

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM NUTRIÇÃO**

CRISTIANE COSMO DA SILVA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DA *Spirulina platensis*
SOBRE PARÂMETROS DE ANSIEDADE E MEMÓRIA NA
PROLE DE RATAS TRATADAS DURANTE A LACTAÇÃO
COM DIFERENTES TAMANHOS DE NINHADAS**

Cuité/PB

2015

CRISTIANE COSMO DA SILVA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DA *Spirulina platensis* SOBRE PARÂMETROS DE ANSIEDADE E MEMÓRIA NA PROLE DE RATAS TRATADAS DURANTE A LACTAÇÃO COM DIFERENTES TAMANHOS DE NINHADAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em Nutrição Experimental.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Késsia Barbosa Soares
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Camila Carolina de Menezes
Patrício Santos

Cuité/PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586e

Silva, Cristiane Cosmo da.

Efeitos da suplementação da *Spirulina platensis* sobre parâmetros de ansiedade e memória na prole de ratas tratadas durante a lactação com diferentes tamanhos de ninhadas. / Cristiane Cosmo da Silva. – Cuité: CES, 2015.

49 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Nutrição) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientadora: Juliana Késsia Barbosa Soares.

Coorientadora: Camila Carolina de Menezes Patrício Santos.

1. *Spirulina platensis*. 2. Lactação. 3. Desnutrição multicarenal. I. Título.

CDU 615.874.2

CRISTIANE COSMO DA SILVA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DA *Spirulina platensis* SOBRE PARÂMETROS DE ANSIEDADE E MEMÓRIA NA PROLE DE RATAS TRATADAS DURANTE A LACTAÇÃO COM DIFERENTES TAMANHOS DE NINHADAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em Nutrição Experimental.

Aprovado em 20 outubro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Juliana Késsia Barbosa Soares
Universidade Federal de Campina Grande
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Camila Carolina de Menezes Patrício Santos
Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora

Prof^a. Dr^a. Nilcimelly Rodrigues Donato
Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora

Cuité/PB

2015

A minha mãe Maria, pelo incentivo, força e por ser exemplo de mulher guerreira a qual me espelho; ao meu pai Luiz, *in memoriam*, pelos ensinamentos deixados e por ser a minha força, a minha motivação de seguir sempre em frente e não desistir diante dos obstáculos; ao meu esposo Alexandre por todo apoio, perseverança, compreensão e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me dar saúde e pela força espiritual para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Educação e Saúde (CES), por possibilitar a oportunidade de realizar o curso.

A minha orientadora Juliana Késsia Barbosa Soares, pelos ensinamentos, por ter me conduzido para o desenvolvimento desta pesquisa.

A minha co-orientadora Camila Carolina de Menezes Patrício Santos, também pelos ensinamentos e desenvolvimento desta pesquisa.

As minhas colegas de laboratórios Rita de Cássia de Araujo Bidô e Iohrana Braz do Nascimento, pelo desenvolvimento dessa pesquisa, pela força e ajuda para que tudo ocorresse da forma certa.

Ao auxiliar de laboratório Jaciel Galdino Melo, pela ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX), professores e colegas pelo acolhimento.

Aos professores do corpo docente do curso de Nutrição, pelos ensinamentos durante estes 5 anos de jornada.

Aos meus amigos e colegas de classe por todo compartilhamento de conhecimentos e alegrias.

*Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento
seja seu remédio.*

Hipócrates

RESUMO

SILVA, C. C. **Efeitos da suplementação da *Spirulina platensis* sobre parâmetros de ansiedade e memória na prole de ratas tratadas durante a lactação com diferentes tamanhos de ninhadas.** 2015. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015.

A *Spirulina platensis* (*SP*) é uma alga que apresenta na sua composição um alto teor de proteínas, cerca de 60-70% do seu peso seco, também possui carboidratos, lipídios, vitaminas e sais minerais e outros fotonutrientes. Objetivou-se com esse estudo avaliar os efeitos da desnutrição multicarenal e da suplementação da *Sp* sobre parâmetros de ansiedade e memória da prole de ratas com diferentes tamanhos de ninhadas tratadas durante lactação. Foram formados quatro grupos de animais: um grupo Controle Normal (Con N) tratado com água destilada; um grupo Spirulina Normal (Spiru N), tratado com solução de 8% de *SP*; um grupo Controle Grande (Con G), tratado com água destilada; e um grupo Spirulina Grande (Spiru G), tratado com solução de 8% de *SP*, o aumento do tamanho foi para induzir uma desnutrição multicarenal, por competição de nutrientes. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. A solução de *SP* foi ofertada por gavagem na proporção de 2ml/100g de peso. Para avaliar parâmetros de ansiedade foram realizados os seguintes testes: Teste do Campo Aberto, cujos parâmetros avaliados foram ambulação, levantar-se, grooming e defecação e Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), onde avaliou-se o número de entradas e tempo de permanência nos braços fechados e abertos e mergulho de cabeça. Para medir alterações na memória foram utilizados: Teste da Habituação ao Campo Aberto onde se avaliou ambulação como um índice de facilitação de memória e o teste de Reconhecimento dos Objetos, onde se analisou a memória a curto e em longo prazo. Os dados demonstraram que os animais do Spiru N apresentaram aumento no *grooming* comparado ao Con G. No LCE o Spiru N e G entraram menos nos braços fechados e Con G e Spiru G permaneceram mais tempo nos braços fechados e realizaram menos mergulho de cabeça ($p < 0,05$). O Teste da Habituação, não mostrou diferenças estatísticas. Os testes de Reconhecimento de Objetos em curto prazo não apresentaram diferenças estatísticas, mas na memória em longo prazo houve uma maior exploração do objeto novo comparado ao familiar no grupo Con N. Essa exploração do objeto novo foi diminuída no grupo Con G comparado ao Con N e ao Spiru G ($p < 0,05$). O modelo de desnutrição multicarenal utilizado nesta pesquisa foi eficiente para induzir aumento da

ansiedade e danos na memória em longo prazo na prole de ratas tratadas durante a lactação. Por outro lado, a suplementação de ratas lactantes com a *Sp* não se mostrou eficiente para reverter os danos ansiogênicos, mas sim para reverter os danos relacionados à memória em longo prazo causados pela competição de nutrientes pelo aumento do tamanho da ninhada.

Palavras - chave: *Spirulina platensis*. Lactação. Desnutrição multicarrencial. Memória. Ansiedade.

ABSTRACT

SILVA, C. C. Effects of Supplementation with *Spirulina platensis* on anxiety and memory parameters in the offspring of rats treated during lactation with different litter size.

Spirulina platensis (*SP*) is an algae. Contents in its composition a high content of protein, about 60-70%, also has carbohydrates, lipids, vitamins and minerals and other fotonutrientes. The objective of this study was to evaluate the effects of malnutrition multicarencial and supplementation of *SP* on anxiety parameters and memory of the offspring of mice with different size litters treated during lactation. Four groups of animals were formed: one Normal control group (Con N) treated with distilled water; a Regular Spirulina group (Spiru N), treated with 8% *Sp* solution; a Great control group (Con G), treated with distilled water; and a Grand Spirulina group (Spiru G), treated with 8% *Sp* solution, increasing the size was to induce a multicarencial malnutrition, by competing for nutrients. The animals received food and water *ad libitum*. The *Sp* solution was supplied by gavage at the ratio of 2ml/100g. To evaluate parameters of anxiety were performed the following tests: Test Field Open, whose parameters evaluated were ambulation, get up, grooming and defecation and Test of Elevated Plus Maze (EPM), which evaluated the number of entries and time of permanence in closed and open arms and head-dipping. To measure changes in memory were used: Habituation in the Open Field Test for assessment ambulation as a memory index and the facilitation and the Object Recognition Test, where were examined the short and long term memory. The data showed that the animals of the Spiru N demonstrated an increase in grooming compared to Con G. In the EPM the Spiru N and G entered less in the closed arms and Con G and Spiru G staying longer in the closed arms and performed less diving head ($p < 0.05$). The test of habituation showed no statistical differences. The object recognition test in short term showed no statistical differences, but in long-term memory there was a further exploration of the new object compared to family in Con group N. This exploration of the new object was decreased in Con G group compared to the Con N and Spiru G ($p < 0.05$). The model multicarencial malnutrition used in this study was efficient to induce increased anxiety and memory impairments in the long term in the offspring of female rats treated during lactation. More over, supplementation of lactating rats with *Sp* was not anxiogenic effective to reverse the

damage, but to reverse the long-term memory related damage caused by competition of nutrients by increased litter size.

Key words: *Spirulina platensis*. Lactation. Multicarencial malnutrition. Memory. Anxiety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem microscópica óptica e eletrônica da microalga <i>Spirulina platensis</i>	19
Figura 2 – Aparato do Campo Aberto	29
Figura 3 - Aparato do Labirinto em Cruz Elevado.....	30
Figura 4 - Disposição dos objetos utilizados no teste de Reconhecimento dos Objetos.....	32
Figura 5 - Avaliação de ratos <i>Wistar</i> no Campo Aberto sobre os parâmetros de ambulação, levantar, grooming e defecação.....	34
Figura 6 - Números de entrada nos braços fechados e abertos no Labirinto em Cruz Elevado realizado por ratos <i>Wistar</i>	35
Figura 7 - Tempo de permanência (seg) nos braços fechados e abertos no Labirinto em Cruz Elevado de ratos <i>Wistar</i>	36
Figura 8 - Números de mergulhos de cabeça no Labirinto em Cruz Elevado de ratos <i>Wistar</i>	37
Figura 9 - Teste de Habituação ao Campo Aberto em ratos <i>Wistar</i>	38
Figura 10 - Avaliação da memória a curto prazo por meio da exploração dos objetos em ratos <i>Wistar</i>	39
Figura 11 - Avaliação da memória a longo prazo por meio da exploração dos objetos em ratos <i>Wistar</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Sp</i>	<i>Spirulina platensis</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
OMS	Organização Mundial de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
B1	Tiamina
B2	Riboflavina
B3	Nicotinamida
B5	Ácido pantotênico
B6	Piridoxina
B7	Biotina
B9	Ácido fólico
B12	Cianocobalamina
EPA	Ácido eicosapentaenóico
DHA	Ácido docosahexaenóico
GLA	Ácido γ -linolênico
<i>AIN</i>	<i>American Institute of Nutrition</i>
CC	Controle casein
CS	Controle Spirulina
RC	Recuperado caseína
RS	Recuperado Spirulina
DBR	Dieta Básica Regional
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
LANEX	Laboratório de Nutrição Experimental
CES	Centro de Educação e Saúde
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
Con N	Controle Normal
Spiru N	Spirulina Normal
Con G	Controle Grande
Spiru G	Spirulina Grande

LCE	Labirinto em Cruz Elevado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
ANOVA	Análise de Variância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 <i>Spirulina platensis</i>	19
3.1.1 Composição nutricional da <i>Spirulina platensis</i>	20
3.1.2 <i>Spirulina platensis</i> e recuperação do estado nutricional	22
3.2 DESNUTRIÇÃO E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	23
4 METODOLOGIA	27
4.1 ANIMAIS.....	27
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	27
4.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	28
4.3.1 Testes de ansiedade	28
4.3.1.1 Teste do Campo Aberto.....	28
4.3.1.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	29
4.3.2 Testes de memória	31
4.3.2.1 Teste de Habituação ao Campo Aberto.....	31
4.3.2.2 Teste de Reconhecimento de Objetos.....	31
4.4 EUTANÁSIA.....	32
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
5 RESULTADOS	34
5.1 TESTES DE ANSIEDADE.....	34
5.1.1 Teste do Campo Aberto	34
5.1.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	34
5.1.2.1 Números de entrada nos braços fechados e abertos do Labirinto em Cruz Elevado.....	34
5.1.2.2 Tempo de permanência dos animais nos braços fechados e abertos do Labirinto em Cruz Elevado.....	35
5.1.2.3 Números de mergulhos de cabeça no Labirinto em Cruz Elevado.....	36

5.2 TESTES DE MEMÓRIA.....	37
5.2.1 Teste de Habituação ao Campo Aberto.....	37
5.2.2 Teste de Reconhecimento dos Objetos.....	38
5.2.2.1 Avaliação da memória a curto prazo.....	38
5.2.2.2 Avaliação da memória a longo prazo.....	39
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A *Spirulina platensis* (*Sp*), pertence ao filo Cyanobactéria ou divisão Cyanophyta, que é um grupo composto de bactérias que obtêm energia por meio do processo de fotossíntese. A denominação de Cyanobactéria é devido a sua cor azul, que é composta dos pigmentos naturais, clorofila (verde), ficocianinas (azul) e carotenóides (laranja), desta forma a *Sp* pode ser chamada de algas azuis ou algas verde-azuladas (ARRUDA et al., 2013).

A *Sp* cresce em águas alcalinas e ricas em sais minerais em lagos da África, Ásia, América do Sul e do Norte e existem na Terra há 3,5 bilhões de anos. Possui um alto teor de proteínas (cerca de 60-70% do seu peso seco) e também possui carboidratos (10 a 20%), lipídios (5 a 15%), vitaminas e sais minerais e outros fotonutrientes, como o ácido graxo essencial (ácido γ linolênico), antioxidantes, sulfolípides, glicolípides e polissacarídeos (BABADZHANOV et al., 2004; YADA et al., 2005; AYOUB, 2007; ARRUDA et al., 2013). Devido a essa rica composição nutricional, a *Sp* pode ser introduzida na alimentação como alimento e como suplemento em dietas desequilibradas, visto que, estudos comprovam a inocuidade de seu uso por seres humanos, tanto que os órgãos regulatórios, tais como o *Food and Drug Administration* (FDA) classificam-na como *Generally Recognized as Safe* (GRAS), o que garante seu uso como alimento sem riscos à saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde 2009, libera o consumo em determinados limites diários (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003; SCAPIN, 2005; BRASIL, 2009).

Em países subdesenvolvidos, tem-se uma grande carência de alimentos protéicos, com alta prevalência de desnutrição, e a *Sp* vem sendo uma possibilidade para as populações pobres, auxiliando nos casos de desnutrição (ALVES; DÂMASO; PAI, 2008; ARRUDA et al., 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 30% da população mundial está desnutrida e 40.000 crianças morrem todos os dias devido à desnutrição e doenças relacionadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Quando a desnutrição ocorre nos primeiros anos de vida, está pode provocar alterações com consequências graves sobre o organismo, podendo apresentar irreversibilidade mesmo com recuperação nutricional (MEDEIROS et al., 2008).

Em experimentos com ratos submetidos à desnutrição no início da vida, período que corresponde ao estágio mais vulnerável do desenvolvimento cerebral, foi possível observar alterações de eventos de maturação cerebral que conduziu a alterações comportamentais, nas funções cognitivas, distúrbios no aprendizado e na memória. Essas alterações podem atingir

também parâmetros de ansiedade (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; SILVA; ALMEIDA, 2006).

Sendo assim a baixa ingestão de proteína durante a fase inicial da vida pode alterar a anatomia do cérebro, fisiologia e bioquímica, causando danos permanentes (WANG; XU, 2007). As principais alterações estruturais se referem ao cerebelo, sistema hipocampal, ao menor número e tamanho de células cerebrais, assim como alterações na ramificação dendrítica e na camada de mielina dos neurônios e redução do peso do cérebro (WALKER, 2005; SILVA; ALMEIDA, 2006). Já as alterações fisiológicas e bioquímicas, promovem alterações no nível de neurotransmissores e no número e na afinidade de alguns receptores de vários sistemas de neurotransmissão, como o serotoninérgico, o dopaminérgico, o gabaérgico e o colinérgico (SILVA; ALMEIDA, 2006).

A desnutrição pode levar ao aparecimento de comorbidades psiquiátricas e comportamentais que podem ser vistas em adultos e crianças, como depressão e ansiedade. Outras enfermidades, entretanto, aparecem especificamente na infância, como autismo, transtornos de aprendizagem e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (PORTO et al., 2010).

Dependendo do grau da desnutrição, do período e do tempo e de eventual posterior reabilitação nutricional, pode ser que não haja alterações anatômicas ou mesmo doenças focais equivalentes a lesões microscópicas, nem mesmo retardo mental evidente ou psicopatologias detectáveis (SCHWEIGERT; SOUZA; PERRY, 2009).

Com base nos estudos citados, a desnutrição é um problema de relevante importância para ser combatida, revertida e evitada, por causar danos para o organismo, principalmente na fase inicial da vida, onde é necessário ter uma ingestão de calorias e principalmente proteína adequada por ser constituinte das células de todo o organismo, visto que a falta de proteína leva à desnutrição protéica, promove, especialmente no sistema nervoso, alterações anatômicas, fisiológicas e neuroquímicas sérias, comprometendo todo o desenvolvimento cerebral sobre os aspectos de ansiedade, memória e aprendizagem. Desta forma, é importante investigar as consequências da desnutrição sobre um cérebro em desenvolvimento, mais ainda, se a suplementação alimentar nesta fase pode reverter possíveis danos.

Sendo assim, a presente pesquisa teve por finalidade avaliar os efeitos da desnutrição multicarenal causada pelo aumento do tamanho da ninhada sobre os parâmetros de ansiedade, memória e locomoção da prole de ratas tratadas durante a lactação com *Sp* e se essa suplementação reverteria os possíveis danos causados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da desnutrição multicarenal e da suplementação da *Sp* sobre parâmetros de ansiedade e memória da prole de ratas com diferentes tamanhos de ninhadas tratadas durante lactação.

2.2 Objetivos específicos

- Validar o método de indução de desnutrição multicarenal por competição de nutrientes aumentando-se o tamanho da ninhada;
- Avaliar a atividade locomotora e parâmetro de ansiedade na prole utilizando metodologias específicas;
- Medir a capacidade de Habituação do animal em longo prazo, como um índice de facilitação da memória;
- Analisar alterações na memória em curto e em longo prazo na prole.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Spirulina platensis*

A microalga *Sp* é uma Cyanobactéria filamentosa que forma tricomas cilíndricos multicelulares com 1 a 12 μ m de diâmetro e se dispõem em forma espiralada, atingindo até 1mm de comprimento. Através da fotossíntese a *Sp*, converte os nutrientes do meio em material celular, liberando oxigênio (COLLA, 2002).

A reprodução da *Sp* ocorre por fissão transversal binária, onde há a formação do hormogônio (tricoma) que se destaca dando origem a um novo filamento. Sua célula possui uma membrana plasmática cercada por multi-camadas da parede celular, Gram-negativas, caracterizadas com uma fileira de poros ao redor do tricoma separados por septos que são visíveis por microscopia (Figura 1) (TOMASELLI; GIOVANNETTI; TORZILLO, 1993).

A *Sp* possui envoltório celular mais parecido com uma bactéria do que com uma alga, ou seja, suas paredes celulares são mais digeríveis, uma vez que são formadas por mucopolissacarídeos e não por celulose, o que representa vantagem do ponto de vista de preservação da integridade de componentes, como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados (TOMASELLI; GIOVANNETTI; TORZILLO, 1993; BABADZHANOV et al., 2004).

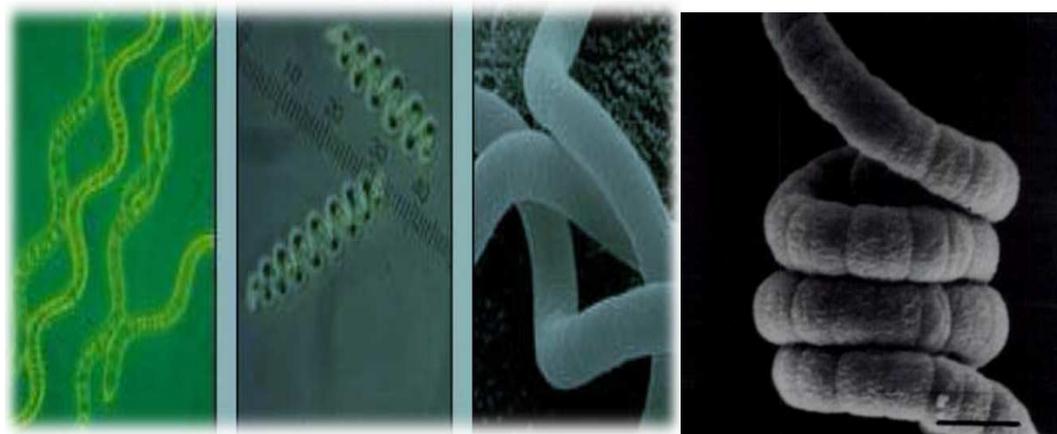


Figura 1- Imagem microscópica óptica e eletrônica da microalga *Spirulina platensis*.

Fonte: VONSHAK, 1997; SHIMAMATSU, 2004.

Essa microalga apresenta-se como uma alternativa na produção de biomassa alimentar em regiões áridas com escassez de água por responder bem à radiação solar intensa e altas temperaturas entre 35 e 40 °C, sendo que a temperatura mínima na qual o seu crescimento se realiza, está entre 15 e 18 °C durante o dia, mas a noite a *Sp* pode tolerar temperaturas

relativamente baixas, crescer em águas alcalinas e com alta salinidade (8,5 a 200g.L-1) (RICHMOND; SOEDER, 1986; COZZA; COSTA, 2000).

Ao contrário de outras microalgas, a *Sp*, apresenta baixa susceptibilidade à contaminação em seu cultivo por outros microrganismos devido ao alto pH necessário ao seu desenvolvimento, estando inicialmente em torno de 8,0 e podendo atingir pH 11,0 (BARROS; SASSI, 2007). É essencialmente fotoautotrófica, isto é, através da fotossíntese, obtém energia da luz para a fixação de carbono necessário à construção de biomassa. Como subproduto da reação, a microalga libera oxigênio na atmosfera (CHRONAKIS, 2001).

A *Sp* é um produto totalmente de origem biológica. Considerada como GRAS, pode ser adicionada em alimentos preparados na quantidade de 0,5-3g/porção (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003). Em maio de 2009, a *Spirulina* passou a fazer parte da Lista de Novos Ingredientes (enquadrada nos Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos) aprovada pela ANVISA, a qual limita a sua ingestão diária em 1,6g por indivíduo (BRASIL, 2009).

3.1.1 Composição nutricional da *Spirulina platensis*

A *Sp* possui um alto teor de proteína, cerca de 60-70% do seu peso seco, enquanto que a carne e os peixes contêm cerca de 15-20%; a soja, 35%; o leite desidratado, 35%; os amendoins, 25%; os ovos, 12%; e os grãos, 8-14%, cujo valor nutricional da mesma relaciona-se com a qualidade de seus aminoácidos, pois contém todos os aminoácidos essenciais, como, fenilalanina, triptofano, valina, leucina, isoleucina, treonina, lisina, histidina e metionina, e os não-essenciais como, glicina, alanina, prolina, tirosina, serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, cisteína, glutamina e arginina. Apresenta limitadas quantidades dos aminoácidos metionina e cisteína, que são aminoácidos que contém enxofre e lisina, quando comparadas às proteínas da carne, ovos e leite. Porém, a concentração apresentada nesta microalga é superior às quantidades encontradas nos cereais, nas sementes e nas verduras dos aminoácidos metionina e cisteína. Já a quantidade de lisina presente na *Sp* é superior a de todas as proteínas vegetais, exceto as encontradas nas leguminosas. A *Sp* também apresenta o ácido α -diaminopimélico derivado da lisina, característico de certas paredes celulares de algumas bactérias (RICHMOND; SOEDER, 1986; UNITED NATIONS ORGANIZATION FOR FOOD AND AGRICULTURE, 1990; BABADZHANOV et al., 2004; ARRUDA et al., 2013).

A *Sp* apresenta quantidades maiores de aminoácidos essenciais do que quantidades teóricas em proteína dietética recomendada para crianças em idade de 2-5 anos (UNITED NATIONS ORGANIZATION FOR FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1990), com exceção da lisina apresentando 2,95% em relação a 5,8% na dieta protéica recomendada para criança pela FAO (MORAIS et al., 2009).

Esta Cyanobactéria apresenta ainda na sua composição, altas concentrações de pró-vitamina A, vitaminas do complexo B como, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (nicotinamida), B5 (ácido pantotênico), B6 (piridoxina), B7 (biotina) B9 (ácido fólico), B12 (cianocobalamina) e inositol, e também contém as vitaminas C, D, E (tocoferol), além de β -caroteno. Com relação à vitamina B12, que é deficiente em alimentos de origem vegetal, sendo mais presente em alimentos de origem animal, a *Sp* se destaca por apresentar um alto teor dessa vitamina e da vitamina B9 que é necessária para a formação das células e para o bom funcionamento dos sistemas, cardiovascular e nervoso. Além das vitaminas presentes, a *Sp* é uma rica fonte de minerais, tendo como os principais: potássio (0,64 a 1,54 %), cálcio (0,13 a 0,14 %), fósforo (0,67 a 0,9 %), e também possui o cromo, o cobre, o magnésio, o manganês, o selênio, o sódio, o ferro absorvível e o zinco, que são necessários para a manutenção do metabolismo, para a conservação da pele e das mucosas e para o desenvolvimento normal dos ossos e dos dentes (BECKER et al., 1986; BELAY et al., 1993; BROWN et al., 1999; TOKUSOGLU; UUNAL, 2003; COLLA; MUCCILLO-BAISCH; COSTA, 2008; ARRUDA et al., 2013).

Ela ainda apresenta cerca de 10 a 20% de carboidratos, 5 a 15% de lipídeos, entre eles ácidos graxos essenciais poli-insaturados, ômega 3 e 6, sendo os da família ômega 3: o α -linolênico, precursor na biossíntese de outros ácidos graxos do tipo ômega 3, ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), ambos altamente insaturados; e os da família ômega 6: ácido γ -linolênico (GLA), dihomo- γ -linolênico e linoléico essencial, característico de alimentos de origem vegetal e precursor do ácido araquidônico que também é do tipo ômega 6. Além de apresentar os ácidos graxos da família monoenoico: palmitoléico, oléico, erúico (BABADZHANOV et al., 2004; AYOUB, 2007; PHILIPPI, 2008; ARRUDA et al., 2013).

Entre os pigmentos que constitui a *Sp*, estão a ficocianina (20%) e 0,37% de carotenóides e a clorofila (BABADZHANOV et al., 2004; ARRUDA et al., 2013).

A importância nutricional da *Sp* é determinada pela variedade dos nutrientes que a mesma contém, alguns dos quais não são sintetizados pelo organismo humano. Devido a essa

variedade, torna-se um alimento completo, podendo-se dizer que a *Sp* é o alimento com maior número de diferentes nutrientes por unidade de peso (PHANG et al., 2000).

3.1.2 *Spirulina platensis* e recuperação do estado nutricional

A *Sp* e os seus constituintes possuem várias propriedades nutricionais e terapêuticas que fazem dela, um apropriado suplemento alimentar, uma fonte potencial para ser utilizada na prevenção e no tratamento de diversas enfermidades e na recuperação do estado nutricional (AMBROSI et al., 2008).

Após a liberação da ANVISA no Brasil em 2009 do consumo da *Sp* para seres humanos, vários estudos científicos têm sido realizados para verificar seus efeitos biológicos. A partir deste ponto são mostrados estudos relevantes nesta área:

O estudo de Moreira et al. (2013), analisou os efeitos do uso da *Sp* na recuperação do estado nutricional de ratos submetidos à desnutrição, sobre os parâmetros de crescimento, bioquímica e aspecto hematológico. Para a realização do experimento, foram administradas cinco dietas à base de formulação para roedores em crescimento *American Institute of Nutrition* (AIN -93G) descrita por Reeves, Nielsen e Fahey (1993), como dieta controle (C): 93G adaptado para 12% de proteína; dieta apteíca (A): nenhuma proteína agregada; dieta S1: Spirulina 8,8%; dieta S2: Spirulina 17,6%; e dieta S3: Spirulina 24,4%. Os resultados do estudo mostraram que as diferentes concentrações de *Sp* permitiram a recuperação do estado nutricional dos ratos *Wistar* e que a dieta com concentração de 8,8% de *Sp* foi mais eficiente, com resposta equivalente para o controle e superior as outras.

Alves, Mello e Voltarelli (2005), também avaliou os efeitos da *Sp* como fonte protéica em ratos, os quais foram submetidos à desnutrição protéica e posterior recuperação nutricional. O estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira (fase de desnutrição), os ratos foram separados em dois grupos, de acordo com a dieta recebida dos 28 aos 60 dias de idade, grupo controle e grupo desnutrido, respectivamente, que receberam 17% e 6% de proteína na forma de caseína na dieta. Após o período de desnutrição protéica, foi iniciada a 2ª etapa (fase de recuperação nutricional), onde os ratos foram separados em 3 grupos, de acordo com a dieta recebida do 60º ao 90º dia de idade. O grupo controle foi alimentado com dieta contendo 17% de proteína dos 28 aos 60 dias de idade e mantidos na mesma dieta dos 61 aos 90 dias; grupo recuperado com caseína; alimentados com a dieta contendo 6% de proteína na forma de caseína dos 28 aos 60 dias e com a dieta contendo 17% de proteína na forma de caseína dos 61 aos 90 dias; e o grupo recuperado com *Sp*: alimentados com a dieta contendo 6% de

proteína na forma de caseína dos 28 aos 60 dias e com a dieta com 17% de proteína na forma de Spirulina dos 61 aos 90 dias. Ao final do experimento, concluíram que ambas as dietas empregadas (caseína e Spirulina) na recuperação nutricional dos ratos foram igualmente eficazes e isso demonstra que o potencial protéico da *Sp* na recuperação protéica dos ratos foi tão eficiente quanto o da caseína, que é considerada uma proteína padrão.

Outro estudo avaliou a ação da *Sp* como fonte proteica na recuperação do estado nutricional de ratos machos adultos. Foram estudados 48 animais, divididos em quatro grupos de 12 animais de acordo com a dieta: aos grupos CC (controle caseína) e CS (controle Spirulina) foi administrada dieta à base de caseína e Spirulina, respectivamente, com a concentração protéica de 12%, durante todo o experimento. Os grupos RC (recuperado caseína) e RS (recuperado Spirulina) receberam dieta desequilibrada, com 7% de proteína (caseína) durante 60 dias e posteriormente foram recuperados com dietas contendo caseína (12%) e Spirulina (12%) durante 90 dias, perfazendo um total de 150 dias do estudo. Concluíram que durante a desnutrição protéica (dieta com 7% de proteína) houve diferenças estatísticas entre os grupos RC e RS e, posteriormente o grupo RC teve perda de peso significativamente superior ao RS. No período de recuperação, durante o qual os grupos receberam dieta com 12% de proteína, o ganho de peso foi significativamente maior no grupo recuperado com a fonte proteica proveniente da *Sp* (grupo - RS), entre o intervalo da 10^a a 18^a semanas. Posteriormente, não apresentou diferença estatística em relação ao grupo RC, porém este apresentou um ganho de peso inferior em todo o período de recuperação. A recuperação do peso com a *Sp* comprova a sua eficiência como fonte alimentar (DONATO et al., 2010).

3.2 DESNUTRIÇÃO E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O estado nutricional de um indivíduo pode ser caracterizado a partir da disponibilidade e da utilização de nutrientes para obtenção da energia de que ele necessita em nível celular. Desta forma o estado nutricional é considerado normal quando a oferta de nutrientes, advindos da alimentação, supre às necessidades metabólicas normais. Quando ocorre um desequilíbrio nutricional e esta disponibilidade se torna insuficiente para atender à demanda do organismo, ocorrerão alterações orgânicas e um quadro favorável ao surgimento de doenças carenciais, sendo a desnutrição uma das mais sérias (MEDEIROS et al., 2008).

Na espécie humana, a desnutrição nos primeiros anos de vida pode levar à consequências assoladoras sobre os sistemas orgânicos, podendo levar a danos irreversíveis, mesmo após período de recuperação nutricional, pois durante esta fase da vida, o

desenvolvimento é rápido e as necessidades calóricas e nutricionais são maiores (MEDEIROS et al., 2008).

A privação dietética de proteína durante a infância pode levar a diversos efeitos sobre a anatomia do cérebro, fisiologia e bioquímica com danos permanentes. O cérebro passa por um rápido crescimento, que ocorre a partir do terceiro trimestre da gravidez até 24 meses após o nascimento nos seres humanos e ocorre a partir do 15º dia de gestação até 21 dias após o nascimento, em ratos. Se ocorrer o *déficit* nutricional nesta fase, a estrutura e a função do cérebro podem ser comprometidas (WANG; XU, 2007).

Um estudo foi realizado para investigar os efeitos da desnutrição induzida por uma Dieta Básica Regional (DBR) sobre o desenvolvimento motor de ratos. A DBR é uma dieta composta de 7,87% de proteínas que é compatível com dietas fornecidas à pessoas pobres do Nordeste do Brasil. Ratas foram tratadas com DBR durante a lactação e o desenvolvimento da atividade motora foi avaliado na prole. Os ratos desnutridos tiveram um atraso na maturação e evolução da atividade locomotora. Os resultados mostram que a deficiência na maturação está relacionada à deficiência protéica no período crítico de desenvolvimento do cérebro, mostrando os efeitos deletérios induzidos pela DBR no desenvolvimento e maturação somático do SNC. Os primeiros 21 dias após o nascimento se configuram como o período crítico, onde a desnutrição em ratos provoca um atraso de padrões motores e neuro-comportamentais (BARROS et al., 2006).

Mendonça et al. (2004), analisou a dieta DBR *versus* a dieta comercial em ratas gestantes e lactantes, na distribuição dos astrócitos no hipotálamo e obteve como resultados, alterações na gliogênese e proliferação de células gliais, provocadas pela dieta DBR. Outro estudo tratando ratos machos e fêmeas com a DBR durante 60 dias, observou desorganização na mielinização do nervo óptico (ALMEIDA et al., 2005).

Já Vilela et al. (2005), analisou a dieta DBR *versus* a dieta comercial em ratas gestantes, lactantes e concluiu que a DBR causou alterações nas estruturas dos ciclos circadianos e dimensões e densidade no SNC.

Experimentos com ratos submetidos à desnutrição no início da vida possibilitaram observar alterações tais como a redução do peso corporal e determinadas alterações no desenvolvimento cognitivo. Porém, há outras alterações estruturais e funcionais que são mais sutis e ocorrem em determinados períodos de desenvolvimento mais acelerado do cérebro, sendo, dependendo de sua natureza, passíveis de reversibilidade diante de reabilitação nutricional. Entre as alterações estruturais, as principais se referem ao cerebelo, sistema hipocampal, ao menor número e tamanho de células cerebrais. Além disso, alterações na

ramificação dendrítica na camada de mielina dos neurônios e redução do peso do cérebro (WALKER, 2005; SILVA; ALMEIDA, 2006).

Com relação às alterações neuroquímicas, a desnutrição protéica provoca alterações no nível de neurotransmissores e no número e na afinidade de alguns receptores de vários sistemas de neurotransmissão, como o serotoninérgico, o dopaminérgico, o gabaérgico e o colinérgico. Já do ponto de vista funcional, a desnutrição modifica aspectos como emoção, motivação e ansiedade, como também altera os processos que estão relacionados com a memória e aprendizagem (SILVA; ALMEIDA, 2006).

A maturação do SNC depende de raízes genéticas, da complexidade e do grau da estimulação ambiental e de uma alimentação adequada. A desnutrição não faz parte dos fatores genéticos, mas se configura como uma das principais causas que afetam o desenvolvimento cerebral (SCHWEIGERT; SOUZA; PERRY, 2009).

Atraso em apenas poucos eventos neurológicos isolados, resultantes da desnutrição, podem ser causa de reação em cadeia, amplificando erros funcionais (KAWAGUCHI; HAMA, 1988, apud MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002, p. 473). Interferências temporais na progressão dos processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento do SNC, podem levar a déficit funcional permanente (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Dependendo do grau da desnutrição, do período e do tempo e de eventual posterior reabilitação nutricional, pode ser que não haja alterações anatômicas ou mesmo doenças focais equivalentes a lesões microscópicas, nem mesmo retardo mental evidente ou psicopatologias detectáveis. Porém, pode resultar em condições sub-otimizadas permanentes do desenvolvimento intelectual e comportamental. Assim, lesões focais expressivas contribuem menos do que desequilíbrio no sistema de neurotransmissores para alterações funcionais tardias (SCHWEIGERT; SOUZA; PERRY, 2009).

Morgane, Mokler e Galler (2002), ressaltam a necessidade de diferenciar em relação ao cérebro, o retardo do desenvolvimento normal, que apenas se tornou lento, do desenvolvimento anormal. A conclusão dos autores é que a desnutrição leva ao desenvolvimento anormal significativo, incluindo desequilíbrio de neurotransmissores, e não simplesmente um retardo no desenvolvimento normal.

Os estudos experimentais em animais com desnutrição mostraram que a desnutrição protéica pode causar alterações na função, fisiologia e anatomia do cérebro e que esta desnutrição pode ser passível de reversão quando tratada a tempo com uma fonte de proteína

que se assemelhe com a caseína que é considerada proteína padrão de alto valor biológico e capaz de reverter algumas dessas alterações.

A *Sp* é um alimento que apresenta uma composição nutricional rica em micronutrientes e macronutrientes, principalmente em proteína, que se configura como uma alternativa de suplementação protéica em pessoas que apresentam um quadro de desnutrição, de modo a evitar os seus efeitos nocivos no corpo e especialmente no cérebro.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Fêmeas primíparas, da linhagem *Wistar*, obtidas no biotério de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com idade de 90 dias e peso de 250 ± 50 g foram utilizadas para obtenção dos ratos lactentes. Durante o acasalamento, cada fêmea foi mantida com um macho; os animais foram mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – *campus* Cuité, até confirmação da prenhez através do esfregaço vaginal. Posteriormente, as ratas prenhas 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 h), umidade de $\pm 65\%$, recebendo ração e água *ad libitum*, desde o primeiro dia de gestação até o final da lactação. As ninhadas foram padronizadas em 6 filhotes e 12 filhotes, de acordo com os grupos experimentais formados. O desmame foi realizado aos 21 dias pós-natal. O protocolo experimental seguiu as recomendações éticas do *National Institute of Health* (Bethesda, USA), com relação aos cuidados com os animais. Todos os procedimentos foram analisados pela Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA/UFCG, com a finalidade de cumprir a Lei 11.794/2008 que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa, com o número de protocolo 241-2015.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- Controle Normal (Con N), com ninhada padrão (6 filhotes);
- Spirulina Normal (Spiru N), com ninhada padrão (6 filhotes) e recebendo solução com 8% de *Sp*;
- Controle Grande (Con G), com grande ninhada (12 filhotes);
- Spirulina Grande (Spiru G), com grande ninhada (12 filhotes) e recebendo solução com 8% de *Sp*;

O número total de animais do experimento foi 48, sendo 12 por grupo, foi utilizado apenas ratos machos. A determinação do tamanho da ninhada foi baseado no estudo de Rocha-de-Melo et al. (2006).

A suplementação com *Sp* foi administrada apenas durante os 21 dias de lactação (2mL/ 100g de peso) diariamente por meio de gavagem no período da manhã . Foi utilizado *Sp* liofilizada da marca Fazenda Tamanduá embalagem de 1Kg. Uma porção de 1,5g fornece 5Kcal; 0,3g de carboidratos; 0,8g de proteínas; 0,1g de gorduras totais; 0,04g de gorduras saturadas; 0,09 de fibra alimentar; 3mg de cálcio; 0,3mg de ferro e 19mg de sódio. Os grupos controle receberam (2mL/ 100g de peso) diariamente por meio de gavagem no período da manhã de água destilada. Todos os animais experimentais e controles tiveram acesso à água e ração *ad libitum*.

4.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os testes para a avaliação comportamental realizadas nos animais para ambos os grupos iniciou-se a partir dos 35 dias de vida dos mesmos.

Para todos os testes os animais possuíram uma identificação por meio de números em placas de papéis que foram colocadas em locais que pudesse ser captados pelo vídeo. A cada animal testado o aparelho foi limpo antes de iniciar e depois de concluído o teste com álcool a 70° e papel absorvente e a cada troca de animal com álcool a 10° e papel absorvente.

Em todos os testes as sessões foram filmadas com uma câmera de vídeo instalada em um suporte acima do aparato e conectada a um computador. Posteriormente, os vídeos foram analisados e as categorias comportamentais identificadas e registrada manualmente.

4.3.1 Testes de ansiedade

4.3.1.1 Teste do Campo Aberto

O procedimento baseia-se em submeter o animal a um ambiente desconhecido, do qual a fuga é impedida por paredes circundantes. O animal foi colocado no centro do Campo Aberto onde os parâmetros avaliados foram: ambulação (número de cruzamentos dos campos pelo animal com as quatro patas); levantar-se (número de vezes que o animal se levantou e andou na arena somente com as patas posteriores); *grooming* (tempo de comportamentos de autolimpeza no qual o animal passou as patas sucessivas vezes na cabeça ou ficou se lambendo); defecação (números de bolos fecais ao final do tempo de observação). Tanto a ambulação quanto o levantar-se, o animal ao realizar bastante estes processos menos ansioso ele se encontrava, já ao realizar muita vezes o processo de *grooming* e defecação mais ansioso

o animal se encontrava. O tempo de observação para os parâmetros foi de 10 minutos (MONTGOMERY, 1955 apud SANTOS, 2008; RACHETTI et al., 2012). E foi realizado entre as 14:00–18:00h.

O aparelho consiste em uma arena circular de metal (pintada de branco), medindo 1m de diâmetro, circundada por uma parede de 41 cm de altura. O piso da arena é dividido em 3 círculos concêntricos (16.5, 58.5, e 97.5 cm de diâmetro, respectivamente) que, por sua vez, são subdivididos em um total de 16 segmentos e um círculo central. Há também uma lâmpada de 40 watts suspensa a uma altura de 46 cm do piso da arena, sendo posicionada no centro do aparelho.

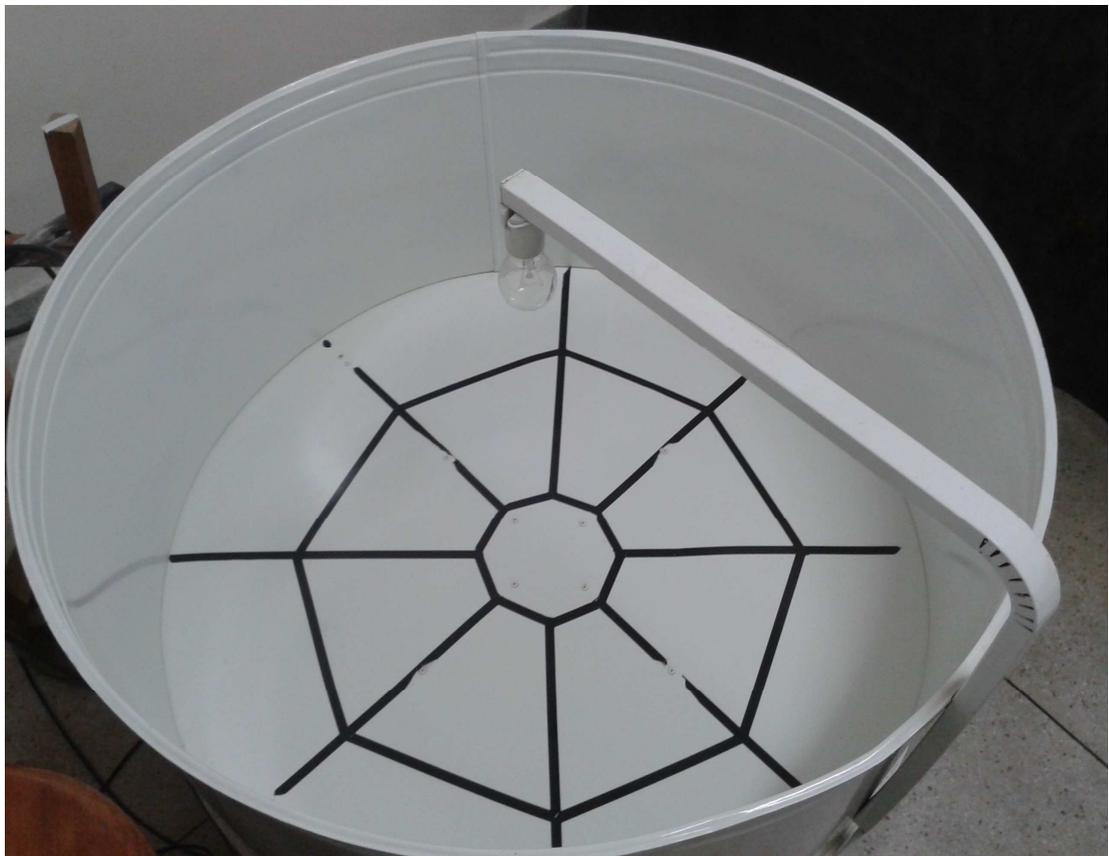


Figura 2: Aparato do Campo Aberto

Fonte: autoria própria

4.3.1.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O animal foi colocado individualmente no centro do Labirinto cuidadosamente para que ele pudesse explorar livremente, os parâmetros avaliados durante um período de 5 minutos foram o número de entradas e o tempo total de permanência nos braços abertos e

fechados, e o mergulho de cabeça (*Head-Dipping*). A entrada nos braços foi definida como a entrada do animal com todas as quatro patas dentro do braço. Quanto maiores os níveis de ansiedade, menos o animal explora os braços abertos e realiza mergulho de cabeça, permanecendo mais tempo e entrando nos braços fechados (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985). O procedimento foi realizado entre as 08:00–10:00.

O LCE é feito de madeira e consiste em quatro braços, sendo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), medindo 50 cm de comprimento por 10 cm de largura e 40 cm de altura, colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com o mesmo comprimento e largura. Cada braço é posicionado a 90° do braço adjacente e cruzam-se numa área central onde o animal é posicionado. O labirinto é apoiado sob um suporte com 50 cm elevado em relação ao solo.



Figura 3: Aparato do Labirinto em Cruz Elevado

Fonte: autoria própria

4.3.2 Testes de memória

4.3.2.1 Teste de Habituação ao Campo Aberto

O teste consistiu em colocar o animal no centro da arena circular do Campo Aberto. O parâmetro avaliado foi atividade locomotora (número de cruzamentos dos campos pelo animal com as quatro patas) como índice de facilitação da memória em logo prazo. A Habituação ocorre com a diminuição da atividade locomotora pelo animal decorrente da exposição repetida ao mesmo ambiente (RACHETTI et al., 2012). O tempo de observação para o parâmetro foi de 10 minutos

Todo o procedimento foi repetido 7 dias após a primeira exposição. O teste foi realizado entre as 14:00–18:00h.

4.3.2.2 Teste de Reconhecimento de Objetos

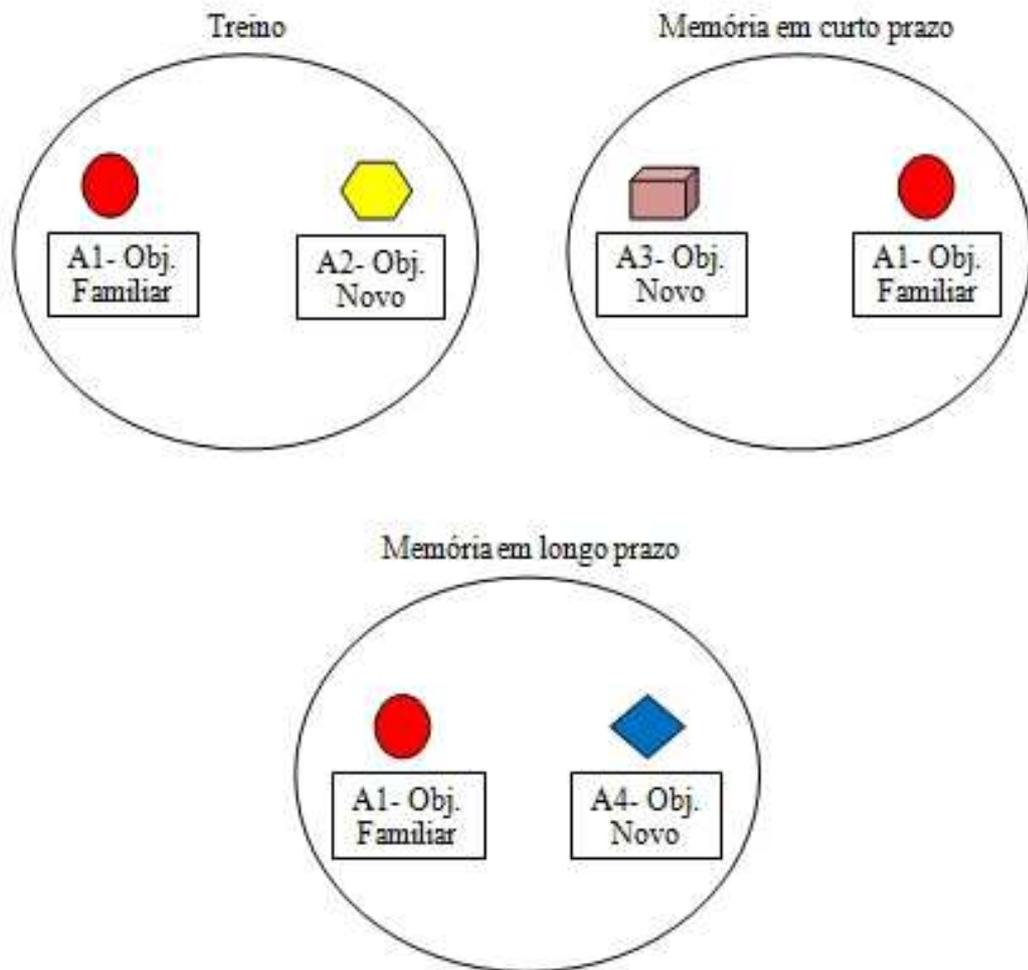
O teste compreendeu de dois momentos com exposições do animal ao Campo Aberto, sendo que a segunda exposição ocorreu 7 dias após a primeira. O teste envolve 4 etapas.

Para a realização do experimento foram utilizados 4 objetos, sendo 1 para ser o objeto familiar (A1); 1 objeto novo para o treino (A2); 1 objeto novo para o primeiro teste (A3) e 1 objeto novo para o segundo teste (A4).

A primeira etapa, à sessão de habituação, todos os animais, um por vez, foram colocados no Campo Aberto na ausência de objetos, ficando livres para explorar e permaneceram por 3 minutos, apenas para se habituar ao local do teste. A segunda etapa, o treino, ocorreu após a sessão de habituação do animal, este foi colocado de volta na arena do campo aberto, contendo 2 objetos diferentes (A1- familiar e A2- novo), onde explorou livremente por 10 minutos. A terceira etapa, o primeiro teste, memória a curto prazo, ocorreu no mesmo dia da sessão de treino, de forma que o primeiro rato da sessão de treino foi colocado novamente no Campo Aberto três horas após a sessão de treino, na presença do objeto familiar A1 e um objeto novo A3, isso ocorreu sucessivamente com todos os ratos e este teste teve duração de 5 minutos. A quarta etapa, o segundo teste, memória a longo prazo, foi realizado 7 dias após o teste de memória a curto prazo. Neste teste, foi mantido o objeto familiar A1 e um objeto novo A4. O animal foi introduzido na arena para explorar por 5 minutos. Quando o animal lembra-se do objeto familiar ele se interessa mais pelo objeto novo e o explora mais (RACHETTI et al., 2012).

Para todos os testes os objetos foram colocados em lados opostos (padronizados para todos os animais) (Figura 4) e o animal foi colocado no centro da arena do campo aberto, de modo que nenhum dos objetos ficasse de frente pra ele. E o parâmetro avaliado foi o tempo gasto para explorar cada objeto: a exploração foi definida como o comportamento do animal ao cheirar ou tocar o objeto com o focinho e/ou patas dianteiras. O procedimento foi realizado entre as 08:00–12:00h.

Figura 4 - Disposição dos objetos utilizados no Teste de Reconhecimento dos Objetos.



4.4 EUTANÁSIA

Todos os animais foram eutanasiados com 60 dias de vida através de anestesia com Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina, de ambos foi utilizado 1 ml/g de peso.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou de Dunn. Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TESTES DE ANSIEDADE

5.1.1 Teste do Campo Aberto

Analisando os dados da ambulação, levantar-se, *grooming* e defecação dos animais, percebeu-se que houve diferença estatística entre o grupo Spiru N *versus* o Con G ($41,5 \pm 5,86$ x $14,1 \pm 3,75$) apenas com relação ao processo de autolimpeza (*grooming*), ($p < 0,05$).

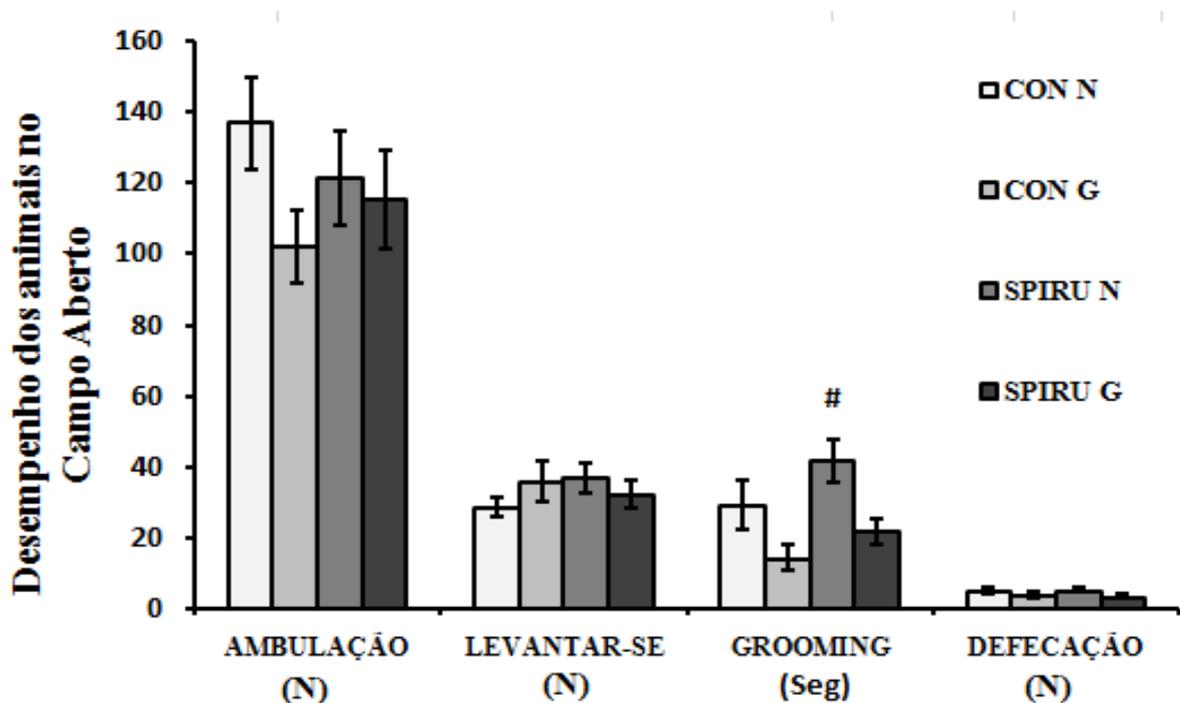


Figura 5 - Avaliação de ratos *Wistar* no Campo Aberto sobre os parâmetros de ambulação, levantar, *grooming* e defecação com 35 dias de vida em diferentes tamanhos de ninhadas cujas mães foram tratadas com *Sp* por gavagem durante os 21 dias de lactação. Os Spiru N ($n=12$) e Spiru G ($n=12$) receberam uma solução com concentração de *Sp* de 8% e os Con N ($n=12$) e Con G ($n=12$) receberam solução de água destilada. Dados expressos em média \pm erro médio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou Dunn. Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. # = diferença Spiru N comparado com Con G.

5.1.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

5.1.2.1 Números de entrada nos braços fechados e abertos do Labirinto em Cruz Elevado

A análise do número de entradas nos braços abertos e fechados mostrou que houve diferenças estatísticas com relação ao número de entradas nos braços fechados comparando os grupo Spiru N ao Con G ($6,5 \pm 0,80$ x $10,3 \pm 0,70$) e Spiru G ao Con G ($6,2 \pm 0,80$ x $10,3 \pm 0,70$) e ao Con N ($6,2 \pm 0,80$ x $9,2 \pm 0,70$) ($p \leq 0,05$). Os animais tratados com *Sp*, tanto os pertencentes à grandes ninhadas como os de pequenas ninhadas entram menos vezes nos braços fechados, ($p < 0,05$). Os braços abertos não tiveram diferença estatísticas.

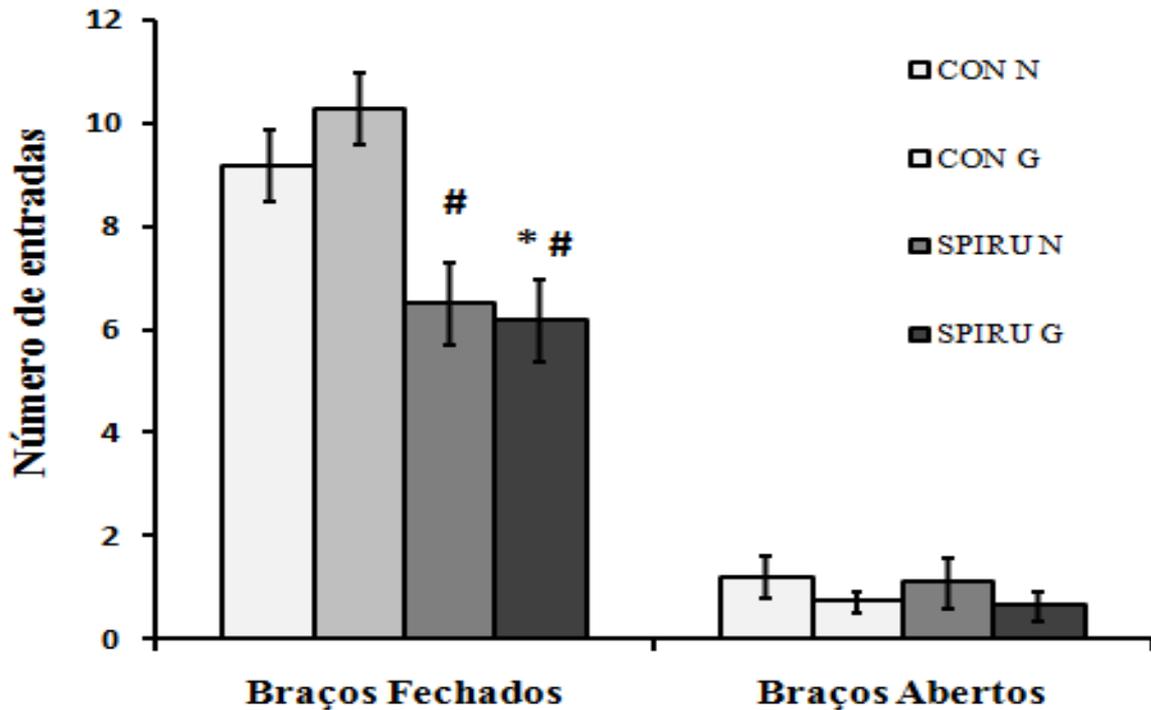


Figura 6: Número de entrada nos braços fechados e abertos no Labirinto em Cruz Elevado realizado por ratos *Wistar* com 49 dias de vida em diferentes tamanhos de ninhadas (N= com 6 filhotes e G com 12 filhotes por ninhada) cujas mães foram tratadas com *Sp* durante a lactação. Os grupos Spiru N e Spiru G receberam uma solução com 8% de *Sp* e os Con N e Con G receberam solução de água destilada. Todos os grupos continham 12 animais. Dados expressos em média \pm erro médio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou Dunn. Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. # = diferença Spiru N *versus* Con G e Spiru G *versus* Con G; * = Spiru G *versus* Con N.

5.1.2.2 Tempo de permanência dos animais nos braços fechados e abertos do Labirinto em Cruz Elevado

O confronto dos dados dos grupos estudados mostrou que os animais do Spiru G permaneceram mais tempo nos braços fechados comparados com os Con N ($266,6 \pm 5,7$ x $222,4 \pm 7,2$), similar resultado observado no Con G comparado ao Con N ($261,1 \pm 6,5$ x $222,4 \pm 7,2$), ($p < 0,05$). Os braços abertos não tiveram diferenças estatísticas.

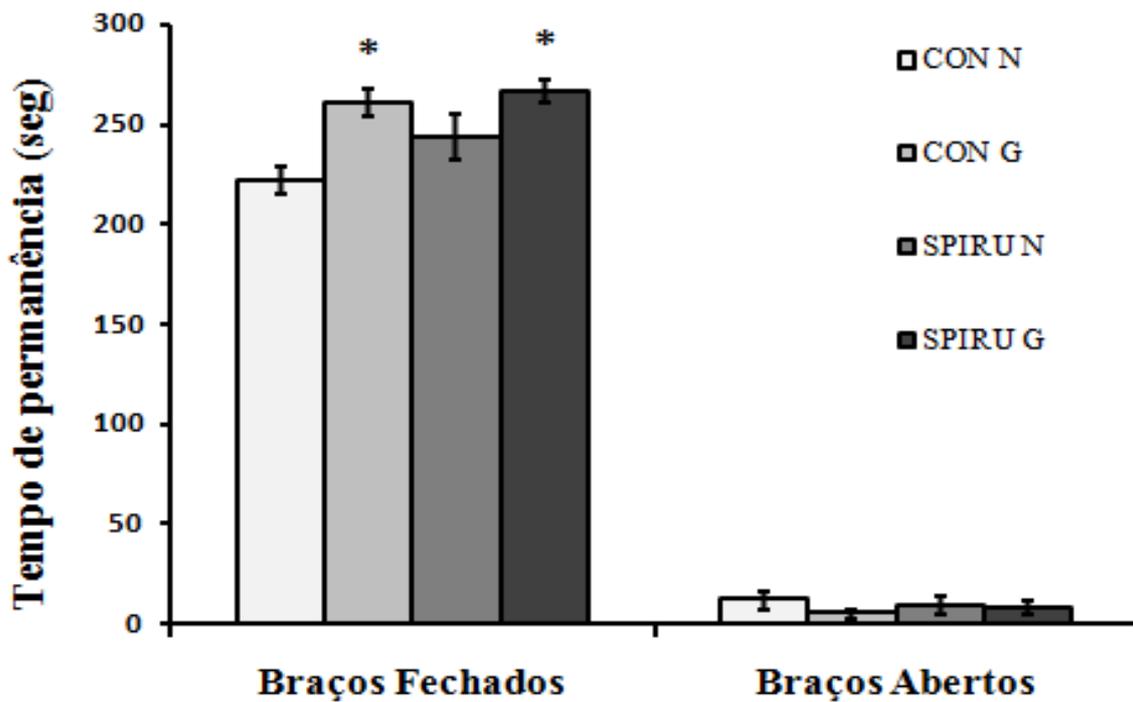


Figura 7: Tempo de permanência (seg) nos braços fechados e abertos no Labirinto em Cruz Elevado de ratos *Wistar* com 49 dias de vida em diferentes tamanhos de ninhadas cuja mães foram tratadas com *Sp* por gavagem durante os 21 dias de lactação, onde os grupos Spiru N e Spiru G receberam uma concentração de *Sp* em 8% e os Con N e Con G receberam solução de água destilada. Dados expressos em média \pm erro médio padrão. $n=12$ para todos os grupos. Os grupos foram divididos em N com ninhadas com 6 filhotes e G com ninhadas com 12 filhotes. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou Dunn. Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. *= diferença Spiru G *versus* Con N e Con G *versus* Con N.

5.1.2.3 Números de mergulhos de cabeça no Labirinto em Cruz Elevado

A análise demonstrou que os grupos desnutridos, Spiru G ($4,6 \pm 0,6 \times 12,6 \pm 2,1$) e Con G ($4,4 \pm 0,8 \times 12,6 \pm 2,1$) realizaram menos mergulhos de cabeça comparados ao Con N, ($p < 0,05$).

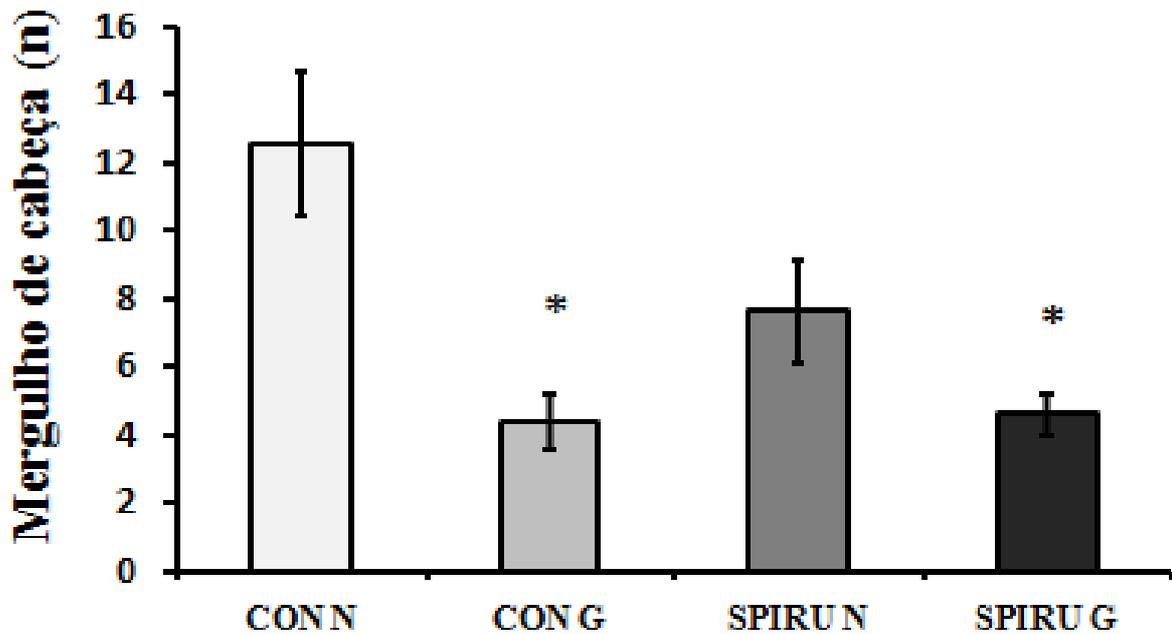


Figura 8: Números de mergulhos de cabeça no Labirinto em Cruz Elevado de ratos *Wistar* com 49 dias de vida em diferentes tamanhos de ninhadas cuja mães foram tratadas com *Sp* por gavagem durante os 21 dias de lactação, onde os grupos Spiru N (n=6 por ninhada) e Spiru G (n=12 por ninhada) receberam uma concentração de *Sp* em 8% e os Con N (n=6 por ninhada) e Con G (n=12 por ninhada) receberam solução de água destilada. Dados expressos em média \pm erro médio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou Dunn. Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$.
 *= diferença Spiru G versus Con N e Con G versus Con N.

5.2 TESTES DE MEMÓRIA

5.2.1 Teste de Habituação ao Campo Aberto

O teste da Habituação não mostrou diferenças estatísticas ao comparar-se os grupos Controles e Experimentais na primeira e segunda exposições ao Campo Aberto.

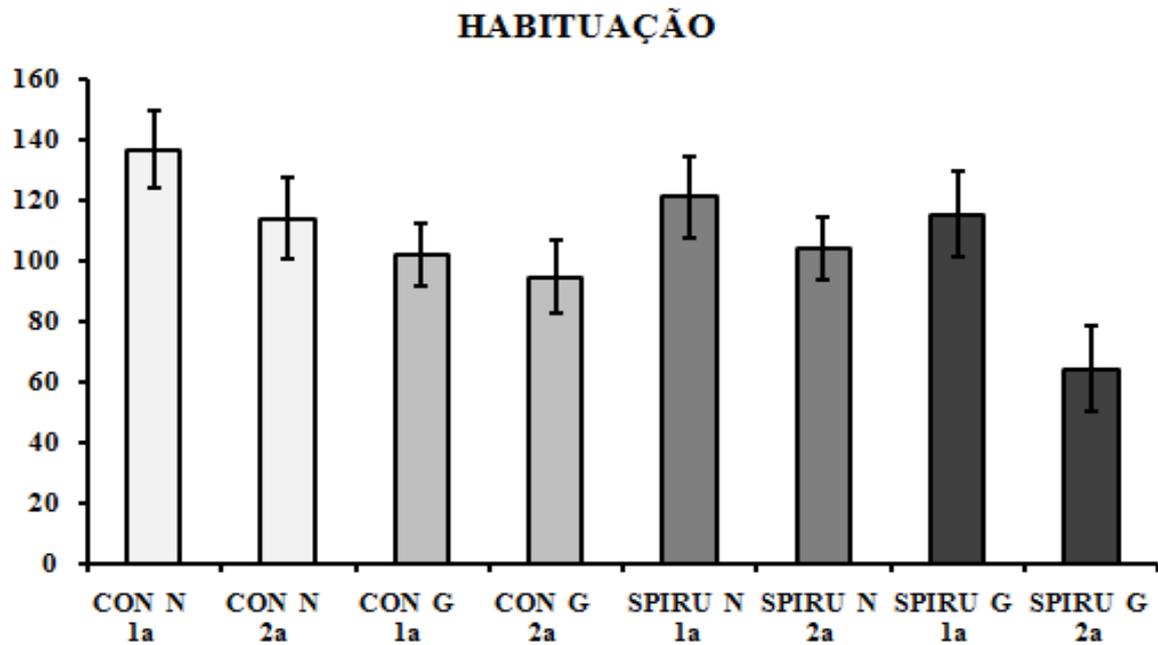


Figura 9: Teste de Habituação ao Campo Aberto em ratos *Wistar* com 42 de vida tratados durante a lactação em diferentes tamanhos de ninhadas cuja mães foram tratadas com *Sp* por gavagem durante os 21 dias de lactação, onde os grupos Spiru N (n=12) e Spiru G (n=12) receberam uma solução com 8% de *Sp* e os grupos Con N (n=12) e Con G (n=12) receberam solução de água destilada. Dados expressos em média \pm erro médio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou Dunn.

5.2.2 Teste de Reconhecimento de Objetos

5.2.2.1 Avaliação da memória a curto prazo

A análise da memória a curto prazo não mostrou diferenças estatísticas nos confrontos dos grupos.

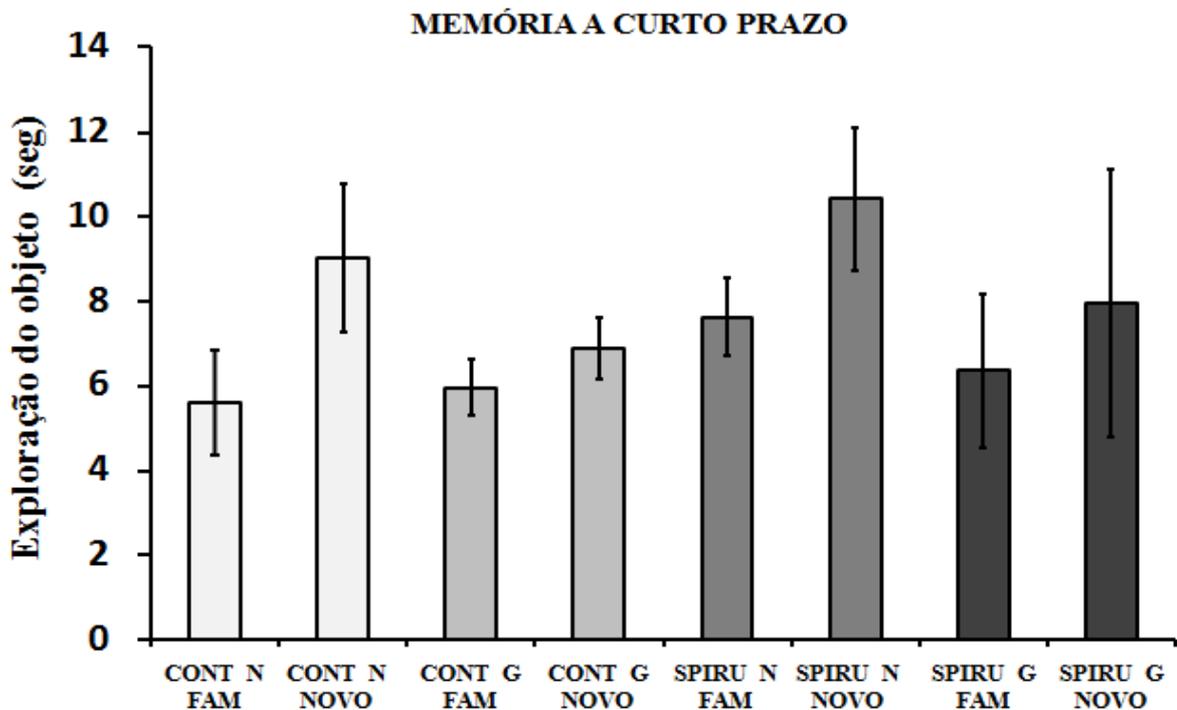


Figura 10: Avaliação da memória a curto prazo por meio da exploração dos objetos em ratos *Wistar* com 53 dias de vida em diferentes tamanhos de ninhadas cuja mães foram tratadas com *Sp* por gavagem durante os 21 dias de lactação, onde os grupos Spiru N (n=6 por ninhada) e Spiru G (n=12 por ninhada) receberam uma concentração de *Sp* em 8% e os Con N (n=6 por ninhada) e Con G (n=12 por ninhada) receberam solução de água destilada. Dados expressos em média \pm erro médio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou Dunn. Todos os grupos continham 12 animais por grupo.

5.2.2.2 Avaliação da memória a longo prazo

A análise dos dados da memória a longo prazo mostrou que houve uma maior exploração do objeto novo comparado ao familiar no grupo Con N ($13,1 \pm 2,9$ x $4,4 \pm 0,7$). Essa exploração do objeto novo foi diminuída no grupo Con G comparado ao Con N ($5,0 \pm 0,5$ x $13,1 \pm 2,9$), ($p < 0,05$).

Estatisticamente os grupos Con N ($13,1 \pm 2,9$), Spiru N ($7,7 \pm 0,6$) e Spiru G ($9,4 \pm 2,3$) são iguais ao explorar objeto novo. Mas, ao comparar a exploração do objeto novo nos grupos Con G *versus* Spiru G ($5,0 \pm 0,5$ x $9,4 \pm 2,3$), houve uma maior exploração no grupo experimental.

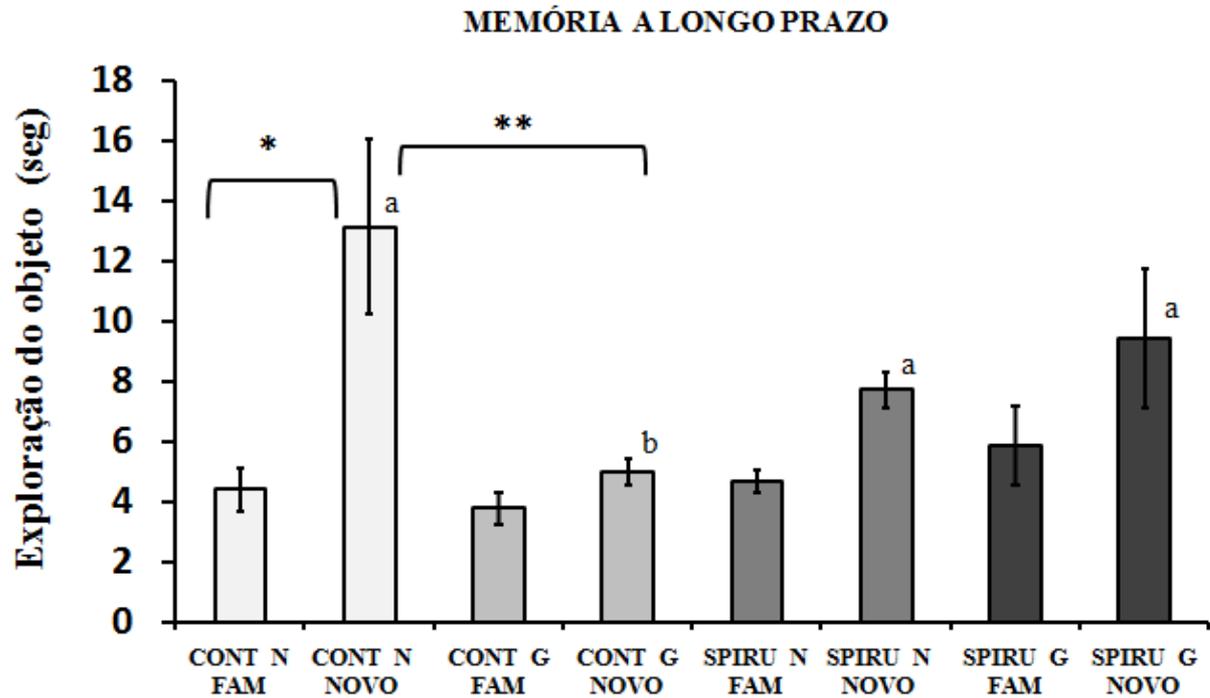


Figura 11: Avaliação da memória em longo prazo por meio da exploração dos objetos em ratos *Wistar* com 60 dias de vida em diferentes tamanhos de ninhadas cuja mães foram tratadas com *Sp* por gavagem durante os 21 dias de lactação, onde os grupos Spiru N e Spiru G receberam uma concentração de *Sp* em 8% e os Con N e Con G receberam solução de água destilada. Dados expressos em média \pm erro médio padrão. Ninhadas N foram padronizadas com 6 filhotes e ninhadas G com 12 filhotes. O número total de animais por grupo foi de 12. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.1 utilizando o teste de One way ANOVA. O pós teste foi Kruskal-Wallis ou Dunn. Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. **= diferença Con G Novo *versus* Con N Novo; * = diferença Con N Novo *versus* Con N Familiar.

6 DISCUSSÃO

Objetivou-se com o presente trabalho validar o método de tamanhos de ninhadas diferentes como indutor de desnutrição multicarenal ocasionada pela competição de nutrientes como causa de alterações na memória e ansiedade, bem como verificar se a suplementação com a *Sp* seria eficiente para reverter esses danos causados. Assim, observou-se por meio dos aparatos utilizados aumento da ansiedade e alterações de memória.

Com relação ao teste de Campo Aberto foi observado um aumento da atividade ansiogênica por meio do processo de autolimepeza (*grooming*), no grupo Spirulina Normal (Spiru N), sugerindo que este efeito tenha sido causado pela *Sp*, visto que este grupo não sofreu desnutrição por meio da competição de nutrientes, devido ao seu número de animais.

Já análise da ansiedade utilizando o aparato do Labirinto em Cruz Elevado, estudos demonstraram que ratos desnutridos com restrição protéica durante a lactação entram mais vezes e passam mais tempos nos braços abertos e realizam com frequência mergulhos de cabeça. Os autores interpretam este comportamento como uma diminuição da ansiedade e/ou maior impulsividade causada pelo próprio processo de desnutrição. Este efeito ansiolítico sugere que a desnutrição protéica de curto prazo pode afetar os sistemas neurais e/ou neuroquímicos. Acredita-se que estas respostas comportamentais em situações ansiogênicas podem ser causadas por estruturas límbicas como hipocampo e amígdala (SOARES; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2014; FRANÇOLIN-SILVA et al., 2006; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2004). Os resultados do presente trabalho mostraram que os grupos suplementados com *Sp* entraram menos vezes nos braços fechados comparados aos controles, sugerindo que os animais suplementados tiveram uma redução da ansiedade nesse parâmetro quando analisado de forma isolada. Porém, ao analisar os parâmetros juntos, o grupo de ninhada aumentada suplementado com *Sp* entra menos nos braços fechados, mas passa mais tempo neles, como também realiza menos mergulhos de cabeça, indicando aumento da ansiedade. Já o grupo de ninhada aumentada normal entra mais e passa mais tempo nos braços fechados e realiza menos mergulhos de cabeça, também sugerindo aumento da ansiedade. Esses dados sugerem que o modelo indutor de desnutrição por competição de nutrientes aumentando-se o tamanho da ninhada induziu efeito ansiogênico nesses filhotes e que a suplementação materna com 8% de *Sp* durante a lactação não foi suficiente para reverter esses danos ansiogênicos analisados em conjunto. Os observações nos braços abertos não mostraram diferenças estatísticas.

A Habituação consiste na diminuição da atividade locomotora, como um índice de facilitação de memória decorrente da exposição repetida do animal ao mesmo ambiente (RACHETTI et al., 2012). No presente trabalho o teste da atividade locomotora para medir a memória (teste de Habituação ao Campo Aberto), não foram observadas diferenças estatísticas significantes. Mas o estudo de Barros et al. (2006), mostrou que a atividade locomotora dos animais foram reduzidas devido à desnutrição provocada pela dieta básica regional no período da lactação que induziu uma desnutrição multicarenal. O estudo de Valadares et al. (2010), obteve como resultado uma diminuição na memória espacial, bem como o aumento da atividade locomotora e comportamento exploratório nos animais submetidos à desnutrição protéica durante o período da lactação. O processamento da memória espacial envolve a participação da formação do hipocampo, que é uma importante estrutura para a formação do mapa espacial cognitivo. O qual é formado por meio da informação sensorial recebida. Assim, a exploração pode corresponder a um conjunto de comportamentos que permitam capturar as informações vindas de várias partes do ambiente com características desconhecidas que não correspondem aos mapas anteriores. Neste sentido, o aumento do comportamento exploratório e locomotor do animal pode estar diretamente relacionado com a dificuldade em reconhecer o ambiente. Valadares et al. (2010), também sugere outra possível explicação para o aumento da atividade exploratória do animal, que poderia ser a maior impulsividade de animais desnutridos. Este resultado pode ser visto no estudo de Alamy et al. (2005), o qual mostrou que a desnutrição protéico-calórica induzida pós-desmame provocou um aumento na hiperatividade, que acarretou em um aumento na locomoção no primeiro teste no campo aberto, sugerindo que os ratos desnutridos tiveram uma diminuição na emotividade para ambientes novos. No presente trabalho, a desnutrição foi induzida por competição por nutrientes devido ao aumento no tamanho da ninhada diferentemente dos estudos que mantiveram o tamanho das ninhadas, mas modificaram a dieta materna.

Com relação à memória, estudos comprovam que a desnutrição no início da vida compromete o sistema hipocampal, prejudicando a retenção de informações relativas ao reconhecimento de objetos (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; SILVA; ALMEIDA, 2006; BRAGA; FUKUDA; ALMEIDA, 2014). Essa hipótese é reforçada pelos resultados das análises dos dados do presente estudo onde o grupo desnutrido controle (Con G) ao explorar o objeto novo, mostrou diminuição da memória, ou seja, explorou menos o objeto novo porque ele lembrou menos do objeto familiar e foi explorá-lo mais. Desta forma, o presente modelo de desnutrição comprometeu a função do cérebro para o armazenamento de memórias a longo

prazo. Este resultado corroborou com os resultados do estudo de Braga; Fukuda; Almeida, (2014) utilizando ratos que sofreram desnutrição protéica durante a lactação, onde os grupos desnutridos tiveram comprometimento de memória. Outro estudo analisado por Valadares et al. (2010), ao avaliar a memória por meio do reconhecimento de objetos, também mostrou que os animais desnutridos apresentaram um déficit de reconhecimento de memória. Nos animais cujas mães receberam suplementação da *Sp*, tanto no grupo com tamanho de ninhada normal como na aumentada, não houve diferença significativa comparado ao grupo controle N. Mas, ao comparar a exploração do objeto novo entre os grupos Con G e Spiru G, este teve um comportamento diferente, explorou mais o objeto novo. Desta forma, podemos inferir que para a memória a longo prazo, utilizando o reconhecimento de objetos, essa suplementação foi eficaz, diminuindo os danos causados pela competição de nutrientes entre a prole. A análise da avaliação da memória a curto prazo não mostrou diferenças estatísticas

7 CONCLUSÃO

Desta forma os procedimentos experimentais utilizados no presente trabalho permitiram concluir que o modelo escolhido como indutor de desnutrição por competição de nutrientes, aumentando o tamanho da ninhada, foi eficiente para induzir aumento da ansiedade no Labirinto e danos na memória a longo prazo no Reconhecimento de Objetos na prole de ratas tratadas durante a lactação.

Por outro lado, a suplementação materna com a *Sp* não foi suficiente para reverter esses danos ansiogênicos, mas sim para reverter os danos relacionados a memória a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ALAMY, M.; ERRAMI, M.; TAGHZOUTI, K.; SADDIKI-TRAKI, F.; BENGELLOUN, W. A.. Effects of postweaning undernutrition on exploratory behavior, memory and sensory reactivity in rats: Implication of the dopaminergic system. **Physiology & Behavior**, v.86, p. 195 – 202, 2005.
- ALMEIDA M. F.; SILVEIRA, A. C.; GUEDES, R. C. A.; HAKOC, J. N.; MARTINEZ, A. M.. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted a multideficient diet. **Nutr Neurosc**, v. 8, n. 2, p.91-9, 2005.
- ALVES, A. P.; DÂMASO, A. R.; PAI, V. D..The effects of prenatal and postnatal malnutrition on themorphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **Jornal de Pediatria** - v. 84, n. 3, 2008.
- ALVES, C. R.; MELLO, M. A. R.; VOLTARELLI, F.A.. *Spirulina* como fonte protéica na recuperação de ratos desnutridos: efeitos sobre o músculo esquelético. **Revista Digital, Buenos Aires**. [periódico na Internet]. [acesso em 7 abr. 2015]; v. 10, n. 86, 2005. Disponível em: <http://www.efdeportes.com/efd86/spirulin.htm>
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.. Propriedades de saúde de *Spirulina spp*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 109-117, 2008.
- ARRUDA, R. O. M.; BARBOSA, D. C. C. R.; MEDEIROS, M. M.; OLIVEIRA, M. R.; FRATTINI, W. C..Aspectos fermentativos de *spirulina platensis* sob condições naturais de temperatura e iluminação. **Revista Saúde**, v.7, n. 3/4, 2013.
- AYOUB, M. E.. Terapia nutricional na lipodistrofia ginóide. In: Silva, S. M. C. S.; Mura J. D. P.. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, p. 633-54, 2007.
- BABADZHANOV, A. S.; ABDUSAMATOVA, N.; YUSUPOVA, F. M.; FAIZULLAEVA, N.; MEZHLUMYAN, L. G.; MALIKOVA, M. K. H.. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 3, p. 276-279, 2004.
- BARROS, K. K. S.; SASSI, R.. Uso de microalgas na alimentação humana e animal: tecnologia de produção e valor nutricional de concentrados algáceos obtidos em cultivo em massa. In: **Encontro de Iniciação Científica, 15º, 2007, João Pessoa**. Anais eletrônicos. João Pessoa: UFPB, 2007. Disponível em: <http://www.prpg.ufpb.br/prpg/cgpq/enic/arquivos/anais/EnicXV_2007/livro_enic_2007_vida.pdf>. Acesso em: 21 fevereiro 2015.

BARROS, K. M. F. T.; MANHÃES--DE-CASTRO, R.; LOPES-DESOUZA, S.; MATOS, R. J. B.; DEIRÓ, T. C. B. J.; CABRAL-FILHO, J. E.; CANON, F.. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional Neuroscience**, Febr./Apr., v. 9 (1/2), p.99–104, 2006.

BECKER, E. W.; JAKOBER, B.; LUFT, D.; SCHMILLING, R. W.. Clinical and biochemical evaluations of Spirulina with regard to its application in the treatment of obesity. **Nutrition Reports International**, v. 33, n. 4, p. 565-574, 1986.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H.. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 35-41, 1993.

BRAGA, N. N.; FUKUDA, M. T. H.; ALMEIDA, S. S.. Early postnatal protein malnutrition impairs recognition memory in rats (*Rattus norvegicus*). **Psychology & Neuroscience**, v.7, n. 2, p.103 – 111, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Lista dos novos ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2009.

BROWN, M. R.; MULAR, M.; MILLER, I.; FARMER, C.; TRENERRY, C.. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, n. 3, p. 247–255, 1999.

COLLA, L. M.. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidantes da microalga *S. platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia**. [Dissertação] Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, 2002.

_____. MUCCILLO-BAISCH A. L.; COSTA J. A. V.. *Spirulina platensis* Effects on the Levels of Total Cholesterol, HDL and Triacylglycerols in Rabbits Fed with a Hypercholesterolemic. **Diet Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 51, n. 2, P.405-411, Mar./Apr. 2008.

COZZA, K. L.; COSTA, J. A. V.. Lipídios em Spirulina. **Vetor, Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 10, n. 1, p. 69-80, 2000.

CHRONAKIS, I. S.. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain pacifica): thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 888-898, 2001.

DONATO, N. R.; SILVA, J. A.; COSTA, M. J. C.; BARBOSA, M. Q.; BION, F. M.; CARVALHO FILHO, E. V.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A.. Uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à dieta de restrição protéica. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v. 69, n.1, p. 69-77, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003. Disponível em:
<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: 21 janeiro 2015.

FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S.S.. The interaction of housing condition and acute immobilization stress on the elevated plus-maze behaviors of protein-malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1035-1042, 2004.

FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; HERNANDES, A. S.; FUKUDA, M. T. H.; VALADARES, C. T.; ALMEIDA, S. S.. Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. **Behavioural Brain Research** v.173,p. 310–314, 2006.

HANDLEY, S. L; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg's. **Arch. Pharmac**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

MEDEIROS, M. C.; TEODÓSIO, N. R.; PESSOA, D. C. N.; BION, F. M.; SOARES, J. K.B.; BARRETO, E. M. F.; NASCIMENTO, E.. História da Dieta Básica Regional (DBR) – um modelo experimental de desnutrição. **Neurobiologia**, v. 71, n. 4, p. 53-70, out./dez. 2008.

MENDONÇA, J. E.; VILELA, M. C.; BITTENCOURT, H.; LAPA, R. M.; OLIVEIRA, F. G.; ALESSIO, M.L.; GUEDES, R. C. A.; DE OLIVEIRA COSTA, M. S.; DA COSTA, B. L.. GFAP expression in astrocytes of suprachiasmatic nucleus and medial preoptic area are differentially affected by malnutrition during rat brain development. **Nutr Neurosci**, v.7, n. 4, p. 223-34, 2004.

MORGANE, J. P.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R.. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Rev Neurosci Biobehav**, v. 26, n. 4, p. 471-83, 2002.

MORAIS M. G.; RADMANN E. M.; ANDRADE M. R.; TEIXEIRA G. G.; BRUSCH L. R. F.; COSTA J. A. V.. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, n. 294, p. 60-64, 2009.

MOREIRA, L. M.; BEHLING, B. S.; RODRIGUES, R. S.; COSTA, J. A. V.; SOARES, L. A. S.. Spirulina as a Protein Source in the Nutritional Recovery of Wistar Rats. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 56, n. 3, p. 447-456, May./June., 2013.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, S. E; BRILEY, M.. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosc. Methods**, v.14, p. 451-454, 1985.

PORTO, J. A.; OLIVEIRA, A. G.; LARGURA, A.; ADAM, T. S.; NUNES, M. L.. Efeitos da epilepsia e da desnutrição no sistema nervoso central em desenvolvimento: aspectos clínicos e evidências experimentais. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v.16, n.1, p. 26-31, 2010.

PHANG, S. M.; MIAH, M. S.; CHUU, W. L.; HASHIM, M.. Spirulina culture in digested starch factory waste water. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 5, p. 395-400, 2000.

PHILIPPI, S. T. **Pirâmides dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição**. Barueri, SP: Manole, 2008.

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.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, J. R.. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **Rodent Diet**. v.123 n.6, p.1939-195,1993

RICHMOND, A. E; SOEDER, C. J. Microalgae. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 349–438 1986.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; CAVALCANTI, J. B.; BARROS, A. S.; GUEDES, R. C. A.. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, (3/4), p. 155–160, June./August., 2006.

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

Pessoa, 2008.

SILVA, V. C.; ALMEIDA, S. S.. Desnutrição protéica no início da vida prejudica memória social em ratos adultos. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 19, n. 2, p. 195-201, mar./abr. 2006.

SOARES, R. O.; OLIVEIRA, L. M.; ALMEIDA, S.S..Effects of environmental stimulation during different periods of central nervous system development in malnourished rats subjected to the elevated plus maze.**Psychology & Neuroscience**, v.7,n. 4,p. 521-529, 2014.

SCHWEIGERT, I. D.; SOUZA, D. O. G.; PERRY, M. L. S.. Desnutrição, maturação do sistema nervoso central e doenças neuropsiquiátricas. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 22, n. 2, p. 271-281, mar./abr. 2009.

SCAPIN A. R. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* para obtenção de biomassa de alto valor nutricional. Chapecó: **Argos**, 2005.

SHIMAMATSU, H. Mas production of *Spirulina* edible microalga. **Hydrobiol**, v. 512, p. 39-44, 2004.

TOKUSOGLU, O.; UUNAL, M. K.. Biomass Nutrient Profiles of three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **J.Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.

TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G.. Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H. & TOULEMONT, A. Spiruline Algue de Vie. **Bulletin de L'Institut Océanographique**, Monaco, v.12, p. 65-75, 1993.

UNITED NATIONS ORGANIZATION FOR FOOD AND AGRICULTURE. Protein Quality Evaluation, Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome, 1990.

VALADARES, C.T.; FUKUDA, M.T.H.; FRANÇOLIN-SILVA, A.L.; HERNANDES, A.S.; ALMEIDA, S.S.. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures, **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 6, 2010.

VILELA, M. C.; MENDONÇA, J. E.; BITTENCOURT, H.; LAPA, R. M.; ALESSIO, M. L.; COSTA, M. S.; GUEDES, R. C. A.; SILVA, V. L.; ANDRADE DA COSTA, B. L.. Differential vulnerability of the rat retina, suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet to malnutrition induced during brain development. **Brain Res Bull**, v.15, n.64(5), p. 395-408, 2005.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthorspira)*: Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. **London**, p. 264, 1997.

WALKER, C. D.. Nutritional aspects modulating brain development and the responses to stress in early neonatal life. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, p. 1249–1263, 2005.

WANG, L.; XU, R. J.. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. **Asia Pac J Clin Nutr**, v.16, (Suppl 1), p. 467-472, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011. Disponível em:< <http://www.who.int/en>> acessado em 16 de abril de 2015.

YADA, E.; NAGATA, H.; NOGUCHI, Y.; KODERA, Y.; NISHIMURA, H.; INADA, Y.; MATSUSHIMA, A.. Na Arginine Specific from *Spirulina platensis*. **Mari Biothec**. p. 474-80, 2005.