



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GEX PEREIRA DE SOUSA

**MODULAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO *Danio rerio*
(TELEOSTEI: DANIONIDAE) FRENTE A SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM
A POLPA LIOFILIZADA DO BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)**

Belém - PA
2023

GEX PEREIRA DE SOUSA

MODULAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO *Danio rerio*
(TELEOSTEI: DANIONIDAE) FRENTE A SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM A
POLPA LIOFILIZADA DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)

Trabalho de conclusão de curso concernente à graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Pará - campus Belém, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de licenciado em ciências biológicas.

Orientadora: Dra. Lílian Lund Amado

Co-orientador: Msc. Yure Jefferson da Cruz do Nascimento

Belém – PA
2022

GEX PEREIRA DE SOUSA

MODULAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO *Danio rerio*
(TELEOSTEI: DANIONIDAE) FRENTE A SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM A
POLPA LIOFILIZADA DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)

Trabalho de conclusão de curso concernente à graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Pará - campus Belém, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de licenciado em ciências biológicas.

Orientadora: Dra. Lílian Lund Amado

Co-orientador: Msc. Yure Jefferson da Cruz do Nascimento

Data de aprovação: ___/___/_____

Banca examinadora:

Prof. Dra. Lílian L. Amado
Orientadora – ICB – UFPA

Msc. Irina Sofia Cardoso de Carvalho
Membro interno – ICB – UFPA

Dra. Sildiane Martins Cantanhede
Membro externo – NUMA – UFPA

Belém – PA
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família que sempre me deu o apoio necessário na vida, nunca medindo esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Em especial, agradeço minha mãe, Girlene Braga, por ser meu porto seguro por todo esse tempo me dando amor, carinho e dedicação, te amo!

À minha orientadora, Dra. Lílian Amado, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e pela oportunidade de me proporcionar o contato incrível com essa grande área que é a bioquímica. Tenho na senhora o modelo ideal de pesquisadora e professora, pois nota-se o brilho contagiante que tens quando fala sobre aquilo que trabalhas. Obrigado!

Ao meu co-orientador, Msc. Yure Nascimento, pela paciência, dedicação e pelo esforço de fazer este trabalho acontecer. Me sinto agraciado por ter como co-orientador uma pessoa tão inteligente, atenciosa e proativa, sendo você meu modelo de estudante e cientista e por quem tenho muita admiração. Me sinto muito orgulhoso de ter sido teu 1º “co-orientando”. Muito obrigado!

Aos membros do laboratório de ecotoxicologia da UFPA, por terem se disposto a me ajudar nessa jornada, sempre tão solícitos e atenciosos. Em especial gostaria de agradecer aos colegas que conheci nesse período de tempo e que me auxiliaram demais tanto nas dosagens e lavagem de materiais quanto no apoio moral, nos risos e nos cafés: ao Matheus, Danilo Júnior, Danilo, Amanda, Erika, Borges, Irina, Daniele, Clayciane, Evandro e Clarissa. Vocês com certeza fizeram essa trajetória mais leve e divertida. Obrigado!

Aos meus amigos da graduação por fazerem desses 4 anos os mais transformadores da minha vida. Agradeço à Mariana freire, por ser essa pessoa incrível pela qual tenho muita admiração e respeito; à Kaelle Caldeira pela sua gentileza, carinho e cuidado; à Aila Neves pela alegria e carinho que me destina; ao Edson Vinicius pelas brigas divertidas e pelo companheirismo; ao Jonas Martins por ser um amigo carinhoso e presente; à Lígia Dias pelas boas fofocas e cuidados que me direcionou. Adoro todos vocês incondicionalmente!

Por fim, gostaria de agradecer aos meus dois companheiros de vida que a graduação me deu: Isabella Frazão e Alysson Luiz. Considero vocês meus grandes amigos e quero levar essa amizade para sempre. Fizeram dessa graduação um período mais descontraído, acolhedor e alegre, com a energia e companheirismo de vocês. Sempre adorei o jeito que cada um melhora a energia do outro se elogiando, se defendendo, brincando e rindo. Apesar das brigas e desavenças que tivemos, vocês sempre me acolheram e me confortaram, amo demais os dois.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Polpa liofilizada do buriti.....	9
2.2. Delineamento experimental.....	10
2.3. Dosagens bioquímicas.....	11
2.3.1. Proteínas totais.....	11
2.3.2. Capacidade antioxidante total (ACAP)	11
2.3.3. Glutathiona S-transferase (GST).....	12
2.3.4. Glutathiona redutase (GR).....	12
2.3.5. Glutamato cisteína ligase (GCL) e glutathiona reduzida (GSH).....	12
2.3.6. Lipoperoxidação (LPO).....	13
2.4. Análises estatísticas.....	13
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ANEXO I	24

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

MODULAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO *Danio rerio*
(TELEOSTEI: DANIONIDAE) FRENTE A SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM A
POLPA LIOFILIZADA DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)

Autores: Gex Pereira de Sousa, Yure Jefferson da Cruz do Nascimento, Maria Caroline Rodrigues Ferreira, Raul Nunes de Carvalho Jr., Lílian Lund Amado.

Status de publicação: não submetido.

Revista: Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology

ISSN: 1096-4959

Modulação do sistema de defesa antioxidante do *Danio rerio* (teleostei: danionidae) frente a suplementação alimentar com a polpa liofilizada do buriti (*Mauritia flexuosa* L.)

Gex Pereira de Sousa^a, Yure Jefferson da Cruz do Nascimento^a, Maria Caroline Rodrigues Ferreira^b, Raul Nunes de Carvalho Jr.^b, Lílian Lund Amado^{a,*}

^aLaboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Pará, Brasil.

^bInstituto de Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pará (UFPA), Pará, Brasil.

* Autor correspondente: Lílian Lund Amado

Laboratório de Ecotoxicologia - LABECOTOX – ICB

Laboratório de Pesquisas em Monitoramento Ambiental Marinho - LAPMAR – IG

Av. Augusto Corrêa, 01 – Guamá

CEP: 66075-110 - Belém, PA – Brasil

E-mail: lilian.amado@gmail.com

Resumo: A suplementação alimentar realizada com o aproveitamento do imenso potencial de frutas amazônicas é uma prática crescente por conta dos benefícios nutricionais que esses produtos oferecem. Uma das frutas nativas do Brasil, com ampla distribuição na região amazônica e com grande potencial nutricional é o buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), justamente por apresentar compostos que atuam na modulação do sistema de defesa antioxidante celular, como os carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico, ácidos graxos e polifenóis. Tendo em vista os potenciais efeitos antioxidantes dos compostos presentes no buriti, este trabalho visa avaliar o efeito da suplementação alimentar com a polpa liofilizada de buriti sobre o sistema de defesa antioxidante do *Danio rerio* (*Zebrafish*). Para isso, 60 machos adultos de *D. rerio* foram divididos em 6 grupos experimentais, cada um com 10 réplicas: o grupo controle (CT) e 5 tratamentos com exposição por imersão a diferentes concentrações da polpa do buriti liofilizada (5, 10, 20, 40 e 80 mg/L). A polpa liofilizada foi oferecida aos peixes como alimento, a cada 24h pelo período de 168h (7 dias consecutivos). Foram analisados 6 biomarcadores de estresse oxidativo (atividade da Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione redutase (GR) e Glutathione Cisteína Ligase (GCL), concentração de Glutathione reduzida (GSH), lipoperoxidação (LPO) e capacidade antioxidante total (ACAP). Os resultados demonstraram que a suplementação alimentar diminuiu os níveis basais de LPO e reduziu a atividade enzimática GCL nas maiores concentrações testadas. No entanto, não alterou os outros biomarcadores analisados, apesar da GR e da GST apresentarem uma tendência de aumento numérico similar. Portanto, a suplementação alimentar com a polpa do buriti apresenta potencial de atuar de forma sinérgica

ao sistema de defesa antioxidante do *D. rerio*, protegendo suas células de danos lipídicos ocasionados pelo estresse oxidativo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Bioativos; Biomarcadores; *Zebrafish*; Antioxidantes.

ABSTRACT: Food supplementation carried out using the immense potential of Amazonian fruits is a growing practice due to the nutritional benefits that these products offer. One of the native fruits of Brazil, widely distributed in the Amazon region and with great nutritional potential is buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), precisely because it contains compounds that act in the modulation of the cellular antioxidant defense system, such as carotenoids, tocopherols, ascorbic acid, fatty acids and polyphenols. Considering the potential antioxidant effects of the compounds present in buriti, this work aims to evaluate the effect of food supplementation with lyophilized pulp of buriti on the antioxidant defense system of *Danio rerio* (*Zebrafish*). For this, 60 adult males of *D. rerio* were divided into 6 experimental groups, each with 10 replicates: the control group (CT) and 5 treatments with immersion exposure to different concentrations of lyophilized buriti pulp (5, 10, 20, 40 and 80 mg/L). The lyophilized pulp was offered to the fish as food every 24 hours for a period of 168 hours (7 consecutive days). Six biomarkers of oxidative stress: Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione Reductase (GR) and Glutamate Cysteine Ligase (GCL) activity), reduced Glutathione (GSH) concentration, lipoperoxidation (LPO) and total antioxidant capacity (ACAP) were measured. The results showed that dietary supplementation decreased baseline levels of LPO and reduced GCL enzymatic activity at the highest concentrations tested. However, it did not change the other biomarkers analyzed, despite the fact that GR and GST showed a similar numerical increase trend. Therefore, dietary supplementation with buriti pulp has the potential to act synergistically with *D. rerio's* antioxidant defense system, protecting its cells from lipid damage caused by oxidative stress.

Keywords: Oxidative stress; Carotenoids; Biomarkers; *zebrafish*; Antioxidants.

1. INTRODUÇÃO

A notável biodiversidade vegetal das regiões tropicais implica na descoberta de plantas com compostos que possuem propriedades nutritivas interessantes para a implementação de produtos nos sistemas industriais e comerciais (JESUS, 2020). Atualmente, a suplementação alimentar de espécies animais com produtos derivados de frutas nativas é uma prática que vem se desenvolvendo, principalmente por conta dos benefícios nutricionais somativos que esses produtos podem fomentar (DE CASTRO *et al.*, 2014).

Uma das frutas nativas do Brasil com maior interesse nutricional é o buriti, justamente por apresentar fitocompostos funcionais aproveitáveis ao processo industrial na elaboração de produtos comerciais (ZANNATA *et al.*, 2008). O buriti é considerado um item repleto de bioativos que auxiliam em processos metabólicos e é almejado, principalmente, pelo aproveitamento quase integral de todos os seus componentes, incluindo casca, polpa e sementes (DAS NEVES LOUREIRO *et al.*, 2013). Também conhecido como miriti, o buriti é o nome popular dado ao fruto elipsóide-oblongo ou globoso-oblongo do buritizeiro (*Mauritia flexuosa* L.) pertencente à família Arecaceae, sendo uma palmeira arbórea caulescente de ampla ocorrência em regiões de matas brejosas e veredas das regiões norte, nordeste, sudeste e centro-oeste (RESENDE, 2012).

A promissora atividade bioativa que o buriti apresenta se deve às grandes concentrações de antioxidantes não enzimáticos como os carotenoides (pró-vitamina A), tocoferóis, ácido ascórbico (vitamina C), ácidos graxos monoinsaturados e polifenóis, destacando-se os flavonoides (HAMACEK *et al.*, 2018). Tais compostos atuam, principalmente, na modulação do sistema de defesa antioxidante celular, justamente por apresentarem alta reatividade bioquímica, desempenhando um papel crucial na captura e inativação de radicais livres ou na interrupção da cadeia de processos oxidativos desencadeados pelos mesmos (MORAIS, 2009).

Para o metabolismo aeróbio, é importante que haja um sistema de defesa antioxidante que tenha coevoluído com a intensificação do uso de oxigênio para produção de energia pelas células (FERREIRA; ABREU, 2007) de maneira que mantenha a proteção celular contra agentes pró-oxidantes (DE VASCONCELOS *et al.*, 2014). As defesas antioxidantes endógenas que os organismos apresentam classificam-se em: enzimáticas, representadas por enzimas abundantes em meio extra e intracelular como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPH-Px), glutatona redutase (GR), entre outros e as não enzimáticas como o tripeptídeo da glutatona (GSH) (VALKO *et al.*, 2007).

Além das fontes endógenas de antioxidantes, diversas são as moléculas que podem ser usadas como suplementos da função antioxidante celular. Os carotenoides, pigmentos

polisoprenóides lipofílicos de origem vegetal estão entre elas e classificam-se como um dos mais importantes antioxidantes do fruto do buriti devido ao seu elevado número de ligações duplas conjugadas que permitem sua atuação nos organismos como “desativadores do oxigênio singlete ou como sequestradores dos radicais peroxila” (BARREIROS *et al.*, 2006), reduzindo assim os danos estruturais que esses radicais proporcionam ao DNA e aos lipídeos de membrana.

Para observar os efeitos modulatórios do buriti sobre o sistema antioxidante, é importante que se utilize um organismo teste adequado nesse âmbito. Um dos exemplos mais notórios desses organismos é o *Danio rerio* (*zebrafish*), um teleósteo tropical de água doce pertencente à família Danionidae (TARO; TAMNG; DAS, 2022). É utilizado largamente como organismo modelo em diversos estudos científicos, elucidando os aspectos bioquímicos e toxicológicos de suas estruturas celulares e fundamentando conhecimento biológico aplicado em outros organismos a nível unitário ou ecossistêmico (MARIANO *et al.*, 2020).

A grande utilização do *zebrafish* em estudos ecotoxicológicos e genéticos se fundamenta em diferentes características que o peixe apresenta, tais como: sua importância socioeconômica e biológica, haja vista seu papel integrante em ecossistemas aquáticos; rápido desenvolvimento; fácil cultivo e manejo; tamanho diminuto, o que facilita sua manipulação em âmbito laboratorial (LEICHTWEIS *et al.*, 2022); seu genoma completamente sequenciado e o seu alto grau de similaridade genética com mamíferos, o que potencializa a utilização desse peixe em estudos genéticos de patologias humanas (PADILLA; GLABERMAN, 2020).

Sendo assim, os compostos bioativos funcionais de frutos como o buriti são importantes moduladores de defesa contra o estresse oxidativo, justamente por atuar diretamente nos ERO formados ou induzir um reforço no sistema de defesa antioxidante do organismo (CÂNDIDO *et al.*, 2015). Assim, tendo em vista o potencial dos efeitos antioxidantes dos compostos presentes no buriti, o presente trabalho possui como objetivo averiguar a modulação do sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo do peixe zebra (*Danio rerio*) frente a suplementação alimentar com a polpa liofilizada do buriti.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Polpa liofilizada do buriti

A suplementação alimentar foi realizada com o liofilizado da polpa com casca do buriti (*Mauritia flexuosa* L.). A liofilização consiste na secagem de um determinado material, geralmente alimentício, para dificultar a proliferação microbiana e minimizar as suas perdas nutricionais (MELO *et al.*, 2021), o que favorece a “proteção das propriedades mais sensíveis

do alimento como aroma e sabor” (DOS SANTOS *et al.*, 2013). A metodologia utilizada para obtenção do liofilizado seguiu o descrito por Dos Santos (2020), que consistiu na adição do encapsulante AmidoMax2500, as polpas foram congeladas a -70°C por 24 horas e em seguida foram submetidas ao processo de liofilização por 72 horas. A quantidade de carotenoides no liofilizado foi igual à $301,05 \mu\text{g/g}$. Para alimentação, o liofilizado foi macerado, pesado em balança analítica e armazenado em microtubos do tipo *ependorfs* de 2 mL.

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 6211260521 utilizando indivíduos comprados comercialmente e reproduzidos em laboratório. Foram divididos 60 machos adultos de *D. rerio* em 6 grupos experimentais (figura 1), cada um com 10 réplicas: o grupo controle (CT) – sem aplicação do suplemento alimentar – e 5 tratamentos com aplicação da polpa liofilizada do buriti (T1, T2, T3, T4 e T5), onde foram adicionadas as concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 mg da polpa liofilizada de buriti em 200mL de água, respectivamente. Tais concentrações de exposição equivaleram a uma concentração nominal de $7,5 \mu\text{g/L}$; $15,05 \mu\text{g/L}$; $30,11 \mu\text{g/L}$; $60,21 \mu\text{g/L}$ e $120 \mu\text{g/L}$ de carotenoides em cada um dos grupos experimentais T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente. Os peixes foram colocados, individualmente, em 60 beakers contendo 200 mL de água de osmose reversa reconstituída de íons e aclimatados por cerca de 24h antes do início da suplementação. Durante o experimento foi mantido o fotoperíodo 14C:10E e aeração constante.

O experimento ocorreu durante sete dias consecutivos (total de 168h), nos quais foram realizadas duas alimentações por dia, sendo ministradas as supracitadas concentrações da polpa do buriti, por amostra, no horário de 8:30h (grupo controle recebeu 5 mg de ração comercial *ovovit*). Já na segunda alimentação, que ocorreu no horário de 16:30h, foi padronizado a concentração de 5 mg de ração comercial para todos os tratamentos. Optou-se por separar a alimentação com a polpa da alimentação com a ração comercial para evitar algum tipo de preferência/seletividade dos animais. A polpa liofilizada de buriti foi oferecida da mesma forma que a ração comercial: na superfície da água onde os animais estavam imersos.

A cada 24h - sempre antes da alimentação seguinte - foi realizada uma sifonagem padronizada de 10 mL de água com pipeta do tipo pasteur no fundo dos beques com o intuito de remover o excedente de suplemento e as excretas do peixe. Logo em seguida, foi acrescentado água até completar o volume inicial (200 mL). Após o fim da exposição, os peixes foram eutanasiados em gelo, pesados em balança analítica e medido o comprimento padrão – métrica da cabeça até o início da nadadeira caudal – utilizando um paquímetro de precisão.

Para o preparo do homogeneizado foi utilizado o peixe inteiro, a fim de se verificar os efeitos globais da suplementação. As amostras foram homogeneizadas em tampão (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂.6H₂O 5 mM) em pH 7,75 numa proporção de 1:4 (peso: volume). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas no agitador Kline Timer modelo LIF215 e centrifugadas a 20.000 x g, 4 °C por 20 minutos. Após a centrifugação, os *pellets* foram descartados e os sobrenadantes retirados, separados em microtubos do tipo *ependorfs* de 2 mL devidamente identificados e armazenados em ultra-freezer (-80 °C) para posterior dosagem.

2.3 Dosagens bioquímicas

Foram realizadas a dosagem de proteínas totais nas amostras e a análise de 6 biomarcadores de estresse oxidativo a fim da observação da modulação do sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo do *zebrafish*, sendo 5 biomarcadores de exposição: a capacidade antioxidante total (ACAP), a glutathione S-transferase (GST), a glutathione redutase (GR), a glutamato cisteína ligase (GCL) e a glutathione reduzida (GSH); e 1 biomarcador de efeito: lipoperoxidação (LPO).

2.3.1 Proteínas totais

Foi realizada dosagem de proteínas totais com kit comercial (Dole's Ltda, Brazil) baseado no teste do Biureto (citrato trissódico 0,114 M, carbonato de sódio 0,21 M e sulfato de cobre 0,01 M) para relativizar os resultados da GST e GR, e realizar a diluição necessária para as dosagens da ACAP, GCL e GSH. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer) a 550 nm seguindo o padrão de albumina bovina e os resultados foram expressos em miligramas de proteínas/mL.

2.3.2 Capacidade antioxidante total (ACAP)

A ACAP é um método que determina a capacidade antioxidante total das amostras, medindo todo o aparato bioquímico de proteção contra os agentes pró-oxidantes. A metodologia utilizada foi descrita por Amado *et al.* (2009), que consiste na aplicação do gerador de radicais peroxil ABAP, 4nM – 2'2'-azobis-2-metilpropionamida dihidroclorato – na amostra e usa o H₂DCF-DA – diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína – como substrato. Os radicais peroxil são produzidos por termólise (37° C) do ABAP, neutralizados pelo aparato antioxidante da amostra e o excedente têm seus elétrons interceptados pelo H₂DCF-DA, gerando um fluorocromo que é detectado utilizando comprimentos de ondas de 488 e 525nm para excitação e emissão,

respectivamente. Os resultados são expressos como o inverso da área relativa, pois as amostras que apresentam menor formação de radicais peróxil possuem maior capacidade antioxidante.

2.3.3 Glutathione S-transferase (GST)

A glutathione S-transferase (GST) é uma isoenzima do sistema de defesa antioxidante responsável pela catalisação da reação de conjugação de xenobióticos com a glutathione, desempenhando um papel fundamental na detoxificação celular (BARBOSA *et al.*, 2021). A análise da atividade da GST foi realizada seguindo o método descrito por Habig e Jakoby (1981), no qual avalia a conjugação de Glutathione reduzida (GSH, 1 μ M) com o substrato 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, 1 μ M), processo catalisado pela enzima GST presente na amostra. O complexo conjugado formado possui absorvância máxima de 340 nm. O meio de reação utilizado foi tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e os resultados foram expressos em UGST/mg de proteína, o que representa a quantidade necessária da GST para catalisar a conjugação de 1 μ Mol de CDNB/min/mg de proteína.

2.3.4 Glutathione reductase (GR)

A glutathione reductase (GR) é uma enzima importante para o sistema de defesa antioxidante, pois utiliza a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para reduzir a glutathione oxidada (GSSG) em glutathione reduzida (GSH) (HUBER *et al.*, 2008). A metodologia empregada para dosar a atividade da GR foi baseada no método descrito Nagalakshimi e Prasad (2001). Foi utilizado o tampão de fosfato de sódio (200 mM, pH 7,4), a glutathione oxidada (GSSG, 1 mM) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH – 0,1 mM) para o preparo da placa. Em seguida, foi observado a diminuição da absorvância de NADPH em 340 nm no espectrofotômetro (Victor X3, Perkin Elmer). Os resultados foram expressos em nmol de NADPH/min/mg de proteína.

2.3.5 Glutamato cisteína ligase (GCL) e glutathione reduzida (GSH)

A GCL é uma enzima responsável pela produção de GSH através da via metabólica conhecida como síntese de novo, no qual conjuga o ácido glutâmico com a cisteína formando o complexo γ -glutamilcisteína (SILVA, 2012). A metodologia utilizada para atestar a atividade da GCL e as concentrações de GSH foi descrita por White *et al.* (2003). Esse método consiste na reação do naftaleno dicarboxialdeído (NDA) com GSH ou γ -glutamilcisteína (γ -GC) para formar produtos cíclicos altamente fluorescentes. A cisteína não foi adicionada aos poços de base da GSH para medir a atividade de GCL. Após incubação de 30 minutos, a intensidade de

fluorescência do complexo NDA- γ -GC ou NDA-GSH foi medida com excitação de 472 nm e emissão de 528 nm em um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; Perkin Elmer). Os resultados para atividade da GCL foram expressos em nmol/min/mg de proteína e nmol de GSH para a quantificação de GSH.

2.3.6 Lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação lipídica configura-se como danos estruturais aos lipídios insaturados das membranas celulares decorrentes da ação de radicais livres em excesso (LIMA & ABDALLA, 2001). A Lipoperoxidação foi determinada pelo método para fluorimetria de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Oakes e Kraak (2003). Este método quantifica o malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica. No ensaio, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.8%) em meio ácido (ácido acético 20%) a uma temperatura de 95°C, formando o complexo MDA-TBA₂ de cor rosa, que é detectado pelo fluorímetro utilizando comprimentos de ondas de 515 e 553 nm para emissão e excitação, respectivamente. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como antioxidante para as amostras e o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como padrão. O Dodecilsulfato de Sódio (SDS, 8.1%) foi utilizado como surfactante e o n-Butanol para separar a fase orgânica da inorgânica. Os resultados foram expressos em nmol MDA/g de tecido úmido.

2.4 Análises estatísticas

Para a análise dos dados de biomarcadores bioquímicos foram testados os pressupostos de normalidade (Teste de Shapiro-Wilks) e homocedasticidade (Teste de Levene). Posteriormente houve a aplicação da análise de variância (ANOVA) com posterior aplicação do teste *post-hoc* de Tukey para verificar diferenças estatísticas nas médias entre os grupos experimentais. Foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

A média dos dados métricos obtidos do peso e do comprimento padrão do *Zebrafish* correspondem a $0,33 \pm 0,08$ g e $26,64 \pm 2,20$ mm, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) da ACAP do *D. rerio* frente a diferentes concentrações da suplementação alimentar (CT= $2,36 \pm 0,84$; T1= $3,54 \pm 0,78$; T2= $3,45 \pm 0,66$; T3= $3,87 \pm 0,68$; T4= $2,71 \pm 0,75$ e T5= $2,68 \pm 0,48$).

As diferentes concentrações de suplemento alimentar não alteraram ($p > 0,05$) a atividade enzimática da GR (CT= $1,06 \pm 0,14$ nmol de NADPH/min/mg de proteína; T1= $1,05 \pm 0,15$ nmol

de NADPH/min/mg de proteína; T2= $1,22 \pm 0,09$ nmol de NADPH/min/mg de proteína; T3= $1,45 \pm 0,13$ nmol de NADPH/min/mg de proteína; T4= $1,54 \pm 0,19$ nmol de NADPH/min/mg de proteína e T5= $1,54 \pm 0,18$ nmol de NADPH/min/mg de proteína) (fig. 3 C). Não houve alteração ($p > 0,05$) na atividade da GST (CT= $42,21 \pm 2,68$ UGST/mg proteína; T1= $37,23 \pm 4,46$ UGST/mg proteína; T2= $37,95 \pm 3,89$ UGST/mg proteína; T3= $42,29 \pm 5,65$ UGST/mg proteína; T4= $50,02 \pm 6,49$ UGST/mg proteína, T5= $55,78 \pm 6,53$ UGST/mg proteína) (fig. 3 D).

Não foi observada alteração ($p > 0,05$) nas concentrações do tripeptídeo GSH (CT= $84,78 \pm 10,73$ nmol de GSH; T1= $72,44 \pm 10,73$ nmol de GSH; T2= $71,43 \pm 4,52$ nmol de GSH; T3= $98,72 \pm 19,77$ nmol de GSH; T4= $80,30 \pm 14,05$ nmol de GSH e T5= $71,32 \pm 8,71$ nmol de GSH) entre os grupos analisados (fig. 3 E). A atividade da GCL não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle (CT= $446,91 \pm 30,61$ nmol/min/mg de proteína) e os tratamentos que receberam quantidades menores do extrato liofilizado (T1= $448,25 \pm 74,75$ nmol/min/mg de proteína; T2= $402,91 \pm 44,02$ nmol/min/mg de proteína). Porém os peixes que receberam maior quantidade do liofilizado (T3= $238,40 \pm 54,06$ nmol/min/mg de proteína; T4= $273,39 \pm 36,60$ nmol/min/mg de proteína e T5= $250,62 \pm 28,20$ nmol/min/mg de proteína) apresentaram redução significativa quando comparados ao grupo controle ($p = 0,023$, $p = 0,0377$, e $p = 0,0380$, respectivamente). Os grupos T3, T4 e T5 apresentaram diminuição significativa na atividade da GCL quando comparados com T1 ($p = 0,0287$; $p = 0,0441$ e $p = 0,0460$, respectivamente) (fig. 3 F).

Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) apresentaram redução significativa em todos os tratamentos (T1= $1,71 \pm 0,58$ nmol MDA/g de tecido úmido; T2= $1,41 \pm 0,38$ nmol MDA/g de tecido úmido; T3= $1,20 \pm 0,53$ nmol MDA/g de tecido úmido; T4= $1,19 \pm 0,41$ nmol MDA/g de tecido úmido e T5= $1,37 \pm 0,37$ nmol MDA/g de tecido úmido) quando comparados ao grupo controle (CT= $3,81 \pm 0,39$ nmol MDA/g de tecido úmido), apresentando os valores de $p = 0,0364$, $p = 0,0056$; $p = 0,0055$; $p = 0,0197$ e $p = 0,0146$, respectivamente. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si (fig. 3 B).

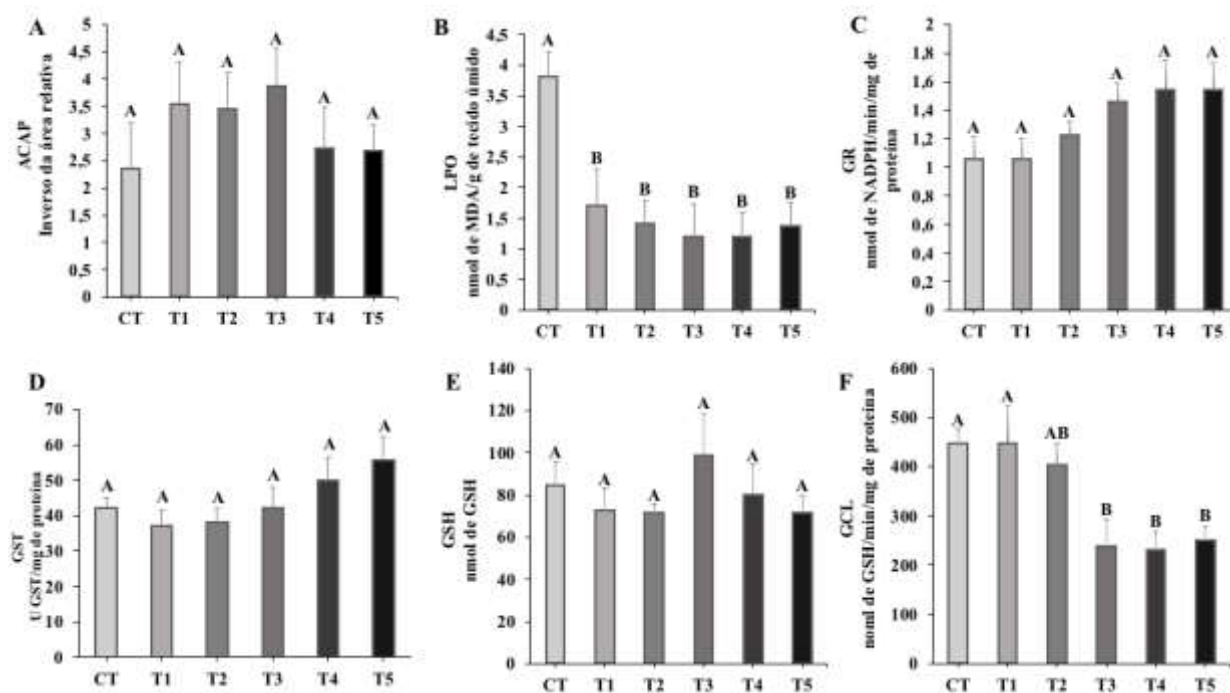


Figura 3: Biomarcadores de estresse oxidativo no *Danio rerio* após 168h de suplementação alimentar. (A) capacidade antioxidante total. (B) níveis de lipoperoxidação. (C) atividade da glutatona redutase. (D) atividade da glutatona S-transferase. (E) concentração de glutatona reduzida. (F) atividade da glutatona cisteína ligase expresso em média±erro padrão. As letras distintas representam diferença ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

4. DISCUSSÃO

A análise integrada dos biomarcadores de estresse oxidativo constitui uma ferramenta importante para elucidar as relações de causa-efeito em unidades biológicas mediante exposição química ou dieta nutricional (AMORIM, 2003). Esta relação apresenta uma visão holística sobre a modulação bioquímica dos indicadores biológicos do organismo estudado e suas implicações macro fisiológicas com a saúde animal (reprodução, crescimento, dentre outros) ou implicações ecossistêmicas como avaliações de risco e impacto ambiental (FREIRE *et al.*, 2008). No entanto, são escassos os trabalhos acadêmicos que tratam dos efeitos modulatórios da suplementação com buriti sobre os biomarcadores bioquímicos em peixes. Assim, este trabalho objetivou analisar seis biomarcadores de estresse oxidativo a fim de obter uma resposta plural sobre a modulação do sistema de defesa antioxidante do *zebrafish* frente a suplementação alimentar com a polpa liofilizada do buriti exposta sob via gastrointestinal, branquial e corporal.

Neste estudo, a análise da capacidade antioxidante total frente à suplementação alimentar do *zebrafish*, não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. Tal resultado pode estar relacionado a utilização do peixe inteiro para homogeneização e dosagens bioquímicas, haja vista o caráter não específico da ACAP, uma vez que se configura como um

biomarcador global justamente por estimar a atividade antioxidante total da amostra analisada, englobando o aparato bioquímico enzimático e não enzimático (Amado *et al.*, 2006). Também se configuram como fatores possíveis de relação com a ausência de resposta do ACAP o tempo reduzido (168h) e a forma de suplementação alimentar por oferta do suplemento desagregado da ração comercial.

Um indício dessa afirmação é a comparação com os resultados de Morselli *et al.* (2020), que atestaram aumento na capacidade antioxidante hepática do peixe Carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) ao realizar um estudo de suplementação alimentar com timol dietético incluído na ração basal por 60 dias consecutivos. Esse estudo denota que tanto a realização da suplementação alimentar agregada a ração basal por um período de tempo mais longo quanto a realização da análise do órgão-específico (no caso fígado) gera resultados significativos para o aparato antioxidante dos peixes, o que contrasta com a resultados e metodologia empregado neste trabalho (exposição de sete dias ao suplemento de forma desagregada da ração comercial e análise do peixe inteiro).

Além disso, foram dosados 4 componentes do metabolismo da glutathiona: GR, GST, GCL e GSH. Esses biomarcadores desempenham papel fundamental na defesa celular contra o estresse oxidativo, assim como auxiliam no processo de eliminação de xenobióticos do organismo (JOSEPH; MANNERVIK; ORTIZ, 1997). Embora a atividade da GST não tenha apresentado diferença significativa, visualizamos um aumento numérico da atividade enzimática à medida que aumentam as concentrações do liofilizado. Tal tendência também é observada nos resultados da glutathiona redutase (GR), nos quais não houve diferença significativa, no entanto apresentou uma tendência similar de aumento numérico. Esse aumento numérico e não significativo pode estar vinculado a utilização do peixe inteiro para análise bioquímica, haja vista que a GST tem sua expressão mais acentuada no fígado (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005) por se tratar de uma isoenzima de detoxificação celular.

Logo, o panorama encontrado para os biomarcadores acima citados pode ser explicado por uma via metodológica similar a encontrada para a expressão da ACAP: a forma de administração do suplemento por oferta do liofilizado de forma desagregada à ração comercial. Administrar concentrações diferentes na água para servir como suplemento oferece o risco de que o peixe não consuma o total ofertado e que, por conta disso, os resultados obtidos não gerem diferença significativa. Comparativamente, Monserrat *et al.* (2008) estudou o efeito do ácido lipoico (AL) sobre potencial antioxidante de diferentes órgãos do peixe *Corydoras paleatus*, adicionando 70 mg de AL/ Kg de massa corporal a uma dieta comercial de peixes durante 4

semanas. Dentre os resultados obtidos, observou-se que o AL aumenta a atividade cerebral da glutathiona S-transferase do peixe, indicando melhoria da sua capacidade antioxidante.

Sendo a GST uma enzima de detoxificação celular atuante no processo de conjugação nucleofílica de xenobióticos à glutathiona reduzida (GSH) (RIBEIRO; ZANETTE, 2015) e a GR a enzima responsável pela reciclagem da GSH a partir do processo de redução da glutathiona oxidada (GSSG) (HUBER *et al.*, 2008), podemos inferir que um aumento considerado nas atividades de ambas as enzimas indicariam maior efeito protetor contra danos provocados por estresse oxidativo. Um indício dessa afirmação são os dados obtidos da análise da LPO, onde houve redução nos peixes suplementados com a polpa, pois o aumento da atividade desses componentes confere maior proteção celular contra ação de ERO que, por conseguinte, não oxidam os ácidos graxos poli-insaturados que compõem os lipídeos de membrana, reduzindo assim os níveis de lipoperoxidação como conforme observado nesse estudo.

Agregado a isso, temos a redução significativa da atividade da GCL nos 3 últimos tratamentos (T3, T4 e T5) – que correspondem a concentração de 20, 40 e 80 mg de polpa em 200 mL do meio de imersão dos animais, respectivamente – quando comparados ao grupo controle e ao tratamento T1. Tal dado complementa a hipótese de proteção antioxidante que a enzima glutathiona redutase (GR) desempenha frente à suplementação alimentar, pois se os bioativos antioxidantes do buriti proporcionam subsídio bioquímico necessário (por exemplo poder redutor para a formação de NADPH) para a glutathiona redutase manter sua atividade reduzindo a GSSG a GSH e devolvendo-lhe o poder redutor (YANG *et al.*, 2019), não é necessário que a GCL conjugue o ácido glutâmico com a cisteína (LEONEL, 2014), que resultará em mais GSH pela ação da glutathiona sintetase (síntese de novo).

Apesar de não haver diferença significativa na capacidade antioxidante total, a suplementação alimentar com a polpa liofilizada do buriti conferiu um efeito citoprotetor ao *zebrafish*, pois observou-se que, mesmo na menor concentração administrada (T1= 5 mg da polpa liofilizada), a suplementação diminuiu os níveis basais de peroxidação lipídica em relação ao grupo controle. Tal resultado denota que os compostos antioxidantes presentes na polpa do buriti, em especial os carotenoides, atuam como substrato oxidável realizando a interceptação de elétrons dos agentes pró-oxidantes que prejudicam os lipídios das membranas celulares (YOUNG & LOWE, 2001) e alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (BROINIZI *et al.*, 2008).

Contudo, observa-se que diferentes concentrações de polpa do buriti ofertadas ao *zebrafish* por via superfície gastrointestinal, branquial e corporal não geram diferença significativa nos níveis basais de lipoperoxidação, isto é, concentrações distintas conferem o

mesmo efeito citoprotetor. Tal dado colabora com resultados obtidos por Santos (2014), ao analisar o efeito de distintas concentrações de extrato de açaí (*Euterpe oleracea*) sobre os níveis de lipoperoxidação em uma linhagem de astrócitos de ratos *Sprague-Dawley* mediante a influência de 500 μM de MnCl_2 (cloreto de manganês). Verificou-se no supracitado estudo que o extrato do açaí possui efeito remediador na lipoperoxidação das células, no entanto não diferem nas duas concentrações analisadas (0,1 $\mu\text{g/ml}$ e 1 $\mu\text{g/ml}$).

A análise do aumento numérico em relação a atividades GST e da GR - quando observadas de maneira concentração dependente - associada aos níveis relativamente constantes da glutathiona reduzida (GSH) denotam a importante ação que a polpa de buriti possui como provedor de poder redutor para a manutenção do metabolismo antioxidante. Tal fato é atestado pelos níveis baixos encontrados na atividade da GCL (diminuição da necessidade de síntese de GSH por ação antioxidante direta do buriti) e a redução significativa na LPO. Apesar do notório efeito benéfico que a suplementação alimentar com buriti proporciona ao *zebrafish*, destacamos algumas alterações metodológicas na experimentação que poderiam promover resultados mais conclusivos acerca da modulação do seu sistema de defesa antioxidante, tais como: aumentar o tempo de suplementação de tal forma que tenhamos um efeito bioquímico a longo prazo e realizar a análise de órgão-específico para visualizarmos o efeito do suplemento em diferentes tecidos analisados.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que os bioativos administrados na suplementação alimentar com a polpa liofilizada do buriti promovem efeitos modulatórios do sistema de defesa antioxidante do *D. rerio*, aumentando sua eficácia no combate aos ERO e protegendo suas células de efeitos deletérios ocasionados pelo estresse oxidativo, seja pela oferta de antioxidantes não enzimáticos ou pela sustentação bioquímica de enzimas endógenas responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox das suas células. O estudo dos efeitos bioquímicos dos bioativos presentes em produtos naturais sobre o aparato antioxidante do *zebrafish* auxilia no entendimento das bases moleculares de ação dos seus sistemas macro fisiológicos e comportamentais, obtendo dados essenciais das implicações bioquímicas e sistêmicas para possíveis aplicações para outros organismos, incluindo seres humanos. Além disso, destaca-se a importância nutricional, econômica e social que os frutos nativos do Brasil exercem sobre o manejo de produtos naturais, a valorização de produtores locais e a proteção de ecossistemas nos quais esses frutos ocorrem. Por fim, nota-se que a polpa do buriti se

configura como um suplemento alimentar adequado ao *D. rerio*, diminuindo seu grau de estresse oxidativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO, Lílian Lund et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2115-2123, 2009.

AMADO, Lílian Lund et al. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 2, p. 199-206, 2006.

AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.

BARBOSA, Andreia Marcelino. Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade em Rede Pro-Centro-Oeste) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.

BROINIZI, Priscila Regina Bolelli et al. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 773-781, 2008.

CÂNDIDO, Thalita Lin Netto; SILVA, Mara Reis; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313-319, 2015.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Normativas do Concea para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de

ensino ou pesquisa científica: lei, decreto, portarias, resoluções normativas e orientações técnicas, 2015.

DAS NEVES LOUREIRO, Marinalva et al. Armazenamento de buriti em pó: Efeito da embalagem nas características físicas e químicas. **Bioscience Journal**, 2013.

DE CASTRO, Deise Souza et al. Caracterização física e físico-química de polpa de buriti, *Mauritia flexuosa*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 2, p. 18, 2014.

DE VASCONCELOS, Thiago Brasileiro et al. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.

DOS SANTOS, André Leonardo et al. Propriedades físico-químicas em polpas de frutos do cerrado in natura e liofilizada. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 7, n. Especial, p. 52-58, 2020.

DOS SANTOS, Bianca Silva et al. Obtenção, liofilização e caracterização de extrato de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) E hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 5, p. 090-099, 2013.

FERREIRA, Isabel CFR; ABREU, Rui. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FREIRE, Marina Moreira et al. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 2, 2008.

HABIG, William H.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferases (rat and human). In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, 1981. p. 218-231.

HALLIWELL, Barry. The antioxidant paradox. **The lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HAMACEK, Fabiana Rossini et al. Buriti of the cerrado of Minas Gerais, Brazil: physical and chemical characterization and content of carotenoids and vitamins. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 263-269, 2018.

HAYES, John D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, Ian R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

JESUS, Beatriz et al. PANCs-Plantas Alimentícias Não Convencionais, benefícios nutricionais, potencial econômico e resgate da cultura: uma revisão sistemática. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 33, 2020.

JOSEPH, P. D.; MANNERVIK, B.; ORTIZ de Montellano, P.; Molecular Toxicology, 1st ed., **Oxford University Press: New York**, v.10, n.3, p.152-186,1997.

LEICHTWEIS, Jandira et al. Utilização do *zebrafish* (*Danio rerio*) como espécie de avaliação da toxicidade de efluentes: Uma revisão. **Meio Ambiente, Sustentabilidade e Tecnologia** Volume 10, p. 63, 2022.

LEONEL, Camila et al. Expression of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase pi in canine mammary tumors. **BMC veterinary research**, v. 10, p. 1-10, 2014.

LIMA, Émerson Silva; ABDALLA, Dulcineia Saes Parra. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Braz J Pharm Sci**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MARIANO, M.; GOMES Pereira, L.; LUIS Franco, J.; DE BRUM Vieira, P. Peixe Zebra (*Danio rerio*) como um modelo alternativo para pesquisas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 11, n. 1, 14 fev. 2020.

MELO, Mylena Olga Pessoa et al. Modelagem matemática da cinética de liofilização do extrato ou “leite” de gergelim. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, 2021.

MONSERRAT, José Maria et al. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 287-292, 2008.

MORAIS, Selene M. de et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MORSELLI, Monique B. et al. Benefits of thymol supplementation on performance, the hepatic antioxidant system, and energetic metabolism in grass carp. **Fish physiology and biochemistry**, v. 46, p. 305-314, 2020.

NAGALAKSHMI, N.; PRASAD, M. N. V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Science**, v. 160, n. 2, p. 291-299, 2001.

OAKES, Ken D. et al. Oxidative stress and bioindicators of reproductive function in pulp and paper mill effluent exposed white sucker. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 1, p. 51-65, 2003.

PADILLA, Stephanie; GLABERMAN, Scott. The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. In: An introduction to interdisciplinary toxicology. **Academic Press**, p. 525-532, 2020.

RESENDE, Isa Lucia de Moraes et al. Estrutura etária de populações de *Mauritia flexuosa* LF (Arecaceae) de veredas da região central de Goiás, Brasil. **Revista árvore**, v. 36, p. 103-112, 2012.

RIBEIRO, Eduardo; CANTELE, Maluare; ZANETTE, Juliano. Efeito In Vitro do Anestésico Tricaína MS-222 na Atividade do Biomarcador Glutathione S-transferase de Carpa. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 392-392, 2015.

SANTOS, Vívian da Silva. Açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu

extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, 2014

SILVA, Natália Eduarda da. Biomarcadores de estresse oxidativo no camarão *Macrobrachium amazonicum*: (Heller, 1862) avaliação em uma área de preservação ambiental na Amazônia/Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Departamento de Meio Ambiente e Desenvolvimento, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP, 2022.

TARO, Koj; TAMANG, Lakpa; DAS, D. N. Ichthyofaunal diversity of Senkhi stream, Itanagar, Arunachal Pradesh: a comparative status between 2004–05 and 2018–19. **Journal of Threatened Taxa**, v. 14, n. 7, p. 21356-21367, 2022.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WHITE, Collin C. et al. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. **Analytical biochemistry**, v. 318, n. 2, p. 175-180, 2003.

YANG, J. L.; FAN, W. and ZHENG, S. J. Mechanisms and regulation of aluminum induced secretion of organic acid anions from plant roots. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, vol. 20, p. 513-527, 2019.

YOUNG, Andrew J.; LOWE, Gordon M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20-27, 2001.

ZANATTA, Cinthia Fernanda et al. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2776-2781, 2008.

ANEXO 1: NORMAS DA REVISTA



COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY - PART B: BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY

An International Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.6



ISSN: 1096-4959

Description:

Comparative Biochemistry & Physiology (CBP) publishes papers in comparative, environmental and evolutionary physiology.

Part B: Biochemical and Molecular Biology (CBPB), focuses on biochemical physiology, primarily bioenergetics/energy metabolism, cell biology, cellular stress responses, enzymology, intermediary metabolism, macromolecular structure and function, gene regulation, evolutionary genetics. Most studies focus on biochemical or molecular analyses that have clear ramifications for physiological processes.

All four *CBP* journals support and follow the editorial direction from all the major societies in the field: Australia & New Zealand Society of Comparative Physiology and Biochemistry (ANZSCP) American Physiological Society (APS) Canadian Society of Zoologists (CSZ) Deutsche Zoologische Gesellschaft (DZG) European Society of Comparative Physiology and Biochemistry (ESCPB) Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry (JSCP) South American Society for Comparative Physiology and Biochemistry (SASCP) Societe de Physiologie (SDP) Society for Experimental Biology (SEB) Society for Integrative & Comparative Biology (SICB)

The journal publishes original articles emphasizing comparative and environmental aspects of the physiology, biochemistry, molecular biology, pharmacology, toxicology and endocrinology of animals. Adaptation and evolution as organizing principles are encouraged. Studies on other organisms will be considered if approached in a comparative context.

Part A. Molecular and Integrative Physiology covers molecular, cellular, integrative, and ecological physiology. Topics include bioenergetics, circulation, development, excretion, ion regulation, endocrinology, neurobiology, nutrition, respiration, and thermal biology. Studies on regulatory mechanisms at any level or organization such as signal transduction and cellular interactions and control of behaviour are encouraged.

Part B. Biochemistry and Molecular Biology covers biochemical and molecular biological aspects of metabolism, enzymology, regulation, nutrition, signal transduction, promoters, gene structure and regulation, metabolite and cell constituents, macromolecular structures, adaptational mechanisms and evolutionary principles.

Part C. Toxicology and Pharmacology covers chemical and drug action at different levels of organization, biotransformation of xenobiotics, mechanisms of toxicity, including reactive oxygen species and carcinogenesis, endocrine disruptors, natural products chemistry, and signal transduction. A molecular approach to these fields is encouraged. Measured rather than nominal exposure concentrations of toxicants must **be reported whenever possible**. For water-borne exposures of aquatic organisms, reporting of detailed chemistry data for the exposure waters is encouraged. When reporting data obtained from bioassays (e.g., LC50 tests), raw data (i.e., the value of the measured biological response variable(s) for each treatment and each observation time) should be submitted as online supplementary material.

Part D. Genomics and Proteomics covers the broader comprehensive approaches to comparative biochemistry and physiology that can be generally termed as "-omics", e.g., genomics, functional genomics (transcriptomics), proteomics, metabolomics, and underlying bioinformatics. Papers dealing with fundamental aspects and hypotheses in comparative physiology and biochemistry are encouraged rather than studies whose main focus is purely technical of methodological.

Naturally, a certain degree of overlap exists between the different sections, and the final decision as to where a particular manuscript will be published after passing the rigorous review process lies with the editorial office.

Types of articles

A Research Paper is a paper that focuses on an experimental question of broad interest to the comparative physiology community.

- Word count (excluding references): typically 4000 -8000 words, with at least 2 figures / tables.
- Papers are normally subdivided into sections titled: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and References. Results and discussion may be combined if appropriate.

A Short Communication is like a Regular Article in scope, but is of a nature that a complete story can be presented in a brief communication. As Short Communications are expected to have higher than average impact on the field rather than report on incremental research, they will receive prioritized and rapid publication.

- Word count: less than 3000 words, with no more than 2 figures / tables.
- Each paper will begin with "Short Communication:" followed by the title.
- The paper includes an Abstract, but is otherwise not subdivided into sections.

A Methods article is focused on applying a novel technology or approach that would inform the CBP readership about a novel technology applied to a comparative physiology question.

- Word count: typically less than 3000 words, with no more than 2 figures / tables.
- Each paper will begin with "Methods:" followed by the title.
- The paper is subdivided into abstract, background, methods, applications.

An Invited Review is a submission that is solicited by an Editor-in-Chief, Associate Editor or member of the Editorial Board. An invited review is published with free access for the first year.

- Word count: typically 6,000- 10,000, with 2 or more figures / tables.
- Each paper will begin with "Invited Review:" followed by the title.

A Graphical Review article can be submitted without a specific invitation, but authors are encouraged to request input from the appropriate Editor-in-Chief to ensure that the paper falls within the scope of the journal. This article type is meant to summarize the most recent status of a specific topic mainly through illustrations. The text and the number of references allowed are limited to favor a focus on the figures. The article structure should be as follows:

- Abstract: up to 250 words.
- Body (exclusive of figure legends): up to 2000 words, double-spaced, Arial font, size 11
- 3-5 color schemes/figures summarizing the state of the specific topic covered. Each figure needs to be self-explanatory, including sufficient annotations to allow the readers to quickly grasp the content of the figure

- Figure legends must be straight to the point, providing additional details which deepen the message of the figure itself. Please ensure that the reader, who may not be a direct expert in the field, can easily grasp the information provided.
- References: no more than 25 key articles that exemplify the most significant recent advances in the field
- Illustrations: Authors are expected to use their own illustration resources. They may also make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images, in accordance with all technical requirements.

An example of GR is available [here](#)

A Review article can be submitted without a specific invitation, but authors are encouraged to request input from the appropriate Editor-in-Chief to ensure that the paper falls within the scope of the journal. Each paper will begin with "Review" followed by the title. The paper is not subdivided into sections. A review is published with free access for the first year.

- Word count: typically 6,000- 10,000 words, with 2-4 figures or tables
- Each paper will begin with "Review:" followed by the title.

A Commentary is a more narrowly written review, typically focused on a specific concept of immediate importance to the discipline. While it is expected that authors survey the peer-reviewed literature on the subject, a Commentary paper offers more **room for more** speculative consideration of a topic. Authors are advised to contact the Editor-in-Chief to determine if your topic is suitable.

- Word count: less than 3000 words, with no more than 2 figures / tables.
- Each paper will begin with "Commentary:" followed by the title.
- The paper is not normally subdivided into sections

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with **The Code of Ethics of the World Medical Association** (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the **Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals** and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms **sex and gender** should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Declaration of competing interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required. If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. [More information](#).

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly

by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

Preprints

Please note that **preprints** can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's **sharing policy**. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '**Multiple, redundant or concurrent publication**' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of **Open Science**, this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server **SSRN**. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to **SSRN**, please consult the **SSRN Terms of Use** and FAQs.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and

"allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any

addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated **Scientific Managing Editor**, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. **More information.**

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see **more information** on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. **Permission** of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has **preprinted forms** for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (**more information**). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of **user license**.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Referees

The slowest part of the review process is finding reviewers who meet the criteria for expertise and have sufficient time to take on these onerous tasks. It will accelerate the review process if you suggest reviewers that are suitable, using the following guidelines.

Free from conflict: Referees should be arms-length from the authors. This means they should be from different institutions and with no history of meaningful collaboration within 2 years.

International representation: At least two of your suggestions should be from outside your home country. At least one referee should be from our [Editorial Board](#)

Justification: Referees are not selected unless the editors can find evidence of their expertise through a publication record or institutional homepage. A URL can help the Editors verify that the recommended reviewer is appropriate.

Editors use the recommended reviewers as an indication of whether the authors believe their work can withstand scrutiny by international peers. If you cannot identify five expert, arms-length reviewers from different countries, then we see this as a sign that your study may not have broad appeal to our international readership, and may not be sent out for review.

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Manuscript file format

Editorial Manager (EM) is the journal's editorial system. EM automatically extracts the information from your submitted file to save you time during submission. Therefore, only EDITABLE source files must be uploaded for the main manuscript file - including figure captions, and these will typically have the extension .docx, .doc, or .tex. A PDF is NOT an acceptable source file for the manuscript. All other submission files can be supplied in your preferred file format. We strongly recommend you use the formatting recommended <https://www.ariessys.com/wp-content/uploads/Best-Practices-for-Metadata-Extraction.pdf> to enter authors names and information in your Manuscript file. The information can then be automatically extracted to fill in many required submission fields on the following pages, saving you a lot of time.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Statistics

Submissions are incomplete without detailed information on independent replication of experiments, statistical approaches and statistical analysis.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- *Title*. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations*. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author*. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- *Present/permanent address*. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Essential title information

If submitting a Review article, write "REVIEW" at the top of the title page.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate Word file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract of a maximum of 250 words is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be a single paragraph not exceeding 250 words.

Graphical Abstract

A Graphical abstract is required for this journal and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. A Graphical abstract should as much as possible provide a visual indication of the context of the results depicted and should contain simple labels. Specifications: the maximum size of the image should be 200 x 500 pixels with a minimum resolution of 300 dpi. A Graphical Abstract should be one image and should not contain multiple panels; visualize one process or make one point clear; for ease of browsing, images should have a clear start and end, preferably 'reading' from top to bottom or left to right. No additional text, outline or synopsis should be included. Any text or label must be part of the image file. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Graphical Abstracts can be uploaded by selecting "Graphical Abstract" from the drop-down list when uploading files.

In case of Review or Perspective articles, you may reuse one of your figures as graphical abstract.

The graphical abstract will be displayed in online search result lists, the Contents List and the online article, but will not appear in the article PDF file or print.

Up to eight key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetical order after the abstract. Only these key words, together with the title, will be used for indexing purposes.

Keywords

Authors should supply five keywords after the Abstract. Please take the time to choose your keywords as they increase the discoverability of your article via search engines. They should not be words from the title or the abstract specifically because that would not improve the discoverability.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

DNA sequences and GenBank Accession numbers

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the

accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors must check accession numbers very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the *printed* article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final *electronic* copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. **Further information on the preparation of electronic artwork.**

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either

'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support **Citation Style Language styles**, such as **Mendeley**. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you

remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

1. All publications cited in the text should be presented in alphabetical order in a list following the text of the manuscript.
2. In the text refer to the author's name and year of publication.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". In this list names of first authors and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically.
5. The List of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Do not use et al. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc. Follow the relevant examples below.

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

Axelsson, M., Farrell, A.P., 1993. Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Am. J. Physiol. 264, R963 - 971.

Hiramatsu, N., Cheek, A.O., Sullivan, C.V., Matsubara, T., Hara, A., 2005. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: Mommsen, T.P., Moon, T.W. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 6. Environmental Toxicology, Elsevier, Amsterdam, pp. 431-471.

Lushchak, V.I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 153, 175-190.

Moyle, P.B., Cech, J.J., 2004. *Fishes. An introduction to ichthyology*. 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Reference style

Example:

Azad, M., Kikusato, M., Maekawa, T., Shirakawa, H., Toyomizu, M., 2010. Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 155, 401-406

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Submission check list at a glance

The following list will be useful during the final checking of an article prior to uploading it to the journal's website:

Ensure that the single, complete PDF file contains:

- One author designated as the corresponding author with complete contact details (e-mail address, full affiliation and postal address)
- Keywords
- All figures as high-resolution files
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- References in proper format (in text and in reference section)

For successful electronic submission, authors also have to have to hand:

- cover letter (word-processing format)
- a list of 5 or more researchers (names, affiliations and e-mail address), with expertise in the areas covered in the manuscript and who might be considered as suitable referees for the manuscript

Further considerations:

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

For any other information please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a

faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.