



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

GÉSSICA AMORIM DO NASCIMENTO

**Suplementação alimentar com açaí (*Euterpe oleracea*) como
potencial modulador das defesas antioxidantes e dano
oxidativo em zebrafish (*Danio rerio*)**

Altamira - PA
2024

GÉSSICA AMORIM DO NASCIMENTO

Suplementação alimentar com açaí (*Euterpe oleracea*) como potencial modulador das defesas antioxidantes e dano oxidativo em zebrafish (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Nogueira Valentin Lucianelli
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lilian Lund Amado

Altamira - PA
2024


GÉSSICA AMORIM DO NASCIMENTO

Suplementação alimentar com açaí (*Euterpe oleracea*) como potencial modulador das defesas antioxidantes e dano oxidativo em zebrafish (*Danio rerio*)


Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Data de apresentação: 25 de abril de 2024.


BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA NOGUEIRA VALENTIN LUCIANELLI**
Data: 13/06/2024 20:01:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Fernanda Nogueira Valentin Lucianelli
FAMED/PPGBC/UFPA (Presidente/Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **JOSE MARIA MONSERRAT**
Data: 29/04/2024 15:13:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José María Monserrat
ICB/FURG (Membro externo)

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS DE LUCCA MOREIRA GOMES**
Data: 29/04/2024 12:42:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes
DBE/UFTM (Membro externo)

Documento assinado digitalmente
 **ADENILSON LEAO PEREIRA**
Data: 25/04/2024 17:08:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Adenilson Leão Pereira
FAMED/UFPA (Membro interno)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós,
dona **Maria Palma Amorim** e seu
Almerindo Pires de Amorim (*in
memoriam*), que cuidaram de mim
desde que nasci, e que continuarão a
cuidar onde quer que estejam. Espero
que estejam orgulhosos de mim...
Saudades Eternas!!

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por tudo que me permitiu até aqui, pela força e consolo nos momentos mais difíceis e que não me deixou desistir; toda honra e glória a Ele.

Agradeço aos meus pais, Laide Amorim e Wilson Lopes por todo apoio, conselhos e amor incondicional que me guiaram desde sempre na minha existência. Essa conquista também é de vocês, amo vocês!

Ao meu marido, Oriel Machado pela parceria, cuidado e suporte que tanto me ajudaram antes e durante dessa caminhada. Obrigada por estar sempre ao meu lado, eu te amo!

A minha orientadora Profa. Fernanda Valentin pelas avaliações críticas, pela sua paciência e compreensão nos momentos de dificuldade. Grata por todo apoio.

A minha coorientadora Profa. Lilian Lund por todo suporte experimental, sou grata pelos conselhos, carinho e atenção, muito obrigada por me acolher no seu laboratório e me ajudar em tudo sempre.

Ao professor Dr. Raul Carvalho e sua equipe LABTECS do BioTec-Amazonia pelo fornecimento da polpa do açaí liofilizado, insumo natural muito importante para esta pesquisa, e essencial no enriquecimento conceitual para a sociedade.

A toda a equipe LABECOTOX do LAPMAR/ICB da UFPA-Belém, a Alana, Sarita, Mara, Kawê, Marília, Rafael, João Pedro, Eri, Jacky e Jhon pela parceria e amizade.

Sou grata, especialmente, a doutoranda Carla Carolina, por sacrificar seu tempo a me ajudar em cada etapa do trabalho. Muito obrigada por acreditar em mim e me incentivar a não desistir do mestrado! Obrigada por compartilhar seus amplos conhecimentos comigo, você é demais mana!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC) da UFPA-Altamira pelos excelentes docentes que sempre estiveram disponíveis a me ajudar.

A minha turma de mestrado 2022 pela admiração e respeito que construímos ao longo das disciplinas.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro como agência de fomento para a execução deste projeto.

Muito obrigada a todos que direta ou indiretamente me apoiaram nessa caminhada (de desafios) acadêmica.

EPÍGRAFE

*“O sol brilha por si
Açaí, guardiã; Zum de besouro, um imã;
Branca é a tez da manhã, Açaí, guardiã...”*
Djavan

Suplementação alimentar com açaí (*Euterpe oleracea*) como potencial modulador das defesas antioxidantes e dano oxidativo em zebrafish (*Danio rerio*)

RESUMO GERAL

Dietas enriquecidas com o açaí da Amazônia (*E. oleracea*) proporcionam grandes benefícios nutricionais e terapêuticos à saúde, relacionados à presença de compostos bioativos. A polpa do fruto do açaí apresenta alto teor de antocianinas, pigmentos vegetais que apresentam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. A utilização de *D. rerio* (Teleostei: Cyprinidae) como um modelo animal em bioensaios, torna-se importante para avaliações de possíveis alterações moleculares causadas pelos pró-oxidantes presentes nas células, tendo aplicações diretas em outros peixes e também podendo ser extrapoladas para o ser humano, devido a homologia genética de 70% do genoma. O objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos da suplementação alimentar com polpa de açaí liofilizada (AÇL) testando distintas concentrações de antocianinas, como potencial modulador do sistema de defesa antioxidante em *D. rerio*. O estudo foi desenvolvido na seção de Ecotoxicologia do LAPMAR da UFPA/Belém. Total de 40 exemplares *D. rerio* foram organizados em: grupo controle (CTR) – somente dieta padrão; e de acordo com o valor da dieta padrão foram calculadas as quantidades para a suplementação em tratamento T1 – dieta padrão e suplementação de 10% AÇL; T2 - dieta padrão e suplementação de 25% AÇL; T3 – dieta padrão e suplementação de 50% AÇL. Ao longo de 5 dias foram realizadas análises dos parâmetros físico-químicos da água, sifonagem e trocas parciais de água, e ao final das 120 h de experimento, os peixes foram coletados, eutanasiados por crioanestesia, biometrados, pesados e armazenados a -80 °C em *ultrafreezer*. Posteriormente, os animais inteiros foram homogeneizados, seguindo pela quantificação de proteínas totais e dosagens com biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo: capacidade antioxidante total (ACAP), glutamato cisteína ligase (GCL), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GR), glutathiona s-transferase (GST) e lipoperoxidação (LPO). Os resultados foram analisados por meio de comparações entre grupos independentes com variável resposta quantitativa, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com o nível de significância de 5%. Dos parâmetros físico-químicos avaliados, os níveis de amônia foram os únicos monitorados que mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento T3 – 50% AÇL no último tempo de análise. Não houve nenhuma diferença estatística significativa ($p > 0,005$) para os dados biométricos e também para os biomarcadores entre os grupos amostrais. Os resultados indicam tendências que a oferta suplementar de açaí, por períodos mais prolongados, pode promover uma neutralização dos agentes pró-oxidantes das células. Essa suplementação pode ser considerada uma alternativa natural para aumentar a resistência ao estresse frente às condições pró-oxidantes do organismo, estabelecendo estratégias de quimioproteção para saúde humana e animal.

Palavras-chaves: Polpa de açaí; Antocianinas; Estresse oxidativo.

Dietary supplementation with açai (*Euterpe oleracea*) as a potential modulator of antioxidant defenses and oxidative damage in zebrafish (*Danio rerio*)

GERAL ABSTRACT

Diets enriched with Amazonian açai (*E. oleracea*) provide great nutritional and therapeutic health benefits, related to the presence of bioactive compounds. The pulp of the açai fruit is high in anthocyanins, plant pigments that have anti-inflammatory and antioxidant properties. The use of *D. rerio* (Teleostei: Cyprinidae) as an animal model in bioassays is important for evaluating possible molecular alterations caused by the pro-oxidants present in the cells, with direct applications in other fish and can also be extrapolated to humans, due to the genetic homology of 70% of the genome. The aim of this study was to characterize the effects of dietary supplementation with freeze-dried açai pulp (AÇL), testing different concentrations of anthocyanins, as a potential modulator of the antioxidant defence system in *D. rerio*. The study was carried out in the Ecotoxicology section of LAPMAR at UFPA/Belém. A total of 40 *D. rerio* specimens were organized into: control group (CTR) - standard diet only; and according to the value of the standard diet, the amounts for supplementation in treatment were calculated T1 - standard diet and supplementation of 10% AÇL; T2 - standard diet and supplementation of 25% AÇL; T3 - standard diet and supplementation of 50% AÇL. Water physicochemical parameters, siphoning and partial water changes were analyzed over the course of 5 days. At the end of the 120-hour experiment, the fish were collected, euthanized by cryoanesthesia, biometrically measured, weighed and stored at -80 °C in an ultrafreezer. Subsequently, the whole animals were homogenized, followed by the quantification of total proteins and measurements of biochemical biomarkers of oxidative stress: total antioxidant capacity (TACC), glutamate cysteine ligase (GCL), reduced glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), glutathione s-transferase (GST) and lipoperoxidation (LPO). The results were analyzed by means of comparisons between independent groups with a quantitative response variable, using the non-parametric Kruskal-Wallis test, with a significance level of 5%. Of the physicochemical parameters evaluated, ammonia levels were the only ones monitored that showed a significant difference ($p < 0.05$) in the T3 - 50% AÇL treatment at the last analysis time. There was no statistically significant difference ($p > 0.005$) for the biometric data and also for the biomarkers between the sample groups. The results indicate that the supplementary supply of açai for longer periods can promote a neutralization of pro-oxidant agents in the cells. This supplementation can be considered a natural alternative to increase resistance to stress in the face of pro-oxidant conditions in the body, establishing chemoprotection strategies for human and animal health.

Keywords: Açai pulp; Anthocyanins; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Açazeiro (<i>Euterpe oleracea</i> Mart) em vegetação natural. Fonte: Portal Embrapa.....	14
Figura 2 – A. Representação do cacho maduro do açazeiro (<i>Euterpe oleracea</i> Mart); B. Representação do fruto globoso do açazeiro. Fonte: Viana, 2019....	15
Figura 3 - Peconha, instrumento manual para auxílio na colheita do fruto do açai. Fonte: LensCulture.....	16
Figura 4 – A. Representação da polpa natural de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart); B. Representação da polpa de liofilizada de açai. Fonte: google imagens.....	17
Figura 5 - Esquema de classificação dos compostos fenólicos e subdivisões dos grupos fenólicos e polifenóis. Fonte: Da Silva et al. (2023).....	18
Figura 6 - Representação da estrutura molecular geral das antocianinas. Fonte: Ecured.....	19
Figura 7 - Composição fitoquímica química e estruturas moleculares dos sub-compostos de antocianinas. Fonte: Hribar et al. (2014).	19
Figura 8 - Sistema enzimático antioxidante. Fonte: Linhares, 2014	22
Figura 9 - Peixe adulto <i>D. rerio</i> (Teleostei: Cyprinidae). Fonte: Mirko Rosenau.	24
Figura 10 - A. Comparações fisiológicas do peixe <i>D. rerio</i> (Teleostei: Cyprinidae) em relação a outros organismos modelos; B. Representação gráfica da homologia genética do <i>D. rerio</i> com o ser humano e outros animais. Fonte – José Xavier Neto / LNBio, Mônica Ryff Vianna / PUC-RS e Denis Rosemberg, 2013.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AÇL	polpa de açaí liofilizada
pH	potencial hidrogeniônico
SNC	sistema nervoso central
LDL	lipoproteína de baixa densidade
EROs	espécies reativas de oxigênio
CAT	catalase
SOD	superóxido dismutase
GPx	glutathione peroxidase
GCL	glutamato cisteína ligase
GR	glutathione reductase
GST	glutathione s-transferase
GSH	glutathione reduzida
O ₂ -	radicais ânion superóxido
HO	hidroxila
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ACAP	capacidade antioxidante total
LPO	lipoperoxidação / peroxidação lipídica
NH ₄ ⁺	amônia ionizada
NH ₃	amônia não-ionizada
LAPMAR	Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
NBR	Normativa Brasileira
TPA	Troca parcial de água
CT	controle
q1	1º quartil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Açaí da Amazônia (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	14
1.2 Antocianinas e suas aplicações	17
1.3 Sistemas de defesa antioxidante	21
1.4 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo experimental.....	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.1 Objetivos Específicos.....	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 1	35
Suplementação alimentar com açaí (<i>Euterpe oleracea</i>) como potencial modulador das defesas antioxidantes e de dano oxidativo em zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	36
RESUMO	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	39
Certificação de estudo	39
Obtenção da polpa de açaí liofilizado para o experimento	40
Preparo para o bioensaio.....	40
Ofertas de alimentação para o experimento.....	41
Desenho experimental.....	41
Parâmetros físico-químicos da água.....	42
Preparo de homogeneizados para análises bioquímicas	43
Determinação de proteínas totais nas amostras	43
Determinação da capacidade antioxidante total (ACAP)	43
Determinação da atividade da glutathiona reduzida (GSH) e do glutamato cisteína ligase (GCL).....	43
Determinação da atividade da glutathiona redutase (GR)	44
Determinação da atividade da glutathiona-S-transferase (GST)	44
Análise do nível de lipoperoxidação (LPO).....	44
Análises estatísticas	45
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Açaí da Amazônia (*Euterpe oleracea* Mart.)

O açaizeiro (*E. oleracea*) é uma palmeira nativa amazônica da família Arecaceae que cresce principalmente no bioma tropical úmido. É uma palmeira muito comum em matas pantanosas e ao longo de riachos e igapós na América Central e do Sul (Cedrim *et al.*, 2018; Da Silva *et al.*, 2023).

A palmeira do açaí é amplamente utilizada de diferentes maneiras como fonte de matéria-prima para fabricação de biojóias, construções civis, produção de palmito e na agricultura familiar de comunidades ribeirinhas (Nogueira *et al.*, 1998). As fibras das folhas são utilizadas para confecção de chapéus e cestas, além do comércio do fruto, portanto, é uma planta economicamente importante para populações nativas (Lorenzi, 1996).

Cada açaizeiro, como visto na Figura 1, apresenta um multicaule de 9 a 16 cm de diâmetro do tipo estipe podendo atingir mais de 25 m de altura, possui folhas compostas com arranjo espiralado em pares de 8 a 14 folíolos, inflorescência ramificada e o período de frutificação pode ocorrer durante todo o ano, porém, os frutos ficam com maturação uniforme no verão (Fregonesi *et al.*, 2010).



Figura 1 - Açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart) em vegetação natural. Fonte: Portal Embrapa.

O fruto do açazeiro é uma drupa globosa medindo cerca de 1 a 2 cm de diâmetro (Neri-Numa *et al.*, 2018), possui sementes que representam 85% do seu volume e são cobertas com uma camada de polpa de cor arroxeada (Wycoff *et al.*, 2015), essa coloração é devido à alta concentração de antocianinas, um corante natural com diversas propriedades medicinais (Figura 2).

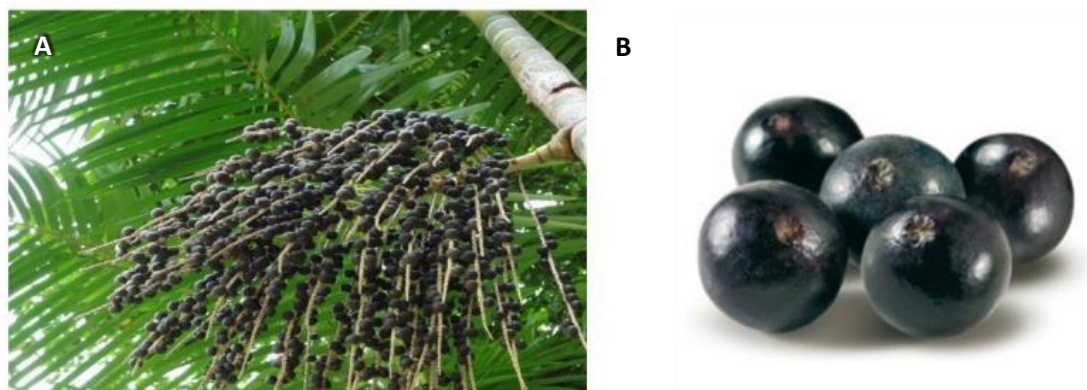


Figura 2 – A. Representação do cacho maduro do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart); B. Representação do fruto globoso do açazeiro. Fonte: Viana, 2019.

Os principais aproveitamentos ambiental e econômico da *E. oleracea* são na região Norte do Brasil (Barbosa *et al.*, 2022), sendo o Estado do Pará o responsável por cerca de 98,3% de produção, processamento e extração do fruto do açaí da Amazônia em relação as demais Estados brasileiros (IBGE, 2020), estando atualmente com grande expansão econômica atingindo mercados no exterior.

O modo de plantação predominante do açaí é do tipo várzea, esse cultivo é realizado em um sistema agroflorestal pelos produtores familiares, sendo a colheita e debulha (processo de retirada do fruto dos cachos) feitas tradicionalmente pelos chamados peconheiros, pessoas que fazem a colheita do açaí manualmente subindo no caule da palmeira (Almeida *et al.*, 2021) com o auxílio da peconha, instrumento artesanal de aderência preso aos pés do indivíduo (Figurar 3).

A polpa do açaí é a parte comestível do fruto, considerada um insumo para a produção da bebida denominada açaí (Oliveira *et al.*, 2022), e tem sido muito estudado em função de seu valor essencialmente energético, com elevada concentração de fibra alimentar e aspecto nutritivo, assim como benefícios da polpa liofilizada (Rogez, 2000).



Figura 3 - Peconha, instrumento manual para auxílio na colheita do fruto do açai. Fonte: LensCulture.

A polpa de açai é definida como produto não fermentado e com teor mínimo de sólidos totais obtidos da parte comestível do fruto (BRASIL, 2000). Apresenta potencial relevante como fonte de fibra alimentar (Ramulu *et al.*, 2003), elevado teor lipídico, alto teor antioxidante, apresenta muitos compostos fenólicos e antocianinas totais, porém possui baixo teor proteico (Silva *et al.*, 2017).

Em contrapartida, a polpa de açai liofilizada (AÇL) mostra-se como um alimento altamente calórico com cerca de 489,39 Kcal/g de polpa liofilizada, contendo elevados índices de lipídeos, carboidratos e proteínas, alto teor de minerais e pouca concentração de ferro, como mostrado na Figura 4 (Menezes *et al.*, 2008).

Este alimento tem recebido bastante atenção das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética devido ao valor nutricional e medicinal, com composição rica em bioativos relacionados a propriedades antioxidantes, antimicrobianas, analgésicas e cardioprotetoras (Maciel-Silva *et al.*, 2022).

Há relatos populares de que o açai pode promover efeitos medicinais como tratar febres, prevenir gripes, resfriados, ajudar na melhora de dores e tratar doenças gastrointestinais (Matheus *et al.*, 2006). Pode atuar como antidepressivo (Souza-Monteiro *et al.*, 2019), além de possuir em sua composição vitaminas A, C, D e E, minerais, ácidos graxos, fibras, carboidratos e proteínas, e devido essas características ganhou o status de “superfruta” (Neri-Numa *et al.*, 2018).



Figura 4 – A. Representação da polpa natural de açaí (*Euterpe oleracea* Mart); B. Representação da polpa de liofilizada de açaí. Fonte: google imagens.

Estudos dietéticos comprovam que o consumo do açaí proporciona inúmeros benefícios nutricionais e terapêuticos para a saúde, podendo prevenir o aparecimento de doenças crônicas não-transmissíveis, como diabetes, obesidade e síndrome metabólica, sendo considerado como um alimento funcional (Cedrim *et al.*, 2018; Schauss *et al.*, 2006).

1.2 Antocianinas e suas aplicações

Os compostos fenólicos são moléculas originadas do metabolismo secundário das plantas (Angelo; Jorge, 2007), pertencentes aos maiores grupos fitoquímicos do reino vegetal, sendo essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem na sua pigmentação (Luo *et al.*, 2022).

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza (Figura 5), sendo os compostos resultantes chamados de polifenóis, dentre eles, destacam-se o grupo dos flavonoides, substâncias que contribuem para a pigmentação e mecanismos sensoriais de atração das partes dos vegetais (Angelo; Jorge, 2007; Santana-Gálvez, 2018).

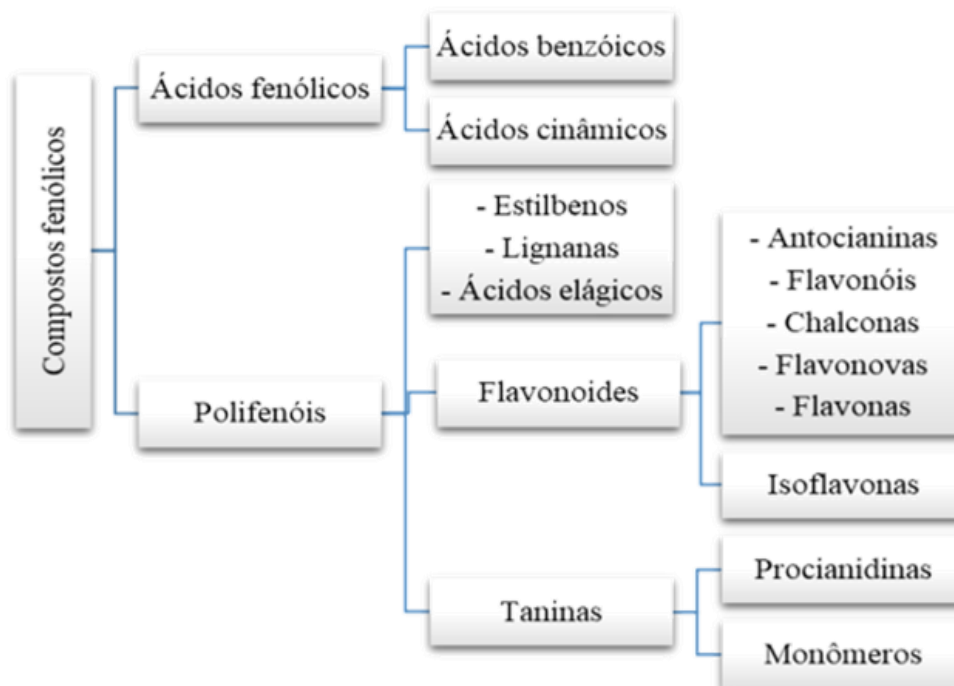


Figura 5 - Esquema de classificação dos compostos fenólicos e subdivisões dos grupos fenólicos e polifenóis. Fonte: Da Silva *et al.* (2023).

As antocianinas são polifenóis do subgrupo dos flavonoides caracterizados como pigmentos vegetais hidrossolúveis, juntamente com os carotenoides, sendo a maior classe de substâncias coloridas do reino vegetal encontradas amplamente em flores, frutos e plantas superiores (Fenger *et al.*, 2019).

Diferentemente dos outros subtipos de flavonoides, as antocianinas são pigmentos capazes de absorver fortemente luz na região do espectro visível, conferindo uma afinidade com as cores laranja, vermelho, púrpura e azul (Brouillard, 1982) e responsável pela coloração roxa escura do fruto e por sua atividade antioxidante (Dantas *et al.*, 2021; De Lima Yamaguchi *et al.*, 2015).

Conforme a figura 6, esse polifenol apresenta em sua estrutura molecular dois anéis de benzeno, ligados por um anel C de pirona, com 2-fenilbenzopirílio em esqueleto heterocíclico C-15, denominado de antocianidina, contendo grupos -OH ou -OCH₃ com um ou mais resíduos de açúcar (Abdal Dayem *et al.*, 2016; Oancea, 2021).

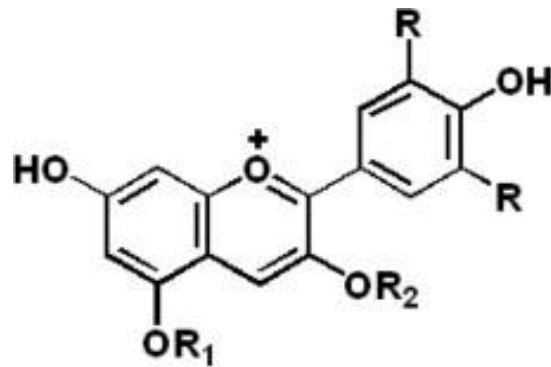


Figura 6 - Representação da estrutura molecular geral das antocianinas. Fonte: Ecured.

Em análise da composição fitoquímica da polpa de açaí (Figura 7), foi encontrada a antocianina cianidina, principalmente a cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo, considerados sub-compostos desse flavonoide em maior quantidade em *E. oleracea*, relacionadas ao seu potencial antioxidante (Carvalho *et al.*, 2017; Petruk *et al.*, 2017).

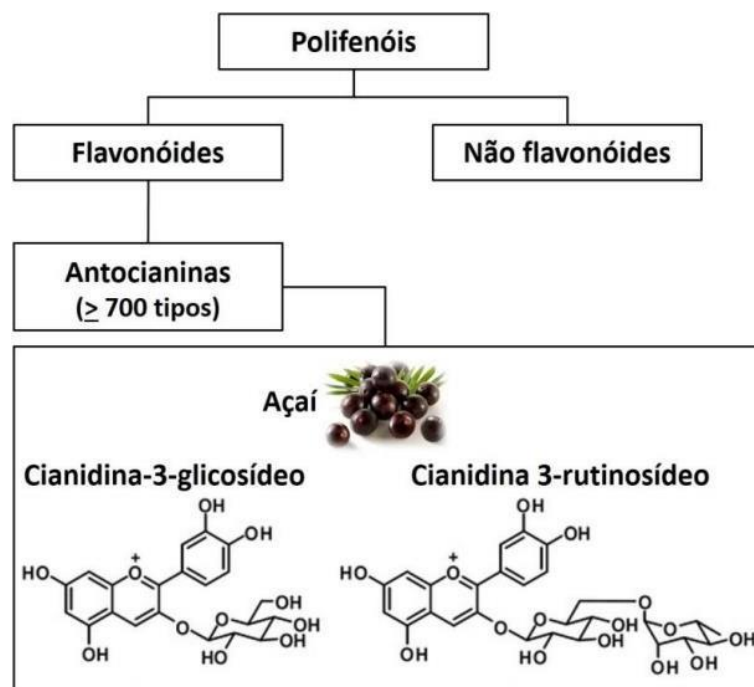


Figura 7 - Composição fitoquímica química e estruturas moleculares dos sub-compostos de antocianinas. Fonte: Hribar *et al.* (2014).

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interceptadores de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), sendo muito eficientes na prevenção da

autoxidação de ERO, favorecendo a abstração do seu hidrogênio molecular (Kruk *et al.*, 2022).

O efeito de combate às ERO, como radicais livres: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), exercido pelos flavonoides do tipo antocianinas, deve-se à capacidade em neutraliza-los, pois em sua estrutura química apresentam grupos hidroxilas que podem inibir reações de oxidação das ERO, doando átomos de hidrogênio às espécies, assim estabilizando-as e transformando-as em quinonas (Souza, 2009).

A bioacessibilidade de compostos polifenólicos, refere-se à quantidade que esse composto atravessa a parede intestinal do indivíduo e que se torna disponível para absorção na corrente sanguínea (Wootton-Beard, 2011). Essa transição do ambiente gástrico ácido para o intestino alcalino pode causar uma diminuição na quantidade de flavonoides bioacessíveis, como é o caso das antocianinas, que é instável em pH intestinal (Bouayed *et al.*, 2011).

As cores das antocianinas, como dito anteriormente, variam com as mudanças no pH. Em soluções com pH abaixo de 2, o pigmento de antocianina se apresenta como um vermelho intenso, mas torna-se violeta quando o pH é aumentado para a faixa de 4 a 6; em contrapartida, quando há um aumento no pH da solução para acima de 7 até 11, o pigmento da antocianina passa de azul para verde e depois da faixa de pH 12 fica na cor amarela (Hocine *et al.*, 2018).

O comportamento térmico das antocianinas pode ser diferente em matrizes alimentares, como o açaí (Rossi *et al.*, 2022). Esses pigmentos são instáveis e podem se degradar em diferentes graus de aquecimento, e essa destruição das antocianinas ocasionada pelo calor pode estar relacionado com a quebra do anel heterocíclico com formação da chalcona (Constant, 2003), logo, o tempo de aquecimento parece influenciar em maior grau a perda de antocianinas (Hocine *et al.*, 2018).

Referente ao fator luz, em ambientes ricos em oxigênio, a degradação das antocianinas é mais rápida, principalmente em pigmentos expostos à luz fluorescente (Miranda *et al.*, 2021), ou seja, a degradação da molécula do flavonoide induzida pela luz é dependente da concentração de oxigênio molecular presente no ambiente.

Há dificuldade em usar antocianinas como corantes naturais, devido à grande instabilidade desse flavonoide, uma vez que o modo como é feito o processamento ou armazenamento desse composto torna-se essencial para determinar fatores como

prazo de validade, qualidade e viabilidade do produto (Miranda *et al.*, 2021; Rossi *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, houve um aumento no consumo de produtos ricos em antocianinas, que demonstraram exercer efeitos preventivos contra muitas doenças por apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatória (Alzaabi *et al.*, 2021) e potencial neuroprotetor para a saúde (Earling *et al.*, 2019).

Muitos dos benefícios fisiológicos desses flavonoides têm sido atribuídos a ações citoprotetoras e efeito antioxidante, podendo o mesmo ser direto (eliminando espécies reativas) ou indireto (aumentando a atividade ou expressão de enzimas antioxidantes) (Souza, 2009).

O uso de compostos derivados de plantas, extratos vegetais e componentes fitoquímicos que contêm bioativos com ação anti-inflamatória, pode promover efeitos de modulação da via de sinalização e de fatores de transcrição envolvidos em vias pró e anti-inflamatórias, e essas alterações são importantes para permitir o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Soares *et al.*, 2015).

É conhecido que alimentos ricos em antocianinas, como o açaí, podem estabelecer proteção contra doenças no sistema nervoso central (SNC) (Hamsalakshmi *et al.*, 2022), podem reduzir o teor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), melhorando a função hepática do indivíduo (De Souza *et al.*, 2010) e danos hepáticos em vertebrados (Viana, 2019).

Outros bioensaios com modelos *in vitro* e *in vivo* mostraram redução da produção de ERO em células sanguíneas mediante tratamentos com polifenóis (Da Cruz Pádua *et al.*, 2010), além de diminuir a peroxidação lipídica em pacientes com hemodiálise (Martins, 2019) e diminuir os efeitos hipocolesterolêmicos (De Souza *et al.*, 2010).

Estudos bioquímicos recentes têm demonstrado eficácia de antocianinas no aumento da defesa antioxidante em brânquias e músculos de grupos de invertebrados aquáticos (Schmitz *et al.*, 2020), estímulo no crescimento corporal e melhoramento do estado bioenergético muscular de peixes (Da Silva *et al.*, 2023).

1.3 Sistemas de defesa antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que inibem o dano oxidativo de outras biomoléculas e neutralizam o excesso de radicais livres presentes nas células do indivíduo (Gomes, 2012).

Essas substâncias possuem mecanismos de ação contra os pró-oxidantes, agindo como sistemas de prevenção que impedem a formação de ERO. São sistemas varredores, que impedem a ação das ERO, além de atuar como sistemas de reparo para reconstituir estruturas moleculares lesadas pelos pró-oxidantes (Akimoto, 2022).

Os antioxidantes também classificam-se em duas categorias: os enzimáticos, constituído de algumas enzimas como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), atuando no equilíbrio do sistema antioxidante/oxidante (Figura 8) (Loureiro *et al.*, 2023); e os não-enzimáticos, que podem ter origem dietética, como as vitaminas C e E (Barbosa *et al.*, 2010), a glutatona reduzida e os flavonoides (Moussa *et al.*, 2019), antioxidantes que atuam em diferentes mecanismos de ação impedindo a formação dos radicais livres (Clarkson *et al.*, 2000).

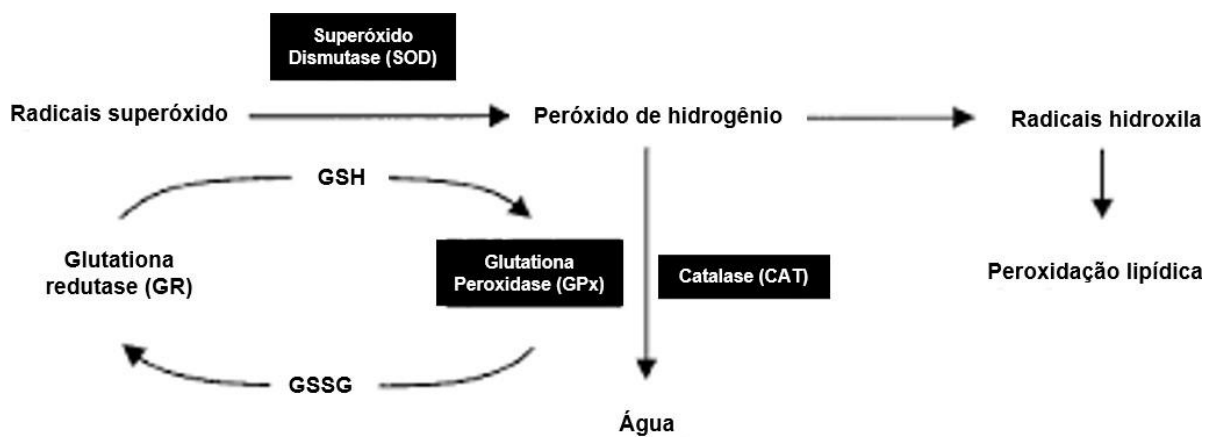


Figura 8 - Sistema enzimático antioxidante. Fonte: Linhares, 2014.

As ERO são derivadas do metabolismo oxidativo celular, formadas por moléculas com elétrons desemparelhados na última camada de valência, apresentando grande instabilidade elétrica e alta capacidade reativa molecular (Rahal *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio molecular devido a formação de pró-oxidantes que excede a capacidade de ação dos antioxidantes do organismo, gerando assim, a oxidação de biomoléculas (Halliwell *et al.*, 1985).

Atualmente, a melhor definição de estresse oxidativo seria uma alteração da sinalização redox específica por vias de controle do organismo (Jones *et al.*, 2006),

tendo em vista que este desequilíbrio está relacionado com o envelhecimento precoce e ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças, como as cardiovasculares (Powers *et al.*, 2020).

A maioria dos organismos possui, naturalmente, um mecanismo de defesa para interceptação de ERO ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e H_2O_2) (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017), contudo, o emprego de biomarcadores de estresse oxidativo pode servir como uma ferramenta promissora em estudos bioquímicos sobre respostas das defesas antioxidantes e de parâmetros de dano oxidativo (Gupta, 2019).

Os biomarcadores são alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas medidas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos (Lam *et al.*, 2003). O uso de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo são excelentes instrumentos para avaliar os efeitos e modulações biológicas causados pelos pró-oxidantes nas células do organismo (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017).

Estudos bioquímicos utilizam amplamente a análise de capacidade antioxidante total (ACAP), considerada uma medida usada como ferramenta de avaliação da competência de proteção contra os efeitos dos peroxi radicais nos tecidos (Loureiro *et al.*, 2023) e a glutatona S-transferase (GST), enzima de fase II responsável pela conjugação da glutatona reduzida (GSH), que desempenha papel importante na eliminação de xenobióticos (Xiong *et al.*, 2011).

Outro biomarcador importante é a glutamato cisteína ligase (GCL), enzima necessária para síntese de glutatona (Choong *et al.*, 2013); a glutatona redutase (GR) considerada um antioxidante enzimático com função de reciclagem da GSH e detoxificação de ERO intracelular (Change *et al.*, 1979), e a lipoperoxidação (LPO), considerada um biomarcador de efeito com função de quantificar lipídeos peroxidados proveniente da exposição aos pró-oxidantes (Amato *et al.*, 2019).

Os biomarcadores de estresse oxidativo podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química, podendo ser utilizados para avaliar a exposição, efeitos e suscetibilidade individual das substâncias químicas, sendo utilizados como medidas bioquímicas que evidenciam o *status* redox e de saúde do organismo (Amorim, 2003).

A utilização de biomarcadores bioquímicos em estudos de suplementação alimentar pode servir para avaliar os efeitos dos compostos bioativos presentes nos alimentos funcionais, bem como mensurar possíveis modulações no sistema de

defesa antioxidante, tendo em vista que a terapia nutricional à base de alimentos antioxidantes é uma alternativa na prevenção e tratamento de doenças em organismos (Batistussi *et al.*, 2019).

1.4 Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental

Atualmente, grande atenção é dada a estudos com *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae), também conhecido como zebrafish. Considerado um peixe tropical nativo do sul asiático, de pequeno porte, quando adulto pode medir em média de 4-5 cm de comprimento e possui corpo cilíndrico com listras horizontais claras e escuras da parte posterior da cabeça até a nadadeira caudal, como ilustrado na Figura 9 (Spence *et al.*, 2008).



Figura 9 - Peixe adulto *D. rerio* (Teleostei: Cyprinidae). Fonte: Mirko Rosenau.

D. rerio, também conhecido popularmente como “paulistinha”, é considerado um importante modelo experimental para vertebrados e está sendo mundialmente utilizado em diversas áreas de pesquisas, por possuir algumas vantagens em relação a outros organismos experimentais, como por exemplo, apresentar alta taxa reprodutiva (Trigueiro *et al.*, 2020) e rápida embriogênese (Simonetti, 2014).

Como um modelo vertebrado, o *D. rerio* compartilha muitas características anatômicas e fisiológicas em relação aos mamíferos, embora seja um animal agástrico, sem estômago, com um longo intestino, apresentando também características que são adaptações específicas à vida aquática (Gawel *et al.*, 2020; Ulloa *et al.*, 2011).

Essa espécie apresenta atributos que contribuem para substituição, redução e o refinamento do uso de mamíferos nas pesquisas, como transparência de ovos e

larvas, baixo custo de manutenção comparados a outros organismos modelos (Fukushima *et al.*, 2020), homologia genética e fisiologia homóloga com a dos seres humanos, especialmente o sistema nervoso (Figura 10) (Tal *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que no ano de 2013, foi divulgado a sequência genômica do *D. rerio*, revelando que esse peixe e os humanos tem alta semelhança genética apresentam cerca de 12.700 genes em comum (Howe *et al.*, 2013), ou seja, 70% de conservação genética com os humanos (Tal *et al.*, 2020).

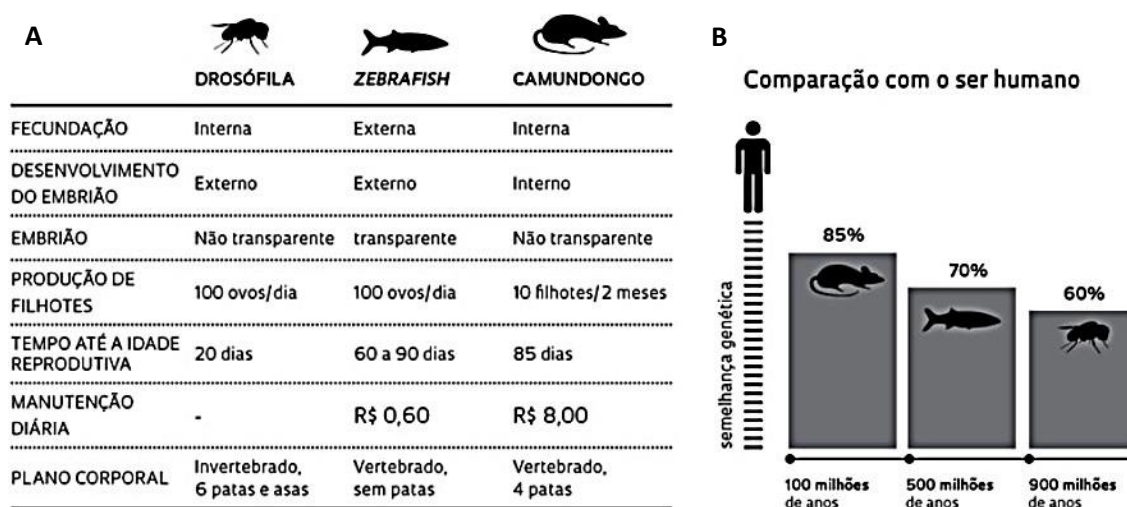


Figura 10 - A. Comparações fisiológicas do peixe *D. rerio* (Teleostei: Cyprinidae) em relação a outros organismos modelos; B. Representação gráfica da homologia genética do *D. rerio* com o ser humano e outros animais. Fonte – José Xavier Neto / LNBio, Mônica Ryff Vianna / PUC-RS e Denis Rosemberg, 2013.

É frequentemente descrito como um peixe onívoro e territorialista, estabelecendo hierarquias, apresenta hábitos diurnos e durante o cortejo permanecem em toda a coluna de água (Spence *et al.*, 2006); além de ter comportamentos sociais, nadando em pequenos cardumes (Pritchard *et al.*, 2001).

Os peixes *D. rerio* são animais ovíparos, sua fecundação e o desenvolvimento embrionário são externos, as fêmeas são assíncronas, se reproduzindo em pequenos grupos e espalhando seus ovos pelo substrato sem cuidado parental (Lawrence, 2007).

Os ovos são demersais, ficando ao fundo do substrato, altamente dependente das condições ambientais, com eclosão entre 48 - 72 h; os embriões são transparentes desenvolvem-se rapidamente em torno de quatro dias, as larvas

eclodem entre 2.5 – 3 dias após a fertilização e a transição de larva para juvenil ocorre 30 dias após a fertilização (Ulloa *et al.*, 2011).

A qualidade da água, assim como a alimentação, exerce um grande impacto sobre a sobrevivência, reprodução e metabolismo de peixes, principalmente para o *D. rerio* (Simonetti, 2014). Dependendo dos níveis de pH e temperatura do meio aquático, as concentrações de nitrito, nitrato e amônia podem promover toxicidade, causando efeitos danoso e letais às populações de seres vivos (Holanda *et al.*, 2017).

A amônia é encontrada no ambiente aquático na forma ionizada em amônio (NH_4^+) ou não ionizada (NH_3), sendo o principal produto nitrogenado gerado pelo metabolismo de proteínas em peixes teleósteos (Forster *et al.*, 1969). Concentrações elevadas desses compostos na água dificultam a excreção dos peixes, aumentando o nível de amônia no sangue e nos tecidos, causando graves prejuízos fisiológicos (Boyd *et al.*, 2012).

Na piscicultura, a principal fonte de compostos nitrogenados incorporados à água é a alimentação (Cavero *et al.*, 2004), e a intervenção não farmacológica que vem sendo implementada em vertebrados é a suplementação dietética, no qual se obtém aumento das defesas antioxidantes através da ingestão de certos alimentos e bebidas ricos em agentes antioxidantes (Akimoto, 2022).

O uso de animais em pesquisas científicas tem gerado grandes discussões nos últimos anos, e têm sido crescentes as preocupações relacionadas à bioética e bem-estar animal (Simonetti, 2014). Em contrapartida, avaliação da qualidade da água com biomarcadores, têm se tornado bastante comuns nos últimos anos no Brasil (Holanda *et al.*, 2017).

É importante que os estudos com *D. rerio* tenham análises de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, uma vez que essas análises funcionam como ferramentas necessárias para respostas basais dos organismos, frente a homeostase e reações de antioxidantes e danos oxidativos (Loureiro *et al.*, 2023).

Estudos dietéticos devem ser realizados para fornecer maiores informações acerca de possíveis alterações moleculares advindas da suplementação alimentar, principalmente quando se utiliza o açaí como suplemento, podendo este ter finalidade de uso potencial terapêutico para amenizar doenças desencadeadas por ERO e danos provocados pelo estresse oxidativo celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os efeitos da suplementação alimentar com polpa de açaí liofilizada (*E. oleracea*) testando distintas concentrações, baseadas no teor de antocianinas, como potencial modulador do sistema de defesa antioxidante em *D. rerio* (Teleostei: Cyprinidae).

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade antioxidante total (ACAP) em *D. rerio* expostos à dieta padrão e suplementação de AÇL;
- Analisar a concentração da glutathiona reduzida (GSH) e a atividade do glutamato cisteína ligase (GCL) em *D. rerio* expostos à dieta padrão e suplementação de AÇL
- Avaliar a atividade da glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST) em *D. rerio* expostos à dieta padrão e suplementação de AÇL;
- Analisar o nível de lipoperoxidação (LPO) em *D. rerio* expostos à dieta padrão e suplementação de AÇL.

REFERÊNCIAS

- ABDAL DAYEM, A.; CHOI, H.Y.; YANG, G.M. KIM, K.; SAHA, S.K.; CHO, S.G. The anti-cancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: molecular mechanisms. **Nutrients**, v. 8, n. 9, p. 581, 2016.
- AKIMOTO, A. N. **Aspectos fisiológicos do açaí no sistema cardiovascular, autonômico e estresse oxidativo**. 2022. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2022).
- ALMEIDA, H.P.; HOMMA, A.K.O.; DE MENEZES, A.J.E. A.; FILGUEIRAS, G.C.; FARIAS NETO, J.T. Perfil socioeconômico da produção de açaí manejado em comunidades rurais do Município de Igarapé-Miri, Pará. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, e592101120084, 2021
- ALZAABI, M. M.; HAMDY, R.; ASHMAWY, N.S.; HAMODA, A.M.; ALKHAYAT, F.; KHADEMI, N.N.; JOUD, S.M.A.A.; EL-KEBLAWY, A.A.; SOLIMAN, S.S.M. Flavonoids are promising safe therapy against COVID-19. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-22, 2021.
- AMATO, A.A.; ROSA, E.C.C.C.; SANTOS, R.R.C.; NEVES, F.A.R.; GRIS, E.F.; FERREIRA, E.A.; COELHO, M.S. Avaliação do Estresse oxidativo e Lipoperoxidação (LPO) em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tratados no Hospital Universitário de Brasília (HUB). **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 4236–4256, 2019.
- AMORIM, L.C.A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158–170, jun. 2003.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos–Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- BARBOSA, J. R.; DE CARVALHO JÚNIOR, R. N. Food sustainability trends-How to value the açaí production chain for the development of food inputs from its main bioactive ingredients? **Trends in Food Science Technology**, 124, p. 86-95, 2022.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, jul. 2010.
- BATISTUSSI, E. G.; VICTOR, I.; MUSSINATO, J. C. S.; SANTOS, J. G.; ODIA, J. S.; BERNARDI, D. M. Açaí e seus benefícios: uma revisão bibliográfica. Cap. 4, p.37-53, *In: Composição e propriedades funcionais de frutas, bebidas e temperos*. Cascavel, PR: FAG, 2019. ISBN 978-85-45540-07-6.
- BIRNIE-GAUVIN, K.; COSTANTINI, D.; COOKE, S.J.; Willmore, W.G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. **Fish and Fisheries**, 18, n. 5, p. 928-942, 2017
- BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T.J.F. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion

and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 14-21, 2011.

BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Pond aquaculture water quality management**. Springer Science & Business Media, 2012. 1461554071.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.1, de 07 de janeiro de 2000**. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpas e sucos de frutas. MAPA, Brasília, 2000.

BROUILLARD, R.J.A. **Chemical structure of anthocyanins**. Chapter 1, p. 1-38, 1982.

CARVALHO, A.V.; FERREIRA FERREIRA DA SILVEIRA, T.; MATTIETTO, R.A.; OLIVEIRA, M.S.P.; GODOY, H.T. Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 5, p. 1467-1474, 2017.

CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; BORDINHON, A. M.; FONSECA, F.A. L.; ITUASSÚ, D.R.; ROUBACH, R.;ONO, E.A. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 513-516, 2004.

CEDRIM, P.C.A.S.; BARROS, E.M.A.; NASCIMENTO, T.G. Propriedades antioxidantes do açai (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. e2017092, 2018.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, Washington, v.59, n.3, p.527-605, 1979.

CHOONG, G.; LIU, Y.; XIAO, W.; TEMPLETON, D.M. Cadmium-induced glutathionylation of actin occurs through a ROS-independent mechanism: implications for cytoskeletal integrity, **Toxicology and applied pharmacology**, v. 272, p. 423-430, 2013.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S.J.T.A. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American journal of clinical nutrition**72, n. 2, p. 637S-646S, 2000.

DA CRUZ PÁDUA, B.; SILVA, L. D.; JÚNIOR, J. V. R. HUMBERTO, J.L.; CHAVES, M.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; COSTA, D.C. Antioxidant properties of Baccharis trimera in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 381-386, 2010.

DA SILVA, T.V.N.; DOS SANTOS, C.F.; DOS SANTOS, J.M. SCHMITZ, M.J.; RAMÍREZ, J.R.B.; TORRES, M.F.; BARBAS, L.A.L.; SAMPAIO, L.A.; VERDE, P.E.; TESSER, M.B.; MONSERRAT, J.M. Effects of dietary inclusion of lyophilized açai berries (*Euterpe oleracea*) on growth metrics, metabolic and antioxidant biomarkers, and skin color of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture International**, v. 31, n. 2, p. 1031-1056, 2023.

DANTAS, A. M.; BATISTA, J. D. F.; DOS SANTOS LIMA, M.; FERNANDES, F.A., RODRIGUES, S.; MAGNANI, M.; BORGES, G.D.S.C. Effect of cold plasma on açai pulp: Enzymatic activity, color and bioaccessibility of phenolic compounds. **LWT**, v. 149, p. 111883, 2021.

DE LIMA YAMAGUCHI, K. K.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.

DE SOUZA, M.O.; SILVA, M.; SILVA, M.E.; OLIVEIRA, R.D.E.P.; PEDROSA, M.L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7-8, p. 804-810, 2010.

EARLING, M.; BEADLE, T.; NIEMEYER, E.D. Açai Berry (*Euterpe oleracea*) dietary supplements: variations in anthocyanin and flavonoid concentrations, phenolic contents, and antioxidant properties. **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 74, p. 421-429, 2019.

FENGER, J.A.; MOLONEY, M.; ROBBINS, R.J.; COLLINS, T.M.; DANGLES, O. The influence of acylation, metal binding and natural antioxidants on the thermal stability of red cabbage anthocyanins in neutral solution. **Food & Function**, v. 10, n. 10, p. 6740-6751, 2019.

FORSTER, R.P.; GOLDSTEIN, L. 5 Formation of Excretory Products. *In: Fish physiology*: Elsevier, 1969. v. 1, p. 313-350.

FREGONESI, B.M.; YOKOSAWA, C.E.; OKADA, I.A. MASSAFERA, G.; COSTA, T.M.B.; PRADO, S.P.T. Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz – RIAL**, v. 69, n. 3, p. 387-395, 2010.

FUKUSHIMA, H.; BAILONE, R.; BAUMGARTNER, I.; BORRA, R.C.; CORREA, T.; DE AGUIAR, L.; ...; SETTI, P.G. Potenciais usos do modelo animal Zebrafish *Danio rerio* em pesquisas na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 18, n. 1, 2020.

GAWEL, K.; LANGLOIS, M.; MARTINS, T.; van der ENT, W.; TIRABOSCHI, E., JACMIN, M.; ...; ESGUERRA, C.V. Seizing the moment: Zebrafish epilepsy models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 116, p. 1-20, 2020.

GOMES, E.C.; SILVA, A.N.; OLIVEIRA, M.R.D. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

GUPTA, R. C. **Biomarkers in toxicology**. Academic press, 2019.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

HAMSALAKSHMI, A.M.A.; MARAPPA, A.M.; JOGHEE, S.; CHIDAMBARAM, S.B. Therapeutic benefits of flavonoids against neuroinflammation: a systematic review. **Inflammopharmacology**, 30, p. 111-136, 2022.

HOCINE, R.; FARID, D.; YASMINE, S.; KHODIR, M.; KAPRANOV, V.N.; KISELEV, E.F. Recent advances on stability of anthocyanins. **Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агротомия и животноводство**, v. 13, n. 4, p. 257-286, 2018.

HOLANDA, E.C.C.; DE SOUZA, R.H.B.; PASSINATO, E.B.; BAY-HURTADO, F.; RODRIGUES, J.F.H. **Toxicidade de amônia em peixes**. 2017.

HOWE, K.; CLARK, M.D.; TORROJA, C.F.; TORRANCE, J., BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; ...; TEUCKE, M. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

HRIBAR, U.; ULRIH, N.P. The metabolism of anthocyanins. **Current drug metabolism**, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2014.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura- PEVS**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2020>, 2020. Acessado em: 01 ago 2022.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

KRUK, J. ABOUL-ENEIN, B.H.; DUCHNIK, E.; MARCHLEWICZ, M. Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, v. 72, n. 1, p. 19, 2022.

LAM, P.K.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.

LINHARES, G. **Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos**. Blogspot. Disponível em: <https://radicaislivreseantioxidantes.blogspot.com/2014/06/antioxidantes-enzimaticos-e-nao.html> 2014. Acessado em: 08 jan 2023.

LORENZI, H. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Editora Plantarum, 1996.

LOUREIRO, S.N.; AMADO, L.L.; GIARRIZZO, T.J. A multi-tissues comparison of biomarkers in *Serrasalmus rhombeus* (Teleostei: Serrasalminidae) and *Prochilodus nigricans* (Teleostei: Prochilodontidae) from two Amazonian rivers with distinct levels of pollution. **Ecological Indicators**, v. 147, p. 109936, 2023.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, J.; LI, Y.; LUO, H.; CHEN, S.; ZENG, X.; HAN, Z. Acylation of anthocyanins and their applications in the food industry: Mechanisms and recent research advances. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2166, 2022.

MACIEL-SILVA, F.W.; VIGANÓ, J.; CASTRO, L.E.; SGANZERLA, W.G.; BULLER, L.S.; MARTÍNEZ, J.; ...; FORSTER-CARNEIRO, T. Pressurized liquid extraction coupled in-line with SPE and on-line with HPLC (PLE-SPExHPLC) for the recovery and purification of anthocyanins from SC-CO₂ semi-defatted Açaí (*Euterpe oleracea*). **Food Research International**, v. 160, p. 111711, 2022.

MARTINS, I.C.V.D.S. **Efeitos da suplementação com açaí clarificado (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre marcadores de estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica em hemodiálise**. 2019.

MATHEUS, M.E.; DE OLIVEIRA FERNANDES, S.B.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; DE SOUSA MENEZES, F.; FERNANDES, P.D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 291-296, 2006.

- MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SABAA SRUR, A.U. Valor nutricional da polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta amazônica**, v. 38, p. 311-316, 2008.
- MIRANDA, P.H.S.; DOS SANTOS, A.C.; DE FREITAS, B.C.B. DE SOUZA MARTINS, G.A.; BOAS, E.V.D.B.V.; DAMIANI, C. A scientific approach to extraction methods and stability of pigments from Amazonian fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 335-345, 2021.
- MOUSSA, Z.; JUDEH, Z.M.A.; AHMED, S. Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *Free radical medicine and biology*, v. 1, p. 11-22, 2019.
- NERI-NUMA, I.A.; SANCHO, R.A.S.; PEREIRA, A.P.A.; PASTORE, G.M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, p. 345-360, 2018.
- NOGUEIRA, O.L.; HOMMA, A.K. O. **Análise econômica de sistemas de manejo de açaiuais nativos no estuário amazônico**. Belém - PA: Embrapa Amazônia Oriental (Embrapa-CPATU), 1998. 38 p.
- OANCEA, S. A review of the current knowledge of thermal stability of anthocyanins and approaches to their stabilization to heat. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1337, 2021.
- OLIVEIRA, M.S.P.; MATTIETTO, R.A.; DOMINGUES, A.F.N. *et al.* (ed.). **E. oleracea e E. precatória - Açai**. Brasília - DF: 2022. 303 - 323 p. (Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o Futuro - Região Norte.
- PETRUK, G.; ILLIANO, A.; DEL GIUDICE, R.; RAIOLA, A.; AMORESANO, A.; RIGANO, M.M.; ...; MONTI, D.M. Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p. 42-51, 2017.
- POWERS, S. K.; DEMINICE, R.; OZDEMIR, M. YOSHIHARA, T.; BOMKAMP, M.P.; HYATT, H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? **Journal of sport and health science**, v. 9, n. 5, p. 415-425, 2020.
- PRITCHARD, V.L.; LAWRENCE, J.; BUTLIN, R.K.; KRAUSE, J. Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 6, p. 1085-1088, 2001.
- RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B., TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- RAMULU, P.; RAO, P.U. Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. **Journal of food composition and analysis**, v. 16, n. 6, p. 677-685, 2003.
- ROGEZ, H. **Açai: preparo, composição e melhoramento da conservação**. 2000.
- ROSSI, I.S.; COSTA, J.B.; NASCIMENTO, L.G.L.; DE CARVALHO, A.F. Estabilidade de antocianinas do açai: uma breve revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 8, n. 9, p. 14880-01a, 2022.
- SANTANA-GÁLVEZ, J.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D.A. Classification of phenolic compounds. In: *Phenolic Compounds in Food*. CRC press, 2018. p. 3-20.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(Acai). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006.

SCHMITZ, M.J.; COLOMBO, G.M.; DOS SANTOS SIMIÃO, C.; ORTIZ, C.R.; COSTA, L.D.F.; DA SILVA, T.V.N.; ...; MONSERRAT, J.M. Modulation of nodularin toxicity in shrimp *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) fed with dietary açai (*Euterpe oleracea*) inclusion. **Fish & Shellfish immunology**, v. 103, p. 464-471, 2020.

SILVA, A.; BECKMAN, J.; RODRIGUES, A.D.C.; SILVA, L.H.M. Avaliação da composição nutricional e capacidade antioxidante de compostos bioativos da polpa de açai. **Revista brasileira de tecnologia agroindustrial**, v. 11, n. 1, p. 2205-2216, 2017.

SIMONETTI, R.B. **Zebrafish (*Danio rerio*): futuro do modelo animal em pesquisa biomédica**. 2014. 41f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, 2014.

SOARES, E.R.; MONTEIRO, E.B.; DA SILVA, R.C.; BATISTA, A.; SOBREIRA, F.; MATTOS, T.; ...; DALEPRANE, J.B. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. 3, 2015.

SOUZA, M.O. **Suplementação da dieta com polpa do fruto do açai (*Euterpe oleraceae* Martius) melhora o perfil lipídico e a capacidade antioxidante—uma avaliação in vivo**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

SOUZA-MONTEIRO, J.R.; ARRIFANO, G.P.; QUEIROZ, A.I.D.; MELLO, B.S.; CUSTÓDIO, C.S.; MACÊDO, D.S.; ...; CRESPO-LÓPEZ, M.E. Antidepressant and antiaging effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) in mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

SPENCE, R.; FATEMA, M.; REICHARD, M.; HUQ, K.A.; WAHAB, M.A.; AHMED, Z.F.; SMITH, C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal of fish biology**, v. 69, n. 5, p. 1435-1448, 2006.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

TAL, T.; YAGHOUBI, B.; LEIN, P.J. Translational toxicology in zebrafish. **Current opinion in toxicology**, v. 23, p. 56-66, 2020.

TRIGUEIRO, N.S.S.; CANEDO, A.; BRAGA, D.L.S.; LUCHIARI, A.C.; ROCHA, T.L. Zebrafish as an emerging model system in the global south: two decades of research in Brazil. **Zebrafish**, 17, n. 6, p. 412-425, 2020.

ULLOA, P.E.; ITURRA, P.; NEIRA, R.; ARANEDA, C. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 649-666, 2011.

VIANA, A.M.F. **Açai (*Euterpe oleracea* Mart.): efeitos sobre a modulação do sistema glutatona, do perfil de genes do estresse do retículo endoplasmático e**

do metabolismo de fase I em ratas intoxicadas com paracetamol. 89 f. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

WOOTTON-BEARD, P.C.; RYAN, L. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. **Journal of functional foods**, v. 3, n. 4, p. 329-334, 2011.

WYCOFF, W.; LUO, R.; SCHAUSS, A.G.; NEAL-KABABICK, J.; SABAA-SRUR, A.U. MAIA, J.G. S.; ...; SMITH, R.E. Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 181-187, 2015.

XIONG, Y.; UYS, J.D.; TEW, K.D.; TOWNSEND, D.M. S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes, **Antioxidants & Redox Signaling, Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 1, p. 233-270, 2011.

CAPÍTULO 1

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) COMO POTENCIAL MODULADOR DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES E DANO OXIDATIVO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)¹

¹ Artigo a ser submetido ao periódico científico **Plos Biology**, normas disponíveis em: <https://journals.plos.org/plosbiology/s/submission-guidelines>

1
2 Title page

3

4 **Suplementação alimentar com açai (*Euterpe oleracea*) como potencial**
5 **modulador das defesas antioxidantes e dano oxidativo em zebrafish (*Danio***
6 **rerio)**

7

8 Géssica Amorim do Nascimento¹, Carla Carolina Miranda dos Santos², Lilian Lund
9 Amado^{2*}, Fernanda Nogueira Valentin^{1,3*}.

10

11 ¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade
12 Federal do Pará (UFPA), Campus Altamira.

13 ² Seção de Ecotoxicologia (LABECOTOX) do Laboratório de Pesquisa em
14 Monitoramento Ambiental Marinho (LAPMAR) do Instituto de Ciências Biológicas –
15 ICB da UFPA, Belém-PA.

16 ³ Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus
17 Altamira.

18

19 *Corresponding authorship: lilian.amado@gmail.com , fervalentin@ufpa.br

20

21

22 RESUMO

23 Dietas enriquecidas com o açaí da Amazônia (*E. oleracea*) proporcionam grandes
24 benefícios nutricionais e terapêuticos à saúde. O objetivo deste estudo foi caracterizar
25 os efeitos da suplementação alimentar com polpa de açaí liofilizado (AÇL) como
26 potencial modulador do sistema de defesa antioxidante em *D. rerio* (Teleostei:
27 Cyprinidae). Quarenta peixes foram organizados em: grupo controle (CTR) –
28 somente dieta padrão; tratamento T1 – dieta padrão e 10% AÇL; T2 - dieta padrão e
29 25% AÇL e T3 – dieta padrão e 50% AÇL. Durante o bioensaio foram realizadas
30 análises dos parâmetros físico-químicos da água, sifonagem, trocas parciais de água,
31 e ao final, os peixes foram eutanasiados por crioanestesia, biometrados e
32 armazenados. Houve homogeneização, seguido da quantificação de proteínas totais e
33 dosagens com biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo: capacidade
34 antioxidante total (ACAP), glutamato cisteína ligase (GCL), glutathiona reduzida
35 (GSH), glutathiona redutase (GR), glutathiona s-transferase (GST) e lipoperoxidação
36 (LPO). Os resultados foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-
37 Wallis, nível de significância de 5%. Dos parâmetros físico-químicos avaliados, os
38 níveis de amônia mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento T3 no
39 último tempo de análise. Não houve nenhuma diferença estatística significativa
40 ($p > 0,005$) para os dados biométricos e para os biomarcadores entre os grupos
41 amostrais. Os resultados indicam tendências que a oferta suplementar de açaí,
42 por períodos mais prolongados, pode promover neutralização dos agentes pró-
43 oxidantes das células, podendo ser considerada uma alternativa natural para
44 aumentar a resistência ao estresse frente às condições pró-oxidantes do organismo.

45

46 **Palavras-chaves:** Polpa de açaí; Antocianinas; Estresse oxidativo

47

48 INTRODUÇÃO

49

50 Açaizeiro (*E. oleracea*) é uma palmeira nativa amazônica da família
51 Arecaceae [1, 2], considerada uma planta economicamente importante para
52 populações nativas [3], utilizada de diferentes maneiras como fonte de matéria-prima
53 para fabricação de biojóias, construções civis, produção de palmito e na agricultura
54 familiar de comunidades ribeirinhas [4].

55 A polpa de açaí liofilizada (AÇL) mostra-se como um alimento altamente
56 calórico com cerca de 489,39 Kcal/g de polpa liofilizada, contendo elevados índices
57 de lipídeos, carboidratos e proteínas, alto teor de minerais e pouca concentração
58 de ferro, além de muitos compostos fenólicos e antocianinas totais [5].

59 As antocianinas são polifenóis do subgrupo dos flavonoides caracterizados
60 como pigmentos vegetais hidrossolúveis, juntamente com os carotenoides, sendo
61 a maior classe de substâncias coloridas do reino vegetal encontradas amplamente
62 em flores, frutos e plantas superiores [6].

63 O efeito de combate às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) exercido pelos
64 flavonoides do tipo antocianinas, deve-se à capacidade em neutralizar os radicais
65 livres, como ânion superóxido (O_2^-), hidroxila ($HO\cdot$) e peróxido de hidrogênio
66 (H_2O_2) como peroxil radical, pois em sua estrutura química apresentam grupos
67 hidroxilas que podem inibir reações de oxidação das espécies reativas de
68 oxigênio, doando átomos de hidrogênio às espécies, assim estabilizando-as e
69 transformando-as em quinonas [7].

70 A maioria dos organismos possui naturalmente um mecanismo de defesa para
71 interceptação de ERO [8]. A aplicação de marcadores bioquímicos de estresse
72 oxidativo representa uma valiosa abordagem para examinar as repercussões e
73 alterações biológicas resultantes da exposição aos pró-oxidantes nas células do
74 corpo [7, 8].

75 A análise da capacidade antioxidante total (ACAP) e a glutathione S-
76 transferase (GST) são amplamente utilizadas em estudos bioquímicos para avaliar
77 a competência na proteção contra os efeitos das espécies reativas de oxigênio
78 (ERO) nos tecidos [9]. Além disso, a glutamato cisteína ligase (GCL) é um
79 biomarcador relevante, sendo uma enzima essencial na síntese de glutathione
80 [10].

81 Outros importantes biomarcadores incluem a glutathione redutase (GR),
82 responsável pela reciclagem da glutathione reduzida (GSH) e pela detoxificação
83 intracelular das ERO [1 1] , e a lipoperoxidação (LPO), que quantifica a
84 peroxidação de lipídios como resultado da exposição a pró-oxidantes [12].

85 Contudo, o emprego de biomarcadores de estresse oxidativo pode servir como
86 uma ferramenta promissora em estudos bioquímicos sobre respostas das defesas
87 antioxidantes e de parâmetros de dano oxidativo [13] .

88 Existem diversos modelos experimentais amplamente utilizados para
89 investigar os efeitos de agentes pró-oxidantes e estresse oxidativo, sendo o *Danio*
90 *rerio* um dos mais proeminentes. *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae) ou Zebrafish é
91 um peixe asiático considerado um importante modelo experimental para vertebrados
92 e está sendo mundialmente utilizado em diversas áreas de pesquisas, por possuir
93 algumas vantagens em relação a outros organismos experimentais, como por
94 exemplo, apresentar alta taxa reprodutiva [14], rápida embriogênese [15] e 70% de
95 conservação genética em relação aos seres humanos [16].

96 A inclusão de análises de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo nos
97 estudos com *D. rerio* é crucial, pois essas avaliações desempenham um papel
98 fundamental na compreensão das respostas dos organismos em termos de
99 homeostase, reações antioxidantes e danos oxidativos [9].

100 Desta forma, o presente estudo tem como principal objetivo caracterizar os
101 efeitos da suplementação alimentar com polpa de açaí liofilizada (*E. oleracea*)
102 testando distintas concentrações, baseadas no teor de antocianinas, como potencial
103 modulador do sistema de defesa antioxidante em *D. rerio*.

104

105 **MATERIAL E MÉTODOS**

106 **Certificação de estudo**

107 Todos os procedimentos experimentais neste estudo, principalmente a
108 crioanestesia no *D. rerio*, foram de acordo e aprovado com o protocolo n.
109 8521271022 do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará
110 (CEUA/UFGPA), em Belém-PA.

111 O desenho experimental deste trabalho, seguiu as diretrizes da ABNT NBR
112 15088 de 02/2022 referente a ecotoxicologia aquática que consiste em métodos
113 de ensaios com as espécies de peixes da família Cyprinidae, *Danio rerio* ou
114 *Pimephales promelas*. As etapas de higienização das vidrarias seguiram a ABNT NBR

115 11.257, referente a lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório.

116

117 **Obtenção da polpa de açaí liofilizado para o experimento**

118 A polpa de açaí liofilizada (AÇL) utilizada no presente estudo foi fornecida pelo
119 pesquisador Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior, docente da Faculdade
120 de Engenharia de Alimentos da UFPA, Belém-PA.

121 O conteúdo de antocianinas totais de AÇL foi determinado pelo método da
122 diferença de pH [17], que dissolve-se em dois sistemas tampão: cloreto de potássio
123 – ácido clorídrico pH 1,0 (0,025M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4M); e após extração,
124 a amostra foi diluída nas soluções tampão até o fator de diluição igual a 100 (para se
125 obter densidade óptica na faixa de 0,100-1,200, a 514 nm) e efetivadas as medidas
126 em máximos de absorção na região visível e a 700 nm.

127

128 **Preparo para o bioensaio**

129 O estudo foi realizado com 40 peixes no total entre machos e fêmeas juvenis-
130 adulto de *D. rerio* obtidos comercialmente de uma loja especializada em aquários e
131 posteriormente aclimatados em laboratório por 48 h antes da realização dos
132 bioensaios.

133 Foi feita uma seleção randomizada de peixes para pesagem *in vivo* em
134 balança de precisão, em seguida, com base no valor da média de peso dos
135 animais, foi realizado o cálculo preciso para a dieta padrão. Após a pesagem, os peixes
136 foram mantidos em beckers de 600 mL, sendo o volume final em 315 mL de água por
137 Becker, volume de acordo com a NBR 15088 pela razão 1 g/L de água.

138 A água de manutenção utilizada no experimento foi de osmose reversa
139 reconstituída de sais, sendo sua composição sulfato de cálcio (0,4 g CaSO₄), cloreto
140 de potássio (0,06 g KCl), bicarbonato de sódio (1,44 g NaHCO₃) e sulfato de magnésio
141 (1,83 g MgSO₄), concentrações para volume final de 30 L a fim de ser atingida uma
142 condutividade de 0.5 S/m (siemens por metro) e mantida em pH 7,0 e temperatura
143 entre 26 e 28 °C. Após o preparo da água reconstituída, foi feito aeração do aquário
144 por 24 h para total solubilização dos sais, estabilização do pH, temperatura e
145 saturação do oxigênio dissolvido.

146 Os peixes aclimatados foram alimentados 2 vezes ao dia com ração
147 comercial, ficaram sob condições de fotoperíodo de 14 horas claro/10 horas escuro
148 e temperatura da sala constante em 26 °C.

149

150 **Ofertas de alimentação para o experimento**

151 A dieta padrão do experimento foi feita utilizando a ração comercial
152 macerada (Fe 27,0 mg/kg; Zn 7,1 mg/kg; Mn 5,3 mg/kg; Cu 1,3 mg/kg; I 0,16 mg/kg;
153 Se 0,15 mg/kg; Mo 0,03 mg/kg; Co 0,008 mg/kg; Proteína bruta 43,0%; Matéria gorda
154 bruta 11,0%; Fibra bruta 2,0% e Umidade 6,0%), mediante cálculo de 10% da
155 biomassa do peixe. Assim, foram ofertados 3,15 mg de ração por peixe diariamente,
156 com base no valor da média de peso dos animais.

157 Em função da porcentagem de biomassa do peixe, citada acima, foram
158 calculadas as quantidades necessárias para a suplementação com AÇL, nas
159 seguintes concentrações: tratamento T1 recebeu 10% de AÇL (equivalente a 3,15
160 mg de AÇL), tratamento T2 recebeu 25% de AÇL (equivalente a 7,87 mg de AÇL) e
161 tratamento T3 recebeu 50% de AÇL (equivalente a 15,75 mg de AÇL), que
162 correspondem as concentrações de 1,34; 3,34 e 6,69 mg de antocianinas
163 respectivamente.

164

165 **Desenho experimental**

166 Para o experimento, 40 exemplares juvenis-adultos de *D. rerio* foram
167 distribuídos aleatoriamente. Cada tratamento teve 10 réplicas e cada unidade
168 experimental mantinha um indivíduo por Becker, sendo 10 peixes selecionados para
169 o grupo Controle (CTR), que receberam apenas dieta padrão, e os 30 peixes
170 restantes foram distribuídos igualmente entre os tratamentos, recebendo a dieta
171 padrão e a suplementação com AÇL em concentrações distintas: AÇL 10% (T1),
172 AÇL 25% (T2) e AÇL 50% (T3) por 5 dias (120 h).

173 As ofertas de alimentação eram feitas duas vezes ao dia, sendo uma pela
174 manhã (09h30) e outra pela tarde (17h30). Para os animais que receberam
175 suplementação, padronizou-se que a primeira alimentação seria ofertada junto com
176 a dieta padrão e na segunda apenas AÇL.

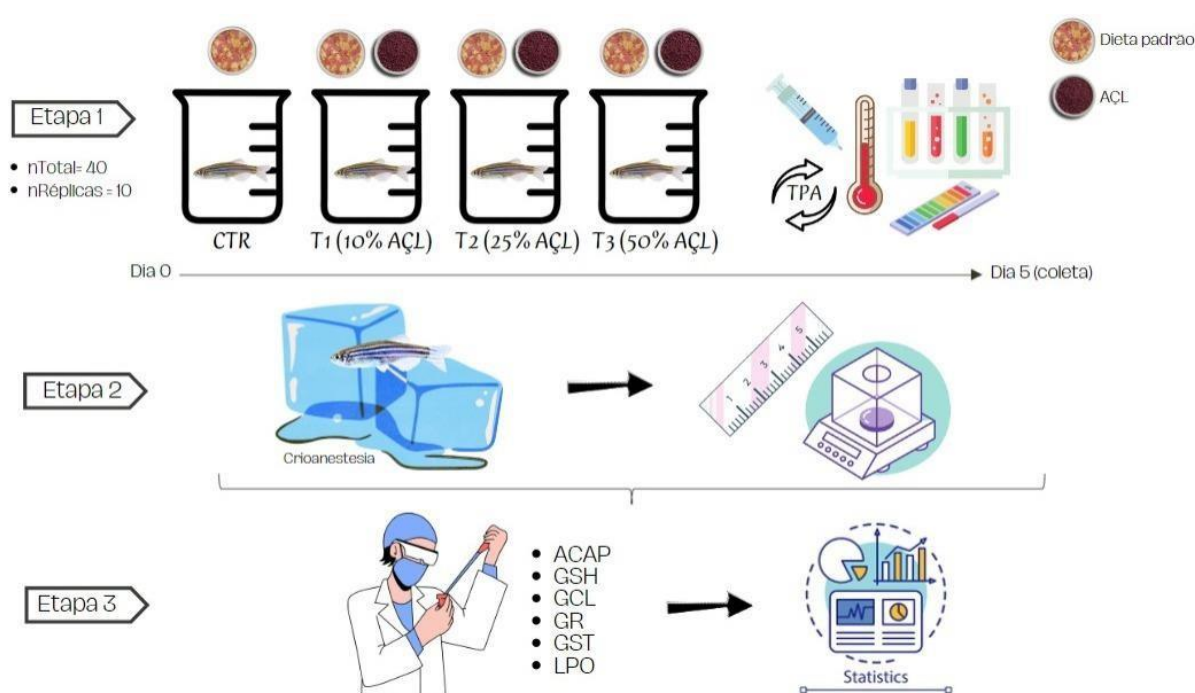
177 Durante o período experimental, as sifonagens diárias em cada becker foram
178 realizadas 1 h antes da oferta alimentar para retirada de resíduos, havendo em seguida
179 a troca parcial de água (TPA 50%) com a reposição de água reconstituída. Foram
180 realizadas ao longo do experimento duas TPAs antes da primeira oferta de dieta
181 padrão, e antes da suplementação foram realizadas as análises dos parâmetros

182 físico-químicos da água.

183 Ao final do experimento (5 dias), cada peixe foi crioanestesiado de maneira
184 a minimizar o estresse nos animais e preservar as características metabólicas
185 dos mesmos e em seguida medido em comprimento total e comprimento parcial
186 com paquímetro digital eletrônico (precisão de 0,01 cm), e pesado em balança semi-
187 analítica (precisão de 0,01g).

188 Todos os dados biométricos serviram para garantir a uniformidade e
189 isometria de peso e tamanho dos peixes. Após a biometria, cada peixe foi
190 armazenado em tubos tipo Falcon 15 ml etiquetados e levados para
191 acondicionamento em *ultrafreezer* a -80 °C até o momento da homogeneização. m
192 seguida foram feitas as seguintes dosagens bioquímicas: determinação da
193 capacidade antioxidante total (ACAP), determinação da atividade da glutiona
194 reduzida (GSH) e do glutamato cisteína ligase (GCL), determinação da atividade da
195 glutiona redutase (GR), determinação da atividade da glutiona-S-transferase
196 (GST), análise do nível de lipoperoxidação (LPO) (Figura 11).

197



198

199 **Figura 1 - Esquema do desenho experimental em três etapas.**

200

201 **Parâmetros físico-químicos da água**

202 Foram analisados os níveis de pH através de tiras universais de pH (KASVI
203 - Ref K36-014) e seus valores medidos em ppm (partes por milhão); para análise de

204 nitrito, nitrato, amônia e oxigênio dissolvido foram utilizados os kits testes comerciais
205 com as medidas em ppm. Para avaliação da temperatura utilizou-se termômetro
206 digital, os valores foram obtidos em °C.

207 Os parâmetros físico-químicos da água foram aferidos em triplicata em todos
208 os grupos amostrais nos tempos 0, 48, 96 e 120 h sempre nos mesmos horários e
209 de maneira aleatória entre os beckers por meio de sorteio.

210

211 **Preparo de homogeneizados para análises bioquímicas**

212 As amostras do peixe todo foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão
213 composto por Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) e MgCl₂ (5 mM), com pH
214 ajustado para 7,0 [18]. Os homogeneizados foram processados em agitador
215 mecânico, tipo Potter, e centrifugados a 20.000 × g por 20 min a 4°C. Após a
216 centrifugação, o sobrenadante foi separado em alíquotas de 200 µL, colocados em
217 tubos tipo Falcon 15 mL e acondicionados a -80 °C até o momento das dosagens
218 bioquímicas.

219

220 **Determinação de proteínas totais nas amostras**

221 As proteínas totais foram determinadas pelo método do Biureto com kit
222 comercial (Doles LTDA, Brasil) (0,114 M de citrato trissódico, 0,21 M de
223 carbonato de sódio e 0,01 M de sulfato de cobre). As leituras foram realizadas em
224 um leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer, EUA) a 550 nm.

225

226 **Determinação da capacidade antioxidante total (ACAP)**

227 Para as análises da ACAP, seguiu-se o método de Amado e colaboradores [19],
228 no qual foi utilizado 10 µl de amostra para determinar a concentração de espécies
229 reativas de oxigênio nas amostras com e sem exposição a um gerador de radicais
230 peroxil (2'2'-azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato – ABAP), usando 2',7'-
231 diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) como fluorocromo. O princípio deste
232 método é que as amostras de *D. rerio* com maior capacidade antioxidante terão
233 menor fluorescência, sendo esses resultados expressos em inverso da área relativa.
234 As leituras (485 e 530 para excitação e emissão, respectivamente) foram
235 realizadas durante uma hora em leitor de microplaca Victor X3 (Perkin Elmer, EUA).

236

237 **Determinação da atividade da glutatona reduzida (GSH) e do glutamato**

238 **cisteína ligase (GCL)**

239 A concentração de GSH e a atividade de GCL foram medidas seguindo a
240 metodologia proposta por White e colaboradores [20]. As amostras diluídas para 1 mg
241 de proteínas foram colocadas em tampão de reação de GCL com Tris (400 mM), ATP
242 (40 mM), ácido L-glutâmico (20 mM), EDTA (2,0 mM), borato de sódio (20 mM), serina
243 (2 mM) e MgCl₂ (40 mM) na presença e ausência de cisteína. Para a leitura das
244 amostras, foi adicionado às placas uma solução de NDA (2,3 naftalenos
245 dicarboxialdeído) que atua como fluorocromo. As leituras foram mensuradas em
246 espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin Elmer, EUA) e sendo os resultados foram
247 expressos em nmol para GSH e nmol/min/mg de proteína para a atividade da GCL.

248

249 **Determinação da atividade da glutathione redutase (GR).**

250 Para a atividade da Glutathione redutase, o protocolo utilizado segue o
251 trabalho de Gallagher e colaboradores [21]. Os resultados foram expressos em
252 UGR/mg de proteína que representa a quantidade de enzima necessária para
253 catalisar a redução de 1 μmol de GSSG por minuto (equivalente à oxidação de 1 μmol
254 de NADPH por minuto.

255

256 **Determinação da atividade da glutathione-S-transferase (GST)**

257 As análises da atividade da GST foram de acordo com o método descrito por
258 Habig e colaboradores [22], que avalia a conjugação de 1 μM de Glutathione reduzida
259 (GSH) com 1 μM do reagente 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) a 25 ° C and pH 7.0.
260 Os resultados foram expressos em UGST/mg de proteína, e as leituras realizadas
261 em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin Elmer, EUA) com leitor de microplacas.

262

263 **Análise do nível de lipoperoxidação (LPO)**

264 A peroxidação lipídica dos tecidos foi determinada pelo método de
265 *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS), conforme descrito por Oakes e van
266 der Kraak [23], no qual quantifica um subproduto da peroxidação lipídica, o
267 malondialdeído (MDA). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido
268 e em alta temperatura formando um complexo (MDA-TBA₂). As leituras foram feitas
269 no leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer, EUA) e os resultados
270 expressos em nmol de MDA/g de tecido úmido.

271

272 **Análises estatísticas**

273 Os resultados dos parâmetros biométricos foram expressos em médias±desvio
 274 padrão e os valores dos biomarcadores de estresse oxidativo foram representados
 275 em medianas $\pm 1^{\circ}$ *quartil*. Todos os dados obtidos no experimento foram submetidos à
 276 análise de normalidade e homoscedasticidade, e uma vez não alcançados os
 277 pressupostos para análise paramétrica, foi realizado o teste não-paramétrico de
 278 Kruskal-Wallis, com o nível de significância adotado de 5% na plataforma online
 279 *Statistics Kingdom*.

280

281 **RESULTADOS**

282 Para os resultados biométricos não houve significância estatística ($p > 0,05$)
 283 para as medidas de comprimento total, comprimento padrão e pesos entre os peixes
 284 dos grupos amostrais, demonstrando isometrias para todos os grupos amostrais
 285 (Tabela 1).

286

287 **Tabela 1** - Valores dos parâmetros biométricos de comprimento total (CT) e comprimento padrão
 288 (CP) representados na unidade de medida em centímetro (cm), e valores de peso mensurados em
 289 gramas (g) de *D. rerio* utilizados no estudo. Todos os dados foram expressos em médias \pm desvio
 290 padrão.

	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Peso (g)
Controle (CTR)	26,1 \pm 1,55	25,5 \pm 1,5	0,18 \pm 0,03
AÇL10% (T1)	25,4 \pm 2,1	20,7 \pm 1,9	0,24 \pm 0,2
AÇL 25% (T2)	27,8 \pm 2,6	22 \pm 1,5	0,20 \pm 0,03
AÇL 50% (T3)	25,9 \pm 2,6	20,8 \pm 1,7	0,18 \pm 0,04

291

292 Os resultados das análises físico-químicas da água realizados ao longo do
 293 experimento, demonstraram que a temperatura da água não variou entre os grupos
 294 amostrais mantendo-se em média \pm desvio padrão de 24,7 \pm 0,2°C, enquanto o
 295 pH se manteve levemente ácido em torno de 6,0 \pm 0,1 ppm para todos os grupos
 296 amostrais ao longo do experimento. Não houve diferenças significativas entre os
 297 grupos experimentais nos valores de nitrito, nitrato e oxigênio dissolvido.

298 Os níveis médios \pm desvio padrão de amônia na água, nos tempos 0, 48, 96 e
 299 120 h entre os grupos amostrais CTR, T1, T2 e T3 foram 2,8 \pm 0,1 ppm; 2,0 \pm 0,4 ppm,
 300 2,0 \pm 0,4 ppm e 1,4 \pm 1,4 ppm, respectivamente. Contudo, foi observado diferença
 301 estatística entre os grupos CTR e o tratamento T3 ($p < 0,05$) no tempo de 120 h de

302 verificação, resultando em menores concentrações de amônia no tratamento T3 (50%
303 AÇL) (Tabela 2).

304

305 **Tabela 2** - Valores dos parâmetros físico-químicos da água utilizados no estudo. Nas colunas estão
306 representados os grupos amostrais do experimento: CTR (grupo controle), tratamento T1 (10% AÇL),
307 tratamento T2 (25% AÇL) e tratamento T3 (50% AÇL). Nas linhas estão representados os parâmetros
308 mensurados: pH (potencial hidrogeniônico), °C (temperatura), NO₂⁻ (nitrito), NO₃⁻ (nitrato), O₂ dissolv
309 (oxigênio dissolvido) e NH₃ (amônia). Todos os dados foram expressos em médias (μ), desvio padrão
310 (σ) e coeficiente de variação (**cv %**).

	CTR			T1 (10%)			T2 (25%)			T3 (50%)		
	μ	σ	cv %	μ	σ	cv %	μ	σ	cv %	μ	σ	cv %
pH	6,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0
°C	24,9	0,1	0,5	24,6	0,2	0,7	24,8	0,1	0,4	25,0	0,4	1,8
NO ₂ ⁻	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NO ₃ ⁻	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
O ₂ dissolv.	4,6	1,0	22,2	5,3	1,3	24,1	4,9	1,0	19,4	5,3	0,5	20,9
NH ₃	2,8	0,1	2,1	2,0	0,4	20,2	2,0	0,4	17,7	1,4	0,5	37,4

311

312 Também foi observado um pequeno aumento da turbidez da água,
313 principalmente, no tratamento T3 comparado aos demais grupos amostrais, onde foi
314 fornecido a quantidade máxima de AÇL do experimento, contendo o maior teor de
315 antocianinas para este tratamento.

316 Para a ACAP não houve diferença significativa entre os grupos amostrais. Os
317 resultados obtidos foram expressos em inverso da área relativa e representados em
318 mediana \pm 1^o quartil (q1) nos grupos CTR (12.2 \pm 7.4); T1 (12.8 \pm 4.6); T2 (3.8 \pm 2.3)
319 e T3 (2.5 \pm 2.2). Foi observado uma tendência de menor ACAP nos indivíduos dos
320 tratamentos T2 e T3 que receberam concentrações mais elevadas de antocianinas,
321 em relação aos primeiros grupos amostrais (Figura 12 – A).

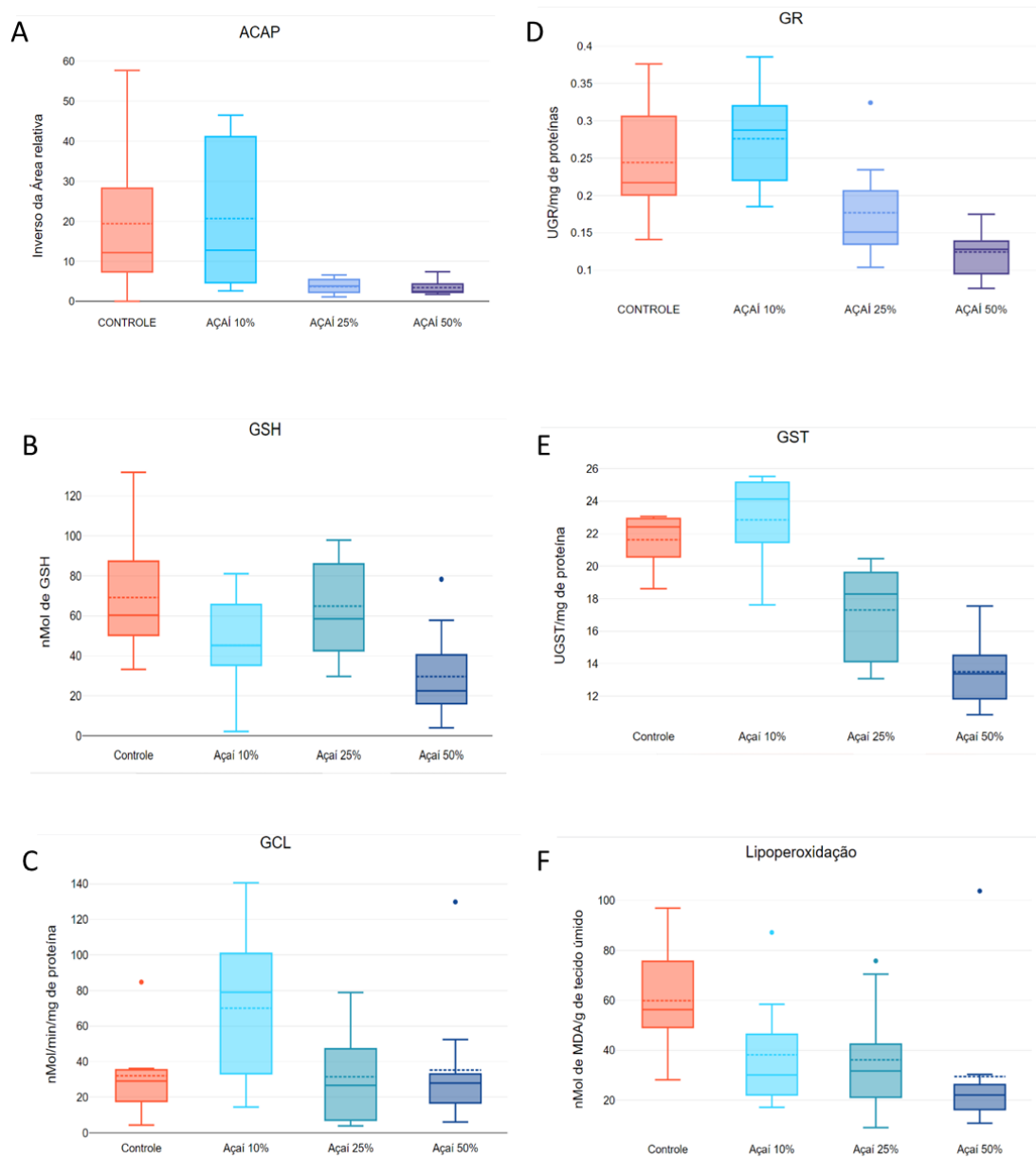
322 Para a concentração de GSH, obteve-se as seguintes mediana e \pm q1 de GSH
323 nos grupos CTR (60.3 \pm 50.2 nMol); T1 (45.2 \pm 35.3 nMol); T2 (58.5 \pm 42.6 nMol) e T3
324 (22.5 \pm 16.1 nMol). Não houve significância estatística entre os grupos amostrais.
325 Entretanto, foi observada uma tendência de menor concentração de GSH no
326 tratamento T3 em relação aos demais grupos amostrais (Figura 12 – B).

327 Para a atividade do GCL, enzima responsável pelo passo limitante na síntese
328 de GSH, foram registradas as seguintes medianas \pm q1 nos grupos CTR (29.1 \pm 17.7
329 nMol/min/mg de proteínas); T1 (79.0 \pm 33.2 nMol/min/mg de proteínas); T2 (26.6

330 ± 7.1 nMol/min/mg de proteínas) e T3 (27.9 ± 16.8 nMol/min/mg de proteínas).
331 Não foi apresentada nenhuma diferença significativa entre os grupos amostrais,
332 apenas uma tendência maior média de GCL nos indivíduos do tratamento T1 em
333 relação aos demais grupos do bioensaio (Figura 12 – C).

334 Foram obtidas a mediana $\pm 1^{\circ}$ *quartil* (q1) da atividade enzimática de GR nos
335 grupos CTR (0.22 ± 0.2 UGR/mg de proteínas); T1 (0.29 ± 0.2 UGR/mg de proteínas);
336 T2 (0.15 ± 0.1 UGR/mg de proteínas) e T3 (0.13 ± 0.1 UGR/mg de proteínas),
337 enquanto que as medianas \pm q1 de GST nos grupos amostrais foram: grupo CTR (22.4
338 ± 20.6 UGST/mg de proteínas); T1 (24.1 ± 21.5 UGST/mg de proteínas); T2 ($18.3 \pm$
339 14.1 UGST/mg de proteínas) e T3 (13.4 ± 11.8 UGST/mg de proteínas). Não houve
340 nenhuma diferença significativa das atividades enzimáticas de GR e GST entre os
341 grupos amostrais ao longo do experimento. Contudo, apresentaram-se tendências
342 de alta atividade dessas enzimas nos grupos CTR e tratamento T1 em relação aos
343 tratamentos T2 e T3 para ambas as enzimas (Figura 12 – D e E, respectivamente).

344 Em termos de lipoperoxidação (biomarcador de efeito) foram registradas
345 mediana \pm q1 nos grupos CTR (56.3 ± 49.2 nMol de MDA/g de tecido úmido); T1 (30.1
346 ± 22.1 nMol de MDA/g de tecido úmido); T2 (31.7 ± 21.2 nMol de MDA/g de tecido
347 úmido) e) e T3 (22.0 ± 16.3 nMol de MDA/g de tecido úmido). Não foi verificada
348 nenhuma diferença estatística significativa entre os tratamentos e o controle.
349 Entretanto, verificou-se uma tendência a níveis mais baixos de LPO no tratamento T3
350 que recebeu a maior concentração de antocianinas (Figura 12 - F).



351

352 **Figura 2** - Defesas antioxidantes e lipoperoxidação em *D. rerio* nos grupos controle (CTR) e
 353 tratamentos AÇL 10% (T1), AÇL 25% (T2) e AÇL 50% (T3), todos os dados expressos em mediana
 354 \pm 1^o quartil. A - atividade da capacidade antioxidante total (ACAP) com valores expressos em
 355 inverso da área relativa; B - concentração enzimática da glutathiona reduzida (GSH) com valores expressos
 356 em nMol; C - atividade do glutamato cisteína ligase (GCL) com valores expressos em nMol/min/mg de
 357 proteínas; D - atividade da glutathiona redutase (GR) com valores expressos em UGR/mg de proteínas;
 358 E - atividade da glutathiona s-transferase (GST) com valores expressos em UGST/mg de proteínas; F -
 359 nível de peroxidação (LPO) com valores expressos em nMol de MDA/g de tecido úmido. Asteriscos
 360 (*): valores discrepantes (outliers).

361

362

DISCUSSÃO

363

364

365

366

Nesse contexto, o presente estudo buscou avaliar os efeitos das antocianinas presentes na polpa de açai liofilizada (AÇL) no sistema de defesa antioxidante em *D. rerio* utilizando como ferramenta de medida os biomarcadores de defesa antioxidante e de estresse oxidativo. Portanto, como resultado as maiores

367 concentrações de açaí (T3 - 50% AÇL, equivalente a 6,69 mg de antocianinas)
368 obtiveram melhores tendências de desempenho das defesas antioxidantes,
369 sugerindo um possível aumento da resistência às condições pró-oxidantes no
370 organismo.

371 Sabe-se que as dietas enriquecidas com compostos bioativos proporcionam
372 grandes benefícios nutricionais e terapêuticos à saúde. Segundo Malacrida e Motta
373 [24], esses compostos polifenólicos como, por exemplo as antocianinas,
374 apresentam ampla funcionalidade no vegetal, desde promover pigmentação de
375 frutos a proteger tecidos biológicos de processos oxidativos.

376 Por ser um tipo de corante natural, as antocianinas possuem função de atrair
377 seres vivos através da cor e aroma que são expressadas nas partes das plantas [25].
378 Nesse estudo, foi possível observar alta atratividade do açaí pelo *D. rerio* durante a
379 oferta do suplemento nos tratamentos. Tal fato pode estar associado, não só pelos
380 estímulos sensoriais presente nos peixes, mas devido a esta espécie ser considerada
381 onívora, podendo se alimentar de uma grande diversidade de fontes alimentares em
382 diferentes estratos do seu hábitat natural, desde a superfície do espelho d'água até
383 o fundo do rio [26], demonstrando assim uma boa aceitabilidade e ingestão do
384 suplemento alimentar pelos indivíduos.

385 Oliveira de Souza *et al.* [27] sugerem que o açaí promove um aumento no ganho
386 de peso em camundongos *Fischer* suplementados, proporcionando saciedade; e
387 apesar de ser considerado um alimento com alto teor lipídico e calórico, ele tem
388 um efeito hipocolesterolêmico, reduzindo o nível de colesterol total e de LDL dos
389 indivíduos, uma vez que a polpa de açaí possui compostos bioativos que atuam na
390 promoção da melhora do *status* antioxidante. Um estudo realizado com indivíduos
391 adultos fêmeas de *Drosophila melanogaster*, mostrou benefícios quanto a
392 utilização de açaí na dieta em relação a longevidade, em que grupos receberam
393 ofertas de açaí liofilizado em 0,25%, 0,5%, 1% e 2% de concentração; e foi constatado
394 no final do experimento um aumento do tempo médio de vida em 22% no grupo de *D.*
395 *melanogaster* que recebeu a maior concentração em comparação ao grupo de dieta
396 padrão não suplementada, ou seja, o açaí pode agir mitigando o estresse oxidativo
397 no envelhecimento celular e antagonizar os efeitos prejudiciais de dietas hiperlipídicas
398 [28].

399 A ingestão de compostos fitoquímicos provenientes do açaí (*E. oleracea* Mart.)
400 por peixes, como o tambaqui, também podem estimular o crescimento corporal,

401 melhorar o metabolismo energético muscular, obter respostas neuroprotetoras
402 positivas e aumentar a competência antioxidante desse organismo [2].

403 A sensibilidade dos organismos a determinados agentes pode mudar em
404 função das condições ambientais, como por exemplo, a temperatura [29], o pH [30] e
405 o nível alimentar [31]. Neste estudo, foi evidenciado que a suplementação com açaí
406 diminuiu a excreção de amônia na água, o que favoreceu a diminuição do efeito tóxico
407 dessa excreta, que conforme Baldisserotto [32], além da excreção dos peixes, a
408 concentração da amônia é influenciada pela decomposição do alimento não ingerido.

409 Em estudos com camarões da espécie *L. vannamei* [33], a presença do açaí
410 na dieta agiu como agente protetor contra os efeitos tóxicos da amônia, bem como um
411 fator importante na capacidade de modulação do perfil lipídico, devido à presença de
412 alto teor de ácidos graxos insaturados no açaí que podem ser usados em rotas
413 metabólicas para produção de energia [34].

414 Ainda assim, a inclusão de açaí na dieta de camarões foi capaz de
415 amenizar significativamente os danos oxidativos e melhorar a capacidade
416 antioxidante em relação a dieta controle, essa melhora pode ser entendida como
417 estratégias de adaptação de organismos aquáticos frente a condições adversas que
418 favoreçam a produção de ERO [33].

419 Neste estudo, o tratamento T3 - 50% de AÇL referente a 6,69 mg de
420 antocianinas, revelou melhores tendências de desempenho do sistema de defesa
421 antioxidante. Resultados semelhantes foram evidenciados em Silva [35], no qual a
422 maior concentração de flavonoides entre os tratamentos foi encontrada no tratamento
423 de maior inclusão de açaí de 10% em sistema de bioflocos para *L. vannamei*. Dessa
424 forma, é possível que a última concentração do tratamento apresente alto teor
425 antioxidante, podendo neutralizar os agentes pró-oxidantes das células do
426 organismo em tempos de suplementação superiores neste experimento.

427 Consecutivamente, a tendência de menor capacidade antioxidante total
428 (ACAP) pode refletir nas condições dos animais com maior suplementação de polpa
429 de açaí liofilizada, que pareciam menos estressantes, não havendo, portanto,
430 necessidade de recrutar defesas fisiológicas ou pode ser que os altos teores de
431 inclusão de açaí tenham sido pró-oxidante. Em contrapartida, no estudo de Da
432 Silva e colaboradores [2] a suplementação de 0,63% de polpa de açaí liofilizado
433 aumentou em até 39,5% da ACAP do intestino de *C. macropomum*,
434 demonstrando que menores concentrações também podem promover esses

435 efeitos bioquímicos, o que corrobora com uma resposta hormética.

436 Apesar da suplementação com AÇL não ter influenciado na comparação entre
437 os grupos em nosso estudo, é importante notar que foi observado tendências
438 de menor capacidade antioxidante total (ACAP), menor atividade da GR e GST e
439 menor nível de lipoperoxidação para os animais com suplementação de Açaí 25% (T2)
440 e Açaí 50% (T3). Ou seja, parece haver uma tendência de que as maiores
441 concentrações de antocianinas estariam tendo um papel protetor contra o dano
442 oxidativo, bem como diminuindo a demanda de atividade da GR para recuperação de
443 GSH, e de atividade detoxificatória (GST).

444 As enzimas GSTs estão envolvidas tanto em processos fisiológicos quanto
445 patológicos, como por exemplo, na remoção de espécies reativas de oxigênio,
446 transporte intracelular e biotransformação de xenobióticos [36].

447 Para estudos com ratos Wistar, utilizando suplementação com extratos de açaí,
448 houve aumento da atividade de GST em cerca de 70%, indicando uma possível
449 diminuição da concentração de compostos xenobióticos no organismo desta espécie,
450 e consecutivamente, incidindo na diminuição de estresse oxidativo [37]. Além
451 disso, evidencia características diferentes entre as enzimas GST hepática e cerebral,
452 mostrando que o açaí pode influenciar na modulação enzimática de formas
453 diferentes [37]. As diferenças encontradas em nossos ensaios podem ser devido a
454 análise do peixe inteiro e a espécie utilizada nesta pesquisa.

455 O fator tempo parece ser uma variável importante, tendo em vista que neste
456 estudo, a suplementação ocorreu por apenas 5 dias, podendo não haver tempo
457 suficiente para que as melhorias nas condições de saúde dos indivíduos de *D. rerio*
458 se tornem visíveis, necessitando assim de bioensaios com tempos mais prolongados
459 de suplementação.

460 Camarões *L. vannamei* alimentados com dieta de açaí por 30 dias, foram
461 capazes de melhorar a capacidade antioxidante e reduzir o dano oxidativo quando
462 expostos a cianotoxinas, resultando em um efeito quimioprotetor deste alimento [38].
463 Diferentemente da nossa pesquisa, a qual não teve outro tipo de estímulo exógeno,
464 além do AÇL, no bioensaio para desencadear algum efeito fisiológico no organismo.

465 Neste mesmo estudo, os autores também evidenciam níveis reduzidos de LPO
466 nas amostras de hepatopâncreas nos indivíduos que receberam dieta com açaí [38].
467 Corroborando com os resultados do nosso estudo, que mostraram tendências de
468 menores níveis de lipoperoxidação nos indivíduos que receberam as maiores

469 concentrações de açaí.

470 Estudo dietético com açaí durante 8 semanas, evidencia uma melhora na
471 peroxidação lipídica de pacientes em hemodiálise, indicando a promissora
472 aplicação do açaí como ação antioxidante em humanos associada à doença [39]. Já a
473 inclusão de açaí na dieta de tabaquistas jovens (*C. macropomum*) por 30 dias,
474 demonstram efeitos satisfatórios na eficiência alimentar, aumento da taxa de
475 crescimento corporal e melhoramento da competência antioxidante intestinal [2].

476 A suplementação com açaí em ratas *Fischer* por 6 semanas, promove
477 redução significativa na atividade do superóxido dismutase nos indivíduos
478 hipercolesterolêmicos, melhorando a regulação dos níveis de colesterol nos
479 indivíduos [27]. Tal como o estudo com ratas *Wistars* adultas que receberam açaí
480 dietético, por 45 dias, evidenciando uma redução nos triglicérides, além de
481 apresentar um maior teor de hemácias, plaquetas, hematócrito e hemoglobina [40].

482 Na atual pesquisa, percebemos de modo geral, a ausência de diferença
483 estatística entre os tratamentos que receberam suplementação em relação ao grupo
484 controle. Fallah e colaboradores [41] em estudo de meta-análise sobre o efeito da
485 incorporação de antocianinas na dieta em marcadores de estresse oxidativo,
486 afirmaram que alguns resultados mostram que a diminuição de níveis de peroxidação
487 lipídica e aumento de marcadores da capacidade antioxidantes são apenas evidentes
488 em indivíduos não saudáveis, muito embora reconheçam a existência de alguns
489 estudos em modelos animais que mostram efeitos mesmo em indivíduos saudáveis.

490 Assim, os animais utilizados nesse experimento, tinham indicativos
491 morfológicos (ausência de deformações ou lesões) e comportamentais (atividade
492 branquial normal, exploração do meio e natação sem alterações) de estarem
493 saudáveis fisicamente podendo esta ser uma das causas da ausência de diferenças
494 estatísticas significativas.

495 Como visto em Narayan e colaboradores [42], as antocianinas podem
496 conferir prevenção de auto oxidação de lipídeos e peroxidação lipídica em
497 sistemas biológicos. De acordo com Rousseau e colaboradores [43], as
498 alterações do status antioxidante podem ser relacionadas a deficiências
499 específicas do organismo resultante de um consumo alimentar desbalanceado,
500 concomitante com o consumo excessivo de suplementos com bioativos que podem
501 falhar em oferecer uma proteção antioxidante e ainda reduzir o efeito adaptativo do
502 sistema de defesa antioxidante endógeno.

503 Embora este estudo traga dados relevantes, principalmente no que diz
504 respeito as propriedades das antocianinas do açaí nas defesas antioxidantes, a
505 pesquisa apresentou algumas limitações, como o tempo de exposição de apenas dias
506 (120 h), juntamente com a restrição de fazermos uma análise bioquímica utilizando o
507 animal inteiro. Apesar desta análise nos dar um panorama geral do *status redox* dos
508 indivíduos, provavelmente as respostas à suplementação podem ser órgão
509 específica.

510 A maior dificuldade encontrada para e analisar órgãos específicos foi
511 aumentar o número de indivíduos por unidade experimental, o que acarretaria em
512 mais custos. Além de tornar o controle da ração oferta de ração/peso muito mais
513 complexa, devido a competição entre os animais quando houvesse a oferta de
514 alimentos. Dessa forma, são necessários estudos mais prolongados para entender
515 melhor os efeitos desses compostos bioativos na possível modulação do sistema de
516 defesa antioxidante em outros organismos aquáticos.

517 Contudo, apesar de poucos estudos prévios a respeito dos efeitos de *E.*
518 *oleracea* na nutrição de peixes, como em *C. macroponum*, o presente trabalho sugere
519 perspectivas de futuros estudos baseando o consumo de açaí em diferentes
520 modelos animais, assegurando que não há relatos que indicam efeitos adversos à
521 saúde pelos organismos. Além de possibilitar pesquisas com desafios de fatores
522 pró-oxidantes a fim de poder ampliar os efeitos benéficos da suplementação natural
523 na proteção contra danos causados pelo estresse e dano oxidativo.

524

525 **CONCLUSÃO**

526 Nossos resultados revelam tendências que a suplementação alimentar com
527 açaí (*E. oleracea* Mart.) na dieta de peixes, pode ser uma alternativa natural para
528 aumentar a resistência ao estresse frente às condições pró-oxidantes do organismo,
529 podendo ser utilizado como subsídio em pesquisas futuras de terapia nutricional e
530 nutrigenômica, para melhor compreender os efeitos dos compostos bioativos na
531 modulação do sistema de defesa antioxidante em outros organismos, afim
532 de estabelecer estratégia de quimioproteção para saúde humana e animal.

533

534

REFERÊNCIAS

535

536 1. Cedrim PCAS, Barros EMA, Nascimento TGd. Propriedades antioxidantes do açaí

- 537 (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. Braz J Food Technol. 2018;21.
538 2. da Silva TVN, dos Santos CF, dos Santos JML, Schmitz MJ, Ramírez JRB, Torres
539 MF, et al. Effects of dietary inclusion of lyophilized açai berries (*Euterpe oleracea*)
540 on growth metrics, metabolic and antioxidant biomarkers, and skin color of juvenile
541 tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquac Int. 2023;31(2):1031-56.
542 <https://doi.org/10.1007/s10499-022-01014-2>
543 3. Lorenzi H, de Souza HM. Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas: Editora
544 Plantarum; 1996.
545 4. Nogueira OL, Homma AKO. Análise econômica de sistemas de manejo de
546 açazais nativos no estuário amazônico. Belém: Embrapa Amazônia Oriental;
547 1998. 38 p.
548 5. Menezes EMdS, Torres AT, Sabaa-Srur AUO. Valor nutricional da polpa de açai
549 (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. 2008.
550 6. Constant PBL. Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açai
551 (*Euterpe oleracea*, M.). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2003.
552 7. Souza MO. Suplementação da dieta com polpa do fruto do açai (*Euterpe*
553 *oleraceae* Martius) melhora o perfil lipídico e a capacidade antioxidante – uma
554 avaliação in vivo. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2009.
555 8. Birnie-Gauvin K, Costantini D, Cooke SJ, Willmore WG. A comparative and
556 evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. Fish and Fish.
557 2017;18:928-42. <https://doi.org/10.1111/faf.12215>
558 9. Loureiro SN, Amado LL, Giarrizzo T. A multi-tissues comparison of biomarkers in
559 *Serrasalmus rhombeus* (Teleostei: Serrasalminidae) and *Prochilodus nigricans*
560 (Teleostei: Prochilodontidae) from two Amazonian rivers with distinct levels of
561 pollution. Ecol Indic. 2023;147:109936.
562 <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.109936>
563 10. Choong G, Liu Y, Xiao W, Templeton DM. Cadmium-induced glutathionylation of
564 actin occurs through a ROS-independent mechanism: implications for cytoskeletal
565 integrity. Toxicology and applied pharmacology. 2013;272(2):423-30.
566 [10.1016/j.taap.2013.07.002](https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.002)
567 11. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.
568 Physiological reviews. 1979;59(3):527-605. [10.1152/physrev.1979.59.3.527](https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527)
569 12. Amato AA, Rosa ECC, Santos RRCd, Neves FdAR, Gris EF, Ferreira EA, et al.
570 Avaliação do Estresse oxidativo e Lipoperoxidação(LPO)em pacientes com
571 diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tratados no Hospital Universitário de Brasília (HUB)
572 / Evaluation of oxidative stress and lipoperoxidation (OLP) in patients with type 2
573 diabetes mellitus (DM2) treated at the University Hospital of Brasília (HUB).
574 2019;2(5):4236-56. [10.34119/bjhrv2n5-029](https://doi.org/10.34119/bjhrv2n5-029)
575 13. Gupta RC. Biomarkers in toxicology: Academic press; 2019.
576 14. Trigueiro NSS, Canedo A, Braga DLS, Luchiari AC, Rocha TL. Zebrafish as an
577 emerging model system in the global south: Two decades of research in Brazil.
578 Zebrafish. 2020;17(6):412-25. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1930>
579 15. Simonetti RB. Zebrafish (*Danio rerio*) : futuro do modelo animal em pesquisa
580 biomédica. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2014.
581 16. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Tarrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The
582 zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.
583 Nature. 2013;496(7446):498-503. [10.1038/nature12111](https://doi.org/10.1038/nature12111)
584 17. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by
585 uv-visible spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry
586 2001;00(1):F1.2.1-F.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>

- 587 18. Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC. Oxidative stress in gill,
588 erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted
589 site. *Aquat Toxicol.* 1996;34(2):151-62. [https://doi.org/10.1016/0166-](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00036-4)
590 [445X\(95\)00036-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00036-4)
- 591 19. Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, et al. A
592 method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic
593 organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ.*
594 2009;407(6):2115-23. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- 595 20. White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ. Fluorescence-based
596 microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem.*
597 2003;318(2):175-80. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00143-x](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00143-x)
- 598 21. Gallagher EP, Di Giulio RT. Glutathione-mediated chlorothalonil detoxification in
599 channel catfish gills. *Mar Environ Res.* 1992;34(1):221-6.
600 [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(92\)90111-X](https://doi.org/10.1016/0141-1136(92)90111-X)
- 601 22. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic
602 step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-9.
603 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- 604 23. Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative
605 stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill
606 effluent. *Aquat Toxicol.* 2003;63(4):447-63. [https://doi.org/10.1016/S0166-](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)
607 [445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)
- 608 24. Malacrida CR, Motta Sd. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de
609 uva. *LWT.* 2005;25.
- 610 25. Batistussi EG, Victor I, Mussinato JCS, Santos JG, Odia JS, Bernardi DM. Açaí e
611 seus benefícios: uma revisão bibliográfica. In: Bernardi DM, Mello HRLS, Almeida
612 LT, Maragon LM, editors. *Composição e propriedades funcionais de frutas,*
613 *bebidas e temperos.* Cascavel: FAG; 2019. p. 37-54.
- 614 26. Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemin KJ, Kent ML, Sanders GE. *The*
615 *zebrafish in biomedical research:* Academic Press; 2020 2020/01/01/.
- 616 27. Oliveira de Souza M, Silva M, Silva ME, de Paula Oliveira R, Pedrosa ML. Diet
617 supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of
618 oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* 2010;26(7):804-10.
619 <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.09.007>
- 620 28. Sun X, Seeberger J, Alberico T, Wang C, Wheeler CT, Schauss AG, et al. Açaí
621 palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet.
622 *Exp Gerontol.* 2010;45(3):243-51. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.008>
- 623 29. Lewis PA, Horning II WB. Differences in acute toxicity test results of three
624 reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environ Toxicol Chem.*
625 1991;10(10):1351-7. <https://doi.org/10.1002/etc.5620101014>
- 626 30. Havens KE. Acid and aluminum effects on sodium homeostasis and survival of
627 acid-sensitive and acid-tolerant cladocera. *Can J Fish Aquat Sci.*
628 1992;49(11):2392-8. <https://doi.org/10.1139/f92-264>
- 629 31. Koivisto S, Ketola M, Walls M. Comparison of five cladoceran species in short- and
630 long-term copper exposure. *Hydrobiologia.* 1992;248(2):125-36.
631 <https://doi.org/10.1007/BF00006080>
- 632 32. Baldisseroto b. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.* Santa Maria: Editora
633 da Universidade Federal de Santa Maria; 2002.
- 634 33. Colombo GM. Respostas bioquímicas de juvenis do camarão *Litopenaeus*
635 *vannamei* (BOONE, 1931) exposto à amônia: O papel do açaí (*Euterpe oleracea*
636 Mart. 1824) como agente quimioprotetor. Rio Grande: Universidade Federal do

- 637 Rio Grande; 2019.
- 638 34. Wei B, You M-G, Ling J-J, Wei L-L, Wang K, Li W-W, et al. Regulation of
639 antioxidant system, lipids and fatty acid β -oxidation contributes to the
640 cardioprotective effect of sodium tanshinone IIA sulphonate in isoproterenol-
641 induced myocardial infarction in rats. *Atherosclerosis*. 2013;230(1):148-56.
642 <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.005>
- 643 35. Silva SM. Inclusão do açaí (*Euterpe oleracea* Mart. 1824) na dieta do camarão
644 branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em sistema de bioflocos:
645 efeito no desempenho zootécnico, respostas bioquímicas e coloração. Rio
646 Grande: Universidade Federal do Rio Grande; 2018.
- 647 36. Helvecio E. Caracterização funcional do gene da Glutathione-S-Transferase
648 Epsilon 2 (GSTE2) em *Aedes aegypti*. Recife: Fundação Oswaldo Cruz; 2014.
- 649 37. Rosa TS. Efeito de extratos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e de pitanga (*Eugenia*
650 *uniflora* L.) sobre a atividade de catalase e gst em cérebros e hepatócitos de ratos
651 visando a proteção contra agentes citotóxicos: Universidade Federal Rural do Rio
652 de Janeiro; 2019.
- 653 38. Schmitz MJ, Colombo GM, Simião CdS, Ortiz CR, Fonseca Costa LD, Nascimento
654 da Silva TV, et al. Modulation of nodularin toxicity in shrimp *Litopenaeus vannamei*
655 (BOONE, 1931) fed with dietary açaí (*Euterpe oleracea*) inclusion. *Fish Shellfish*
656 *Immunol*. 2020;103:464-71. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.055>
- 657 39. Martins ICVS. Efeitos da suplementação com açaí clarificado (*Euterpe oleracea*
658 Mart.) sobre marcadores de estresse oxidativo em pacientes com doença renal
659 crônica em hemodiálise. Belém: Universidade Federal do Pará; 2019.
- 660 40. Fernando FDS. Avaliação do efeito da bebida de açaí no perfil lipídico e glicêmico
661 em ratos Wistar. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2013.
- 662 41. Fallah AA, Sarmast E, Jafari T. Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of
663 oxidative stress and antioxidative capacity: A systematic review and meta-analysis
664 of randomized controlled trials. *J Funct Foods*. 2020;68:103912.
665 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103912>
- 666 42. Narayan MS, Naidu KA, Ravishankar GA, Srinivas L, Venkataraman LV.
667 Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid
668 peroxidation. *PLEFA*. 1999;60(1):1-4. <https://doi.org/10.1054/plef.1998.0001>
- 669 43. Rousseau AS, Hininger I, Palazzetti S, Faure H, Roussel AM, Margaritis I.
670 Antioxidant vitamin status in high exposure to oxidative stress in competitive
671 athletes. *Br J Nutr*. 2004;92(3):461-8. <https://doi.org/10.1079/bjn20041222>
- 672