

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LARISSA MARIA GOMES DUTRA

IMPACTO DO CONSUMO MATERNO DO ÓLEO DA
CASTANHA DO PARÁ (*Bertholletia excelsa*) SOBRE O
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E PEROXIDAÇÃO
LIPIDICA CEREBRAL NA PROLE DE RATAS

JOÃO PESSOA – PB

2021

LARISSA MARIA GOMES DUTRA

**IMPACTO DO CONSUMO MATERNO DO ÓLEO DA
CASTANHA DO PARÁ (*Bertholletia excelsa*) SOBRE O
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E PEROXIDAÇÃO
LIPIDICA CEREBRAL NA PROLE DE RATAS**

JOÃO PESSOA – PB

2021

LARISSA MARIA GOMES DUTRA

**IMPACTO DO CONSUMO MATERNO DO ÓLEO DA
CASTANHA DO PARÁ (*Bertholletia excelsa*) SOBRE O
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E PEROXIDAÇÃO
LIPIDICA CEREBRAL NA PROLE DE RATAS**

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: Prof^a. Dr^a. Juliana Késsia Barbosa Soares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jailane de Souza Aquino

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D978i Dutra, Larissa Maria Gomes.	Impacto do consumo
materno do óleo da castanha do	pará (Bertholletia
excelsa) sobre o comportamento de	ansiedade e
peroxidação lipídica cerebral na prole de	ratas /
Larissa Maria Gomes Dutra. - João Pessoa, 2021.	69
f.: il.	
Orientação: Juliana Késsia Barbosa Soares.	
Coorientação: Jailane de Souza Aquino.	
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.	
1. Óleo vegetal - Castanha do pará. 2. Ácido graxo.	
3. Neurodesenvolvimento. 4. Ansiolítico natural. 5.	
Transtorno de ansiedade. I. Soares, Juliana Késsia	
Barbosa. II. Aquino, Jailane de Souza. III. Título.	
UFPB/BC	CDU 664.34(043)

LARISSA MARIA GOMES DUTRA

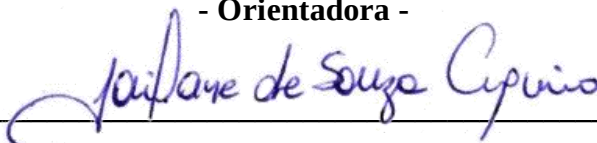
**IMPACTO DO CONSUMO MATERNO DO ÓLEO DA CASTANHA DO PARÁ
(*Bertholletia excelsa*) SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA CEREBRAL NA PROLE DE RATAS**

Dissertação aprovada em 09/ 04 / 2021.

BANCA EXAMINADORA



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



Prof.ª. Dr.ª. Jailane de Souza Aquino
CCS/UFPB
- Coorientadora -



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



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

Aos meus pais, Lúcia Dutra e José Gomes (*in memória*), e minha irmã, Maria dos Milagres, por todo apoio e amor que sempre me deram e por NUNCA terem me deixado desistir dos meus sonhos.

Dedico

O meu amor por vocês é incondicional!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pela dádiva da vida. Obrigada por me permitir errar, aprender e crescer e sempre está presente na minha vida nos melhores e piores momentos. Obrigada por me guiar e me iluminar com tranquilidade para seguir em frente com seus objetivos.

Aos meus pais, **Lúcia Dutra** e **José Gomes** (*in memória*), e minha irmã, **Maria dos Milagres**, por lutarem junto a mim, pela realização dos meus sonhos e nunca me deixarem desistir de nada. Eu não tenho nem com descrever o meu amor por vocês e toda admiração que sinto. Amo-os infinitamente.

A minha orientadora, **Juliana Késsia**, por toda atenção, amizade e profissionalismo. Deus te colocou na minha vida no meu pior momento e me ajudou com toda a sua espiritualidade a me erguer e seguir em frente. Por ter me aceitado como aluna sem nem me conhecer direito e ter me transmitido sua experiência profissional com tanta dedicação, compromisso e competência. Minha gratidão é eterna!

A minha coorientadora, **Jailane Aquino**, por ter me aceitado como sua coorientada e por todo carinho, atenção e por ter me transmitido sua experiência profissional com muito afeto e competência. Meu muito obrigada, de coração.

Ao meu amor, **Gustavo**, por todo companheirismo, atenção, compreensão, paciência e amizade. Obrigada por estar sempre ao meu lado nos melhores e principalmente nos piores momentos da minha vida. Te amo muito!

Ao meu amigo, **Diego Elias**, por ter me influenciado a não desistir do meu sonho de entrar no mestrado e ter me entusiasmado a ser aluna especial no programa. Agradeço imensamente por ter você em vida.

A **Maciel**, meu muito obrigada de verdade. Sem você eu teria arrancado todo o meu cabelo e me desesperado para entender todos os procedimentos que teria que realizar durante minha pesquisa e por toda atenção e paciência em me ensinar a mexer no Prisma e no Any-Maze. Você é o cara.

A **Elizângela, Thales, Januse e Ritinha** por terem tomado minha pesquisa como se fosse de vocês. Minha pesquisa não teria dado tão certo se não fosse vocês. Meu muito obrigada!

A **Jaciel**, por ter me ensinado toda a parte prática da minha pesquisa dentro do biotério. E por todos os “sim” que você me deu. Obrigada de coração.

A **Vanessa Bordin**, meu eterno agradecimento pelo seu carinho e atenção que me deu durante minhas análises de MDA. Seu coração é enorme e sinceramente, não sei como cabe dentro de você. Deus é muito maravilhoso por ter colocado você na minha vida e sou muito grata por ter conquistado sua amizade. Minha eterna gratidão.

A todos os meus **amigos** que sempre estiveram comigo, não vou citar nomes, pois posso esquecer de alguém. Amo todos.

A minha querida banca, **Maria Elieidy e Marília Frazão**, por terem aceitado participar da minha qualificação e defesa de dissertação. É um prazer receber todos os seus conhecimentos desde a graduação e agora no mestrado. Vocês são excelentes educadoras.

A todos os professores e colegas do **PPGCTA** da Universidade Federal da Paraíba pelo conhecimento transmitido, meu muito obrigada.

A equipe que faz parte do **Laboratório de Nutrição Experimental – LANEX** da Universidade Federal de Campina Grande, meu muito obrigada por ter me recebido com tanto carinho.

Ao **Capes**, pela disponibilidade da bolsa, sem ela não teria comprado minha moto e não teria tanta praticidade em ir para Universidade.

A todos, o meu...

Muito OBRIGADA!!!

**Mudaste o meu pranto em dança,
a minha veste de lamento em veste de alegria,
para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale.
Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.**

Salmos 30:11,12

RESUMO

O consumo materno de ácidos graxos essenciais é considerado crítico para a síntese lipídica estrutural de membranas, crescimento fetal e função celular durante a fase inicial da vida. Sua privação alimentar pode induzir transtornos de ansiedade e aumentar a vulnerabilidade cerebral ao estresse oxidativo. Com o presente trabalho objetivou-se investigar o impacto do consumo materno, do óleo bruto e refinado da castanha do Pará, durante a gestação e lactação sobre o comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral da prole de ratos. Fêmeas primíparas foram usadas para obtenção dos filhotes. A prole foi dividida em seis grupos, sendo três grupos com filhotes machos e três com filhotes fêmeas: controle (CG-M e CG-F) – tratado com água destilada; óleo bruto (OB-M e OB-F) e óleo refinado (OR-M e OR-F) ambos tratados com 3000 mg de óleo/kg de peso do animal. Estas dietas foram ofertadas às mães do 7º dia de gestação e por toda lactação. Apenas as ratas mães receberam o tratamento. A verificação dos parâmetros de ansiedade foi observada na prole durante a adolescência utilizando o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Campo Aberto (CE) e Caixa Claro-Escuro (CCE). Os níveis de malondialdeído (MDA) foram medidos no cérebro. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida de um teste de múltiplas faixas de Tukey e o teste two-way ($p < 0.05$). Como resultado foi observado que, os grupos RO-M/RO-F apresentaram um maior número de entradas nos braços abertos e mergulho de cabeça ($p < 0.05$) no LCE, os grupos OB-F e OR-F gastaram mais tempo nos braços abertos, já o grupo OR-M gastou um maior tempo comparado aos demais grupos ($p < 0.05$). No CA houve uma maior locomoção nos grupos OB-M/OB-F e OR-M/OR-F ($p < 0.05$), o número de rearing foi maior no OR-M/OR-F comparado ao controle e os grupos OB-M/OB-F ($p < 0.05$) obtiveram um maior número de rearing comparado aos demais grupos, os grupos OB-M/OB-F e OR-M/OR-F ($p < 0.05$) realizaram menos grooming. Já no CCE, o tempo no claro e o número de transições foram maiores dos grupos OB-M/OB-F e OR-M/OR-F. No que se refere ao sexo, as fêmeas apresentaram um maior tempo nos braços abertos do LCE, se locomoveram mais no CA e gastaram mais tempo na área clara do CCE comparado aos machos. Houve uma menor concentração de MDA no cérebro tanto nos machos como nas fêmeas ($p < 0.05$). Foi demonstrado que a suplementação materna com óleo bruto e refinado da castanha do Pará durante a gestação e a lactação promoveu um efeito ansiolítico na prole, especialmente nas fêmeas, e preveniu a peroxidação lipídica cerebral.

Palavras-chave: ácido graxo, neurodesenvolvimento; ansiolítico.

ABSTRACT

Maternal consumption of essential fatty acids is considered critical for structural lipid synthesis of membranes, fetal growth and cell function during the early stage of life. Their food deprivation can induce anxiety disorders and increase the brain's vulnerability to oxidative stress. The aim of this study was to investigate the impact of maternal consumption, of crude and refined Brazil nut oil, during pregnancy and lactation on the anxiety behavior and cerebral lipid peroxidation of the offspring of rats. Primiparous females were used to obtain the young. The chicks were divided into six groups, three with male chicks and three with female chicks: control (CG-M and CG-F) - treated with distilled water; crude oil (CO-M and CO-F) and refined oil (RO-M and RO-F) both treated with 3000 mg of oil / kg of animal weigh. These diets have been offered to mothers since the 7th day of pregnancy and throughout lactation. Only the mother rats received the treatment. The verification of anxiety parameters was observed in the offspring during adolescence and the Elevated plus maze (EPM), Open field (OF) and Light-dark box (LDB) were used. Malondialdehyde (MDA) levels were measured in the puppies' brain, liver and heart. The data were analyzed by Anova, followed by a Tukey multiple-band test and the two-way test ($p < 0.05$). As a result, it was observed that the RO-M / RO-F groups had a greater number of entries in the open arms and the head dive ($p < 0.05$) in the EPM, the CO-F and RO-F groups spent more time in the arms open, the RO-M group spent more time compared to the other groups ($p < 0.05$). In OF there was a greater locomotion in groups CO-M / CO-F and RO-M / RO-F ($p < 0.05$), the number of rearing was higher in RO-M / RO-F compared to control and groups CO-M / CO-F ($p < 0.05$) obtained a greater number of rearing compared to the other groups, the groups CO-M / CO-F and RO-M / RO-F ($p < 0.05$) performed less grooming. In the LDB, the time in the clear and the number of transitions were higher in the CO-M / CO-F and RO-M / RO-F groups. With regard to sex, females had a longer time in the open arms of the EPM, moved more in the OF and spent more time in the clear area of the LDB compared to the males. There was a lower concentration of tissue MDA in both males and females ($p < 0.05$). It has been shown that maternal supplementation with crude and refined Brazil nut oil during pregnancy and lactation promoted an anxiolytic effect on offspring, especially in females, and prevented cerebral lipid peroxidation.

keywords: fatty acid, neurodevelopment; anxiolytic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aparatos utilizados para realização dos testes	20
Figura 2 -	Castanheira (<i>Lecythidacea</i>) e sua semente castanha do Pará	23
Figura 3 -	Fluxograma do refino do óleo da castanha do Pará	27
Figura 4 -	Fluxograma experimental	24

ARITGO

Figura 1 -	Experimental protocol	49
Figura 2 -	Teste labirinto em cruz elevado em prole de ratas suplementadas com óleo bruto e refinado da castanha do Pará durante a gestação e lactação	53
Figura 3 -	Teste campo aberto em prole de ratas suplementadas com óleo bruto e refinado da castanha do Pará durante a gestação e lactação	54
Figura 4 -	Teste caixa claro-escuro em prole de ratas suplementadas com óleo bruto e refinado da castanha do Pará durante a gestação e lactação	55
Figura 5 -	Concentração de malondialdeído (MDA) em prole de ratas suplementadas com óleo bruto e refinado da castanha do Pará durante a gestação e lactação	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Comparativo da composição de ácidos graxos do óleo da castanha do Pará	25
-------------------	--	----

LISTA DE TABELAS**ARTIGO**

Table 1 -	Antioxidant values for raw and refined Brazil nut oil	46
Table 2 -	Body weight and maternal food consumption during pregnancy and lactation	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	linolênico
CA	Campo Aberto
CCE	Caixa Claro-Escuro
CLA	Ácido linoléico conjugado
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CG	Grupo Controle
DHA	Ácido docosahexanóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
LABRON	Laboratório de Bromatologia
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LANEX	Laboratório de Nutrição Experimental
LBA	Laboratório de Análise e Pesquisa de Bebidas Alcoólicas
MDA	Malondialdeído
OB	Óleo Bruto
OR	Óleo Refinado
AGPI's	Ácidos graxos poliinsaturados
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	TRANSTORNO DE ANSIEDADE	19
2.2	TRANSTORNO DE ANSIEDADE E O CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS	21
2.3	CASTANHA DO PARÁ	23
2.3.1	Óleo da Castanha do Pará	24
3	METODOLOGIA	26
3.1	LOCAL DE EXECUÇÃO	26
3.2	AMOSTRA	26
3.3	EXTRAÇÃO DO ÓLEO BRUTO DE CASTANHA DO PARÁ.....	26
3.4	REFINO DO ÓLEO BRUTO DE CASTANHA DO PARÁ	26
3.5	ANÁLISES DE COMPOSTOS DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DA CASTANHA DO PARÁ	28
3.5.1	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> - Método FRAP	28
3.5.2	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> - Método ABTS	28
3.5.3	Compostos Fenólicos Totais	29
3.5.4	Flavonoides Totais	29
3.6	ENSAIO BIOLÓGICO	30
3.6.1	Animais e Dieta	30
3.6.2	Peso corporal e consumo alimentar materno	31
3.6.3	Testes comportamentais	31
3.6.3.1	Utilização do aparato Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	31
3.6.3.2	Utilização do aparato Campo Aberto (CA)	32
3.6.3.3	Utilização da Caixa Claro-Escuro (CCE)	32
3.6.4	Eutanásia e coleta do cérebro	32
3.6.5	Determinação do Estresse Oxidativo – Malondialdeído (MDA)	33
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
	REFERÊNCIAS	34
4	RESULTADOS	42
	Artigo 1	43
	ANEXO	70

1 INTRODUÇÃO

Durante o período fetal e os primeiros anos de vida pós-natais, o cérebro cresce rapidamente e é particularmente sensível a muitos fatores externos, como: a nutrição, o estímulo social e ao estresse (FAN *et al.*, 2016). Este período é conhecido como crítico para o desenvolvimento cerebral (MORGANE *et al.*, 1993). O suprimento materno de ácidos graxos, é considerado crítico para a síntese lipídica estrutural de membranas e crescimento normal, bem como para a função celular e desenvolvimento de diferentes sistemas e órgãos do feto (MENNITTI *et al.*, 2018). Sendo assim, o consumo de quantidades adequadas de ácidos graxos essenciais é necessário durante a gravidez e lactação para um crescimento fetal e infantil ideal (OAKS *et al.*, 2017).

Durante a gestação o metabolismo lipídico materno sofre intensas modificações para que ocorra a transferência placentária de nutrientes essenciais para garantir o suprimento fetal. Na lactação, os ácidos graxos continuam sendo disponibilizados através do leite materno e a reserva de gordura corporal aliada à ingestão materna de fontes lipídicas irá interferir diretamente na composição láctea produzida durante esta fase (INNIS, 2014; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; CASTRO-RODRÍGUEZ; ZAMBRANO, 2018). No entanto, os ácidos graxos essenciais (linoleico e linolênico) não podem ser produzidos pelo organismo e precisam ser fornecidos na dieta materna (HANE BUTT, *et al.*, 2008; HERRERA; ORTEGA, 2010). O consumo materno adequado destes ácidos graxos determina a quantidade e a qualidade de ácidos graxos que será acumulado no tecido cerebral da prole (QUEIROZ *et al.*, 2019).

A privação alimentar destes ácidos graxos essenciais pode aumentar a expressão de comportamento semelhante à ansiedade, devido a disfunção nos sistemas transmissores monoaminérgicos do cérebro em neuropeptídeos mediadores do estresse ou fatores neurotóxicos, além de uma desregulação da neurogênese do hipocampo (MULLER *et al.*, 2015). Ademais, o cérebro é vulnerável ao estresse oxidativo, pois consome grandes quantidades de oxigênio (VAN VELZEN *et al.*, 2017).

O dano oxidativo afeta as estruturas celulares, a neurotransmissão, as vias de sinalização da transdução (QUADROS *et al.*, 2019) e induz morte celular; além de aumentar a suscetibilidade a doenças neurodegenerativas, depressão e ansiedade (BARBOSA *et al.*, 2018), devido a formação de moléculas pro-inflamatórias, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015). As defesas antioxidantes celulares modulam os níveis de radicais livres, mantendo assim o

status redox (QUADROS *et al.*, 2019), como também o consumo de ácidos graxos essenciais (QUEIROZ *et al.*, 2019).

Estudos já vem demonstrado o efeito da suplementação de ácidos graxos poliinsaturados sobre os parâmetros de ansiedade em ratos. Cheema *et al.* (2018) observaram que a suplementação de azeite de oliva apresentou um comportamento tipo ansiolítico em ratos machos. Já Auguste *et al.* (2018) analisaram uma dieta deficiente de ômega-3 e outra dieta rica em gordura saturada (óleo de coco) durante o período perinatal, no qual observou-se que o consumo de ambas dietas induziu na prole, comportamento tipo ansiogênico.

Um alimento fonte de ácidos graxos essenciais é a Castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*), nativa da região amazônica (MORAIS DE BRITO *et al.*, 2019) e consumida em todo o mundo devido seu alto teor energético e por ter uma boa fonte de nutrientes (SILVA, 2014; JUNIOR *et al.*, 2017). Amplamente utilizada nos setores culinários e cosméticos (BERENGUEL *et al.*, 2018), como também na produção de outros produtos, como, óleo, barras de cereal e biscoitos (MORAIS DE BRITO *et al.*, 2019).

O óleo da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*), é fonte de ácidos graxos insaturados, com predominância dos PUFA's, apresentando uma média de 75% e possuir propriedades antioxidantes responsáveis pela modulação do sistema imunológico e dos processos inflamatórios (SANTOS *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2018).

Devido os estudos evidenciarem a associação entre os ácidos graxos essenciais com os distúrbios de ansiedade e a escassez de informações sobre o efeito do consumo do óleo da castanha do Pará, hipotetizou-se que a suplementação materna do óleo castanha do Pará poderia modular o comportamento de ansiedade da prole.

Diante do exposto, a presente pesquisa objetivou-se investigar o impacto do consumo materno, do óleo bruto e refinado da Castanha do Pará, durante a gestação e lactação sobre o comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral da prole de ratas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRANSTORNO DE ANSIEDADE

Os transtornos de ansiedade são os transtornos psiquiátricos mais comuns, com uma prevalência estimada ao longo da vida de mais de 28 % da população (PAPENFUSS *et al.*, 2021). Já em jovens esta prevalência é de 15 a 20 % (CROWE; SPIRO-LEVITT, 2020). Essas condições são debilitantes, prejudicam a qualidade de vida e representam um alto custo para a saúde (GRILLON; ERNST, 2020).

A ansiedade generalizada é caracterizada como uma sensação de inquietação ou medo em relação ao futuro e ocorre a partir de uma pressão interna ou cognitiva, estando intimamente ligada ao aprendizado e pode interferir negativamente na habilidade de resolução de problemas (VERLY-MIGUEL *et al.*, 2015; YOCKEY; RHENRY, 2019).

As alterações ocasionadas pela ansiedade culminam no surgimento de sinais clínicos, como: taquicardia, alterações na pele, hiperventilação, sensação de afogamento ou sufocamento, sudorese, dores, tremores, queixas de insônia, falta de concentração e sentimento de constante alerta (PEREIRA, 2018; NATACCI, 2018; IMPEY; GORDON; BALDWIN, 2020).

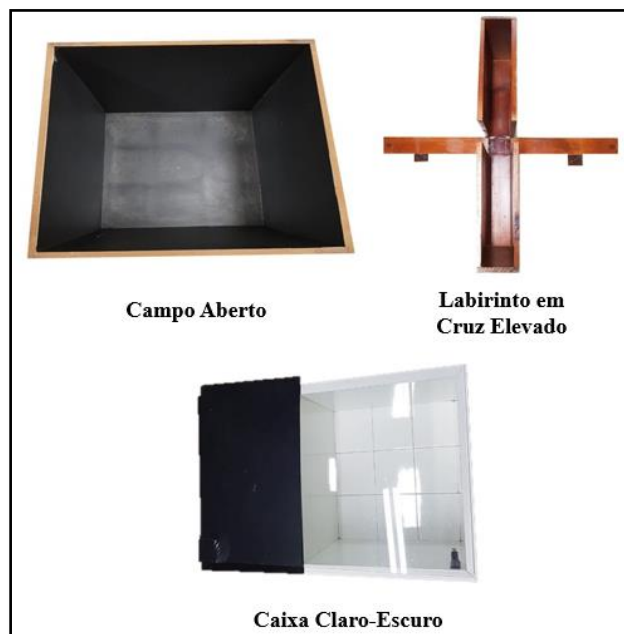
O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal possui papel central por orquestrar as respostas ao estresse e consequentemente a ansiedade, por meio do aumento na produção de cortisol, um hormônio glicocorticoide produzido pelo córtex da adrenal e associado ao estresse. O núcleo paraventricular do hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH) sobre a hipófise anterior, que irá atuar sobre as suprarrenais por meio da liberação do hormônio corticotrópico fazendo com que essa glândula libere cortisol em resposta ao estresse. Camundongos manipulados geneticamente para super expressão do CRH apresentam aumento de comportamentos tido como ansiosos, pois quando os receptores deste hormônio são retirados os camundongos apresentam redução dessas reações (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Problemas de saúde mental tendem a surgir durante o período de desenvolvimento final da adolescência. Há uma crescente percepção de que a adolescência pode ser fundamental na programação de respostas ao estresse e na cognição social, importantes para o desenvolvimento de comportamentos típicos na idade adulta. Estressores ambientais durante esse período sensível podem aumentar muito o risco de distúrbios psicológicos como ansiedade e depressão (WAH, 2019).

Estudos mostram que pessoas com transtornos do humor geralmente têm dietas de baixa qualidade, que são pobres em frutas e outros vegetais, mas com alto teor de gordura e açúcar. Cada vez mais, dietas modificadas estão sendo usadas para tratar transtornos, onde dietas pobres em açúcar e altas em ácidos graxos são recomendadas (DAVISON; MKAPLAN, 2012).

Os modelos de ansiedade com a utilização de roedores são úteis como ferramentas para a identificação de compostos ansiolíticos e dos aspectos envolvidos na etiologia dos distúrbios psiquiátricos. Os mais utilizados são, Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o teste de Caixa Claro-Escuro (CCE), ilustrados na **figura 1**. O primeiro tem o objetivo de avaliar a atividade exploratória onde o aumento da ambulação reflete um comportamento ansiolítico; o segundo teste constitui um aparato formado por dois braços fechados e dois braços abertos perpendiculares aos primeiros, uma área central, sendo este elevado do solo, onde, quanto maior os níveis de ansiedade, menor será o percentual de entradas tempo gasto do animal nos braços abertos, já o último teste vai avaliar através do tempo e permanência do animal nos comportamentos claro e escuro, quanto menos ansioso maior a tendência a explorar o lado claro da caixa (FLIN, 2003; PRUT; BELZUNG, 2003; BOURIN; HASCOËT, 2003).

Figura 1 – Aparatos utilizados para realização dos testes



(Fonte: Própria)

Ferraz *et al.* (2011) mostraram que a suplementação de ácidos graxos poliinsaturados neutralizou os efeitos ansiogênicos do estresse no teste do Labirinto em Cruz Elevado e promoveu uma redução do hormônio corticosterona para níveis compatíveis aos observados no grupo controle. Já Cheema *et al.* (2018) utilizaram o campo aberto para analisar o comportamento tipo ansiedade, onde suplementaram ratos machos com azeite de oliva e observaram um efeito ansiolítico, ocasionado pelo aumento da atividade exploratória no CA.

2.2 TRANSTORNO DE ANSIEDADE E O CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídios desempenham um papel importante na função neural no cérebro (MÜLLER *et al.*, 2015). Se destacam devido seu relacionamento direto com o processo de gênese cerebral (VELASCO, 2009; MADORE, 2014) e a sua composição influencia diretamente a percepção subjetiva, do humor e do comportamento emocional (MÜLLER *et al.*, 2015). E os ácidos graxos poliinsaturados são vitais para estes processos (INNIS; ELIAS, 2003; RACHETTI, 2012).

Os AGPI são classificados nos grupos, ômega 3 e ômega 6. O ácido eicosapentaenóico (EPA), o ácido docosahexaenóico (DHA) e o α -linolênico (ALA) são os principais componentes bioativos da série ômega-3 (THESING *et al.*, 2018) e o principal ácido graxo ômega-3 encontrando no cérebro é o DHA, que compreende até 10 a 20% da sua composição, enquanto o ALA, o EPA e o ácido docosapentaenóico (DPA) compreendem apenas 0,1% do cérebro (JADOON *et al.*, 2012). Eles podem ser encontrados principalmente em peixes gordurosos, frutos do mar, nozes e sementes (MÜLLER *et al.*, 2015). Já os ácidos graxos da série ômega-6 são encontrados, por exemplo, em sementes e óleos de plantas e vegetais, como também é em margarinas e alimentos processados (THESING *et al.*, 2018).

Vários mecanismos bioquímicos podem explicar a associação entre AGPI e ansiedade (YOUNG; CONQUER, 2005). O EPA e o DHA são os componentes integrais da bicamada fosfolipídica nas membranas celulares neuronais, tornando-os relevantes para a fisiologia e neurotransmissão das membranas (GONZALES *et al.*, 2015).

O DHA, é essencial para a função neurológica normal e se acumula rapidamente durante o desenvolvimento cerebral (GREEN *et al.*, 2006; CHEN, 2013), estando associado à estabilidade da membrana neuronal e à transmissão de serotonina e dopamina, (CHALON, 2006), e também tem propriedade antiinflamatória, aliviando o sistema

imunológico hiperativo associado a ansiedade (YOUNG; CONQUER, 2005). Além de afetar a função neurológica modulando a neurotransmissão, neurogênese e mielinização (THESING *et al.*, 2018). O EPA não está concentrado nas membranas neurais, mas pode afetar sua função por meio de efeitos neuroimunológicos (SINCLAIR *et al.*, 2007) antagonizando os PUFA's do ômega 6, o ácido araquidônico, reduzindo a síntese de prostaglandina (JADOON *et al.*, 2012) e aumentando assim o fluxo sanguíneo cerebral (BUYDENS-BRANCHE *et al.*, 2008).

Estudos já vem demonstrado o efeito da suplementação de ácidos graxos poliinsaturados sobre os parâmetros de ansiedade em ratos. Soares *et al.* (2013) suplementaram ratas gestantes e lactantes com gordura do leite de cabra, rica em ácido linoléico conjugado (CLA), e avaliaram seu efeito sobre os parâmetros de ansiedade, indicadores do desenvolvimento somático e ontogênese reflexa em sua prole de machos. Os resultados mostraram que houve uma redução no comportamento tipo ansiogênico e uma melhora no desenvolvimento físico na progênie de mães alimentadas com CLA durante a gestação e lactação. Corroborando com Queiroz *et al.* (2019) que também suplementaram ratas durante a gestação e a lactação com CLA e obtiveram um comportamento tipo ansiolítico em sua prole; além de apresentarem uma concentração maior de glutatona e uma menor de malondialdeído no tecido cerebral dos animais. Demonstrando assim a influência do CLA no comportamento, no crescimento físico e no desenvolvimento do cérebro na prole.

Outro estudo pesquisou o efeito da suplementação do óleo de peixe, contendo 12 % de EPA e 18 % de DHA, em ratos machos na fase inicial da vida e foi observado uma prevenção na ocorrência no comportamento tipo ansiedade e no comportamento tipo depressivo. Os autores associaram que estes efeitos estão ligados principalmente a redução da corticosterona, aumento da fluidez e a excitabilidade da membrana, com liberação de neurotransmissores como a serotonina e a dopamina, promovida pela suplementação dos AGPI (FERRAZ *et al.*, 2011).

Já Auguste *et al.* (2018) analisaram uma dieta deficiente de ômega-3 e outra dieta rica em gordura saturada (óleo de coco) durante o período perinatal, no qual observou-se que o consumo de ambas dietas induziu na prole, comportamento tipo ansiogênico.

Segundo o que foi exposto com relação aos ácidos graxos poliinsaturados e seus efeitos na proteção contra ansiedade, a pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial do óleo da castanha do Pará sobre este tipo de comportamento.

2.3 CASTANHA DO PARÁ

A castanheira é uma espécie de árvore da família *Lecythidaceae* (BONELLI *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2017), que pode atingir mais de 50 metros de altura, com frutificação ocorrendo entre 8 e 12 anos. O fruto da castanheira (ouriço) apresenta formato esférico, possui casca dura e lenhosa, pode conter de 15 a 24 sementes, que possui de 3 a 5 cm e tem coloração branca à amarelada coberta por uma película marrom, como demonstrado na **figura 2** (LOCATELLI *et al.*, 2005). A castanha apresenta 75 % de ouriço e 25 % de sementes, sendo que deste último, 12 % é representado pela casca e 13 % pela amêndoa (MULLER, 1981). Sendo nativa da região amazônica, ocorrendo também nas regiões da Bolívia e do Peru (MORAIS DE BRITO *et al.*, 2019).

A árvore foi descrita em 1808 pelos pesquisadores Humboldt, Bonpland e Kunth e recebeu a denominação botânica (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em homenagem aos pesquisadores. Outras denominações variam conforme seus locais de origem (ENRIQUEZ, *et al.*, 2003).

Figura 2 – Castanheira (*Lecythidaceae*) e sua semente Castanha do Pará



(Fonte: EMBRAPA, 2018)

A Castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) é consumida em todo o mundo devido ao seu alto teor energético e por ter uma boa fonte de nutrientes. Apresenta alto conteúdo de lipídio, de 60 a 70%, com cerca de 23% de ácidos graxos monoinsaturados, 21% de ácidos poli-insaturados e 15% de ácidos graxos saturados, com predominância do ácido graxo linoleico (ômega-6) (SILVA, 2014; JUNIOR *et al.*, 2017). É considerada boa fonte de proteínas, 15 a 20%, e apresenta teor diferenciado para o aminoácido sulfurado da

metionina que é essencial, aminas biogênicas e fosfolipídios (SOUZA, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020); contendo também em sua composição vitaminas, como, niacina, tiamina, vitamina E, vitamina B₆ e minerais, como, selênio, magnésio, fósforo (YANG, 2009). Além disso, a Castanha do Pará é uma boa fonte alimentar de fitoquímicos, como os fenólicos, flavonoides, tocoferol, fitoesteróis e esqualeno (MORAIS DE BRITO *et al.*, 2019). Esses compostos bioativos estão relacionados a capacidade antioxidante e tem seus efeitos benéficos relacionados à saúde humana (CARDOSO *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2019). A ingestão da castanha do Pará reduz os fatores de risco cardiovasculares e mostra uma melhora nas atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antimutagênicas e anticarcinogênicas do organismo (LIMA *et al.*, 2020).

A amêndoa é usada na produção de outros produtos, como o óleo ou ingredientes para adicionar em barras de cereal e biscoitos (MORAIS DE BRITO *et al.*, 2019) sendo amplamente utilizada nos setores culinário e cosmético, na fabricação de shampoos, condicionadores e sabonetes (BERENGUEL *et al.*, 2018). O resíduo marrom obtido pela extração da semente oleaginosa é chamado de “bolo” e tem um interesse crescente entre os pesquisadores devido ao seu alto teor de proteína (KLUCZKOVSKI *et al.*, 2015).

2.3.1 Óleo da Castanha do Pará

As técnicas de extração do óleo são baseadas na recuperação da porção lipídica da semente, promovendo assim um aumento do seu rendimento, redução de custos e melhorando a produtividade da matéria-prima, produtos e subprodutos (CORRÊA *et al.*, 2012). Já o refino do óleo tem como objetivo remover os compostos indesejáveis presentes, como os fosfolipídios e os ácidos graxos livres (SULIHATIMARSYILA *et al.*, 2020). e tornando o óleo seguro para o consumo humano (HEW *et al.*, 2021). A presença destes fosfolipídios pode causar descoloração e servir como principal precursor de sabor estranho no óleo.

O óleo extraído da castanha do Pará, tem característica de cor amarelada clara e com o cheiro agradável (CHUNHIENG *et al.*, 2008), possui um alto valor nutricional e funcional em termos de perfil de ácidos graxos insaturados, com predominância de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), que representam em média 75% do total de ácidos graxos (SANTOS *et al.*, 2013). A composição dos principais ácidos graxos do óleo é variada (**Quadro 1**), podendo ser teoricamente justificada pelo método de extração que foi utilizado (NETO *et al.*, 2018).

Quadro 1 – Comparativo da composição de ácidos graxos do óleo da castanha do Pará

	Araújo et al., 2005	Corrêa et al., 2013	Santos et al., 2013	Neto et al., 2018
Ácido mirístico	0,05	0,06	0,56	-
Ácido láurico	-	0,02	0,76	-
Ácido palmítico	16,18	14,24	14,04	14,70
Ácido esteárico	9,85	11,19	10,63	12,55
Ácido oleico	38,44	36,26	34,55	31,88
Ácido linoleico	35,48	37,53	40,14	39,96
Ácido linolênico	-	0,08	0,08	0,07

Com base nos resultados obtidos em relação ao perfil de ácidos graxos insaturados, pode-se observar a predominância do ácido oleico (ômega-9) e linoléico (ômega-6), mas também há a presença o ácido linolênico (ômega-3) (SANTOS *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2018). Outros ácidos encontrados foram os ácidos graxos saturados palmítico e esteárico (ARAÚJO *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Diante do que foi exposto, estudos já demonstram vários mecanismos que podem explicar a associação entre alimentos fontes de ácidos graxos essenciais e o transtorno de ansiedade: óleo de peixe (FERRAZ *et al.*, 2011), azeite de oliva (CHEEMA *et al.*, 2018), óleo de coco (AUGUSTE *et al.*, 2018). E foi visto que, o óleo da castanha do Pará é um alimento que possui alto valor nutricional e funcional em termos de perfil de ácidos graxos insaturados. Porém, ainda não há estudos que avaliem o consumo materno do óleo da castanha do Pará durante a gestação e a lactação sobre o comportamento de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral da prole.

3 ABORDAGEM METODOLOGIA

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análises e Pesquisa de Bebidas Alcoólicas – LBA – CT/UFPB, no Laboratório de Bromatologia (LABROM) - CES/UFCG, no Laboratório de Bromatologia – CCS/UFPB e no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) – CES/UFCG.

3.2 AMOSTRA

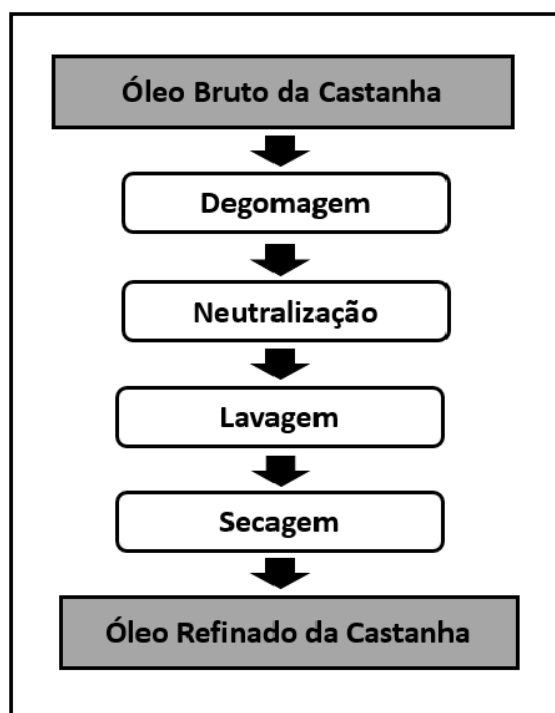
A castanha do Pará foi obtida de um mercado popular da cidade de João Pessoa – Paraíba (PB), em um único lote, no período de novembro de 2019. As mesmas foram acondicionadas em um plástico escuro para a proteção contra luminosidade até o momento de sua utilização.

3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO BRUTO DE CASTANHA DO PARÁ

A obtenção do óleo bruto da Castanha do Pará foi realizada em condições de iluminação controlada através da técnica de extração a frio com auxílio de uma prensa manual com capacidade de 680 kg – Prensa Hidráulica SL 10 (marca SOLAB, Piracicaba – São Paulo, Brasil). Após o processo de extração, o óleo foi armazenado em vidro âmbar em temperatura de refrigeração à – 18 °C.

3.4 REFINO DO ÓLEO BRUTO DE CASTANHA DO PARÁ

Na **figura 3** é representado o fluxograma do processamento do refino do óleo bruto da castanha do Pará. Inicialmente o óleo bruto foi submetido ao processo de degomagem, de acordo com a metodologia de Moretto e Fett (1989), mediante o acréscimo de 3,0% de água em relação ao volume do óleo, com posterior aquecimento a 60 °C e agitação durante 30 minutos.

Figura 3 – Fluxograma do refino do óleo da castanha do Pará

Posteriormente, o óleo foi neutralizado, segundo a metodologia proposta por Aquino *et al.* (2016), sob temperatura de 50 °C por 30 minutos, sendo adicionado 5,0% da solução de hidróxido de sódio à 12 % em relação ao volume do óleo. Em seguida, o óleo foi centrifugado (Centrifuga de Bancada Digital – NT 810, marca Novatecnica, Piracicaba – São Paulo, Brasil) a 3.500 força G, para a retirada de impurezas sólidas presentes na amostra. Logo após, o óleo foi transferido para um funil de separação onde foi realizada a etapa de sucessivas lavagens. As mesmas foram realizadas com intervalos de 30 minutos cada, adicionando-se ao óleo neutralizado água a temperatura ambiente e água em temperatura de 90 – 95 °C de forma alternada e sempre o submetendo a agitação manual no próprio funil de separação e retirada de gás. Em cada etapa de lavagem, após a separação das fases, a água foi descartada e a ela adicionada os indicadores fenolftaleína e, posteriormente, nas ultimas lavagens, o verde de bromotimol, com objetivo de detectar algum resquício de hidróxido de sódio usado na neutralização. As lavagens continuaram até que os indicadores não mais detectassem alcalinidade na água.

O óleo foi seco em evaporador rotativo a temperatura de 60 °C, sob pressão de vácuo por 20 minutos e agitação branda. Logo após, as amostras foram armazenadas em fracos âmbar com capacidade de 1 litro, devidamente codificados e mantidos sob refrigeração à -18 °C.

3.5 ANALÍSES DE COMPOSTOS BIOATIVOS DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DA CASTANHA DO PARÁ

Todas as análises foram realizadas em triplicata e consistiram nas determinações de atividades antioxidantes (FRAP e ABTS), fenólicos totais e flavonoides.

3.3.1 Atividade Antioxidante *in vitro* – Método de Redução de Ferro (FRAP)

Para determinação da atividade antioxidante foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), adaptada por Rockenbach *et al.* (2011). Para a análise, 200 μ L de cada óleo foi adicionado a 1800 μ L do reagente FRAP em um tubo de ensaio e levados ao banho maria a 37 °C por 30 minutos. Para cada óleo foi realizado um branco, sem adição do extrato. Após, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 593 nm. Para determinar a atividade antioxidante (FRAP) foi utilizada a curva de calibração com Trolox e os resultados foram expressos em μ mol de trolox/g de amostra.

3.3.2 Atividade Antioxidante *in vitro* – Método Inibição do Radical 2,2'-azinobis (ABTS)

O método ABTS foi realizado de acordo com a metodologia de Sariburun *et al.* (2010), com algumas modificações. Inicialmente, formou-se o radical ABTS. Uma vez formado o radical, o mesmo foi diluído em água destilada até obter o valor de absorbância de 0,800 ($\pm 0,020$) a 734 nm. Em ambiente escuro foi transferido para um tubo de ensaio uma alíquota de 100 μ L dos extratos e adicionado 500 μ L do radical ABTS. Após, os tubos de ensaio foram mantidos na ausência de luz por 6 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura a 734 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Também foi feita uma solução “controle” que consistiu em uma alíquota de 100 μ L do solvente extrator adicionada de 500 μ L do radical ABTS. A solução “branca” foi o solvente extrator de cada extrato, utilizada para zerar o espectrofotômetro. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em μ M trolox/g de amostra. Foi calculado também o IC₅₀ através da equação da reta plotada através dos resultados contendo os valores de concentração (mg/mL) utilizadas no eixo X e os percentuais de proteção encontrados no eixo Y.

3.3.3 Compostos Fenólicos Totais

Para determinar o teor de compostos fenólicos totais das amostras (óleo bruto e refinado) foi utilizada a metodologia descrita por Liu *et al.* (2002) com algumas modificações. Para tanto, 250 µL de cada amostra foi misturado em um tubo de ensaio com 1250 µL do reagente Folin-Ciocalteu à 10%, as soluções foram agitadas em vórtex e armazenadas em temperatura ambiente (23 °C) na ausência da luz por 6 minutos. Após, foram adicionados 1000 µL da solução de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi levada ao Banho Maria Termostático SL 150, marca SOLAB, Piracicaba – São Paulo, Brasil, a uma temperatura de 50°C, durante 5 minutos. Após, a absorbância foi medida a 765 nm utilizando espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Também foi realizado um branco com a ausência dos extratos para zerar o espectrofotômetro. O conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras foi determinado utilizando uma curva padrão preparada com ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cem gramas de amostra (mg EAG/100 g).

3.3.4 Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen; Mengcheng; Jianming (1999). Uma alíquota de 0,5 mL de cada óleo foi adicionada a 2 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado 150 µL de nitrito de sódio a 5%. Após 5 minutos, 150 µL de cloreto de alumínio a 10% foram adicionados e, após 6 minutos, 1 mL de hidróxido de sódio a 1 M, seguido pela adição de 1,2 mL de água destilada. A absorbância da amostra foi medida a 510 nm usando um espectrofotômetro (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil) contra um branco na ausência dos extratos. O teor de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão de equivalentes de catequina. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina por cem gramas de amostra (mg EC/100 g).

3.6 ENSAIO BIOLÓGICO

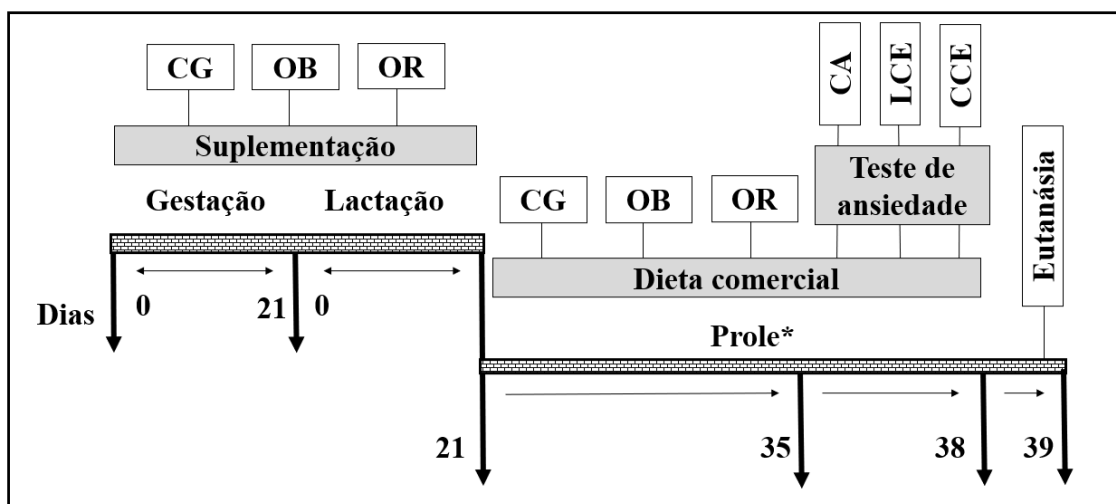
3.6.1 Animais e Dieta

Foram utilizadas fêmeas da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério de criação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com idade entre 90 e 120 dias e peso de 250 ± 50 g para a obtenção dos filhotes. As ratas foram acasaladas e mantidas na proporção de uma fêmea para cada macho. Após confirmação da prenhez, através de esfregaço vaginal, as ratas gestantes foram alojadas em gaiolas-maternidade individuais de polipropileno, em condições-padrão: temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro (12 h; início da fase clara às 6:00 h), umidade de 65%, recebendo ração e água *ad libitum*. Após a confirmação da prenhez as fêmeas receberam dieta comercial Nuvilab®, (marca Quimtia, Rio de Janeiro, Brasil) e o óleo de Castanha do Pará por gavagem, que foi ofertado durante a gestação e durante toda lactação. Foram formados 3 grupos: Grupo Controle (CG) que recebeu água destilada; Grupo Óleo Bruto (CO) e Grupo Óleo Refinado (RO), que foram tratados com 3000 mg de óleo da castanha do Pará/kg de peso do animal.

A dosagem foi definida a partir do estudo realizado por Torres *et al.* (2016), que utilizaram a suplementação de 3000 mg de óleo de pequi/kg de peso do animal com efeitos antiinflamatórios e antioxidantes.

Após o desmame, a prole recebeu dieta comercial Nuvilab® durante o tempo do experimento. As ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes, onde 4 foram fêmeas e 4 machos, preferencialmente, ou que tivesse pelo menos 1 filhote macho/fêmea. Para cada grupo, foram utilizados: Controle – CG-M e CG-F (13 machos e 11 fêmeas), Óleo Bruto – OB-M e OB-F (12 machos e 12 fêmeas) e Óleo Refinado – OR-M e OR-F (14 machos e 15 fêmeas). O desmame foi realizado aos 21 dias pós-natal. O delineamento do experimento está detalhado na **figura 4**.

A pesquisa foi conduzida de acordo com as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais e foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR/UFCG (09/2020).

Figura 4 – Fluxograma Experimental

Protocolo experimental. CG - Controle; OB - Óleo Bruto; OR - Óleo Refinado. * Dividido em machos e fêmeas. CA - Campo Aberto; LCE - Labirinto em Cruz Elevado; CCE - Caixa Claro-Escuro. Eutanásia - Dia de coleta do cérebro para análise de malondialdeído.

3.6.2 Peso corporal e consumo alimentar materno

O peso corporal e o consumo de ração das ratas gestantes e lactantes foram aferidos, semanalmente, em balança eletrônica digital Balmak[®] (modelo ELP – 10, Santa Bárbara do Oeste/SP, Brasil), com variação de 20 a 10.000 g.

3.6.3 Testes comportamentais na prole

3.6.3.1 Utilização do aparato Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é comumente usado como modelo não condicionado de ansiedade em roedores (FLINT, 2003; BRADLEY *et al.*, 2007). O LCE constitui um aparato formado por dois braços fechados medindo 50 cm x 10 cm cada e dois braços abertos medindo 50 cm x 10 cm cada, perpendiculares aos primeiros; uma área central de 10 cm x 10 cm, sendo este elevado 50 cm do solo. O animal foi colocado no centro do aparelho, sempre pelo mesmo pesquisador, com o focinho voltado para o braço fechado direito. Durante 5 minutos, foi analisada a frequência de entradas nos braços fechados e abertos, o tempo gasto em cada braço e no centro do aparelho. Além disso, também foi contabilizada a quantidade de mergulhos da cabeça do animal pelos braços abertos.

3.6.3.2 Utilização do aparato Campo Aberto (CA)

O campo aberto é um instrumento para testar comportamento de ansiedade e atividade exploratória, a fim de verificar os efeitos de ambientes não familiares sobre a emocionalidade em ratos (PRUT; BELZUNG, 2003). O aparelho consiste em caixa quadrada preta uniformemente iluminado, medindo 60 x 60 x 60 cm, sendo subdivididas em 9 quadrantes medindo 20x20 cm. O teste foi realizado com as proles no período da adolescência (35 dias de nascido). Cada animal foi inserido no centro do aparelho e observado durante 10 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros como: ambulação (número de cruzamentos dos segmentos pelo animal com as quatro patas), número de comportamentos de levantar (rearing), tempo de comportamentos de autolimpeza (grooming) e defecação (registrada por meio do número de bolos fecais) (NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013).

3.6.3.3 Utilização da Caixa Claro-Escuro (CCE)

A caixa de transição claro-escuro é utilizada para avaliar o comportamento de ansiedade incondicionada e comportamento exploratório em roedores (BOURIN; HASCOËT, 2003). O aparelho é feito de madeira e revestido com material impermeável com dimensões totais de (45 X 27 X 27cm) e é dividido em dois compartimentos, sendo um escuro (18 X 27cm) e outro claro (27 X 27cm). Na partição entre os dois compartimentos existe uma abertura central que mede 7,5 cm × 7,5 cm. Os animais foram colocados no centro do compartimento claro, com o focinho voltado para o compartimento escuro, sendo mantidos no aparelho por 5 min para livre exploração. Os comportamentos avaliados foram o tempo de permanência do animal em cada um dos compartimentos.

Ao final de cada sessão do comportamento, os aparelhos foram higienizados com uma solução de álcool á 10% em todas as sessões foram filmadas e posteriormente analisadas.

3.6.4 Eutanásia e coleta do cérebro

Após a fase dos testes comportamentais, os animais foram decapitados para a retirada do cérebro. Para análise do conteúdo de malonaldeído (MDA) cerebral da prole,

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.

3.6.5 Determinação de peroxidação lipídica cerebral – Malondialdeído (MDA)

Para se iniciar a determinação do MDA, a amostra do tecido cerebral foi descongelada e posteriormente pesada. Mediante o peso foi calculada a quantidade de tampão Tris HCl para amostra, utilizando-se a proporção de 1:5 (p/v). Em seguida, o tecido foi picado com uma tesoura por aproximadamente 15 segundos em meio resfriado. O material fragmentado foi triturado e homogeneizado a frio, sob ação de um triturador (Ultra Stirrer modelo: Ultra 80), e a ele adicionado o tampão Tris HCl. O homogenato obtido foi centrifugado em uma Centrífuga de Bancada refrigerada – SL 701, marca SOLAB, Piracicaba-São Paulo, Brasil, a 2500 $\times g$ por 10 minutos a 4 °C e 300 μ L, o sobrenadante foi transferido para um eppendorf de 2 ml, sendo adicionados 750 μ L do reativo cromogênico e 225 μ L de ácido clorídrico (HCl – 37%). Em seguida, o material foi colocado em Banho Maria Termostático SL 150, marca SOLAB, Piracicaba – São Paulo, Brasil com agitação a 45° C, durante 40 minutos, e posteriormente levado à uma centrifugação a 2500 $\times g$ durante 5 minutos a 4 °C. 300 μ L do sobrenadante foi transferido para microplaca de 96 poços, em duplicata, e levado para leitor de microplacas (Polaris) 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 é hidrolisado durante o passo de incubação com HCl a 45 °C, gerando o MDA. Os resultados expressos em mol/g tecido (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com média $\pm$ SEM. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado e analisado por ANOVA de duas vias: (CT / OB / OR) X (macho e fêmea) seguido de um teste de múltiplas faixas de Tukey, quando apropriado, e o teste two-way; considerando $p < 0.05$ estatisticamente significativo.

REFERÊNCIAS

AUGUSTE, S., SHARMA, S., FISETTE, A., FERNANDES, M. F., DANEALD, C., DES ROSIERS, C., FULTON, S. Perinatal deficiency in dietary omega-3 fatty acids potentiates sucrose reward and diet-induced obesity in mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 64, p. 8-13, 2018.

ARAÚJO, M. E., AZEVEDO, F. F. M., MACHADO, N. T. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 223-229, 2005.

BAKUNINA, N., PARIANTE, C. M., ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, p. 365-373, 2015.

BARBOSA, M. Q., QUEIROGA, R. D. C. R. E., BERTOZZO, C. C. D. M. S., DE SOUZA ARAÚJO, D. F., OLIVEIRA, L. I. G., SILVA, J. Y. P., ALVES, S., SOARES, J. K. B. Effect of diets with goat milk fat supplemented with exercise on anxiety and oxidative stress in the brains of adult rats. **Food & Function**, v. 9, p. 2891-2901, 2018.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BENZIE, I. F. F, STRAIN, J. J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERENGUEL, O., PESSÔA, G. D. S., ARRUDA, M. A. Total content and in vitro bioaccessibility of tellurium in Brazil nuts. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 48, p. 46-51, 2018.

BONELLI, P.R.; DELLA REOCCA, P.A.; CERRELLA, E.G.; CUKIERMAN, A.L. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil Nuts shells. **Bioresource Technology**, v. 6, p. 15-22, 2001.

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

BRADLEY, B. F., STARKEY, N. J., BROWN, S. L., LEA, R. W. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 517-525, 2007.

BUYDENS-BRANCHEY, L., BRANCHEY, M., HIBBELN, J. R. Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, p. 568-575, 2008.

CARDOSO, B. R., DUARTE, G. B. S., REIS, B. Z., & COZZOLINO, S. M. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, p. 9-18, 2017.

CHALON, S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 259-269, 2006.

CHEEMA, M. A. R., MAHMOOD, K., HALEEM, D. J., KHAN, R. A. Nootropic and Anti-anxiety Effects of Olive Oil: Relationship with Dopamine and Serotonin Metabolism. **J Nutraceuticals Food Sci**, v. 3, p. 4, 2018.

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

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 19, p. 1374-1380, 2008.

CORRÊA, N. C. F., CARVALHO JR, R. N., COSTA, C. E. F., FRANÇA, L. F. F., LANNES, S. C. S. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. **Food Research International**, v. 51.2, p. 841-847, 2013.

CROWE, K., SPIRO-LEVITT, C. Sleep-Related Problems and Pediatric Anxiety Disorders. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics**, 2020.

DAVISON, K., MKAPLAN, B. J. Food intake and blood cholesterol levels of community-based adults with mood disorders, **BMC Psychiatry**, v. 12, p. 1-8, 2012

DE OLIVEIRA, J. M., DE ALENCAR, E. R., BLUM, L. E. B., DE SOUZA FERREIRA, W. F., BOTELHO, S. D. C. C., RACANICCI, A. M. C., DA SILVA, C. R. Ozonation of Brazil nuts: Decomposition kinetics, control of *Aspergillus flavus* and the effect on color and on raw oil quality. **Food Science and Technology**, v. 123, p. 109106, 2020.

ENRÍQUIZ, G., SILVA, M. A., CABRAL, E. **Biodiversidade da Amazônia: usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Pará**. Belém: NUMA/UFPA, 2003.

ESTERIBAUER, H., & CHEESEMAN, K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxyonenal. **Enzymol**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FAN, C., FU, H., DONG, H., LU, Y., LU, Y., QI, K. Maternal n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation during pregnancy and lactation affects neurogenesis and apoptosis in adult offspring: associated with DNA methylation of brain-derived neurotrophic factor transcripts. **Nutrition Research**, v. 36, p. 1013-1021, 2016.

FERRAZ, A. C., DELATTRE, A. M., ALMENDRA, R. G., SONAGLI, M., BORGES, C., ARAUJO, P., LIMA, M. M. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes

beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**, v. 219, p. 116-122, 2011.

FLINT, J. Animal models of anxiety and their molecular dissection. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. V. 14, p. 37-42, 2003.

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

GOMES, S., FINOTELLI, P. V., SARDELA, V. F., PEREIRA, H. M., SANTELLI, R. E., FREIRE, A. S., TORRES, A. G. Microencapsulated Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake extract powder as an added-value functional food ingredient. **LWT**, v. 116, p. 108495, 2019.

GONZALES, E., BARRETT, D. W., SHUMAKE, J., GONZALEZ-LIMA, F., LANE, M. A. Omega-3 fatty acids improve behavioral coping to stress in multiparous rats. **Behavioural Brain Research**, v. 279, p. 129-138, 2015.

GREEN, P., HERMESH, H., MONSELISE, A., MAROM, S., PRESBURGER, G., WEIZMAN, A. Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 107-113, 2006.

GRILLON, C., ERNST, M. M. A way forward for anxiolytic drug development: Testing candidate anxiolytics with anxiety-potentiated startle in healthy humans. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 119, p. 348-354, 2020.

HANE BUTT, F. L., DEMMELMAIR, H., SCHIESSL, B., LARQUÉ, E., KOLETZKO, B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. **Clinical Nutrition**, v. 27, p. 685-693, 2008.

HARTMAN, L., LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-6, 1973.

HERRERA, E., ORTEGA-SENOVILLA, H. HENAR. Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development. **Clinical Lipidology**, v. 5, p. 899-911, 2010.

HEW, K. S., KHOR, Y. P., TAN, T. B., YUSOFF, M. M., LAI, O. M., ASIS, A. J., TAN, C. P. Mitigation of 3-monochloropropane-1, 2-diol esters and glycidyl esters in refined palm oil: A new and optimized approach. **LWT**, v. 139, p. 110612, 2021.

IMPEY, B., GORDON, R. P., BALDWIN, D. S. Anxiety disorders, post-traumatic stress disorder, and obsessive-compulsive disorder. **Medicine**, v. 44, p. 664-671, 2020.

INNIS, S. M.; ELIAS, S. L. Intakes of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids among pregnant Canadian women, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v 77, p 473-478, 2003.

JADOON, A., CHIU, C. C., MCDERMOTT, L., CUNNINGHAM, P., FRANGOU, S., CHANG, C. J., HUANG, S. Y. Associations of polyunsaturated fatty acids with residual depression or anxiety in older people with major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 136, p. 918-925, 2012.

JIANG, X., CHANG, M., JIN, Q., WANG, X. Application of phospholipase A1 and phospholipase C in the degumming process of different kinds of crude oils. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 432-437, 2015.

JUNIOR, E. S., WADT, L. H. O., SILVA, K. E., LIMA, R. M. B., BATISTA, K. D., GUEDES, M. C., GUILHERME, L. R. G. Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. **Chemosphere**, v. 188, p. 650-658, 2017.

KLUCZKOVSKI, A. M.; MARTINS, M.; MUNDIM, S. M.; SIMÕES, R. H.; NASCIMENTO, K. S.; MARINHO, H. A. Propriedades das castanhas do Brasil: uma revisão. **Revista Brasileira de Biotecnologia**, v. 14, p. 642-648, 2015.

LIMA, D. S., EGEA, M. B., CABASSA, I. D. C. C., DE ALMEIDA, A. B., DE SOUSA, T. L., DE LIMA, T. M., HERNANDES, T. Technological quality and sensory acceptability of nutritive bars produced with Brazil nut and baru almond coproducts. **LWT**, v. 137, p. 110467, 2020.

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

LOCATELLI, M; VIEIRA, A. H.; GAMA, M. M. B.; FERREIRA, M. G. R.; MARTINS, E. P.; FILHO, E. P. S.; SOUZA, V. F e MACEDO, R. S. **Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondônia. Sistemas de Produção**, 7 ISSN 1807-1805 Versão Eletrônica Jun./2005.

MADORE, C.; NADJAR, A.; DELPECH, J. C.; SERE, A. Nutritional deficiency n-3 PUFA during the perinatal period alters the innate immune system and the brain associated with neuronal plasticity genes. **Brain Behavioural Immunity**, v. 41, p. 22-31, 2014.

MELO, M. F. F. T. D., PEREIRA, D. E., MOURA, R. D. L., SILVA, E. B. D., MELO, F. A. L. T. D., DIAS, C. D. C. Q., SANTOS, S. G. D., SOARES, J. K. B. 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.

MENNITTI, L. V., OYAMA, L. M., SANTAMARINA, A. B., DO NASCIMENTO, O., PISANI, L. P. Influence of maternal consumption of different types of fatty acids during pregnancy and lactation on lipid and glucose metabolism of the 21-day-old male offspring in rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 135, p. 54-62, 2018.

MORAES DE BRITO, R. C., PEREIRA JUNIOR, J. B., FERNANDES DANTAS, K. D. G. Quantification of inorganic constituents in Brazil nuts and their products by

inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 116, p. 108383, 2019.

MORAIS, M.M.; PINTO, L.A.A.; ORTIZ, S.C.A.; CREXI, V.T.; SILVA, R.L., SILVA, J. D. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 60, p. 23, 2001.

MORETTO, E., FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. 2ed, Varela: Rio de Janeiro, 1989.

MORGANE, P. J., AUSTIN-LAFRANCE, R., BRONZINO, J., TONKISS, J., DIAZ-CINTRA, S., CINTRA, L., GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

MULLER, C. H. A Castanha-do-Brasil, estudos agronômicos. Belém: **EMBRAPA-CPATU**, 25f., 1981.

MÜLLER, C. P., REICHEL, M., MÜHLE, C., RHEIN, C., GULBINS, E., KORNHUBER, J. Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, p. 1052-1065, 2015.

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

NATACCI, L. C. **Associação entre consumo de ácidos graxos ômega-3 e transtorno de ansiedade: análise transversal do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil)**. 2018. 142p. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

NETO, O. Z. S., BATISTA, E. A. C., & DE ALMEIDA MEIRELLES, A. J. The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 866-875, 2018.

OAKS, B. M., YOUNG, R. R., ADU-AFARWUAH, S., ASHORN, U., JACKSON, K. H., LARTEY, A., SHAHAB-FERDOWS, S. Effects of a lipid-based nutrient supplement during pregnancy and lactation on maternal plasma fatty acid status and lipid profile: Results of two randomized controlled trials. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 117, p. 28-35, 2017.

PAPENFUSS, I., LOMMEN, M. J., GRILLON, C., BALDERSTON, N. L., OSTAFIN, B. D. Responding to Uncertain Threat: A Potential Mediator for the Effect of Mindfulness on Anxiety. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 77, p. 102332, 2020.

PERREIRA, D. E. **Efeitos do consumo da amêndoa e do óleo de baru (dipteryx alata vog.) Sobre parâmetros bioquímicos e de ansiedade em ratas tratadas durante a gestação e lactação**. 2018. 78p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

PRUT, L., BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

QUADROS, V. A., ROSA, L. V., COSTA, F. V., MÜLLER, T. E., STEFANELLO, F. V., LORO, V. L., ROSEMBERG, D. B. Involvement of anxiety-like behaviors and brain oxidative stress in the chronic effects of alarm reaction in zebrafish populations. **Neurochemistry International**, v. 129, p. 104488, 2019.

QUEIROZ, M. P., DA SILVA LIMA, M., DE MELO, M. F. F. T., BERTOZZO, C. C. D. M. S., DE ARAÚJO, D. F., GUERRA, G. C. B., SOARES, J. K. B. Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain. **Journal of affective disorders**, 243: 75-82, 2019.

RACHETTI, A. L. F.; ARIDA, R.M.; PATTI, C.L.; ZANIN, K.A.; FERNADES SANTOS, L.; FRUSSA-FILHO. R.; GOMES DA SILVA, S.; SCORZA, F.A.; CYSNEIROS, R.M. Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 283-289, 2012.

ROCKENBACH, I. I. et al. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*vitis vinifera* L. and *vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.

SANTOS, O. V. D., CORRÊA, N. C. F., CARVALHO JR, R. N., COSTA, C. E. F., LANNES, S. C. D. S. Yield, nutritional quality, and thermal-oxidative stability of Brazil nut oil (*Bertolletia excelsa* HBK) obtained by supercritical extraction. **Journal of Food Engineering**, v 117, p. 499-504, 2013.

SARIBURUN, E. et al. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry cultivars. **J. Food Sci**, v. 75, p. 328-335, 2010.

SILVA, A. F. **Efeito das etapas de processamento sobre a qualidade de castanhas-dobrasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.): avaliação da fração lipídica e contaminação por aflatoxina**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) apresentada à Universidade de São Paulo, 2014.

SINCLAIR, A., BEGG, D., MATHAI, M., WEISINGER, R. Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, p. 391-397, 2007.

SOARES, J. K., DE MELO, A. P., MEDEIROS, M. C., QUEIROGA, R. C., BOMFIM, M. A., SANTIAGO, E. C., GUEDES, R. C. 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, J. M. L. **Caracterização e efeitos do armazenamento de amêndoas com películas e despelculadas sobre propriedades das frações proteica e lipídica de castanha-do-Brasil**. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência e tecnologia de alimentos) apresentada a Universidade Federal de Pelotas, 2013.

SULIHATIMARSYILA, A. N., LAU, H. L., NABILAH, K. M., AZREENA, I. N. Production of refined red palm-pressed fibre oil from physical refining pilot plant. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 2, p. 100035, 2020.

TAHA, A. Y., ZAHID, T., EPPS, T., TREPANIER, M. O., BURNHAM, W. M., BAZINET, R. P., ZHANG, L. Selective reduction of excitatory hippocampal sharp waves by docosahexaenoic acid and its methyl ester analog ex-vivo. **Brain Research**, v. 1537, p. 9-17, 2013.

TERRA, V. C., ARIDA, R. M., RABELLO, G. M., CAVALHEIRO, E. A., SCORZA, F. A. The utility of omega-3 fatty acids in epilepsy: more than just a farmed tilapia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 69, p. 118-121, 2011.

THESING, C. S., BOT, M., MILANESCHI, Y., GILTAY, E. J., & PENNINX, B. W. Omega-3 and omega-6 fatty acid levels in depressive and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 87, p. 53-62, 2018.

VAN VELZEN, L. S., WIJDEVELD, M., BLACK, C. N., VAN TOL, M. J., VAN DER WEE, N. J., VELTMAN, D. J., SCHMAAL, L. Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 76, p. 140-144, 2017.

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

VERLY-MIGUEL, M. V. B., FARIAS, D. R., PINTO, T. D. J. P., LEPSCH, J., NARDI, A. E., KAC, G. Serum docosahexaenoic acid (DHA) is inversely associated with anxiety disorders in early pregnancy. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 30, p.34-40, 2015.

WAH, D. T. O., KAVALIERS, M., BISHNOI, I. R., OSSENKOPP, K. P. Lipopolysaccharide (LPS) induced sickness in early adolescence alters the behavioral effects of the short-chain fatty acid, propionic acid, in late adolescence and adulthood: examining anxiety and startle reactivity. **Behavioural Brain Research**, v. 360, p. 312-322, 2019.

WILSON, N. A., MANTZIORIS, E., MIDDLETON, P. T., MUHLHAUSLER, B. S. Gestational age and maternal status of DHA and other polyunsaturated fatty acids in pregnancy: A systematic review. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 144, p. 16-31, 2019.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 1573-1580, 2009.

YOCKEY, J., HENRY, M. Simulation Anxiety across the Curriculum. **Clinical Simulation in Nursing**, v. 29, p. 29-37, 2019.

YOUNG, G., CONQUER, J. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 1-28, 2005.

ZHISHEN, J. et al. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados como artigo científico e foi submetido de acordo com as normas da revista.

Brazil nut oil (*Bertholletia excelsa*) induces anxiolytic-like behavior and reduces cerebral lipid peroxidation in the offspring of rats treated early in life

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the impact during pregnancy and lactation of maternal consumption of crude (raw) and refined Brazil nut oil on anxiety behavior and cerebral lipid peroxidation in the offspring of rats. The pups were divided into six groups with male puppies (M) with female puppies (F): controls (CG-M and CG-F) – were treated with distilled water; crude (raw) oil treatments (CO-M and CO-F), and refined oil treatments (RO-M and RO-F) - treated with 3000 mg/kg of animal weight. The mothers were treated from the 7th day of pregnancy and throughout lactation. Anxiety behavior was observed in the offspring during adolescence using: Elevated Plus Maze (EPM), Open Field (OF), and Light-Dark Box (LDB). Malondialdehyde (MDA) levels were measured in the pups' tissues, and the data were analyzed using way, Anova followed by Tukey's test ($p < 0.05$). The RO-M/RO-F groups presented a greater number of entries into the open arms and Elevated Maze; both CO-F and RO-F spent more time in the open arms. CO-M/CO-F moved more and performed less grooming in the OF; while the CO-M/COF and RO-M/RO-F remained longer in the Light-Dark Box lighted compartment but with a greater number of transitions. Greater effect on female offspring. There were lower concentrations of cerebral MDA in the CO-M/CO-F and RO-M/RO-F groups. Maternal ingestion of Brazil nut oil induced decreases in both anxiety and brain lipid peroxidation parameters of the male and female offspring.

Keywords: Fatty acid, Neurodevelopment; Almond.

1 INTRODUCTION

During the fetal period and the first years of postnatal life, the brain grows rapidly and is particularly sensitive to external factors such as: nutrition, social stimulation, and stress (FAN et al.; 2016). This period is known to be critical for brain development (MORGANE et al., 1993). Maternal fatty acid supply is considered fundamental for structural lipid membrane synthesis and normal growth, as well as for cellular function and development of differing systems and organs of the fetus (MENNITTI et al.; 2018). For optimal fetal and infant growth, consumption of adequate amounts of essential fatty acids is necessary during pregnancy and lactation (OAKS et al., 2017).

Lipids are easily transferred to offspring through the placenta and breast milk. However, essential fatty acids (linoleic and linolenic) cannot be produced by the body and must be supplied in the maternal diet (HANE BUTT, et al., 2008; HERRERA and ORTEGA 2010). Adequate maternal consumption of these fatty acids determines the quantity and quality of fatty acids that will be accumulated in the offspring's brain tissue (QUEIROZ et al., 2019).

Approximately 60% of the brain's dry weight comes from lipids and approximately 30% of these lipids are polyunsaturated fatty acids (PUFAS), which may explain these nutrients' ability to act in both the development, and in prevention and treatment of psychiatric or neurodegenerative diseases (TERRA et al., 2011; TAHA et al., 2013). Maternal PUFA consumption is recognized for promoting brain plasticity and adequate cognitive function in offspring (WILSON et al., 2019).

Deprivation of these essential fatty acids may increase the expression of anxiety-like behaviors due to dysfunctions in the brain's monoaminergic transmitting systems involving stress-mediating neuropeptides, or due to neurotropic factors and deregulation of hippocampal neurogenesis (MULLER et al., 2015). In addition, for consuming great amounts of oxygen, the brain is vulnerable to oxidative stress (VAN VELZEN et al., 2017).

Oxidative damage affects cell structures, neurotransmission, and transduction signaling pathways (QUADROS et al., 2019), induces cell death, and increases susceptibility to neurodegenerative diseases, depression and anxiety (BARBOSA et al., 2018). This is due to the formation of pro-inflammatory molecules, such as malondialdehyde and 4-hydroxynonenal (BAKUNINA et al., 2015). Cellular antioxidant defenses modulate reactive oxygen species levels to maintain redox status (QUADROS et al., 2019); consumption of essential fatty acids does this as well (QUEIROZ et al., 2019).

Study has demonstrated that consumption of goat's milk fat in adult rats induces a reduction in oxidative stress in brain tissue, and is associated with a reduction in anxiety-like behavior (Barbosa et al., 2018). Research has also shown that conjugated linoleic acid supplementation in rats during pregnancy and lactation induces both an anxiolytic effect and decreased oxidative stress in the offspring's brain tissue (QUEIROZ et al., 2019).

The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*), native to the Amazon region (MORAIS DE BRITO et al, 2019) is a source of essential fatty acids and consumed worldwide due to

its high energy content, and since it is a good source of nutrients (SILVA, 2014; JUNIOR et al., 2017). The Brazil nut is widely used in culinary and cosmetics (BERENGUEL, et al., 2018), as well as in production of oils, cereal bars, and cookies (MORAIS DE BRITO et al, 2019). Brazil nut (or *Castanha de Pará*) oil is a source of unsaturated fatty acids with a predominance in PUFAs, ~ 75%, and presents antioxidant properties which are responsible for modulation of both the immune system and inflammatory processes (SANTOS et al., 2013; NETO et al., 2018). In view of the above, our research aimed to investigate the impact of maternal consumption of raw and refined Brazil nut oil during pregnancy and lactation on both anxiety behaviors and brain and liver lipid peroxidation in rat offspring.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Brazil nut oil extraction and refining

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) were purchased in a public market in the city of João Pessoa - Paraíba. To obtain the raw oil, cold extraction technique was used with the aid of a manual press with a capacity of 680 kg. For refining, the raw oil was subjected to successive stages of degumming, neutralization, washing, and drying (MORETTO and FETT, 1989; MORAIS et al., 2001).

The degumming of the raw Brazil nut oil was carried out by adding water (3mL per 100mL) with subsequent heating to 60°C under stirring for 30 minutes. The degummed oil was neutralized with aqueous sodium hydroxide solution (5g per 100mL) at a temperature of 50°C and stirring for 30 minutes. After neutralization, the mixture was centrifuged at 5000 rpm for 15 minutes, and five successive washes were performed. Finally, the oil was dried on a rotary evaporator at 60°C with vacuum pressure for 20 minutes with moderate stirring, then cooled and stored in amber glass at 10°C.

2.2 Antioxidant content analyses of the raw and refined Brazil nut oils

The antioxidant capacities of the oils, both raw and refined, were analyzed using the ABTS and FRAP methods. They were also analyzed for total phenolic and flavonoid components (**Table 1**).

Table 1 - Antioxidant values for raw and refined Brazil nut oil

Values expressed as Standard Deviation ($\pm$ SD) ANOVA. Different letters between columns signify differences between oils ($p < 0.05$). Total flavonoids and phenolics expressed in mg/100g of oil; ABTS and FRAP expressed in μmol trolox TEAC/g oil.

2.3 *In vitro* antioxidant activity - FRAP method

To determine the antioxidant activity, the methodology described by Benzie and Strain (1996), as adapted by Rockenbach et al. (2011) was used. For analysis, 200 μL of each oil was added to 1800 μL of the FRAP reagent in a test tube and taken to a water bath at 37°C for 30 minutes. A blank was also made for each oil, without the extract added. The absorbances were measured in a spectrophotometer (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brazil) at 593 nm. To determine the antioxidant activity (FRAP), the Trolox calibration curve was used and the results were expressed in μmol of trolox/g of sample.

2.4 *In vitro* antioxidant activity - ABTS method

The ABTS method was performed according to the Sariburun et al. (2010) methodology

	Total flavonoids	Total phenolics	ABTS	FRAP
Raw oil	1.18 ± 0.01^a	1.78 ± 0.01^a	0.12 ± 0.00^a	0.85 ± 0.00^a
Refined oil	1.17 ± 0.01^a	0.10 ± 0.00^b	0.10 ± 0.01^b	0.57 ± 0.01^b

with some modifications. Initially, the ABTS radical was formed. Once the radical was formed, it was diluted in distilled water to obtain an absorbance value of 0.800 (± 0.020) at 734 nm. Four different dilutions were prepared from each oil in triplicates. In a dark environment, an aliquot of 100 μL of each extract was transferred to a test tube and 500 μL of the ABTS radical was added. Afterwards, the test tubes were kept in the absence of light for 6 minutes. Reading was then performed at 734 nm in a spectrophotometer (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brazil). A control solution was also made, which consisted of an aliquot of 100 μL of the extracting solvent plus 500 μL of the ABTS radical. The blank solution was the extracting solvent for each extract, and used to reset the spectrophotometer. Trolox was used as a reference and the results expressed in μM trolox/g of sample. The IC_{50} was also calculated using the equation of the plotted line through the results containing the concentration values (mg/mL), used on the X axis, and the percentages of protection found on the Y axis.

2.5 Total Phenolic Compounds

To determine the total phenolic compounds content in the raw and refined oil samples, the methodology described by Liu et al. (2002) was used with certain modifications. Thus,

250 μ L of each sample was mixed in a test tube with 1250 μ L of 10% Folin-Ciocalteu reagent, the solutions were vortexed, and then stored at room temperature (23°C) in the absence of light for 6 minutes. Afterwards, 1000 μ L of 7.5% sodium carbonate solution was added. The mixture was taken to a water bath at a temperature of 50°C, for 5 minutes. Absorbance was then measured at 765 nm using a spectrophotometer (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brazil). A blank was also performed in (absence of extracts) to reset the spectrophotometer. The total phenolic compounds content in the samples was determined using a standard curve prepared with gallic acid. The results were expressed in gallic acid equivalents (GAE) per hundred grams of sample (mg GAE/100 g).

2.6 Total Flavonoids

The total flavonoids content was determined according to the method proposed by Zhishen et al. (1999). A 0.5 ml aliquot of each oil was added to 2 ml of distilled water in a test tube. Then, 150 μ L of 5% sodium nitrite was added. After 5 minutes, 150 μ L of 10% aluminum chloride was added, and after 6 minutes 1 ml of 1 M sodium hydroxide was added, followed by 1.2 ml of distilled water. Absorbance was then measured at 510 nm using a spectrophotometer (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brazil) against a blank in the absence of extracts. The total flavonoids content was determined using a standard catechin equivalents (EC) curve. The results are expressed in catechin equivalents (CE) per hundred grams of sample (mg EC/100 g).

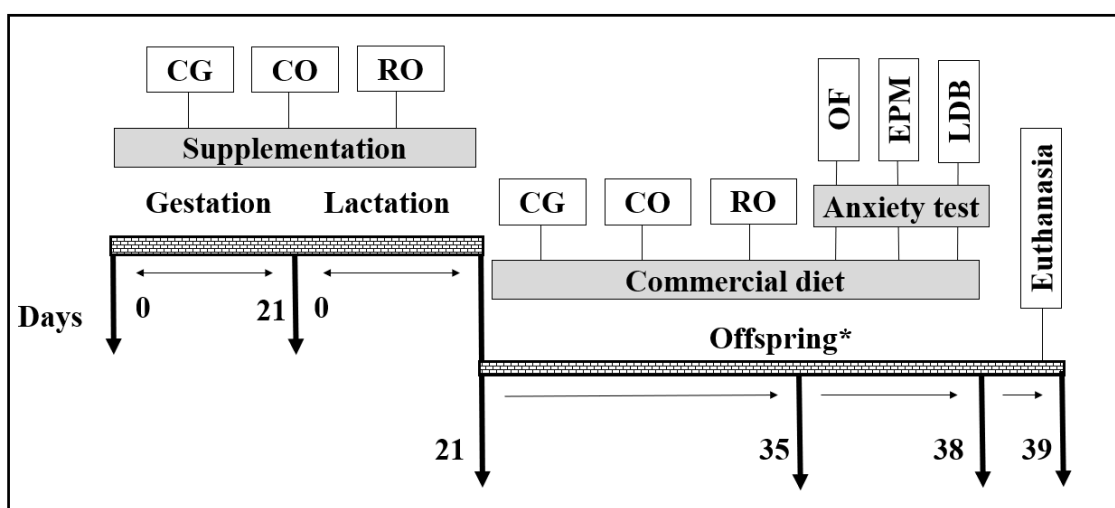
2.7 Animals and diet

Female Wistar rats from the breeding facility of the Federal University of Pernambuco (UFPE), aged between 90 and 120 days and weighing 250 ± 50 g were used to obtain the offspring. The rats were mated and kept in the ratio of one female to each male. After confirmation of pregnancy, through vaginal smear, the pregnant rats were housed in individual polypropylene maternity cages, in standard conditions: temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$, with a 12 h light-dark cycle (start of the light phase at 6: 00 h), humidity of $\pm 65\%$, and received feed and water ad libitum. The females received a commercial diet of Nuvilab® brand and Brazil nut oil by gavage, offered during pregnancy and throughout lactation. Three groups were formed: the Control Group (CG) that received distilled water; the Crude (raw) Oil Group (CO), and the Refined Oil Group (RO), which were both treated with 3000 mg of Brazil nut oil/kg of animal weight.

This dosage was defined based on a study carried out by Torres et al. (2016), using 3000 mg of pequi oil/kg of animal weight as supplementation, yielding both anti-inflammatory and antioxidant effects.

After weaning (21 days postnatal), the offspring received a commercial Nuvilab® diet throughout the experiment. The litters were standardized at 8 pups, where preferably 4 were females and 4 males; no litter was kept without the presence of males and females. For each group, we used: Control - CG-M and CG-F (13 males and 11 females), Crude Oil - CO-M and CO-F (12 males and 12 females), and Refined Oil - RO-M and RO -F (14 males and 15 females) (**Figure 1**).

Figure 1 - Experimental protocol



CG – Control; CO – Crude Oil; RO – Refined Oil. *Divided in males and females. FO – Open field; EPM – Elevated plus maze; LDB – Light-dark box. Euthanasia – Brain collection day for analysis of malonaldehyde.

The research was conducted in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals, and was submitted to and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals - CEUA of the Rural Health and Technology Center - CSTR/UFCG, protocol number 09/2020.

2.8 Body weight and maternal food consumption

The body weights and feed consumption of the pregnant and lactating rats were measured weekly on a Balmak® digital electronic scale (model ELP - 10, Santa Bárbara do Oeste/SP, Brazil), with a range of 20 to 10,000 g.

2.9 Behavioral tests

2.9.1 The Elevated Plus Maze (EPM) apparatus

The EPM is commonly used as an unconditioned model for anxiety in rodents (FLINT, 2003; BRADLEY et al., 2007). The EPM is an apparatus formed by two closed arms measuring 50 cm x 10 cm each and two open arms measuring 50 cm x 10 cm each, perpendicular to the first ones; and a 10 cm x 10 cm central area raised 50 cm from the ground. The animal was placed in the center of the device, always by the same researcher, with its muzzle facing the right closed arm. For 5 minutes, the frequency of entries into the closed and open arms, and the time spent in each arm and in the center of the device was analyzed. In addition, the number of the animal's head dips into the open arms was also counted.

2.9.2 The Open Field (OF) apparatus

The Open Field (OF) apparatus is an instrument to test anxiety behavior and exploratory activity; verifying the effects of unfamiliar environments on emotionality in rats (PRUT and BELZUNG, 2003). The apparatus used consisted of a uniformly lit black square box, measuring 60 x 60 x 60 cm, subdivided into 9 quadrants measuring 20 x 20 cm. The test was carried out with the offspring during adolescence (at 35 days from birth), where each animal was inserted in the center of the device and observed for 10 minutes. The following parameters were evaluated: ambulation (number of crossings of the segments by the animal with all four legs), number of rearing behaviors, self-cleaning behaviors

(grooming time), and defecation (recorded through the number of fecal boluses) (NAVA-MESA et al., 2013).

2.9.3 The Light-Dark Box (LDB)

The light-dark transition box is used to assess unconditioned anxiety and exploratory behavior in rodents (BOURIN and HASCOËT, 2003). The device was made of wood and covered with a waterproof material, presenting total dimensions of (45 X 27 X 27 cm) divided into two compartments, one dark (18 X 27 cm), the other light (27 X 27 cm). In the partition between the two compartments there is a central opening measuring 7.5 cm × 7.5 cm. The animals were placed in the center of the lighted compartment, with its muzzle facing the dark compartment, being kept in the device for 5 min for free exploration. The evaluated behavior was the time the animal stayed in each compartment.

At the end of each behavioral session, the devices were cleaned with a 10% alcohol solution and all sessions were filmed and subsequently analyzed.

2.10 Determination of cerebral lipid peroxidation - Malondialdehyde (MDA)

The samples were suspended and homogenized in Tris-HCl 1: 5 (w/v) buffer and homogenized for 15 seconds. The resulting suspension was homogenized for 2 minutes at 2500g and 4°C for 10 minutes. The supernatants were used to determine the MDA content and the results were expressed in nmol g⁻¹ (ESTERBAUER and CHEESEMAN, 1990).

2.11 Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SEM. The Shapiro-Wilk normality test was applied and analyzed by two-way ANOVA: (CT/CO/RO) x (male and female) followed by a Tukey multiple-band test, when appropriate, and the two-way test; considering p < 0.05 statistically significant.

3 RESULTS

3.1 Body weight and maternal food consumption

There was no statistical difference in body weights and maternal food consumption between the groups during pregnancy or lactation (p > 0.05) (**Table 2**).

Table 2 - Body weight and maternal food consumption during pregnancy and lactation

CG - Control; CO - Crude oil; RO - Refined oil. Values expressed as Standard Deviation ($\pm$ SD) ANOVA. Different letters between lines signify differences between groups ($p < 0.05$).

3.2 Behavioral Tests

3.2.1 Elevated Cross Maze

When analyzing the number of entries into the open arms and head dives, the RO-M and RO-F presented higher numbers relative to the CG-M/CG-F results ($p < 0.05$) (**Figure 2A, 2B, 2E and 2F**). The CO-F and RO-F groups spent more time in the open arms compared to the CG-F ($p < 0.05$) (**Figure 2D**), whereas the RO-M group spent more time than the CG-M and CO-M ($p < 0.05$) (**Figure 2C**).

The only difference between genders in the parameter for time spent in the open arms occurred in the CO group, where females remained longer in the open arms as

Gestation						
	Body weight			Food consumption		
	CG	CO	RO	CG	CO	RO
Start	211 $\pm$ 12.7 ^a	216 $\pm$ 16 ^a	216 $\pm$ 5.7 ^a	132 $\pm$ 3.11 ^a	130 $\pm$ 9.86 ^a	128 $\pm$ 3.05 ^a
Final	261 $\pm$ 30 ^a	260 $\pm$ 15 ^a	262 $\pm$ 18.2 ^a	155 $\pm$ 11.01 ^a	146 $\pm$ 5.65 ^a	152 $\pm$ 19.8 ^a

Lactation						
	Body weight			Food consumption		
	CG	CO	RO	CG	CO	RO
Start	228 $\pm$ 11.3 ^a	225.3 $\pm$ 10 ^a	224 $\pm$ 2.8 ^a	248 $\pm$ 4.94 ^a	240 $\pm$ 15.17 ^a	243 $\pm$ 7.72 ^a
Final	246.6 $\pm$ 22 ^a	250 $\pm$ 5.6 ^a	249.4 $\pm$ 6.4 ^a	342 $\pm$ 11.31 ^a	340 $\pm$ 30.61 ^a	343 $\pm$ 27.19 ^a

compared to males in their respective group ($p < 0.05$).

3.2.2 Open Field

There was greater locomotion in the CO-M/CO-F and RO-M/RO-F groups in relation to their respective CG-M/CG-F control groups (**Figures 3A and 3B**) ($p < 0.05$). The number of rearings was higher in the RO-M/RO-F groups as compared to their respective control groups, ($p < 0.05$) (**Figure 3C and 3D**), with a greater number of rearings in the CO-M/CO-F groups as compared to all other groups. The CO-M/CO-F and RO-M/RO-F

groups performed less grooming than their respective control groups (**Figures 3F and 3F**) ($p < 0.05$).

Regarding the differences between the genders in the same groups, the females presented greater locomotion in the CO and RO groups ($p < 0.05$).

3.2.3 Light-Dark Box

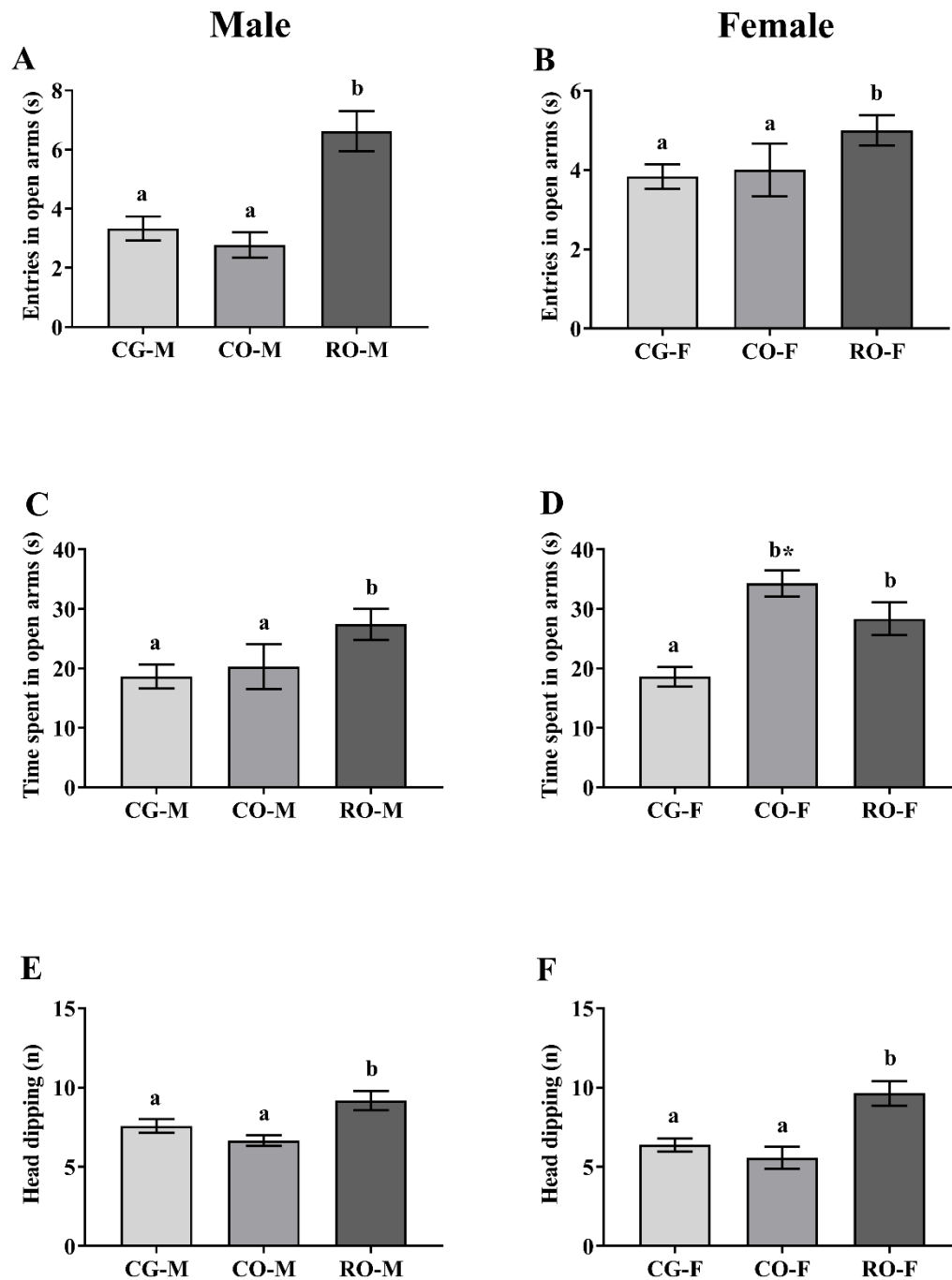
When time in the light, and the number of transitions were analyzed, the values were higher for the CO-M/CO-F and RO-M/RO-F groups than the CG-M/CG-F groups (**Figure 4A, 4B, 4C and 4D**) ($p < 0.05$). RO group females spent more time in the lighted area than did the males ($p < 0.05$).

3.3 Determination of cerebral lipid peroxidation - Malondialdehyde (MDA)

Lower concentrations of cerebral malondialdehyde were determined in the CO-M/CO-F and RO-M/RO-F groups as compared to their respective CG-M/CG-F control groups (**Figures 5A and 5B**) ($p < 0.05$).

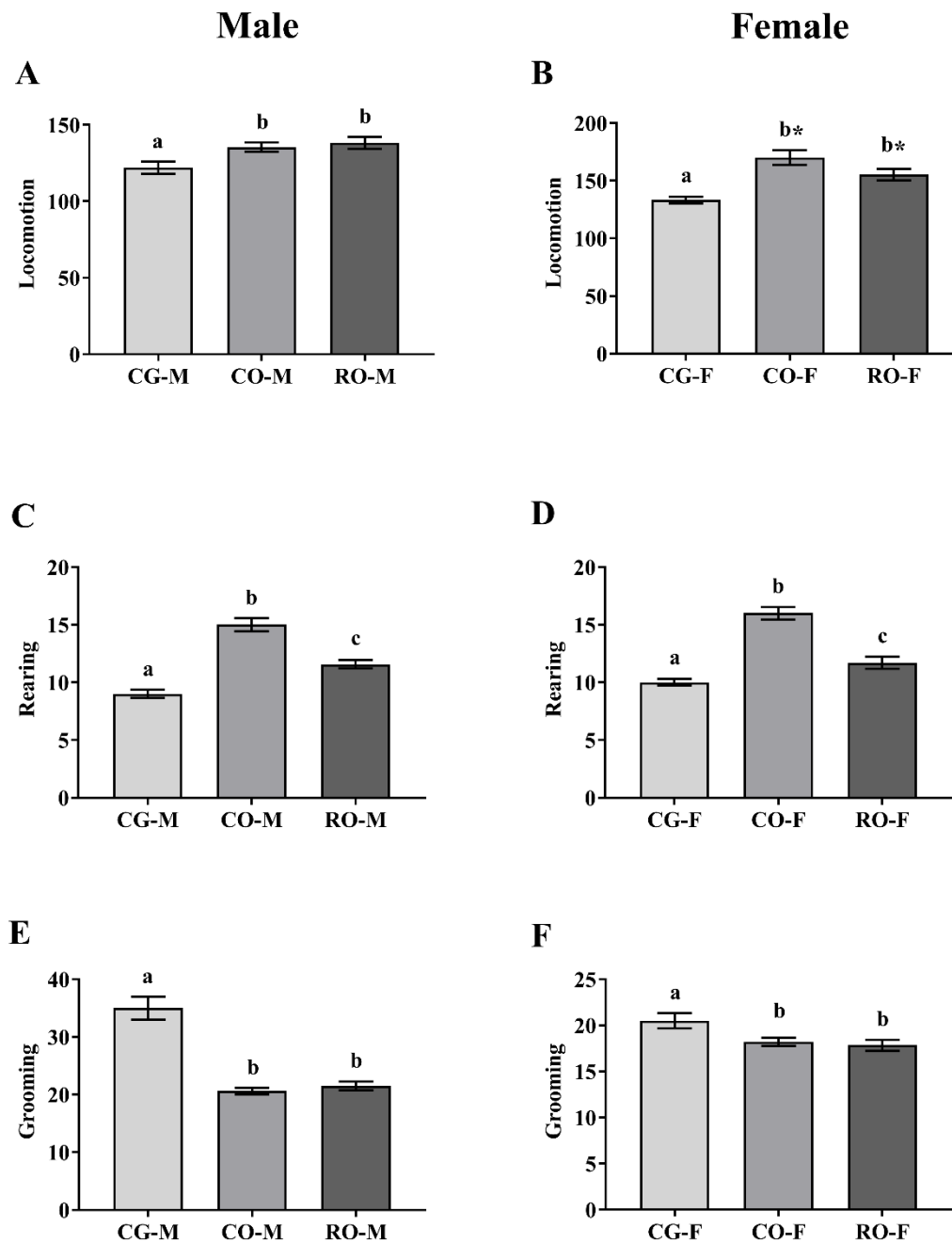
For gender differences, as compared to the females, the males presented a lower indicator of cerebral lipid peroxidation ($p < 0.05$).

Figure 2 – Elevated plus-maze test for offspring of rats supplemented with raw and refined Brazil nut oil during pregnancy and lactation



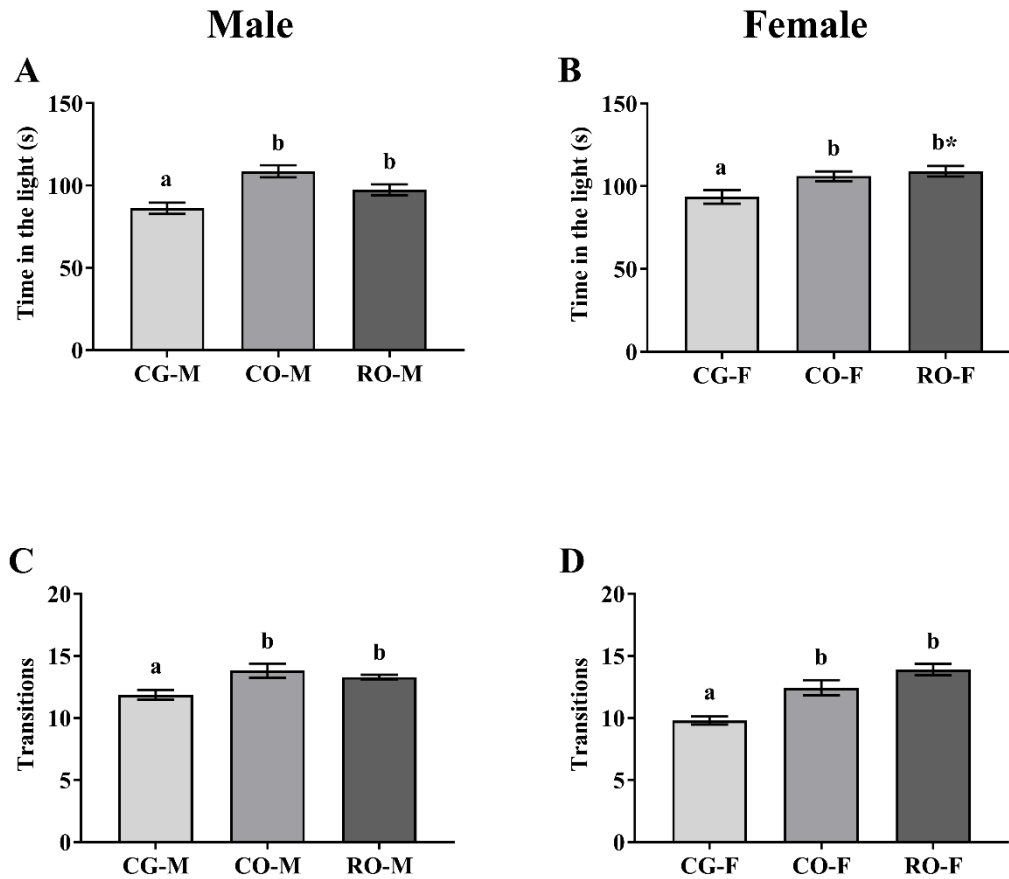
Control (CG-M = 13, CG-F = 11); Crude oil (CO-M = 12, CG-F = 12); Refined oil (RO-M = 14, RO-F = 15). A-B = Number of entry into the open arms; C-D = Time spent in the open arms; E-F = Head dives. Values expressed as Standard Error Mean ($\pm$ SEM) ANOVA. Different letters between bars signify differences between groups ($p < 0.05$). * Significant difference between the male and female genders ($p < 0.05$).

Figure 3 – Open field test for offspring of rats supplemented with crude and refined Brazil nut oil during pregnancy and lactation



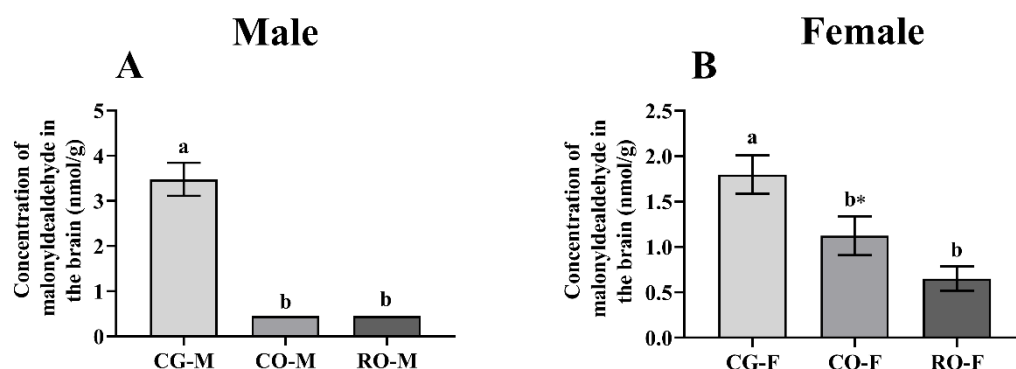
Control (CG-M = 13, CG-F = 11); Crude oil (CO-M = 12, CG-F = 12); Refined oil (RO-M = 14, RO-F = 15). A-B = Locomotion; C-D = Rearing; E-F = Grooming. Values expressed as Standard Mean Error ($\pm$ SEM) ANOVA. Different letters between bars signify differences between groups ($p < 0.05$). * Significant difference between the male and female genders ($p < 0.05$).

Figure 4 - Light-dark box test for offspring of rats supplemented with crude and refined Brazil nut oil during pregnancy and lactation



Control (CG-M = 13, CG-F = 11); Crude oil (CO-M = 12, CG-F = 12); Refined oil (RO-M = 14, RO-F = 15). A-B = Time in the Light; C-D = Transitions. Values expressed as Standard Mean Error ($\pm$ SEM) ANOVA. Different letters between bars signify differences between groups ($p < 0.05$). * Significant difference between the male and female genders ($p < 0.05$).

Figure 5 - Concentration of malondialdehyde (MDA) in the offspring of rats supplemented with crude and refined Brazil nut oils during pregnancy and lactation



Control (CG-M = 13, CG-F = 11); Crude oil (CO-M = 12, CG-F = 12); Refined oil (RO-M = 14, RO-F = 15). A-B = Brain. Values expressed as Standard Mean Error ($\pm$ SEM) ANOVA. Different letters between bars signify differences between groups ($p < 0.05$). * Significant difference between the male and female genders ($p < 0.05$).

4 DISCUSSION

In the present study, maternal supplementation with raw and refined Brazil nut oil during pregnancy and lactation induced anxiolytic effect in both the male and female offspring. To obtain these data we used the Elevated Plus Maze (EPM), Open Field (OF), and Light-Dark Box (LDB).

During the prenatal and postnatal periods, metabolic changes are crucial to formation of fetal/offspring tissue and it is necessary to adjust for nutritional lipid demands (PARK and EICHER-MILLER, 2014). During lactation, fatty acids are transferred throughout pregnancy to the fetus via the placenta and breast milk. Essential fatty acids are needed from the maternal diet and deficiencies affect the neurodevelopment of the offspring (LAURITZEN and CARLSON 2011; INNIS et al., 2014; DE MELO et al., 2017); causing changes such as anxiety, throughout the postnatal phase (SOARES et al 2013).

Lipids stand out due to their direct relationship with brain genesis processes (MADORE, 2014), and their composition directly influences subjective perception, mood, and emotional behavior (MÜLLER et al., 2015). Polyunsaturated fatty acids are vital to these processes (INNIS and ELIAS, 2003; RACHETTI, 2012).

Many biochemical mechanisms can explain the association between PUFA's and anxiety (YOUNG and CONQUER, 2005). EPA and DHA are integral components of the

phospholipid bilayer in neuronal cell membranes, making them relevant to the physiology and neurotransmission of membranes (GONZALES et al., 2015).

DHA is essential for normal neurological function and accumulates rapidly during brain development (GREEN et al., 2006; CHEN, 2013) being associated with neuronal membrane stability, and transmission of serotonin and dopamine (CHALON, 2006). It also possesses anti-inflammatory properties which help to relieve anxiety associated with a hyperactive immune system (YOUNG and CONQUER, 2005), while modulating neurological function through neurotransmission, neurogenesis and myelination (THESING et al., 2018).

EPA is not concentrated in neural membranes, but it can affect their function through neuro-immunological effects (SINCLAIR et al., 2007) antagonizing omega 6 PUFAs and arachidonic acid, and reducing the prostaglandin synthesis (JADOON et al., 2012) and thus increasing cerebral blood flow (BUYDENS-BRANCHE et al., 2008).

Anxiety in animals can be assessed using various behavioral tests. The most often used test is the Elevated Plus Maze (EPM), which generates a conflict between the animal's desire for safety in the closed arms and the desire to explore new environments in the open arms (PELLOW and FILE, 1985). In the present study, using the EPM, the offspring of mothers who received a diet containing the Brazil nut oil presented a reduction in anxiety in the parameters analyzed. The animals in the RO-M and RO-F groups entered the open arms more often and performed more head dive entries. The CO-F, RO-F and RO-M groups spent more time in the open arms. A similar result was observed when animals were tested in an EPM after having been treated with goat's milk fat with high levels of conjugated linoleic acid (CLA) during lactation (Soares et al., 2013), (the male offspring stayed longer in the open arms). Another study observed that male offspring treated with a CLA mix during pregnancy and lactation stayed longer in the open arms and in the central area (Queiroz et al., 2019). Conjugated linoleic acid is a polyunsaturated fatty acid, just like those found in the Brazil nut oil used in this research.

Anxiogenic behavior has been observed in male rats, at 8 and 16 weeks old, treated with palmitic acid, when they spent less time in the open arms of the EPM (MOON et al., 2014). A decrease in the number of open arm entries in the offspring of rats treated with hydrogenated coconut oil during the perinatal period has also been observed (AUGUSTE et al., 2018). Glendining et al. (2018) supplemented rats with a diet rich in lard during pregnancy and lactation and observed anxiogenic behavior in the offspring, with a significant sex related effect, with males spending less time in the open arms of the EPM

than the females. Lard fats are a source of saturated fatty acids, while coconut oil is deficient in essential fatty acids, and may compromise the offspring's brain function/ This was demonstrated by Chen and Su (2013), when animals treated with a deficient omega-3 diet during lactation, presented a decrease in hypothalamic DHA levels. DHA deficiency induces deregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, with a consequent anxiogenic response in the offspring upon reaching adulthood. These findings confirm that the supply of essential fatty acids during the early stage of life, such as those present in the oil of the Brazil nut, are important to ensure good brain function in the offspring and also induce anxiolytic behavior.

To assess anxiety parameters, we also used the Open Field (OF) in this research. The OF consists of a square arena where the locomotor activity of the rodents can be evaluated to verify the effects of unfamiliar environments on emotionality in rats (PRUT and BELZUNG, 2003). In the present work, greater locomotion was verified in the CO-M/CO-F and RO-M/RO-F groups, and a greater number of rearings in both the OR-M/OR-F groups as compared to their respective control groups (and in the CO-M/CO-F groups when compared to all of the groups). The CO-M/CO-F and RO-M/RO-F groups performed less grooming. An increase in rearing indicates greater exploratory activity a consequence of anxiety reduction. Grooming reductions indicate anxiolytic-like behavior (BROWM et al., 1999). Cheema et al., (2018) supplemented male rats with olive oil and observed an anxiolytic effect, revealed through increased exploratory activity in the open field. The opposite result was observed by Wright et al., (2011) who investigated the effects of a cafeteria diet during pregnancy and lactation and found anxiogenic behavior only in the male offspring, through a decrease in rearing behavior. Another study reported anxiogenic behavior in the offspring of rats supplemented with a diet rich in lard and soy oil. The offspring spent less time in the central area of the open field, (a more significant effect in males than in females) (SASAKI et al., 2013). Winthers et al., (2018) observed that male pups of rats which consumed lard during pregnancy and throughout lactation ventured shorter distances in the OF as compared to the female pups.

Auguste et al., (2018) analyzed a deficient omega-3 diet, and a diet rich in saturated fat (coconut oil) during the perinatal period. The animals were exposed to the open field and it was observed that the consumption of both diets induced a smaller number of entries and time spent at the center of the OF, which characterizes anxiogenic behavior. The cafeteria diet contains high caloric density, is a source of refined sugars and fats though deficient in essential fatty acids. This deficiency was also found in the

diets used by Auguste et al., (2018). Basak et al. (2020) reported that low omega-3 consumption induces a decrease in the neuropeptide-y-1 receptor and an increase in glucocorticoid receptor levels in the cognitive frontal cortex affecting the immune and metabolic processes, and thus causing stress and anxiety further on. This affirms the importance of consuming foods rich in polyunsaturated fatty acids, sources of essential fatty acids, such as the oil of the Brazil nut tested in this research and offered to rats during pregnancy and lactation, with anxiolytic-like effects being observed in the offspring.

The present work also used the light-dark box (LDB). The animal's exposure to the light-dark box, which is divided into two compartments, one light and one dark, and aims to assess the animal's aversion to the lighted compartment; the less time the mouse spends in the lighted area, the greater its anxiety. In the results of the present research, we observed longer times spent in the lighted compartment and a high frequency of compartment transitions in the groups CO-M/CO-F and RO-M/RO-F. Queiroz et al., (2019) supplemented rats with CLA during pregnancy and lactation and observed a greater number of transitions in the male offspring, yet with no difference in the time spent in the lighted compartment. A diet rich in saturated fat (lard) was administered to rats during pregnancy and lactation, and resulted in less time spent in the LDB lighted zone by the male offspring, but with no statistical difference noted for the female offspring (Sasaki et al., 2014).

Wintler et al. (2019) evaluated the effect of a (so-called) diet rich in saturated fat (lard) and refined carbohydrate (sucrose and maltodextrin) during pregnancy and lactation on the anxiety of female offspring, observing that these spent less time in the lighted part of the light-dark box, indicating an anxiogenic effect. Sharma et al., (2012) affirms that a diet rich in saturated fat induces metabolic dysfunction, promotes cognitive alterations, increases concentrations of IL-1 and IL-6 (cytokines associated with inflammation), and those of TNF in the hypothalamus and amygdala as well (ALMEIDA-SUHETT et al., 2017; NORONHA et al., 2019), damaging healthy neural cells and causing an accumulation of senescent glial cells in the frontal cortex. The diet is also associated with behavioral abnormalities such as anxiety and oxidative stress (Yang et al., 2020).

Anxiety-related behavior assessed in rodents can also be affected by sex hormones and depends on androgenic signaling (JONES and WATSON et al., 2005). Symptoms increase from the onset of puberty (BOIVIN et al., 2017) and females are twice as likely to experience this disorder than males (MICHENRY et al., 2014; DOMONKOS et al.,

2018). This difference is suggested as due to the potential of sex hormones in the disease etiology (MICHENRY et al., 214). Yet, it seems that this “difference” points in the opposite direction (DOMONKOS et al., 2018). Brown et al. (2015) observed that male rats spent less time in the lighted compartment of the Light-Dark Box than female rats. Corroborating the data found in this research, where females present greater anxiolytic behavior than males in the Elevated Plus Maze (EPM), Open Field (OF), and Light-Dark Box (LDB) tests.

Estradiol and progesterone (female hormones) may be related to the decreased anxiety-like behavior exhibited by females as compared to the males (FREYE et al., 2000; BOIVIN et al., 2017), this, in several behavioral models, including labyrinth in elevated cross and open field (GALEEVA and TUOHEMANA, 2001; FREYE and WALF, 2002). Domonkos et al., 2018 and Scholl et al., (2019) reported that females spent more time in the open arms of the labyrinth, associating this with both anxiolytic behavior and less oxidative stress compared to males.

Oxidative stress (OS) is a condition caused pro-oxidant - antioxidant alterations (NASUTION et al., 2020), which cause an imbalance in reactive oxygen species (ROS's) production (KODAVANTI et al., 2021). Oxidative stress is the cause of many health problems involving cardiovascular diseases, aging, inflammation, and cancer. It also affects cell structures and transduction signaling pathways (SASHOO et al., 2020; QUADROS et al., 2019), bringing imbalances to the physiological mechanisms that regulate anxiety (BOUAYED and SOULIMANI, 2019; KHAN et al., 2019; GUNEY et al., 2017).

Due to its high oxygen consumption, its rich content of unsaturated fatty acids, and its weak antioxidant defenses, the brain is more susceptible to oxidative damage than other organs (BATANDIER et al., 2020). This can result in altered neuronal function (STEENKAMP et al., 2017). In neurodegenerative diseases involving increased oxidative stress, neurons in the amygdala and cerebral hippocampus become more sensitive to degeneration (VAN VELZEN et al., 2017). This plays an important role in the development of anxiety (QUEIROZ et al., 2019).

In our study, we also analyzed malondialdehyde (MDA) concentrations, one of the most used biomarkers to assess oxidative stress in tissues. At the cerebral and hepatic level, the offspring rats whose mothers were fed with the crude and refined Brazil nut oil, (rich in polyunsaturated fatty acids) presented MDA concentration decreases (groups CO-M/CO-F and RO-M/RO-F). Queiroz et al., (2019) observed reductions in MDA and

increases in cerebral glutathione in progenies of animals treated with CLA during pregnancy and lactation, and research has also revealed that consumption of a high-fat diet of goat's milk, a source of CLA, reduces levels of cerebral MDA in sedentary adult rats (BARBOSA et al., 2018).

Studies have found that lard (a source rich in saturated fat) increases concentrations of cerebral malondialdehyde, and decreases levels of neurotropic factor in the hippocampus; which is responsible for regulating neural survival and synaptic plasticity in the peripheral and central nervous system (PARK et al., 2010; SAIYASIT et al., 2020). Galaly et al., (2014) supplemented male rats with a diet rich in saturated fat, using bovine tallow, and observed an increase in the concentration of cerebral MDA and a decrease in glutathione, an important antioxidant responsible for cell defense Langley et al., (2020) reported that a diet rich in saturated fat results in the loss of oligodendrocytes, the neuroglia cells responsible for the formation and maintenance of axon myelin sheaths in the central nervous system; neuroglia cells are particularly sensitive and susceptible to oxidative stress. We know that consumption of essential fatty acids modulates both the concentrations and actions of various neuropeptides which are involved in physiological and homeostatic processes in the nervous system (GONÇALVES et al., 2005). This confirms, as verified in the present study, that a maternal diet, rich in polyunsaturated fatty acids, being found in the oil of the Brazil nut, induces a cerebral protective effect in the offspring, and may prevent or delay neurological diseases, such as anxiety.

Verifying that the maternal diet can prevent or alter anxiety parameters as well as lipid peroxidation in the offspring is very important, since such tissue changes may become permanent in adulthood. In the present study, impacts on the analyzed anxiety behavior were not altered by refining (or not) of the Brazil nut oil.

By gender, the females treated with the crude nut oil spent more time in the open arms of the EPM than the same treated male group, and presented greater locomotion in the open field (CO-F and RO-F) as well. In the light and dark box, females treated with refined the Brazil nut oil spent more time in the lighted compartment, presenting more intense anxiolytic behavior than the male offspring. Further, it was also observed that consumption of essential fatty acids prevented or delayed both cerebral and hepatic lipid peroxidation, decreasing malondialdehyde concentrations.

Future research in humans and a measurement of the of essential fatty acid profiles in animal brains and livers may better elucidate the effects found in our research involving Brazil nut oil supplementation.

5. CONCLUSION

Our study showed that maternal supplementation with either crude or refined Brazil nut oil during pregnancy and lactation promotes anxiolytic effects on the test offspring, with a more significant effect on females. Our research thus confirms that essential fatty acids promote beneficial effects on offspring, helping to prevent anxiety disorder and reducing cerebral lipid peroxidation.

Acknowledgments

We thank all the contributing authors of the study.

REFERENCES

- Almeida-Suhett CP, Graham A, Chen Y, & Deuster P. (2017). Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. *Physiology & Behavior*. 169,130-140.
- Auguste S, Sharma S, Fisette A, Fernandes MF, Daneault C, Des Rosiers C, & Fulton S. (2018). Perinatal deficiency in dietary omega-3 fatty acids potentiates sucrose reward and diet-induced obesity in mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 64,8-13.
- Bakunina N, Pariante CM, & Zunszain PA. (2015). Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*. 144,365-373.
- Barbosa MQ, Queiroga RDCRE, Bertozzo CCDMS, De Souza Araújo DF, Oliveira LIG, Silva JYP, Alves S, & Soares JKB. (2018). Effect of diets with goat milk fat supplemented with exercise on anxiety and oxidative stress in the brains of adult rats. *Food & Function*. 9,2891-2901.
- Basak S, Vilasagaram S, & Duttaroy AK. (2020). Maternal dietary deficiency of n-3 fatty acids affects metabolic and epigenetic phenotypes of the developing fetus. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 158,102109.
- Batandier C, Poyot T, Marissal-Avry N, Couturier K, Canini F, Roussel AM, & Hininger-Favier I. (2020). Acute emotional stress and high fat/high fructose diet modulate brain oxidative damage through NrF2 and uric acid, in rats. *Nutrition Research*. 79, 23-24.

Benzie IFF, & Strain JJ. (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 239,70-76.

Berenguel O, Pessôa GDS, & Arruda, MA. (2018). Total content and in vitro bioaccessibility of tellurium in Brazil nuts. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 48:46-51.

Boivin JR, Piekarski DJ, Wahlberg JK, & Wilbrecht L. (2017). Age, sex, and gonadal hormones differently influence anxiety-and depression-related behavior during puberty in mice. *Psychoneuroendocrinology.* 85,78-87.

Bouayed J, & Soulimani R. (2019). Rachid. Evidence that hydrogen peroxide, a component of oxidative stress, induces high-anxiety-related behaviour in mice. *Behavioural Brain Research.* 359,292-297.

Bourin M, & Hascoët M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology.* 463,55-65.

Buydens-Branchey L, Branchey M, & Hibbeln JR. (2008). Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 32,568-575.

Bradley BF, Starkey NJ, Brown SL, & Lea RW. (2007). Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *Journal of Ethnopharmacology.* 111,517-525.

Brown GR, Kulbarsh KD, Spencer KA, Duval C. (2015). Peri-pubertal exposure to testicular hormones organizes response to novel environments and social behaviour in adult male rats. *Hormones and Behavior.* 73,135-141.

Brown RE, Corey SC, Moore AK. (1999). Differences in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice. *Behavior Genetics.* 29,263-271.

Chalon S. (2006). Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 75,259-269.

Cheema MAR, Mahmood K, Haleem DJ, & Khan RA. (2018). Nootropic and Anti-anxiety Effects of Olive Oil: Relationship with Dopamine and Serotonin Metabolism. *J Nutraceuticals Food Sci.* 3,1-4.

Chen HF, & Su HM. (2013). Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic–pituitary–adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 24,70-80.

Domonkos E, Hodosy J, Ostatníková D, & Celec P. (2018). On the role of testosterone in anxiety-like behavior across life in experimental rodents. *Frontiers in Endocrinology.* 9,441.

Esterbauer H, & Cheeseman K. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxyonenal. *Enzymol.* 186,407-421.

Fan C, Fu H, Dong H, Lu Y, Lu Y, & Qi K. (2016). Maternal n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation during pregnancy and lactation affects neurogenesis and apoptosis in adult offspring: associated with DNA methylation of brain-derived neurotrophic factor transcripts. *Nutrition Research.* 36,1013-1021.

Flint J. (2003). Animal models of anxiety and their molecular dissection. Seminars in Cell & Developmental Biology. *Academic Press.* 14,37-42.

Folch J, Less M, & Stanley S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226,497-509.

Frye CA, Petralia SM, & Rhodes ME. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 α , 5 α -THP. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 67,587-596.

Frye CA, & Walf AA. (2002). Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Hormones and Behavior.* 41,306-315.

Galaly SR, Hozayen WG, Amin KA, & Ramadan S. (2014). Effects of Orlistat and herbal mixture extract on brain, testes functions and oxidative stress biomarkers in a rat model of high fat diet. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences.* 3,93-105.

Galeeva A, & Tuohimaa P. (2001). Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian steroids. *Behavioural Brain Research.* 119,41-47.

Glendinning KA, Fisher LC, & Jasoni CL. (2018). Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. *Psychoneuroendocrinology.* 96,132-141.

Gonçalves CG, Ramos EJ, Suzuki S, & Meguid MM. (2005). Omega-3 fatty acids and anorexia. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 8,403-407.

Gonzales E, Barrett DW, Shumake J, Gonzalez-Lima F, & Lane MA. (2015). Omega-3 fatty acids improve behavioral coping to stress in multiparous rats. *Behavioural Brain Research.* 279,129-138.

Green P, Hermesh H, Monselise A, Marom S, Presburger G, & Weizman A. (2006). Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. *European Neuropsychopharmacology.* 16,107-113.

Guney E, Ceylan MF, Tektas A, Alisik M, Ergin M, Goker Z, & Kizilgun M. (2014). Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders. *Journal of Affective Disorders.* 156,62-66.

- Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, & Koletzko B. (2008). Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clinical Nutrition*. 27,685-693.
- Hartman L, & Lago RC. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*. 22,475-476.
- Herrera E, & Ortega-Senovilla H. (2010). Henar. Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development. *Clinical Lipidology*. 5,899-911.
- Innis SM. (2014). Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 554,27-43.
- Innis SM, & Elias SL. (2003). Intakes of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids among pregnant Canadian women, *The American Journal of Clinical Nutrition* 77,473-478.
- Jones BA, & Watson NV. (2005). Spatial memory performance in androgen insensitive male rats. *Physiology & Behavior*. 85,135-141.
- Khan A, Shal B, Naveed M, Shah FA, Atiq A, Khan NU, & Khan S. (2019). Matrine ameliorates anxiety and depression-like behaviour by targeting hyperammonemia-induced neuroinflammation and oxidative stress in CCl4 model of liver injury. *Neurotoxicology*. 72,38-50.
- Kodavanti PRS, Valdez M, Richards JE, Agina-Obu DI, Phillips PM, Jarema KA, & Kodavanti UP. (2021). Ozone-induced changes in oxidative stress parameters in brain regions of adult, middle-age, and senescent Brown Norway rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 410,115351.
- Jadoon A, Chiu CC, Mcdermott L, Cunningham P, Frangou S, Chang CJ, & Huang SY. (2012). Associations of polyunsaturated fatty acids with residual depression or anxiety in older people with major depression. *Journal of Affective Disorders*. 136,918-925.
- Junior ES, Wadt LHO, Silva KE, Lima RMB, Batista KD, Guedes MC, & Guilherme LRG. (2017). Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. *Chemosphere*. 188,650-658.
- Langley MR, Yoon H, Kim HN, Choi CI, Simon W, Kleppe L, & Scarisbrick IA. (2020). High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1866,165630.
- Lauritzen L, & Carlson SE. (2011). Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. *Matern. Child. Nutr.* 7,41-58.
- Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J, & Liu RH. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50,2926-2930.

- Mchenry J, Carrier N, Hull E, & Kabbaj M. (2014). Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 35,42-57.
- Mennitti LV, Oyama LM, Santamarina AB, Do Nascimento O, & Pisani LP. (2018). Influence of maternal consumption of different types of fatty acids during pregnancy and lactation on lipid and glucose metabolism of the 21-day-old male offspring in rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 135,54-62.
- Moon ML, Joesting JJ, Lawson MA, Chiu GS, Blevins NA, Kwakwa KA, & Freund GG (2014) The saturated fatty acid, palmitic acid, induces anxiety-like behavior in mice. *Metabolism*. 63,1131-1140.
- Moraes de Brito RC, Pereira Junior JB, & Fernandes Dantas KDG. (2019). Quantification of inorganic constituents in Brazil nuts and their products by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *LWT-Food Science and Technology*. 116,108383.
- Morais MM, Pinto LAA, Ortiz SCA, Crexi VT, Silva RL, & Silva JD. (2001). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 60,23.
- Moretto E, & Fett R. (1989). *Vegetable Oils and Fats Technology*. 2ed, Varela: Rio de Janeiro.
- Morgane PJ, Austin-Lafrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, & Galler JR. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 17,91-128.
- Müller CP, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Gulbins E, & Kornhuber J. (2015). Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1851,1052-1065.
- Nasution RA, Islam AA, Hatta M, Turchan A, & Faruk M. (2020). Role of CAPE in reducing oxidative stress in animal models with traumatic brain injury. *Annals of Medicine and Surgery*. 57,118-122.
- Nava-Mesa MO, Lamprea MR, & Múnera A. (2013). Divergent short-and long-term effects of acute stress in object recognition memory are mediated by endogenous opioid system activation. *Neurobiology of Learning and Memory*. 106,185-192.
- Neto OZS, Batista EAC, & De Almeida Meirelles AJ. (2018). The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. *Journal of Cleaner Production*. 180,866-875.
- Noronha SSR, Lima PMD, Campos GSV, Chirico MTT, Abreu AR, Figueiredo ABD, & De Menezes RCA. (2019). Association of high-fat diet with neuroinflammation, anxiety-like defensive behavioral responses, and altered thermoregulatory responses in male rats. *Brain, Behavior, and Immunity*. 80,500-511.
- Oaks BM, Young RR, Adu-Afarwuah S, Ashorn U, Jackson KH, Lartey A, & Shahab-Ferdows S. (2017). Effects of a lipid-based nutrient supplement during pregnancy and

lactation on maternal plasma fatty acid status and lipid profile: Results of two randomized controlled trials. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 117,28-35.

Park CY, & Eicher-Miller HA. (2014). Iron deficiency is associated with food insecurity in pregnant females in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2010. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 114,1967-1973.

Pellow S, & File SE. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 24,525-529.

Prut L, & Belzung C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. 463,30-33.

Quadros VA, Rosa LV, Costa FV, Müller TE, Stefanello FV, Loro VL, & Rosemberg DB. (2019). Involvement of anxiety-like behaviors and brain oxidative stress in the chronic effects of alarm reaction in zebrafish populations. *Neurochemistry International*. 129,104488.

Queiroz MP, Da Silva Lima M, De Melo MFFT, Bertozzo CCDMS, De Araújo DF, Guerra GCB, & Soares JKB. (2019). Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain. *Journal of Affective Disorders*. 243,75-82.

Rachetti ALF, Arida RM, Patti CL, Zanin KA, Fernandes Santos L, Frussa-Filho R, Gomes Da Silva S, & Scorza FA. (2012). Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. *Behavioural Brain Research*. 237,283-289.

Rockenbach II, Rodrigues E, Gonzaga LV, Caliar V, Genovese MI, Gonçalves AEDSS, & Fett R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*vitis vinifera* L. and *vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*. 127,174-179.

Santos OVD, Corrêa NCF, Carvalho Jr RN, Costa CEF, & Lannes SCDS. (2013). Yield, nutritional quality, and thermal-oxidative stability of Brazil nut oil (*Bertolletia excelsa* HBK) obtained by supercritical extraction. *Journal of Food Engineering*. 117,499-504.

Saiyasit N, Chunchai T, Apaijai N, Pratchayasakul W, Sripetchwandee J, Chattipakorn N, & Chattipakorn SC. (2020). Chronic high-fat diet consumption induces an alteration in plasma/brain neurotensin signaling, metabolic disturbance, systemic inflammation/oxidative stress, brain apoptosis, and dendritic spine loss. *Neuropeptides*. 82,102047.

- Sasaki A, De Vega WC, St-Cyr S, Pan P, & McGowan PO. (2013). Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience*. 240,10-12.
- Sasaki A, De Vega W, Sivanathan S, St-Cyr S, & McGowan PO. (2014). Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience*. 272,92-101.
- Sahoo PK, Pradhan LK, Aparna S, Agarwal K, Banerjee A, & Das SK. (2020). Quercetin abrogates bisphenol A induced altered neurobehavioral response and oxidative stress in zebrafish by modulating brain antioxidant defence system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 80,103483.
- Sariburun E, Şahin S, Demir C, Türkben C, & Uylaşer V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry cultivars. *J. Food Sci.* 75,328-335.
- Scholl JL, Afzal A, Fox LC, Watt MJ, & Forster GL. (2019). Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology & Behavior*. 211,112670.
- Sharma S, Zhuang Y, & Gomez-Pinilla F. (2012). High-fat diet transition reduces brain DHA levels associated with altered brain plasticity and behaviour. *Scientific Reports*. 2,431.
- Silva AF. (2014). Effect of processing steps on the quality of Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.): evaluation of the lipid fraction and aflatoxin contamination. 95 p. *Dissertation (Master in Food Science and Technology)* presented to Universidade de São Paulo.
- Sinclair A, Begg D, Mathai M, & Weisinger R. (2007). Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression. *Asia Pacific journal of Clinical Nutrition*. 16,391-397.
- Soares JK, De Melo AP, Medeiros MC, Queiroga RC, Bomfim MA, Santiago EC, & Guedes RC. (2013). Anxiety behavior is reduced, and physical growth is improved in the progeny of rat dams that consumed lipids from goat milk: An elevated plus maze analysis. *Neuroscience Letters*. 552,25-29.
- Steenkamp LR, Hough CM, Reus VI, Jain FA, Epel ES, James SJ, & Lindqvist D. (2017). Severity of anxiety—but not depression—is associated with oxidative stress in Major Depressive Disorder. *Journal of Affective Disorders*. 219,193-200.
- Taha AY, Zahid T, Epps T, Trepanier MO, Burnham WM, Bazinet RP, & Zhang L. (2013). Selective reduction of excitatory hippocampal sharp waves by docosahexaenoic acid and its methyl ester analog ex-vivo. *Brain Research*. 1537,9-17.
- Terra VC, Arida RM, Rabello GM, Cavaleiro EA, & Scorza FA. (2011). The utility of omega-3 fatty acids in epilepsy: more than just a farmed tilapia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 69,118-121.

- Thesing CS, Bot M, Milaneschi Y, Giltay EJ, & Penninx BW. (2018). Omega-3 and omega-6 fatty acid levels in depressive and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 87,53-62.
- Torres LRO, Santana FC, Torres-Leal FL, Melo IL, Yosshime LT, Matos-Neto EM, Seelaender MC, & Araújo CM. (2016). Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*. 97,205-216.
- Van Velzen LS, Wijdeveld M, Black CN, Van Tol MJ, Van Der Wee NJ, Veltman DJ, & Schmaal L. (2017). Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 76,140-144.
- Wilson NA, Mantzioris E, Middleton PT, & Muhlhausler BS. (2019). Gestational age and maternal status of DHA and other polyunsaturated fatty acids in pregnancy: A systematic review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 144,16-31.
- Winther G, Elfving B, Müller HK, Lund S, & Wegener G. (2018). Maternal high-fat diet programs offspring emotional behavior in adulthood. *Neuroscience*. 388,87-101.
- Winther G, Eskelund A, Bay-Richter C, Elfving B, Müller HK, Lund S, & Wegener G. (2019). Grandmaternal high-fat diet primed anxiety-like behaviour in the second-generation female offspring. *Behavioural Brain Research*. 359,47-55.
- Wright T, Langley-Evans SC, & Voigt JP. (2011). The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiology & Behavior*. 103,164-172.
- Yang Y, Duan C, Huang L, Xia X, Zhong Z, Wang B, & Ding W. (2020). Juvenile high-fat diet-induced senescent glial cells in the medial prefrontal cortex drives neuropsychiatric behavioral abnormalities in mice. *Behavioural Brain Research*. 395,112838.
- Young G, & Conquer J. (2005). Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reproduction Nutrition Development*. 45,1-28.
- Zhishen J, Mengcheng T, & Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64,555-559.

ANEXO



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: Juliana Késsia Barbosa Soares

Protocolo CE UA/ C ST R N ° 09 / 202 0

CERTIDÃO

Certificamos para os devidos fins que o projeto intitulado “**IMPACTO DO CONSUMO MATERNO DO ÓLEO DE CASTANHA DO PARÁ (*Bertholletia excelsa*) SOBRE OS PARÊMTROS DE ANSIEDADE E MEMÓRIA NA PROLE DE RATOS**”, coordenado pelo (a) pesquisador (a) acima citado (a), obteve parecer consubstanciado pelo regulamento interno deste comitê, sendo **APROVADO**, em caráter de **ad referendum**, estando a luz das normas e regulamento vigentes no país, atendidas as pesquisas para especificações científicas.

Patos, 11 de novembro de 2020.


Prof. Dr. Valdir Moraes de Almeida
UFCG / Campus Patos
SIAPE 1406222

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