catechin equivalent; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

BEHAVIORAL TESTS: ANXIETY

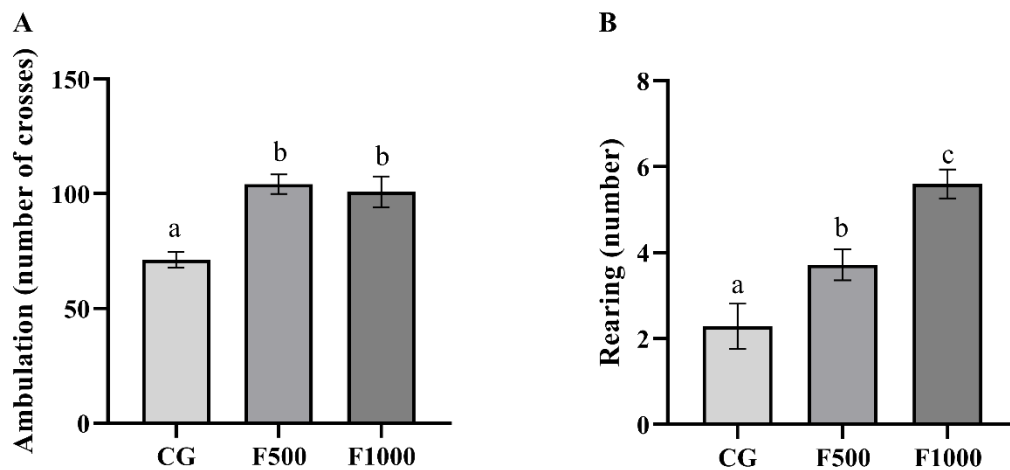
Open field

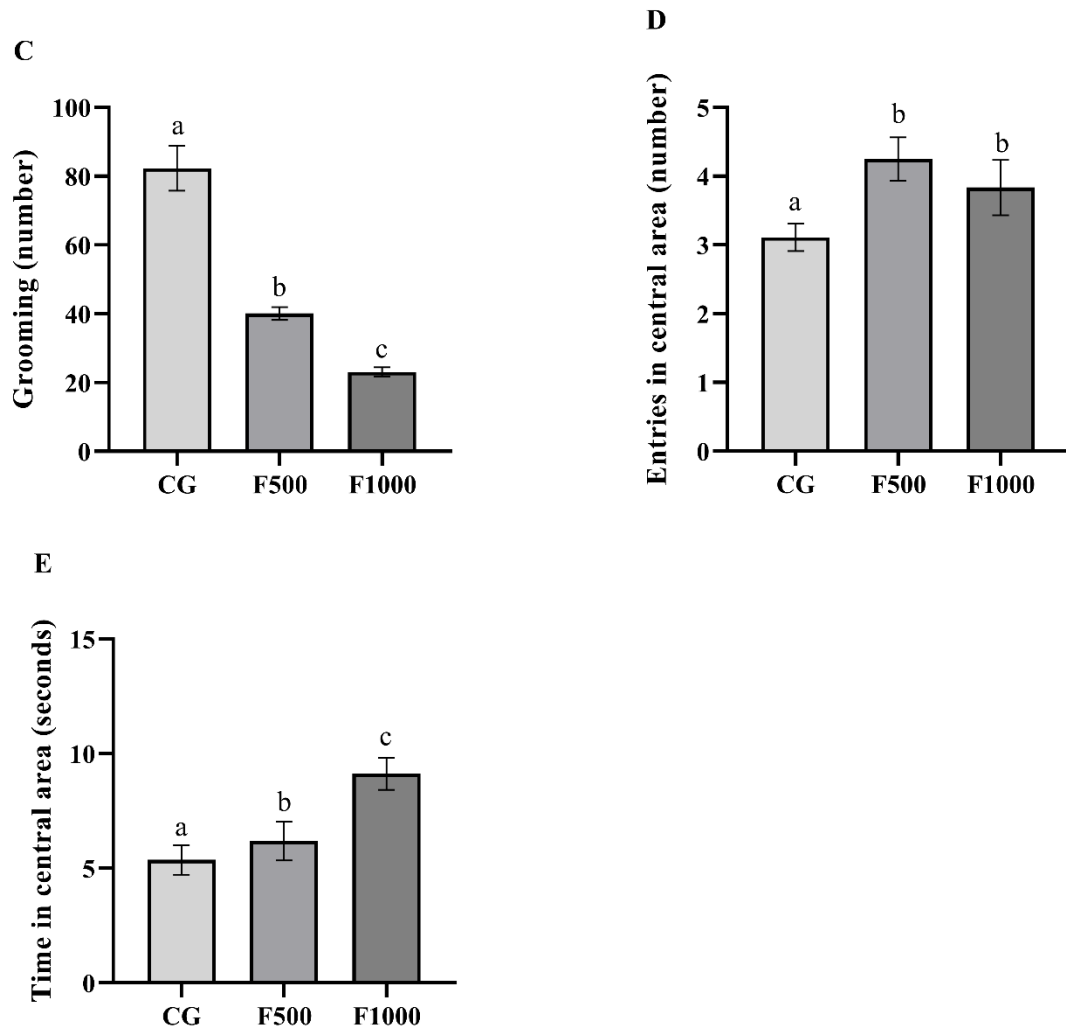
Locomotion (Figure 1A), represented by the number of crossings in the Open Field was higher for the F500 (104.2) and the F1000 (100.85) groups as compared to the Control - CG (71.29) ($p < 0.05$). For the number of head rearings (Figure 1B) the highest record was for the F1000 group (5.6) which differed ($p < 0.05$) from the F500 (3.71) and CG (2.29) groups. For the

grooming parameter (Figure 1C), the F1000 group presented the lowest record (23.12) differing ($p < 0.05$) from the F500 (40.10) and the CG (82.32) group.

As to the number of entries in the central area (Figure 1D), the groups supplemented with pulp presented the highest numbers: F500 (4.25) and F1000 (3.83); differing ($p < 0.05$) from the CG (3.11). The time spent in the center area (Figure 1E) was longer for the F1000 group (9.12) which differed ($p < 0.05$) from the F500 (6.19) and CG (5.37) groups.

Figure 1 – Effect of *Terminalia catappa* Linn flour on aged rats in the CA test: ambulation (A), rearing (B), self-cleaning (C), number of entries in the central area (D), time spent in the central area (E)





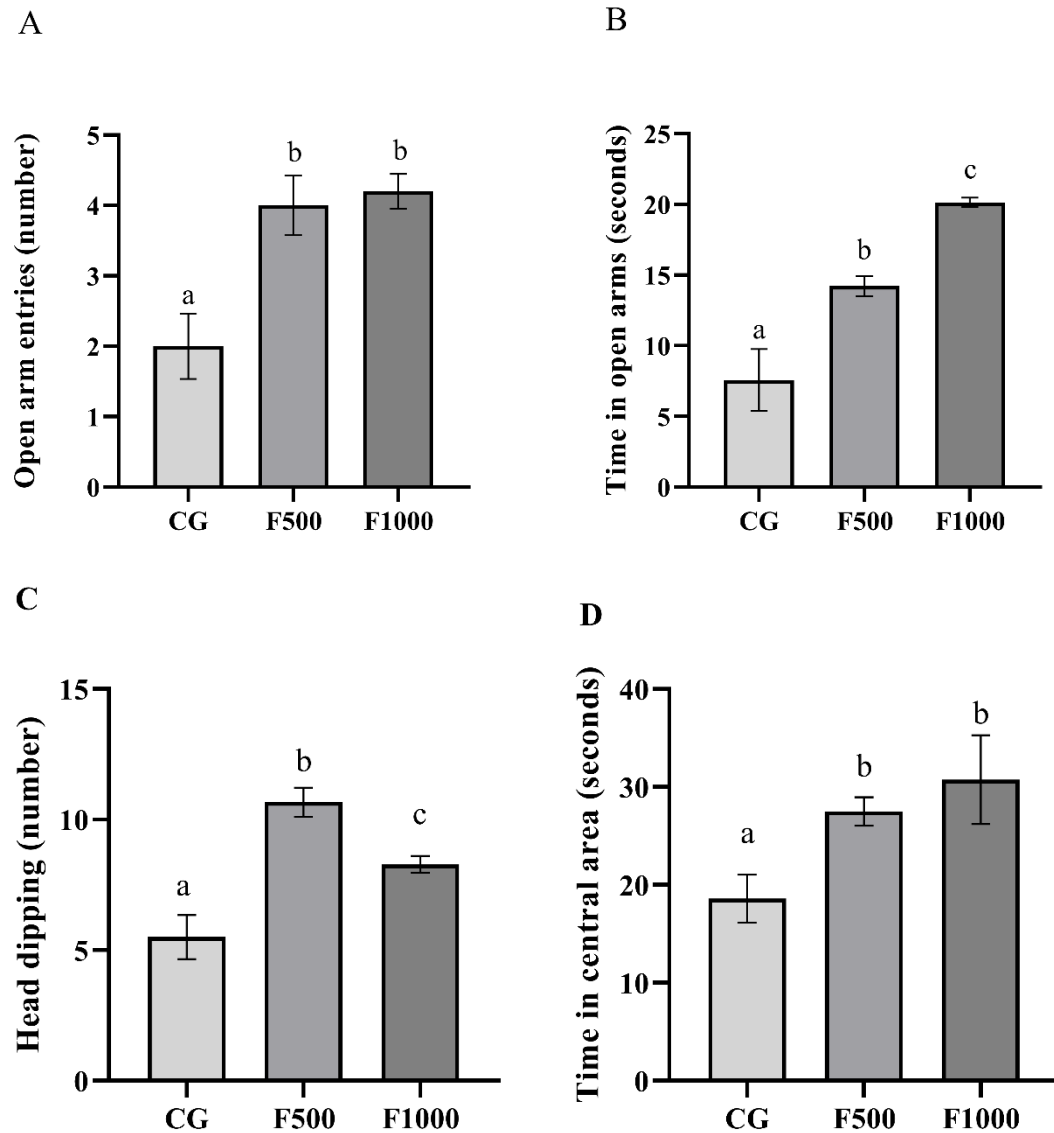
Values expressed as mean $\pm$ SEM (one way ANOVA) followed by Tukey's test, different letters mean significant difference $p < 0.05$. CG = Control group; F500 = group treated with 500 mg of flour; F1000 = group treated with 1000 mg of flour.

Elevated cross maze

The number of entries in the open arms (Figure 2A) was higher for the animals that received the pulp: the F500 group (4) and the F1000 group (4.2) which presented differences ($p < 0.05$) as compared to the CG (2). For time spent in the open arms (Figure 2B), the highest record was for the F1000 group (20.13) which differed ($p < 0.05$) from the F500 (14.22) and the CG (7.58) group.

The number of head dips (Figure 2C) was also analyzed, which was higher for the F500 group (10.67), and differed from the others: F1000 (8.29) and CG (5.5). For the time spent in the central area (Figure 2D), the longest stays were recorded for the F500 group (27.50) and the F1000 group (30.75) $p < 0.05$ as compared to the CG (18.6).

Figure 2 – Effect of *Terminalia catappa* Linn flour on elevated cross maze: number of entries in the open arms (A), time spent in the open arms (B), number of head dipping (C), time spent in the central area (D)

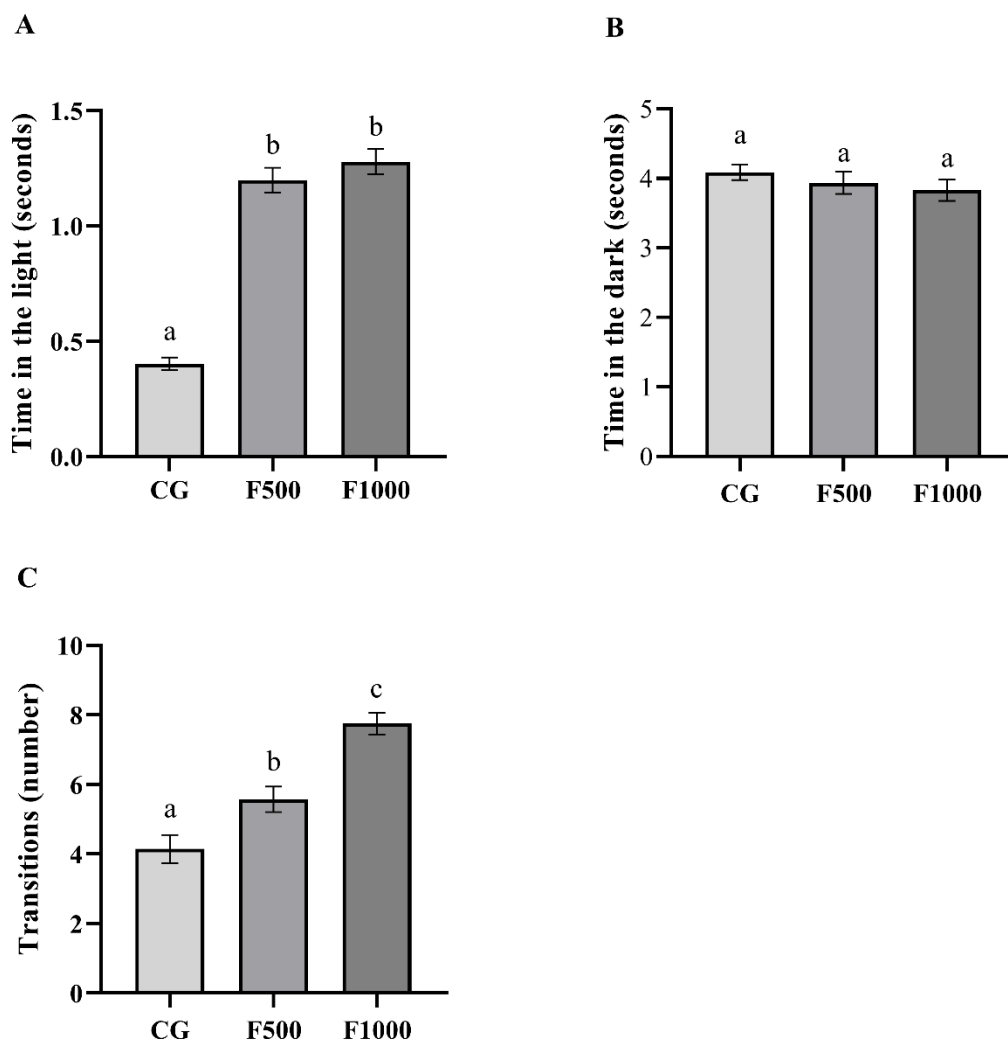


Values expressed as mean $\pm$ SEM (one way ANOVA) followed by Tukey's test, different letters mean significant difference $p < 0.05$; CG = Control group; F500 = group treated with 500 mg of flour; F1000= group treated with 1000 mg of flour.

Light-Dark Box

For the time spent on the lighted side of the box (Figure 3A), the longest permanence was noted for the F500 group (1.20) and the F1000 group (1.28) which differed ($p < 0.05$) from the CG (0.40). For the time on the dark side (Figure 3B) there was no disparity ($p > 0.05$) between any of the groups: CG (4.89); F500 (3.94); F1000 (3.83). As for the number of transitions (Figure 3C), the F1000 group presented the highest record (7.75) differing ($p < 0.05$) from the F500 group (5.57) and the CG (4.14).

Figure 3 – Effect of *Terminalia catappa* Linn flour on aged rats in light-dark box: time in the light area of the box (A), time in the dark area of the box (B), number of transitions (C)



Values expressed as mean $\pm$ SEM (one way ANOVA) followed by Tukey's test, different letters mean significant difference $p < 0.05$; CG = Control group; F500 = group treated with 500 mg of flour; F1000 = group treated with 1000 mg of flour.

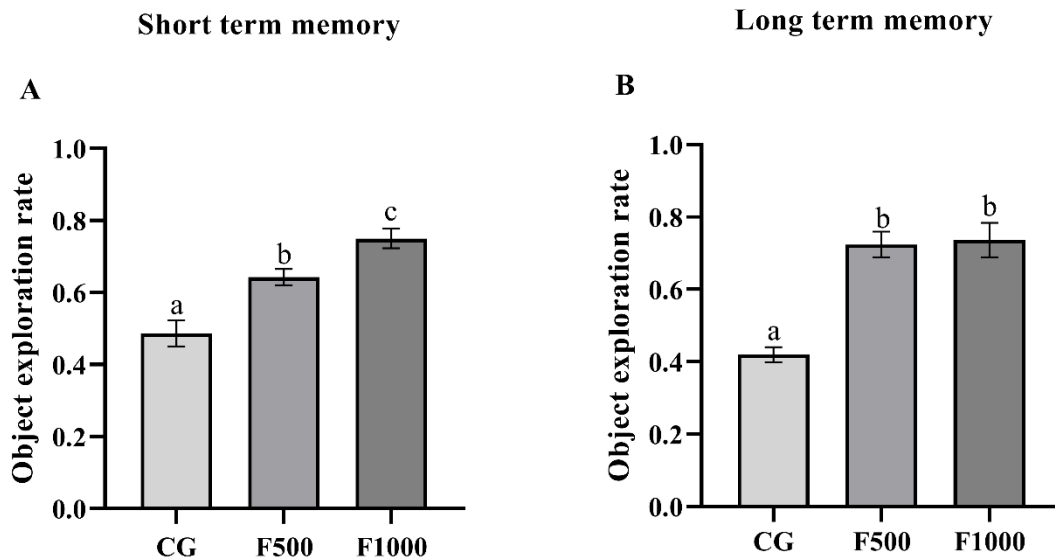
BEHAVIORAL TESTS: MEMORY

Open field

The object recognition test was applied to assess short-term (Figure 4A) and long-term (Figure 4B) memory. For the short-term memory results, it was observed that the F1000 group presented the highest exploration index (0.75) and differed ($p < 0.05$) from the F500 group (0.64) and the CG (0.48).

For long-term memory (Figure 4B) the flour groups presented the highest rates: the F500 group (0.72) and the F1000 group (0.74), with a difference ($p < 0.05$) as compared to the CG (0.42).

Figure 4 – Effect of *Terminalia catappa* Linn flour on aged rats in CA: rate of exploration of the new and familiar object in short-term (A) and long-term (B) memory

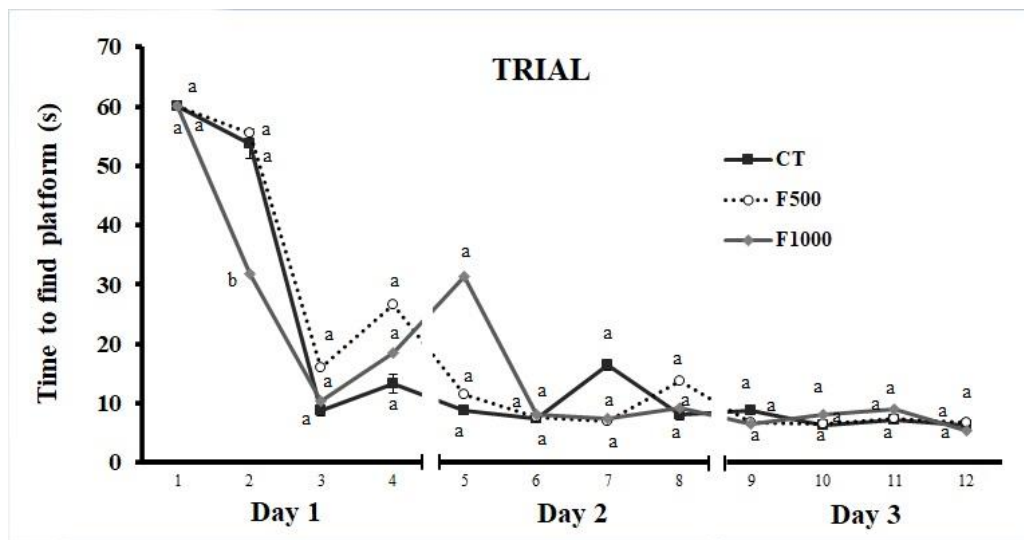


Values expressed as mean $\pm$ SEM (one way ANOVA) followed by Tukey's test, different letters mean significant difference $p < 0.05$; CG = Control group; F500 = group treated with 500 mg of flour; F1000 = group treated with 1000 mg of flour.

Water maze

During the 3 days of training, in all repetitions, no changes were observed in the time of arrival of the animal to the platform. With the exception of the 2nd trial on the 1st day, the F1000 took the shortest time to find the platform, differing ($p < 0.05$) from the CG and F500 (Figure 5).

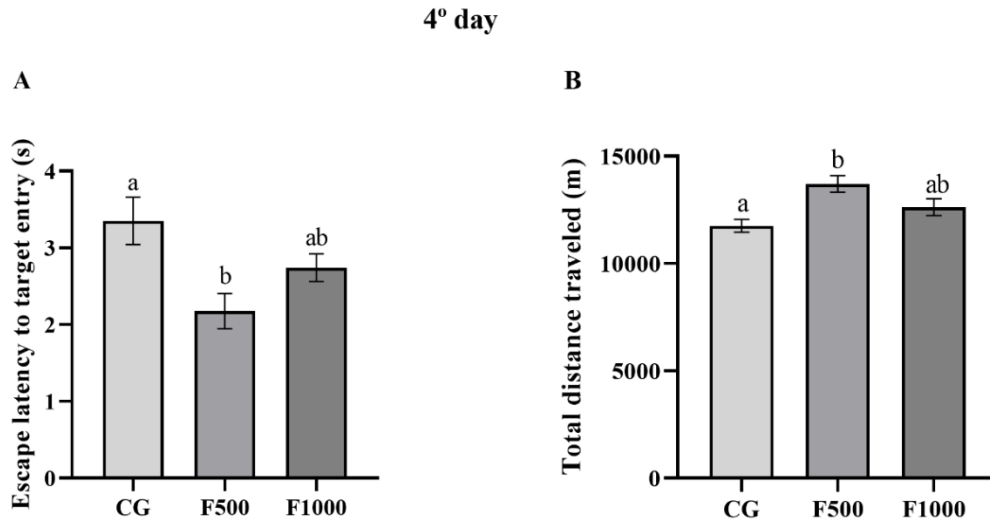
Figure 5 – Effect of *Terminalia catappa* Linn flour on aged rats in WM: Time to find platform (s)



Values expressed as mean $\pm$ SEM (one way ANOVA) followed by Tukey's test, different letters mean significant difference $p < 0.05$. CG = Control group; F500 = group treated with 500 mg of flour; F1000 = group treated with 1000 mg of flour.

On the 4th day of the test, the F500 animals showed the shortest time to locate the region referring to the platform (Figure 6), differing ($p < 0.05$) from the CG. The F1000, in turn, did not differ ($p > 0.05$) from the CG or the F500. Regarding the distance covered during the test, the F500 animals showed the highest indicator differing ($p < 0.05$) from the CG. The F500 and F1000 did not differ from each other ($p > 0.05$).

Figure 6 – Effect of *Terminalia catappa* Linn flour on aged rats in WM: Escape latency to target entry (s), total distance traveled (m)

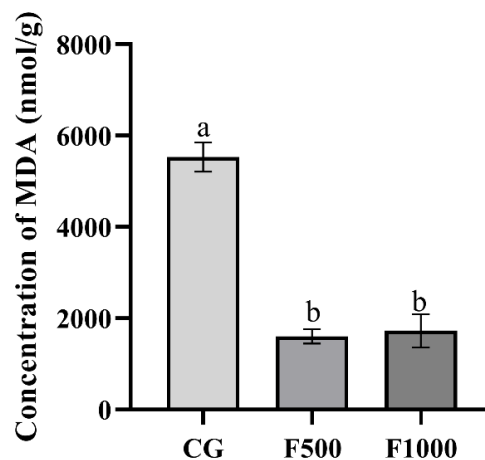


Values expressed as mean $\pm$ SEM (one way ANOVA) followed by Tukey's test, different letters mean significant difference $p < 0.05$. CG = Control group; F500 = group treated with 500 mg of flour; F1000= group treated with 1000 mg of flour.

OXIDATIVE STRESS ANALYSIS: MALONDIALDEHYDE (MDA)

As shown in Figure 7, it can be seen that the F500 group and the F1000 group presented the lowest concentrations of MDA: F500 (80.08) and F1000 (86.33) respectively, differing ($p < 0.05$) from the CG (276.44).

Figure 7– MDA levels in the brain of aged rats treated with *Terminalia catappa* Linn



Values expressed as mean $\pm$ SEM (one way ANOVA) followed by Tukey's test, different letters mean significant difference $p < 0.05$. CG = Control group; F500 = group treated with 500 mg of flour; F1000= group treated with 1000 mg of flour.

FATTY ACIDS PROFILE IN THE BRAIN

The levels of saturated fatty acids identified were higher for the F500 and F1000 groups than the CG ($p < 0.05$). The F500 and F1000 showed the highest concentrations of palmitic and stearic. For the total saturated fat content, increases of 155.71% (F500) and 92.96% (F1000) were found in relation to CG (Table 2).

Also, F500 and F1000 showed an increase in oleic and erucic fat compared to CG. As for palmitoleic acid levels, F500 exhibited a lower concentration compared to CG, F1000 was not detected. For the total monounsaturated fat content, increases of 154.23% (F500) and 83.71% (F1000) were recorded in relation to CG.

Polyunsaturated (linoleic, arachidonic and docosatetraenoic acids) were higher in F1000 brains than in CG. However, F500 showed lower levels of linoleic and arachidonic when compared to CG. For the total polyunsaturated fat content, increases of 3.29% (F500) and 30.43% (F1000) were observed when compared to CG.

Table 2 – Composition of fatty acids present in the elderly brain treated with Terminalia catappa Linn flour

Fatty acids (%)	Groups		
	CG	F500	F1000
SATURATED			
Myristic acid C14:0	-	-	-
Palmitic acid C16:0	8,67	22,17	16,66
Stearic acid C18:0	8,87	23,25	16,94
Behenic acid C22:0	-	-	-
Lignoceric acid C24:0	-	-	-
Others	0,93	1,81	1,99
Total Saturated	18,47	47,23	35,59
MONOUNSATURATED			
Palmitoleic acid C16:1 ω 7c	0,24	0,11	-
Vaccenic acid C18:1 ω 7c	-	-	-
Oleic acid C18:1 ω 9	9,47	24,09	17,20
Gondoic acid C20:1 ω 9	-	-	-
Erucic acid C22:1 ω 9	1,65	4,68	3,67
Others			
Total Monounsaturated	11,36	28,88	20,87
POLYUNSATURATED			

Linoleic acid C18:2 ω 6c	0,78	0,74	1,73
Eicosadienoic acid C20:2 ω 6	-	-	-
Dihomo- γ -linolenic acid C20:3 ω 6	-	-	-
Arachidonic acid C20:4 ω 6c	3,90	3,74	5,13
Docosatetraenoic acid C22:4 ω 6	0,96	1,57	1,67
Docosaheptaenoic acid C22:6 ω 3	4,71	4,64	4,97
Total Polyunsaturated	10,35	10,69	13,50

Values not expressed: LOD (below the limit of detection). Values expressed in percentage.

DISCUSSION

Terminalia catappa Linn, popularly known as castanhola, is a source of phytochemicals, flavonoids, and tannins that give the matrix antioxidant, gastroprotective, and hypoglycemic potential [16]. The pigmentation of its fruit results from the presence of anthocyanins [41], also found in açaí and currants that have demonstrated beneficial effects on rodent behavior [42, 43]. Castanhola bark extract has already demonstrated anti-inflammatory [44] and immunomodulatory effects in rats [45]. Despite this, the fruit has not yet been evaluated for its possible effects on rodent behavioral parameters. Our research sought for the first time, to analyze anxiety, memory, and lipid peroxidation indicators in the brain of elderly rats administered with castanhola pulp flour.

Before the *in vivo* tests, analysis of the physicochemical composition and evaluation of the antioxidant activity of the flour were performed. The flour presented lower values of moisture, pH, and lipids, than those found in fresh pulp [20]. In our research the composition of bioactives obtained was: 106.6 ± 0.01 mg EGA/100 g of total phenolics; and 4.6 ± 0.03 mg EC/100 g, values lower than those obtained by Dos Santos *et al.* [46] to the pulp: respectively 142.33 ± 15.5 mg GAE/g and 43.52 ± 0.37 mg/100g, for phenolics and flavonoids. Differences in fruit compositions may occur due to soil conditions, climate, and ascorbic acid content [47] and drying process. The castanhola flour compounds exhibited antioxidant activity in the FRAP ($2,07 \pm 0,02$) and ABTS ($13,06 \pm 0,01$) assays. Marques *et al.* [20] analyzed castanhola for free radical scavenging capacity through the DPPH assay, and found a record for antioxidant activity in the ripe fruit.

After proving the antioxidant activity of castanhola in our research, we began administration the rats with the flour. For anxiety-like behavior, there are several methodologies already used in rodent research [43]. We used the open field test, elevated plus maze, and the light-dark box. Our data indicated that both doses (500 and 1000 mg) present anxiolytic-like

effect in rats (in all tests). Initially, we used the open field to analyze the exploratory behavior of the rodents [44], assessing both ambulation and rearing. Ambulation analyzes the immobility of the animal as associated with anxiety. The greater the anxiety, the less exploration of the apparatus central region. The same happens in rearing, the lower the number of head rearings, the greater the anxiogenic-like behavior [45, 46].

In our research the F500 and F1000 groups moved around more and performed more rearing, indicating anxiolytic-like behavior. Similar activity was verified by Shan *et al.* [47] in which mice submitted to an aging process and treated with purple sweet potatoes, also a source of anthocyanins, such as the castanhola [41] The treated animals showed an increase in the concentration of synaptic proteins, a decrease in oxidative stress and a delay in lipid peroxidation. Such results were associated with the antioxidant activity of anthocyanins that could minimize the oxidative damage that occurred due to the reduction of free radicals, down-regulation of the expression of COX-2, of the iNOS protein and inhibition of the nuclear translocation of NF-[kappa] B. Therefore, these data show the importance of anthocyanins for the brain, especially in aging [47].

Still in the open field, the grooming parameter was evaluated, which associated with aversive situations; therefore, anxious animals have higher rates of this behavior [48, 49]. Here, the animals treated with castanhola flour performed less grooming, thus, the reduction of this parameter was associated with greater exploration of new environments, this was also found in our study, and is interpreted as a reduction in anxiety [46]. In a study by Pereira [50], 120-day-old male rats were supplemented with 500 mg of açaí and presented no grooming changes. This is likely associated with the treatment period, which was only 7 days, our research used an administration period of 5 weeks.

Exploration of the open and closed arms, the central area, and the number of head dips are observed in the elevated plus maze. These measures are used to assess anxiety, and since rats are nocturnal creatures, they have a natural tendency to stay in the closed arms, which would be the most protected environment. On the other hand, greater exploration of the open arms, the central area, and a greater number of head dips (the animal places its head below the apparatus in the open arms and explores the environment), are indicative of anxiolytic-like behavior [50, 51, 52]. These behaviors were observed; the rats treated with *Terminalia flour catappa* Linn explored the open arms and central area more, and exhibited more head dips. In a study developed by Signor *et al.* [54] anxiolytic effect was also observed in the elevated plus maze, the reduction of anxiety was associated with the supplementation of 200 mg/kg of anthocyanins in aged rats, administered over a period of 7 days. Girish *et al.* [55] also obtained

reduced anxiety in the EPM, the mice were treated with ellagic acid, a flavonoid that seems to act as an agonist at the benzodiazepine site. Ellagic acid is also present in castanhola [56] and this mechanism of action might justify the findings of our research as well.

Anxiety analysis can also be performed using the light/dark box, where a shorter stay in the lighted compartment indicates anxiety [57]. This behavior is based on two factors: the rat is interested in exploring new environments and is naturally afraid of bright illuminated areas [58]. Thus, according to our findings, the greater number of transitions and exploration of the lighted side of the box by the F500 and F1000 groups demonstrated anxiolytic effects. These results are possibly associated with the antioxidant potential of castanhola flour identified in this research, with its ability to reduce iron, and capture the ABTS free radical. The myricetin identified in the extract of the castanhola fruit [21] has already been able to eliminate several radicals and ions, act against proteins related to aging (tau) and inflammatory process (inhibiting NF-kB), attenuate anxiety in several models behavior in mice [59], restore BDNF levels and promote antioxidant action in the rat hippocampus [60].

Flavonoids also act on the Central Nervous System by binding to GABAergic and serotonergic receptors, this has already been demonstrated in rats [61]. The interaction causes an anxiolytic response and muscle relaxation, but without side effects as can occur with the use of anxiolytic drugs [55, 62, 63]. Among the bioactives with this ability to interact with receptors are quercetin and rutin [61] which are present in castanhola fruit [21] and possibly explain the anxiolytic effect obtained with the flour treatments used in our research.

The influence of castanhola flour on rodent memory was also evaluated. As already reported in the literature, fruits rich in anthocyanins such as açai, black currant and blueberry can help prevent neurodegenerative processes [43]. The role of these flavonoids has already been identified in Alzheimer's and Parkinson's disease, multiple sclerosis, and cerebral ischemia. They also protect the neural membrane from toxic compounds [64].

These effects are related to the fact that anthocyanins act by reducing oxidative stress and neuroinflammation. Anthocyanins activate brain-derived neurotrophic factor signaling [64], and stimulate revascularization and vasodilation [65, 66]. As demonstrated by Malin *et al.* [42], memory loss was prevented in elderly rats that received a blueberry-rich diet, this stresses the importance of further neurological study with different sources of antioxidants. In addition, another compound present in castanhola, ellagic acid [56], has already been able to improve memory deficits in mice with Alzheimer's disease [67], emphasizing again, the importance of the composition of the castanhola for the findings of our research.

In the current research, to analyze memory, open field and *water maze* tests were used. These are the most used tests to measure cognitive impairment in rodents [68]. The first test consists of recognition of new objects, and is widely applied in studies related to memory, since the rat tends to explore the new object at the expense of the familiar object. Its use is important when looking to analyze the potential effects of supplements, as well as discovering the brain areas involved in the process [69, 70].

In the Open Field device, both short-term and long-term memory can be evaluated [68]. The groups receiving *castanhola* flour exhibited greater "new object exploration", indicating that the animals had already remembered or considered the familiar object. A similar result was obtained by Carvalho [71], in which 12-week-old rats were supplemented for 7 days with anthocyanins from grape skin. The flavonoids promoted a reduction in memory loss, neutralization of reactive species, protection of the neural membrane, and a decrease in pro-inflammatory mediators. In a study by Gutierrez *et al.* [66] 3-month-old adult male rats were supplemented with 200 mg/kg/d of anthocyanins. The treatment was shown to minimize memory impairment by acting to help regulate enzymes in the cerebral cortex and hippocampus. Significantly, it also prevented ATP breakdown, which in neurodegenerative diseases is a common occurrence [72]. The data reinforce the importance of phenolics for memory in aged rats [42].

The memory was also evaluated in the Morris water maze, the animals that received the administration of 500 mg of *castanhola* flour covered the greatest distance in the maze, which is considered a deficit for learning the task. However, they presented the lowest latency for locating the platform, indicating memory preservation [73], so the parameters evaluated are not conclusive, and further studies could be carried out to assess spatial memory. In the study by Shukitt *et al.* [74], blueberry extract administered to animals was associated with reduced latency in rats induced to cognitive impairment. In another study [75] lyophilized açai powder was able to decrease markers of reactive oxygen species (ROS), in addition, it promoted an increase in the expression of Nrf2 (nuclear factor derived from erythroid 2) and the activity of cyclooxygenase (COX). Therefore, polyphenols are able to reduce oxidative stress and the inflammatory process and increase antioxidant enzymes [75].

Levels of malondialdehyde (MDA), which is the main marker of lipid peroxidation in aged tissue, were also evaluated [76]. A high concentration of MDA denotes damage to brain tissue [77]. In our study, a reduction in MDA levels was observed in the F500 and F1000 groups, which is indicative of brain protection against free radicals. Similarly, in other research, anthocyanins from purple sweet potatoes were associated with decreased malondialdehyde and

increased antioxidant enzyme activity in mice. Such effects were associated with the ability of the compound to act by modulating inflammatory mediators, COX-2, and iNOS, and also inhibiting the NF [kappa] signaling pathway [47].

Fatty acid levels were also measured, and the F500 and F1000 groups presented the highest concentrations of saturated fat in the brain. It has already been reported that this type of fat can negatively impact behavior in mice [78]. However, such effects were not found in our research, probably because these groups also exhibited higher levels of unsaturated, which are capable of reducing the lipotoxicity induced by saturated [79]. According to Frausto-González *et al.* [80], fatty acids such as palmitoleic, palmitic, linoleic, oleic, and stearic are responsible for promoting anxiolytic effects and preventing body weight gain in mice. Rats fed chow containing w-3 and w-6 PUFAs presented benefits to memory due to the activity of these polyunsaturates in cannabinoid (CB₁) receptor regulation [81].

In previous studies [82, 83] the increase in fatty acids in the brain was associated with the lipid content of the substance or matrix administered, however, castanhola flour did not present a significant lipid content (1.38 ± 0.293). But, according to Broiniz *et al.* (2008) and Abreu (2009) matrices with antioxidant potential are also able to reduce the lipid peroxidation of fatty acids in rat brain tissue, these compounds are able to protect membranes from oxidative damage [84, 85]. As castanhola flour showed antioxidant potential, this mechanism of action could elucidate our findings.

In view of the above, our work presents several contributions, since it found that the fruit of a little used plant exhibited beneficial effects on behavior, memory, and lipid peroxidation in rats in the elderly phase of life. Further, it may stimulate the development of new research to evaluate the possible effects of castanhola compounds on anxiety in humans, as well as its intervention in memory impairment in the elderly.

CONCLUSION

The data from this research demonstrated the importance of *Terminalia catappa* Linn, a matrix little applied in the food sector. The flour obtained from the pulp of the *castanhola*, in the two dosages used, promoted anxiolytic effect in all tests performed, preserved short and long-term memory, and attenuated lipid peroxidation in the brain of aged rats, these effects are associated with the antioxidant bioactive compounds of castanhola. Regarding spatial memory, further studies should be carried out. Thus, the present work contributed with a behavioral analysis that encompassed anxiety and different types of memory. With this, it is expected to

encourage the development of new research that evaluate the mechanisms of action involved in the Central Nervous System, as well as the application of the fruit in the food and/or pharmaceutical industry.

FUNDING

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

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the contributing authors of the study.

REFERENCES

- [1] Strawn, J. R.; Levine, A. Treatment Response Biomarkers in Anxiety Disorders: From Neuroimaging to Neuronally-Derived Extracellular Vesicles and Beyond. **Biomarkers in Neuropsychiatry**, p. 100024, 2020.
- [2] Strawn, J. R. *et al.* Efficacy and tolerability of antidepressants in pediatric anxiety disorders: A systematic review and meta-analysis. **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 3, p. 149-157, 2015.
- [3] Sirin, H. *et al.* Assessment of anxiety in elderly population during the COVID-19 pandemic and the impact of compulsory home-stay in the central districts of Ankara, Turkey: A quantitative, qualitative mixed method study. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 36, n. 11, p. 1785-1794, 2021.
- [4] Antunes, H. K. M. *et al.* Depression, anxiety and quality of life scores in seniors after an endurance exercise program. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 27, p. 266-271, 2005.
- [5] Machado, M.; Quevedo, J. Prevalência de transtornos ansiosos e algumas comorbidades em idosos: um estudo de base populacional. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 65, p. 28-35, 2016.
- [6] Fernandes, M. A. *et al.* Transtornos de ansiedade: vivências de usuários de um ambulatório especializado em saúde mental. **Journal of Nursing UFPE**, p. 3836-3844, 2017.
- [7] Tomaz, M. B. **Relação entre a afetividade, depressão e ansiedade com a memória a curto prazo no idoso**. 2012. 40 p. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior Miguel Torga, Coimbra, 2012.
- [8] Hoge, E. A. *et al.* Treatment for anxiety: Mindfulness meditation versus escitalopram (TAME): Design of a randomized, controlled non-inferiority trial. **Contemporary Clinical Trials**, v. 91, p. 105965, 2020.

- [9] Shafiee, M. *et al.* Depression and anxiety symptoms are associated with prooxidant-antioxidant balance: A population-based study. **Journal of affective disorders**, v. 238, p. 491-498, 2018.
- [10] Daneshzad, E. *et al.* Dietary total antioxidant capacity and its association with sleep, stress, anxiety, and depression score: A cross-sectional study among diabetic women. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 37, p. 187-194, 2020.
- [11] Gonçalves, N. G. G. *et al.* Protein fraction from *Artocarpus altilis* pulp exhibits antioxidant properties and reverses anxiety behavior in adult zebrafish via the serotonergic system. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 103772, 2020.
- [12] Ferrera, T. S. *et al.* Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em ervaíras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.
- [13] Enriquez O. D. *et al.* Aqueous two-phase extraction of phenolic compounds from *Sedum dendroideum* with antioxidant activity and anti-proliferative properties against breast cancer cells. **Separation and Purification Technology**, v. 251, p. 117341, 2020.
- [14] Hirshler, Y.; Doron, R. Neuroplasticity-related mechanisms underlying the antidepressant-like effects of traditional herbal medicines. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 10, p. 945-958, 2017.
- [15] Li, Y. *et al.* Protective effect and mechanism of action of mulberry marc anthocyanins on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 595-601, 2016.
- [16] Ohara, R. **Avaliação do efeito cicatrizante da infusão das folhas de *Terminalia catappa* L. na lesão gástrica promovida pelo processo de isquemia e reperfusão em ratos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.
- [17] Yakubu, Y. *et al.* Effect of *Terminalia catappa* methanol leaf extract on nonspecific innate immune responses and disease resistance of red hybrid tilapia against *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100555, 2020.
- [18] Chandrasekhar, Y. *et al.* Antidepressant like effects of hydrolysable tannins of *Terminalia catappa* leaf extract via modulation of hippocampal plasticity and regulation of monoamine neurotransmitters subjected to chronic mild stress (CMS). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 414-425, 2017.
- [19] Katiki, L. M. *et al.* *Terminalia catappa*: chemical composition, in vitro and in vivo effects on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 118-123, 2017.
- [20] Marques, M. R. *et al.* An in vitro analysis of the total phenolic content, antioxidant power, physical, physicochemical, and chemical composition of *Terminalia Catappa* Linn fruits. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 209-213, 2012.

- [21] Silva, G. S. **Desenvolvimento e caracterização de iogurte caprino probiótico adicionado do extrato do fruto da castanhola (*Terminalia catappa* Linn):** avaliação do potencial antioxidante do extrato sobre o iogurte durante o armazenamento. 2020. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, 2020.
- [22] Aqualab. Analisador de atividade de água para avaliar biodegradação (alimentos e fármacos): Modelo CX-2. **Decagon Devices**, Inc. 950 NE Nelson Court Pullman, WA 99163 USA, 2001.
- [23] Folch, J.; Less, M.; Sloane-Stanley, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- [24] Association of Official Analytical Chemists - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 21th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International, 2019. 3000 p.
- [25] Silva, R. C. *et al.* Evaluation of the effectiveness of macaíba palm seed kernel (*Acrocomia intumescens* drude) on anxiolytic activity, memory preservation and oxidative stress in the brain of dyslipidemic rats. **Plos One**, v. 16, n. 3, p. 0246184, 2021.
- [26] Liu, M. *et al.* Antioxidant and anteproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, 2926–2930, 2002.
- [27] 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.
- [28] Benzie, I. F. 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**, v, 299, p.15-27, 1999.
- [29] 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.
- [30] Surveswaran, S. *et al.* Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.
- [31] Soares, R. *et al.* Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract improves aerobic exercise performance in rats. **Food Research International**, v. 136, p. 109549, 2020.
- [32] Pereira, E. da S. **Efeito do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [33] El Morsy, E. M.; Ahmed, M. A. E; Ahmed, A. A. E. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açaí extract preconditioning in a rat model. **Life sciences**, v. 123, p. 35-42, 2015.

- [34] Pellow, S. *et al.* Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p. 149-167, 1985.
- [35] Handley S. L.; Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear"- motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg"s. **Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1–5, 1985.
- [36] Costall, B. *et al.* Exploration of mice in a black and White test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.32, n.3, p.777-785, 1989.
- [37] Rachetti, A. L. F. *et al.* Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 283-289, 2012.
- [38] Nava-Mesa, M. O., Lamprea, M. R., Múnera, A. Divergent short-and longterm 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.
- [39] Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, p. 407-421, 1990.
- [40] Hartman L.; Lago R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, London, 22, 475–476, 1973.
- [41] Uchida, V. H. **Extração do corante do fruto de castanhola (*Terminalia catappa* Linn) e estudos dos seus compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante.** 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- [42] Malin, David H. *et al.* Short-term blueberry-enriched diet prevents and reverses object recognition memory loss in aging rats. **Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 338-342, 2011.
- [43] Peixoto, H. *et al.* Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 385-393, 2016.
- [44] Daram, P. *et al.* Investigation of anti-inflammatory and anti-arthritic potentials of *Terminalia catappa* bark using in vitro assays and carrageenan-induced inflammation, complete Freund's adjuvant induced arthritis model in rats. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 313-321, 2021.
- [45] Abiodun, O. O. *et al.* Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L.(Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 309-319, 2016.
- [46] Dos Santos, O. V. *et al.* Propriedades antioxidativas e morfológicas da *Terminalia catappa* linn em diferentes estágios de maturação. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 30315-30326, 2019.
- [47] Merelo, P. *et al.* Cell wall remodeling in abscission zone cells during ethylene-promoted fruit abscission in citrus. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 126, 2017.

- [43] Lezak K.R; Missig G; Carlezon WA. Behavioral methods to study anxiety in rodents. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 181-191, 2017.
- [44] Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *J Comp Psychol*, v.18, n.3, p.385-403. 1934.
- [45] Monte, B. G. O. do. **QTLs associados com emocionalidade em fêmeas pós parto de camundongos LG/J x SM/J**. 2011. 87 p. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva) Universidade Federal de São Carlos, 2012.
- [46] Zheng, J. *et al*. Enriched Environment Rearing from Birth Reduced Anxiety, Improved Learning and Memory, and Promoted Social Interactions in Adult Male Mice. **Neuroscience**, v. 442, p. 138-150, 2020.
- [47] Shan, Q. *et al*. Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by D-galactose. **Journal of biomedicine and biotechnology**, v. 2009.
- [48] Voigt, J. *et al*. Brain angiotensin and anxiety-related behavior: the transgenic rat TGR (ASrAOGEN) 680. **Brain research**, v. 1046, n. 1-2, p. 145-156, 2005.
- [49] Rojas-Carvajal, M.; Brenes, J. C. Acute stress differentially affects grooming subtypes and ultrasonic vocalisations in the open-field and home-cage test in rats. **Behavioural Processes**, p. 104140, 2020.
- [50] Pereira, E. da S. **Efeito do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [51] Morato, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia Usp**, v. 17, p. 159-174, 2006.
- [52] Lecorps, B.; Rödel, H. G.; Féron, C. Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography. **Physiology & behavior**, v. 157, p. 209-216, 2016.
- [53] Pinto, W. B. V. R. *et al*. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **Revista Sociedade brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, p. 102-120, 2012.
- [54] Girish, C. *et al*. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic-like effect of the flavonoid ellagic acid in mice. *European journal of pharmacology*, v. 710, n. 1–3, p. 49–58, 2013.
- [55] Adefegha, S. A. *et al*. Erectogenic, antihypertensive, antiabetic, antioxidative properties and phenolic compositions of almond fruit (*Terminalia catappa* L.) parts (hull and drupe) – in vitro. **Journal of Food Biochemistry**, v.41, n. 2, p. 01 – 11, 2016.

- [56] Guillén-Ruiz, G. *et al.* Estrous cycle modulates the anxiogenic effects of caffeine in the elevated plus maze and light/dark box in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 413, p. 113469, 2021.
- [57] Rubab, S. *et al.* Enhanced neuroprotective and antidepressant activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers in lipopolysaccharide-induced depression and anxiety rat model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 603, p. 120670, 2021.
- [58] Semwal, Deepak Kumar *et al.* Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 90, 2016.
- [59] Ma, Z. *et al.* Myricetin attenuates depressant-like behavior in mice subjected to repeated restraint stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28377-28385, 2015.
- [60] Aguirre-Hernández, E. *et al.* Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*: GABAergic and serotonergic participation. **Salud mental**, v. 39, n. 1, p. 37-46, 2016.
- [61] Medina, J. H. *et al.* Neuroactive flavonoids: new ligands for the benzodiazepine receptors. **Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 235-243, 1998.
- [62] Ponte, M. F. *et al.* Growth inhibition of Walker carcinosarcoma 256 with alcoholic extract of green tea leaves (*Camellia sinensis*). **Acta cirurgica brasileira**, v. 27, p. 634-638, 2012.
- [63] Zhang, Jinlin *et al.* Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: An outlined review. **European journal of pharmacology**, v. 858, p. 172500, 2019.
- [64] Singh, M. *et al.* Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 4855-4873, 2008.
- [65] Gutierrez, J. M. *et al.* Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 23-24, p. 1221-1228, 2012.
- [66] Kiasalari, Z. *et al.* Ellagic acid ameliorates learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer's disease: an exploration of underlying mechanisms. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 12, p. 1841-1852, 2017.
- [67] Lissner, L. J. *et al.* Object recognition and Morris water maze to detect cognitive impairment from mild hippocampal damage in rats: A reflection based on the literature and experience. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, p. 173273, 2021.
- [68] Chen, L. *et al.* Ventral tegmental area GABAergic neurons induce anxiety-like behaviors and promote palatable food intake. **Neuropharmacology**, p. 108114, 2020.

- [69] Denninger, J. K.; Smith, B. M.; Kirby, E. D. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 141, 2018.
- [70] Carvalho, F. B. *et al.* **Associação entre o consumo de antocianinas e a prevenção de alterações cognitivas, neuroquímicas e inflamatórias nos modelos experimentais de desmielinização e de neuroinflamação em roedores**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- [71] Hauptmann, S. *et al.* Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. **Neurobiology of aging**, v. 30, n. 10, p. 1574-1586, 2009.
- [72] Brandeis, R.; Brandys, Y.; Yehuda, S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. **International Journal of Neuroscience**, v. 48, n. 1-2, p. 29-69, 1989.
- [73] Shukitt-Hale, B. *et al.* Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus. **Nutritional neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 172-182, 2008.
- [74] Poulouse, S. M. *et al.* Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with açai-enriched diets. **Nutritional neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 305-315, 2017.
- [75] Shi, G. *et al.* Alpinia protocathechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 403, n. 3, p. 206-210, 2006.
- [76] Jayakumar, T.; Thomas, P. A.; Geraldine, P. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. **Experimental gerontology**, v. 42, n. 3, p. 183-191, 2007.
- [77] Moon, M. L. *et al.* The saturated fatty acid, palmitic acid, induces anxiety-like behavior in mice. **Metabolism**, v. 63, n. 9, p. 1131-1140, 2014.
- [78] Chen, X. *et al.* Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. **Life sciences**, v. 203, p. 291-304, 2018.
- [79] Frausto-González, O. *et al.* Bertholletia excelsa Seeds Reduce Anxiety-Like Behavior, Lipids, and Overweight in Mice. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3212, 2021.
- [80] Yamada, D. *et al.* Modulation of fear memory by dietary polyunsaturated fatty acids via cannabinoid receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 8, p. 1852-1860, 2014.
- [81] Eady, T. N. *et al.* Docosahexaenoic acid signaling modulates cell survival in experimental ischemic stroke penumbra and initiates long-term repair in young and aged rats. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46151, 2012.
- [82] Melo, M. F. F. T. de *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**, v. 13, p. 9, 2019.

[83] Dos Santos, O. V.; Lorenzo, N. D.; Lannes, S. C da S. Chemical, morphological, and thermogravimetric of *Terminalia catappa* Linn. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 36, n.1, p. 151 – 158, Jan-Mar, 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração da farinha de castanhola para os ratos idosos mostrou potencial efeito ansiolítico em todos os testes aplicados, preservação da memória a curto e a longo prazo. Houve também, redução dos níveis de MDA indicando menor estresse oxidativo, além do aumento de ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, refletindo a proteção da peroxidação lipídica cerebral. Esses resultados podem estar associados a atividade antioxidante apresentada pela farinha.

Sugere-se que pesquisas futuras abordem o perfil fenólico e quantificação de fibras da farinha da castanhola. Nos ratos, poderia ser determinada a concentração de enzimas antioxidantes. Ademais, como nosso estudo abordou o efeito da castanhola em ratos saudáveis, outras pesquisas poderiam avaliar os efeitos dessa matriz em patologias, buscando estimular a sua aplicação em produtos alimentícios e/ou farmacêuticos.

ANEXOS

ANEXO A: Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Centro de Saúde e Tecnologia Rural



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comissão de Ética no Uso de Animais
Av. Santa Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3045



A Sra.: Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares

Protocolo CEUA/CSTR N° 53/2020

CERTIDÃO

Certificamos para os devidos fins que o projeto intitulado “***Efeito do consumo da castanhola (*terminalia catappa linn*) sobre parâmetros físicos e comportamentais em ratos***”, coordenado pelo (a) pesquisado(a) acima citado (a), obteve parecer consubstanciado pelo regulamento interno deste comitê, sendo **APROVADO**, em reunião ordinária no dia 28 de abril de 2021, estando a luz das normas e regulamento vigentes no país atendidas as pesquisas para especificações científicas.

Patos, 29 de abril de 2021

Prof. Dr. Valdir Moraes de Almeida

UFCG / Campus Patos

SIAPE 1406222

Prof. Valdir Moraes De Almeida
Coordenador do CEP/CEUA/UFCG/CSTR

ANEXO B: Comprovante de Tradução do Artigo

Declaration of Document Editing - Corrections

David Peter Harding - U.S.A. - Native American Citizen

American English



Born in California, USA, E-mail kauaii@yahoo.com Tel: 055-083-99332-1042; Skype: kauaiilaura

PHARMACIST: E-mail kauaii@yahoo.com - Tel: 055-083-99332-1042

IDENTIFICATION:



PUBLICATIONS AS AUTHOR - Royal Society of Chemistry - Analytical Methods; Great Britain, Trends in Analytical Chemistry - U.S.A., A.C.T.A., (The Netherlands), Talanta (Oxford).

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6542007229560011> - ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3604-6142>

Research Gate: <https://www.researchgate.net/scientific-contributions/59069231-David-P-Harding>

DOCUMENT TITLE:

Effects of (*Terminalia catappa* Linn) castanhola NUT FLOUR ON ANXIETY, MEMORY, AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN ELDERLY RATS

David Peter Harding
DPH

ANEXO C: Comprovante de Submissão do Artigo