

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



ALAIN DANILO ENAMORADO MONTES

Influência da suplementação com α -ácido lipóico sobre as respostas antioxidantes e de estresse oxidativo na carpa comum *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae)

Rio Grande, RS.

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Influência da suplementação com α -ácido lipóico sobre as respostas antioxidantes e de estresse oxidativo na carpa comum *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae)

Aquicultor: Alain Danilo Enamorado Montes

Orientador: Dr. José Maria Monserrat

Co-orientador: Dr. Marcelo Borges Tesser

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande

Rio Grande, RS

Agostos, 2014

ÍNDICE

	AGRADECIMENTOS.....	i
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	5
	RESUMO.....	6
	ABSTRACT.....	8
1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	16
3.2	PREPARO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	16
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	17
3.4	HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	18
3.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS E DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	18
3.5.1	Determinação da atividade da GST.....	18
3.5.2	Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	18
3.5.3	Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil CAPR.....	19
3.5.4	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS).....	20
3.5.5	Determinação da composição centesimal da ração.....	20
3.5.6	Determinação da dose real de α-ácido lipóico na ração e no músculo.....	21
3.6	ANÁLISES ESTADÍSTICAS.....	22
4	RESULTADOS.....	23
5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÃO	38
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me conduzido até onde ninguém pode chegar.

A nossa equipe de trabalho, especialmente meu orientador o Dr. José Maria Monserrat por ter me recebido e adotado como integrante do seu grupo de pesquisa. Ao meu co-orientador o Dr. Marcelo Tesser pela ajuda oferecida e as suas valiosas sugestões.

Ao pessoal envolvido direta e indiretamente na realização deste trabalho.

À agência de fomento CAPES, FURG e EMA

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 1 AL: α -Ácido lipóico; ADHL: ácido dihidrolipoico; ERO: *Espécies reativas do oxigênio*;
2 ERN: *Espécies reativas do nitrogênio*; SOD: *Superóxido dismutase*; CAT: *Catalase*;
3 GSH: *Glutathiona reduzida*; GPx: *Glutathiona peroxidase*; GR: *Glutathiona reductase*;
4 GST: *Glutathiona-S-transferase*; MDA: *Malondialdeído*; 4-HNE: *4-hidroxinonenal*;
5 TBARS: *Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico*; NDA: *2,3*
6 *naftalenedicarboxialdeído*; CDNB: *1-cloro-2,4-dinitrobenzeno*; CAPR: *Capacidade*
7 *antioxidante contra peroxiradicais*; BHT; *butil hidroxitolueno*; SDS: *dodecil sulfato de*
8 *sódio*; DMSO: *dimetil sulfóxido*; H₂DCFDA: *diacetato de 2',7' diclorofluoresceína*;
9 ABAP: *(2,2'-azobis (2 metilpropionamida) dihidrocloro)*; TMP: *tetrametoxipropano*;
10 PUFAS: *Ácidos graxos poli insaturados por suas siglas em inglês (Polyunsaturated fatty*
11 *acids)*; HUFAS: *Ácidos graxos altamente poli insaturados por sua sigla em inglês*
12 *(Highly unsaturated fatty acids)*
- 13 O₂^{•-}: *Ânion superóxido*; HO₂[•]: *Radical hidroxiperoxil*; HO[•]: *Radical hidroxila*; ROO[•]:
14 *Radical peroxila*; RO[•]: *Radical alcoxila*; H₂O₂: *Peroxido de hidrogênio*; ¹O₂: *Oxigênio*
15 *singlete*; O₃: *Ozônio*; HOCl: *Ácido hipocloroso*.

16 RESUMO

17 Embora os efeitos do ácido lipóico tenham sido testados em vários organismos aquáticos,
18 estudos avaliando as respostas antioxidantes ao longo do tempo são escassos e precisam
19 ser abordados. Além disso, respostas antioxidantes provocadas pela suplementação com
20 ácido lipóico no intestino de peixes ainda não foram estudadas. Neste estudo foram
21 avaliadas as respostas antioxidantes e de estresse oxidativo ao longo do tempo em
22 intestino, fígado e músculo em juvenis de carpa comum *Cyprinus carpio*. Dois grupos
23 experimentais (tratado ou controle) foram alimentados respectivamente com uma ração
24 suplementada com ácido lipóico (1 g/kg) ou não. O experimento foi conduzido durante
25 quatro semanas. Semanalmente nove peixes de cada grupo foram selecionados e
26 dissecados os órgãos para determinação da atividade da enzima glutathione-S-transferase
27 (GST), concentração de glutathione reduzida (GSH), capacidade antioxidante total contra
28 peroxirradicais (CAPR) e peroxidação lipídica (TBARS). Os resultados indicaram que a
29 atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi significativamente maior no intestino do
30 grupo tratado após duas semanas de suplementação ($p < 0.05$). No fígado e músculo a
31 atividade da GST não apresentou diferenças entre os grupos ($p > 0.05$). A concentração de
32 glutathione reduzida GSH foi significativamente maior ($p < 0.05$) no intestino do grupo
33 tratado após duas semanas de suplementação. O fígado apresentou picos de resposta na
34 concentração de GSH após duas e quatro semanas de suplementação com ácido lipóico
35 ($p < 0.05$). A concentração da glutathione (GSH) no músculo do grupo tratado foi
36 significativamente maior após três semanas ($p < 0.05$). Após quatro semanas a capacidade
37 antioxidante total contra peroxirradicais no músculo de animais suplementados foi
38 significativamente maior ($p < 0.05$). Os níveis de peroxidação lipídica não foram reduzidos
39 pela suplementação com ácido lipóico nos órgãos avaliados ($p > 0.05$). No entanto, o nível
40 de malondialdeído foi influenciado pelo tempo. O nível de peroxidação lipídica no
41 intestino de ambos grupos foram significativamente maiores na quarta semana ($p < 0.05$).
42 No fígado, o nível de peroxidação lipídica mostrou uma tendência à diminuição após três
43 semanas em ambos grupos ($p < 0.05$). Estes resultados sugerem que o ácido lipóico induz
44 respostas antioxidantes diferenciadas de maneira órgão específica em juvenis de *C.*
45 *carpio*. A resposta órgão específica pode ser explicada pelas diferenças metabólicas
46 particulares de cada órgão, que podem induzir um estado redox particular para cada um

47 deles. Em conclusão, a suplementação com ácido lipóico (1 g/kg) é uma dose efetiva e
48 segura para induzir respostas antioxidantes e melhorar o estado antioxidante em órgãos
49 de juvenis de carpa comum. Mínimo duas semanas de suplementação são requeridas para
50 influenciar respostas antioxidantes no intestino e fígado, e três semanas em músculo.

51 **Palavras chave:** antioxidante, capacidade antioxidante, glutathione reduzida, glutathione-
52 s-transferase, peroxidação lipídica.

53 **ABSTRACT**

54 Even though the alpha-lipoic acid (α -LA) effects were test in different aquatic animals,
55 information regarding the antioxidants responses throughout the time is scarce. In
56 addition, there are no reports of the alpha-lipoic acid influence on antioxidants responses
57 in intestine of fish. This study aimed to evaluate the influence of lipoic acid
58 supplementation (1 g/kg) on antioxidants responses throughout the time in intestine, liver
59 and muscle of juvenile commom carp *Cyprinus carpio*. Two experimental groups (treated
60 or control) were fed during four weeks with a diet supplemented with or without lipoic
61 acid respectively. Glutathione-S-transferase (GST) activity, glutathione (GSH) content,
62 antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) and lipid peroxidation (TBARS)
63 were evaluate in these organs. The results showed glutathione-S-transferase (GST)
64 activity was significantly higher ($p < 0.05$) in intestine after two weeks of supplementation
65 with alpha-lipoic acid. In contrast, liver and muscle glutathione-S-transferase activity was
66 not affected ($p > 0.05$). Glutathione (GSH) content was significantly higher ($p < 0.05$) in
67 intestine, liver and muscle of fish fed with dietary alpha-lipoic acid at two and three weeks
68 respectively. Total capacity antioxidant against peroxy radicals was significantly
69 increased ($p < 0.05$) in the muscle of animals fed with alpha-lipoic acid after the fourth
70 week. The extent of lipid peroxidation was not reduced by dietary lipoic acid in these
71 organs ($p > 0.05$). However, the malondialdehyde (MDA) level across the trial was affect
72 by the time. At the end of experiment the malondialdehyde content in intestine was
73 significantly different ($p < 0.05$) among times. Interestingly, liver malondialdehyde
74 displayed a downward trend after the third week in both treatments ($p < 0.05$) with respect
75 the first week. In accordance with these findings it can be concluded that supplementation
76 with alpha-lipoic acid (1 g/kg) is a safe way to inducing antioxidants responses and
77 improves the antioxidant status in different organs of common carp. Two week of
78 supplementation are required to induce antioxidants responses in intestine and liver and
79 three week in muscle.

80 **Keywords:** Antioxidant, antioxidant capacity, glutathione-S-transferase, lipid
81 peroxidation, reduced glutathione.

82 1 INTRODUÇÃO

83 Em sistemas biológicos, a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio e
84 nitrogênio (ERO e ERN) são processos essenciais que determinam o estado redox. Níveis
85 elevados ou baixos de ERO e ERN induzem efeitos deletérios ou benéficos incluindo
86 sinalização celular, modulação de vias de proliferação celular, apoptose e ativação de
87 fatores de transcrição gênica (Poljsak et al. 2013; Navarro-Yepes et al. 2014). Estes
88 metabólitos são produzidos constantemente pela redução do oxigênio em reações
89 bioquímicas na cadeia transportadora de elétrons e pela atividade de algumas enzimas em
90 condições fisiológicas ou patológicas. (Hermes-Lima 2004; Lesser 2012). ERO incluem
91 moléculas radicais como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxiperoxil (HO_2^{\bullet}), radical
92 hidroxila (HO^{\bullet}), radical peroxil (ROO^{\bullet}) e radical alcoxila (RO^{\bullet}), além de espécies não
93 radicais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), ozônio (O_3), e o
94 ácido hipocloroso (HOCl) (Halliwell & Gutteridge 2007; Srikanth et al. 2013).

95 A toxicidade e reatividade destas espécies em níveis elevados pode atingir
96 componentes celulares iniciando reações em cadeia que conduzem à progressão de
97 estresse oxidativo, com a consequente modificação de lipídios, proteínas e ácidos
98 nucléicos (Hamre et al. 2004; Hermes-Lima 2004; Lesser 2012). Classicamente, o
99 estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre agentes oxidantes e
100 antioxidantes em favor dos oxidantes, mais especificamente, quando a geração excessiva
101 de ERO e ERN ultrapassa a capacidade endógena de prevenir ou neutralizar dano celular
102 ocasionado por estas moléculas (Sies 1991; Valavanidis et al. 2006; Navarro-Yepes et al.
103 2014).

104 Existem amplas revisões científicas afirmando que os sistemas de defesa antioxidante
105 são altamente conservados entre grupos filogenéticos ao longo da evolução. Organismos
106 aquáticos, assim como outros organismos aeróbicos, estão dotados de um conjunto de
107 antioxidantes enzimáticos que incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT),
108 glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) e
109 não enzimáticos como glutathione reduzida (GSH), ascorbato, α -tocoferol, entre outros
110 (Hermes-Lima 2004; Di Giulio & Meyer 2008; Srikanth et al. 2013).

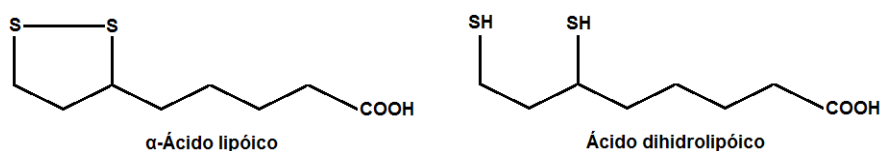
111 Embora organismos aeróbios, incluindo peixes estejam dotados dos mecanismos
112 antioxidantes endógenos acima citados, alguns cenários potencialmente oxidantes
113 perturbam o balanço redox pela produção descontrolada de ERO. Desafios oxidativos
114 intrínsecos inerentes ao metabolismo aeróbio e extrínsecos como condições ambientais
115 desfavoráveis (Lushchak 2011), contaminação antropogênica (Livingstone 2003; Cao et
116 al. 2010), nutrição (Bayir et al. 2011; Chatzifotis et al. 2011; Antonopoulou et al. 2013)
117 entre outras, promovem geração descontrolada de ERO e/ou inibição de defensas
118 antioxidantes endógenas. Desta forma, órgãos e tecidos são susceptíveis de sofrer
119 oxidação, com a consequente aparição de estresse oxidativo. Nesse sentido, modificações
120 oxidativas de lipídios e proteínas em tecido muscular são bastante conhecidas por afetar
121 negativamente propriedades sensoriais e nutricionais de tecidos consumíveis (Aouadi et
122 al. 2014).

123 Os peixes são fontes de lipídios (FAO/WHO 2011), principalmente ácidos graxos os
124 quais dependendo do grau de insaturação (PUFAS - HUFAS) são altamente susceptíveis
125 de sofrer ataque oxidativo por agentes oxidantes (Hamre et al. 2004). A peroxidação
126 lipídica ocorre quando ácidos graxos insaturados são atacados por espécies reativas
127 gerando outros radicais e subprodutos de reação como malondialdeído (MDA) e 4-
128 hidroxinonenal (4-HNE), capazes de atacar e modificar outras biomoléculas como
129 proteínas, até induzir inativação ou formação de agregados (Höhn et al. 2013). A oxidação
130 de proteínas se dá por ataque de ERO diretamente em sua estrutura, em resíduos
131 específicos de aminoácidos, através da formação de proteínas carboniladas, ou por
132 subprodutos secundários modificados oxidativamente (açúcares, aldeídos e lipídios),
133 resultando em perda da funcionalidade bioquímica, formação de agregados, com
134 consequências deletérias para a célula (Höhn et al. 2013).

135 Contudo, evidências experimentais indicam que a administração de antioxidantes
136 exógenos em animais, incluindo organismos aquáticos, podem modular o estado
137 antioxidante com impactos positivos na estabilidade oxidativa de órgãos e tecidos. Assim,
138 o uso de micronutrientes e moléculas com propriedades antioxidantes, como selênio
139 (Betancor et al. 2012), α -tocoferol (Gao & Koshio 2014), ascorbato (Luo et al. 2014),
140 carotenoides (Sahim et al. 2014), compostos fenólicos (Hernández et al. 2014), ácido

141 lipóico (Kütter et al. 2012; Kütter et al. 2013), representam uma estratégia recomendável
142 para frear, prevenir ou minimizar índices de oxidação. Do mesmo modo, a suplementação
143 com antioxidantes como ácido lipóico tem provado aumentar a capacidade antioxidante,
144 e por conseguinte melhorar o estado antioxidante em diferentes órgãos e tecidos de
145 animais aquáticos, o que em teoria poderia incrementar o valor nutricional e vida útil de
146 itens consumíveis provenientes da aquicultura.

147 O ácido lipóico é um composto organossulfurado de origem natural sintetizado
148 enzimaticamente em baixas quantidades na mitocôndria a partir do ácido octanóico
149 (Szeląg et al. 2012). Este composto tem recebido bastante atenção em diferentes áreas
150 pela ampla variedade de propriedades induzidas *in vitro* e *in vivo*. Dentre a diversidade
151 de efeitos que exhibe destacam-se atividade antioxidante direta ou indireta, quelação de
152 metais, sinalização celular, antidiabético, entre outras (Shay et al. 2009; Kütter et al. 2012;
153 Szeląg et al. 2012). Pode ser absorvido das dietas e ser metabolizado a sua forma reduzida
154 o ácido dihidrolipoico (ADHL), acumulando-se em vários tecidos (Packer et al. 1995).
155 Adicionalmente, o ácido lipóico na forma reduzida e/ou oxidada exhibe propriedades
156 antioxidantes e atividade anfipática, diferenciando-se de outros antioxidantes (Navarri-
157 Izzo et al. 2002).



158

159

Estruturas químicas do ácido lipóico e ácido dihidrolipoico

160 Estudos em organismos aquáticos indicam que a administração deste composto
161 auxilia na detoxificação de toxinas e confere proteção de órgãos contra estresse oxidativo
162 (Monserrat et al. 2008; Amado et al. 2011), reduz o nível de peroxidação lipídica (MDA)
163 no músculo, modula a atividade da enzima GST no cérebro, afeta parâmetros zootécnicos
164 e a composição de carcaça em juvenis de pampo *Trachinotus marginatus* em forma dose
165 dependente (Kütter et al. 2012). Neste último trabalho os autores detectaram uma redução
166 considerável das doses nominais com relação as doses reais presentes na ração, e

167 sugeriram que o antioxidante deve ser suplementado em doses entre 316,4 e 524 mg de
168 AL por kg de ração. Experimentos com pacu *Piaractus mesopotamicus* usando uma dose
169 de 1 g/kg de ração provaram que o ácido lipóico exerce influência no metabolismo de
170 lipídios e aminoácidos respectivamente (Terjesen et al. 2004; Trattner et al. 2007). No
171 estudo de Li et al. (2014) a suplementação com 300 mg de AL por Kg de ração reduziu o
172 dano oxidativo e mudanças imunes induzidas por aflatoxicose em frangos. Chen et al.
173 (2011) em um ensaio dose-resposta, concluíram que a suplementação com ácido lipóico
174 incrementou significativamente o teor de α -tocoferol no músculo e que 300 mg/kg
175 incrementaram a capacidade antioxidante e diminuíram o dano oxidativo em frangos.

176 Em virtude dos efeitos antioxidantes e/ou pro-oxidantes do ácido lipóico associados
177 às doses em organismos aquáticos (Kütter et al. 2014) e outros modelos animais, vários
178 estudos sugerem que doses elevadas poderiam desatar efeitos toxicológicos em
179 organismos aquáticos. Por tanto, o uso de doses intermediárias poderia originar efeitos
180 benéficos como os reportados por outros estudos citados anteriormente.

181 Recentemente foi comprovado que substâncias com propriedades antioxidantes além
182 de contribuir com o balanço redox melhoram a estrutura e funções intestinais afetando
183 positivamente o crescimento. Jiang et al. (2010) revelaram que mio-inositol suplementado
184 na ração melhora o estado antioxidante (GST) do intestino concomitantemente com a
185 função intestinal em carpa comum. Chen et al. (2009) reportaram que glutamina dietética
186 protege enterócitos de carpa comum contra dano oxidativo, além de reverter a diminuição
187 da atividade enzimática (GST) induzida por H₂O₂. Igualmente, Hu et al. (2011)
188 observaram que suplementação com piridoxina promove aumento na atividade de
189 enzimas dependentes de GSH (GST) no intestino da mesma espécie. Deng et al. (2014)
190 concluíram que a suplementação com leucina afeta positivamente o crescimento em carpa
191 herbívora, atribuído possivelmente pela manutenção da integridade estrutural do intestino
192 através do aumento capacidade antioxidante enzimática (Cu,Zn-SOD e GPx) e não
193 enzimática (GSH). Assim, resulta lógico pensar que o AL poderia melhorar o estado
194 antioxidante no intestino de carpa comum o qual, até agora, não foi estudado.

195 Fisiologicamente, o fígado em peixes é um órgão com um metabolismo
196 multifuncional, envolvido no metabolismo intermediário, processos de digestão,
197 detoxificação, balanço energético e de nutrientes, regulação de níveis de circulação de
198 aminoácidos, lipídios, glicose (Rust 2005). A elevada geração de radicais livres
199 correlaciona com disfunção hepática e em conseqüentemente muitas funções fisiológicas
200 podem ser afetadas. Em mamíferos, o AL possui um efeito hepatoprotetor (Shay et al.
201 2009). Um efeito similar foi observado em carpas expostas à cianotoxina microcistina
202 previamente suplementadas com AL (Amado et al. 2011) destacando a importância do
203 AL como agente quimioprotetor. Por outra parte, os efeitos do AL no músculo poderiam
204 induzir benefícios antioxidantes num órgão que apresenta grandes variações no
205 metabolismo aeróbico quando passa do estado de repouso a contração intensa.
206 Igualmente, processos de peroxidação lipídica no músculo podem afetar as características
207 sensoriais deste, com conseqüências negativas em termos da qualidade produto final,
208 desta forma, a suplementação com AL também ajudaria a preservar as propriedades deste
209 tecido.

210 No entanto, pode-se considerar que faltam estudos abordando a influência da
211 suplementação com ácido lipóico ao longo do tempo nas respostas antioxidantes que
212 permitam estimar o tempo ideal de suplementação em peixes. Adicionalmente, dados
213 reportando tentativas de determinação quantitativa de ácido lipóico com resultados
214 positivos em tecido muscular de organismos aquáticos são inexistentes. À luz das
215 evidências, e somando os paradigmas envolvidos em estudos clássicos de alimentação e
216 nutrição animal, é de grande relevância em aquicultura otimizar doses e tempos de
217 administração adequados com o objetivo de aprimorar processos de produção animal.

218 De acordo com a FAO (2014), as carpas são espécies de baixo valor, e fonte
219 alternativa de ácidos graxos essenciais de cadeia longa para o consumo humano. *Cyprinus*
220 *carpio* destaca-se dentro da aquicultura como a terceira espécie mais cultivada no mundo.
221 Em países asiáticos, onde são principalmente cultivadas, o consumo de carpas representa
222 um item importante na segurança alimentar e nutricional com maior contribuição que
223 outras espécies de alto valor. O Brasil é o décimo segundo produtor de peixes comestíveis
224 aportando 1,1 % da produção mundial. Do mesmo modo, um 86,4 % da produção total

225 reportada pelo Brasil no 2012 representa aquicultura continental. Aquicultura continental
226 realiza o maior aporte de alimentos proteicos em países em desenvolvimento, por tanto,
227 acredita-se que repercutira na segurança alimentar e nutricional nos próximos decênios.

228 Neste trabalho, foram utilizados juvenis de carpa comum, *Cyprinus carpio* como
229 modelo animal para estudar a resposta antioxidante e de dano oxidativo destes organismos
230 suplementados com ácido lipóico ao longo do tempo. Foi também considerado importante
231 determinar se a suplementação durante quatro semanas induzia a incorporação do
232 antioxidante no tecido muscular destes organismos.

233 **2 OBJETIVOS**

234 **2.1 OBJETIVO GERAL**

235 - Avaliar a influência da suplementação com α -ácido lipóico ao longo do tempo nas
236 respostas antioxidantes e indicadores de estresse oxidativo no músculo, intestino e fígado
237 da carpa comum *Cyprinus carpio*.

238 **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

239 - Determinar o tempo de suplementação adequado para promover respostas antioxidantes
240 (concentração de glutathiona reduzida, GSH; atividade da enzima glutathiona-S-transferase,
241 GST, capacidade antioxidante total; e dano oxidativo lipídico, TBARS).

242 - Caracterizar a incorporação do antioxidante α -ácido lipóico no músculo de juvenis de
243 carpa comum *Cyprinus carpio* suplementados durante 4 semanas.

244 3 MATERIAL E MÉTODOS

245 3.1 MODELO EXPERIMENTAL

246 Juvenis de carpa comum *Cyprinus carpio*, foram adquiridos através de um vendedor
247 local e transportados em bolsas plásticas até instalações do Laboratório de Piscicultura
248 Estuarina e Marinha (LAPEM) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os
249 animais foram estocados em 2 tanques de 1.000 L conectados à um sistema de
250 recirculação, durante 2 meses como período de aclimação dos animais às condições de
251 laboratório. Água doce previamente tratada (declorada e areada) com as seguintes
252 propriedades físico-químicas foi usada: oxigênio dissolvido ($6,74 \pm 0,12$ mg/l),
253 temperatura ($24,38 \pm 0,21$ °C), pH ($7,12 \pm 0,05$) até o início do período experimental. O
254 fotoperíodo foi ajustado para 12 h de luz e 12 h de escuro. Periodicamente (3 vezes por
255 semana), amostras da água foram coletadas para a determinação dos níveis de alcalinidade
256 ($29,26 \pm 1,15$ mg/l de carbonato de cálcio), amônia total ($0,23 \pm 0,03$ mg/l), nitrito ($0,73$
257 $\pm 0,12$ mg/l), garantindo assim condições adequadas para o crescimento. Durante este
258 período os peixes foram alimentados *ad libitum* ao menos 3 vezes por dia usando uma
259 ração comercial Guabi (38% de proteína bruta e 9% de lipídios).

260 3.2 PREPARO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS

261 Uma ração comercial (descrita anteriormente) foi utilizada no preparo de duas rações
262 (tratamento e controle). A ração tratamento foi suplementada com α -ácido lipóico
263 sintético ($\geq 99\%$ pureza, Sigma-Aldrich) para conter 1 g/kg de ração. Previamente a ração
264 comercial foi finamente triturada usando um moinho de rotor (Marconi MA-090), logo
265 depois o AL foi adicionado e homogeneizados em batedeira (BT 120) até garantir uma
266 mistura uniforme. Esta ração foi usada no grupo tratado. Igualmente, a ração controle foi
267 processada seguindo o mesmo procedimento, porém sem adição de α -ácido lipóico para
268 ser usada durante o período experimental. Em ambos casos, água destilada foi usada
269 guardando uma relação (10:1 m/v). Subsequentemente, os homogeneizados foram
270 processados mecanicamente usando um moinho de carne até obter *pellets* com diâmetro

271 médio de 3,5 mm e depois seco à 50 °C em estufa de circulação de ar forçado durante 24
272 h. As rações foram armazenadas a -20°C até serem usadas. Amostras da ração suplementada
273 e não (10 g) foram coletadas e mantidas ao abrigo da luz para posterior determinação de
274 umidade, proteína (N x 6,25), lipídios e cinzas de acordo com os métodos propostos pela
275 AOAC (2000). A concentração de α -ácido lipóico na ração foi determinada de acordo
276 com Kütter et al. (2012) como descrito no item 3.5.5.

277 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

278 Setenta e dois (72) juvenis de carpa comum com massa média (46,15±0,78 g) foram
279 aleatoriamente estocados em seis tanques de 300 L e divididos em dois grupos (tratado e
280 controle) e assignados a sistemas independentes de recirculação de água, aprovionados
281 com filtro biológico para remover impurezas e reduzir as concentrações de produtos
282 nitrogenados. Os peixes foram mantidos nestas condições durante uma semana antes de
283 iniciar o experimento. Durante o período experimental, animais em cada grupo foram
284 alimentados com sua respectiva ração três vezes ao dia (09:00 h – 13:00 h – 17:00 h)
285 durante quatro semanas. A taxa de alimentação foi ajustada à 4% da biomassa por tanque.
286 Restos de ração e fezes no fundo dos tanques foram removidos diariamente por sifonagem
287 após o oferecimento do alimento.

288 Semanalmente, três (3) peixes de cada tanque (9 por grupo) foram retirados
289 aleatoriamente, anestesiados por imersão em benzocaina (100 ppm) 24 h após a última
290 alimentação, medidos e pesados, mortos por ruptura cervical, e dissecados os órgãos
291 intestino, fígado e músculo em cada período amostral (1^a, 2^a, 3^a e 4^a semana). Os órgãos
292 foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para
293 posteriores análises bioquímicas. Durante o período experimental foram monitorados e
294 registrados dados de peso e comprimento, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido usando
295 um oxímetro digital YSI 550A, pH usando um eléctrodo Mettler Toledo FEP20 –
296 FiveEasy Plus™. A determinação de amônia total seguiu a metodologia proposta pela
297 UNESCO (1983), nitrito (Benderschneider & Robinson 1952) e alcalinidade (APHA
298 1985).

299 3.4 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

300 As amostras foram homogeneizadas (1:5 p/v) em solução tampão Tris-HCl (100 mM,
301 pH 7.75) com EDTA (2 mM) e Mg^{2+} (5 mM) usando um homogeneizador (OMNI
302 International Tissue Master 125), de acordo com o protocolo de Kütter et al. (2012).
303 Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C em
304 centrífuga (SIGMA 3K30) e os sobrenadantes utilizados para dosagens bioquímicas
305 (GST, GSH, capacidade antioxidante total, TBARS). O conteúdo de proteínas totais foi
306 determinado utilizando um *kit* comercial (Dole's reagentes) baseado no ensaio de Biureto
307 ($\lambda=550$ nm), em triplicata usando uma leitora de microplacas (BioTek LX 800). Os
308 conteúdos de proteínas totais foram expressos como mg proteína/ml de tecido úmido.

309 3.5 ANALISES BIOQUÍMICAS E DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

310

311 **3.5.1 Determinação da atividade da GST**

312 A atividade da enzima glutathione -S- transferase (GST) foi avaliada monitorando o
313 conjugado formado por 1 mM de glutathione reduzida (GSH) e 1 mM de 1-cloro-2,4-
314 dinitrobenzeno (CDNB) na presença de 15 μ l de amostra em meio de reação (0.1 M em
315 pH 7.0). O cromóforo gerado foi medido em leitora de microplacas (BioTek LX 800) a
316 340 nm, como descrito por Habig & Jakoby (1981). Os valores da atividade da enzima
317 foram expressos em nanomoles do complexo CDNB-GSH formado por minuto
318 relativizado por miligrama de proteína da amostra.

319 **3.5.2 Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH)**

320 A técnica utilizada para determinação da concentração de GSH seguiu o protocolo
321 descrito por White et al. (2003). Esta técnica está fundamentada na reação do composto
322 2,3-naftalenodicarboxialdeído (NDA) com GSH para formar complexos fluorescentes.
323 Para isto, 25 μ l de amostra e 25 μ l das soluções de GSH para construir a reta padrão,

324 foram adicionadas em placa de reação, junto com 25 µl de solução de ácido
325 sulfossalicílico e incubadas a seguir por 20 minutos. Após desnaturação, precipitação das
326 proteínas, e centrifugação, alíquotas de 20 µl do sobrenadante de cada poça da placa de
327 reação foram transferidos a uma microplaca branca de 96 poças para detecção de
328 fluorescência. Em seguida 180 µl de solução de derivatização NDA [50 mM Tris, pH 10,
329 500 mM NaOH, e 10 mM NDA em dimetil sulfóxido (DMSO), numa relação v/v/v de
330 1,4/0,2/0,2] foram adicionados a cada poça. Após 30 min de incubação a temperatura
331 ambiente e ao abrigo da luz, a intensidade da fluorescência do complexo NDA-GSH
332 gerado foi medida por fluorometria (Víctor 2, Perkin Elmer) a 485 nm excitação e 530
333 nm de emissão. Os valores ficam expressos em nanomoles de GSH por mg de proteína.

334 **3.5.3 Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (CAPR)**

335 Para fins práticos, a determinação da CAPR segue a metodologia descrita por Amado
336 et al. (2009) e alia o novo enfoque definido para calcular a CAPR proposto por Monserrat
337 et al. (2014). O método baseia-se na detecção fluorométrica de fluorocromo DCF gerado
338 pela deacetilação do diacetato de 2',7' diclorofluoresceína (H₂DCFDA, Molecular Probes)
339 por esterases até o composto H₂DCF, que na presença de ERO é oxidado a DCF.
340 Brevemente, 10 µl dos tecidos homogeneizados (proteína diluída e fixada em 2 mg/ml)
341 foram dispostos em microplacas de 96 poças brancas (seis poças por amostra). Logo
342 depois, 127,5 µl de tampão de reação pH 7,20 (HEPES 30 mM; KCl 200 mM; MgCl
343 1mM) foram adicionados. Em seguida 7,5 µl de água ultrapura ou o gerador de radicais
344 peroxil ABAP (2,2'-azobis (2 metilpropionamida) dihidrocloro, 4 mM) foram
345 pipetados em três das seis poças por amostra respectivamente. Finalmente, 10 µl da
346 solução H₂DCFDA foram pipetados em todas as poças para iniciar leituras fluorométricas
347 a cada 5 minutos durante 30 minutos a 37°C preestabelecidos usando Víctor 2, Perkin
348 Elmer: excitação 485; emissão 530 nm. Desta forma os dados de capacidade antioxidante
349 ficam expressos como a diferença de área relativa das unidades de fluorescência por
350 minuto nas amostras com e sem ABAP. Na interpretação dos dados, uma área relativa
351 pequena representa uma elevada capacidade antioxidante toda vez que à adição de um
352 gerador de radicais peroxil (ABAP) não teria conseguido aumentar a fluorescência em

353 forma expressiva. Pelo contrário, uma área relativa elevada significa uma baixa
354 capacidade antioxidante.

355 **3.5.4 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS)**

356 Para determinação do dano oxidativo lipídico, foi utilizado o ensaio TBARS, de
357 acordo com Oakes & Van der Kraak (2003). Este método envolve a reação de
358 malondialdeído (MDA), um subproduto de degradação de lipídios peroxidados, com o
359 ácido tiobarbitúrico (TBA) sob condições de alta temperatura (95°C) e acidez, gerando
360 um cromógeno que é quantificado por fluorometria. Alíquotas de tecidos previamente
361 homogeneizados foram incubadas em banho de água a 95 °C por 30 min com
362 hidroxitolueno butilado 67 µM (BHT), dodecil sulfato de sódio 8.1% (SDS), ácido acético
363 20% e ácido tiobarbitúrico 0,8% (TBA). Após esfriamento a temperatura ambiente, 100
364 µL de água ultrapura (Milli Q) e 500 µL de n-butanol foram adicionados ao médio.
365 Seguidamente, as soluções foram minuciosamente homogeneizadas por meio de vórtex,
366 e centrifugadas a seguir a 3.000 x g por 10 minutos a 15°C. Posteriormente, 150 µL da
367 fase orgânica foram removidos e dispostos em microplacas de 96 poças para leitura da
368 fluorescência usando Víctor 2, Perkin Elmer (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm). Os
369 resultados ficaram expressos em nanomoles de equivalentes de TMP por mg de tecido,
370 onde o TMP é o tetrametoxipropano (ACROS Organics), utilizado para construir a reta
371 padrão.

372 **3.5.5 Determinação da composição centesimal da ração**

373 As análises da composição proximal das rações seguiram os métodos propostos pela
374 AOAC (2000). O percentual de umidade foi determinado pela diferença nos pesos das
375 amostras úmidas (5 g) e pesos de amostras secas em estufa a 105 °C durante 6 horas.
376 Cinzas foram determinadas por combustão das amostras a 550°C durante 5 horas. O
377 conteúdo de proteína foi determinado seguindo o método Kjeldahl, onde a proteína é
378 medida como nitrogênio total multiplicado pelo fator específico (Nx6,25). Brevemente,

379 0,2 g de ração e 0,7 g de mistura catalítica dispostos juntamente num papel de filtro,
380 seguindo adição de 3 ml de H₂O₂ e 7 ml de H₂SO₄ foram submetidos a digestão ácida
381 usando um bloco digestor de proteínas. Posteriormente, as amostras digeridas são
382 expostas a destilação num destilador de nitrogênio onde o N orgânico total é convertido
383 em amônia e medido por titulação com HCl 0,1N. O teor de lipídios foi determinado pela
384 extração com éter de petróleo utilizando um extrator Soxhlet. Em todos os casos três
385 amostras por tratamento foram utilizadas e os valores expressos como média ± erro
386 padrão.

387 **3.5.6 Determinação da dose real de α -ácido lipóico na ração e no músculo**

388 A determinação quantitativa de α -ácido lipóico na ração e no músculo facilita a
389 compreensão e suporta a resposta das variáveis avaliadas neste experimento. Para este
390 fim 0,25 g de cada ração foram dissolvidos em 2 ml de metanol (grau HPLC) e extraídos
391 durante a noite a temperatura ambiente. Cinco amostras por tratamento foram filtradas
392 usando filtros descartáveis 0,45 μ m, e os extratos utilizados para detecção de ácido lipóico
393 por meio de técnicas analíticas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de
394 massas (HPLC-MS). A extração e determinação de ácido lipóico em músculo seguiu a
395 método descrito por Yasin et al. (2012). Brevemente, 500 mg de tecido foram
396 homogeneizados em 2 ml de ácido fosfórico de alta pureza. Em seguida 3 ml de hexano
397 e 0,25 ml de isopropanol alta pureza foram adicionados ao meio e logo depois as amostras
398 são submetidas a agitação durante 30 min usando um shaker LabRoller™. Após
399 centrifugação durante 20 minutos, 4000 x g, 4°C os sobrenadantes foram cuidadosamente
400 retirados e filtrados (0,45 μ m) e os extratos utilizados para determinação analítica através
401 de HPLC-MS.

402 Foram utilizados um modulo separador de água (Waters 2695, Milford, USA)
403 equipado com um amostrador automático, um desgasificador de membrana e uma bomba
404 quaternária. A espectrometria de massa foi realizada utilizando um Micromass Quattro
405 Micro API (Waters, Milford, USA). A separação cromatográfica foi obtida utilizando
406 uma fase móvel consistindo de acetonitrilo e ácido acético 0,1% (55:45, v/v), com um

407 fluxo de 0,2 ml/min. A coluna analítica foi mantida em 25°C. O tempo de reação foi 4
408 min. O volume de amostra injetado foi 10 µl. O efluente da coluna foi ligado a uma
409 interface de ionização por electropulverização MS. As condições de interface foram os
410 seguintes: tensão capilar, 3,5 kV; nebulizador 550 l/h e fluxo de dessolvatação 50 l/h, e a
411 temperatura de dessolvatação 250°C. Os teores de AL nas rações e amostras biológicas
412 foram quantificados utilizando curvas analíticas ($r>0,99$) com variações entre 0,001 e 1,0
413 mg/l.

414 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

415 Os dados das variáveis foram submetidos à análise de variância de duas vias
416 (tratamento e tempo de exposição). Os valores foram expressos como média \pm erro
417 padrão. Os pressupostos de homocedasticidade (Levene's Test) e normalidade foram
418 previamente confirmados e aplicadas as devidas transformações matemáticas se pelo
419 menos um pressuposto não era verificado. As comparações de médias foram realizadas
420 usando o teste Newman-Keuls. Em todos os casos foram consideradas diferenças
421 significativas entre tratamentos quando $p<0,05$ e altamente significativas quando $p<0,01$.

422 4 RESULTADOS

423 Durante o período experimental (quatro semanas), não foram registradas
424 mortalidades. Os valores médios registrados para temperatura ($22,85 \pm 0,06$ °C), oxigênio
425 dissolvido ($8,22 \pm 0,02$ mg/L), pH ($7,27 \pm 0,02$), alcalinidade ($28,48 \pm 0,63$ mg/L),
426 amônia total ($0,05 \pm 0,00$ mg/L), nitrito ($0,03 \pm 0,00$ mg/L NO₂) estiveram dentro da zona
427 de tolerância desta espécie (FAO 2004-2014).

428 A confirmação visual da aceitação das rações foi verificada pelo comportamento
429 voraz dos peixes durante o oferecimento das alimentações em ambos grupos ao longo do
430 experimento. Parâmetros zootécnicos referentes ao peso médio inicial, peso médio final,
431 ganho de peso, taxa de crescimento específico estão apresentados na **Tabela 1**. Não foram
432 detectadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$) em nenhuma das
433 variáveis zootécnicas analisadas.

434 As análises da composição centesimal das rações revelaram valores para proteína
435 ($38,34 \% \pm 0,12$ EP) e lipídios ($9,39 \% \pm 0,25$ EP) similares aos especificados pelo
436 fabricante, indicando que tanto o antioxidante quanto a manipulação não induziram
437 alterações do perfil das principais macromoléculas.

438 O teor de α -ácido lipóico detectado na ração suplementada com o antioxidante foi de
439 $439,84 \pm 6,71$ mg/kg, sendo considerada como dose real. É interessante notar que houve
440 uma perda aproximada de 56% da dose nominal suplementada (1 g/kg). Aparentemente,
441 esta diminuição pode ter sido o resultado da reação do AL com a fração lipídica ou um
442 reflexo da técnica de extração usada para este fim. Entretanto, os valores determinados
443 na ração controle foram menores do que o limite de detecção utilizado que foi de 0,001
444 mg/L (3 injeções no LC-MS). Resultados similares foram reportados por Kütter et al.
445 (2012) usando a mesma técnica de extração. Por outro lado, não foi possível detectar a
446 presença de ácido lipóico nos músculos dos organismos suplementados com este
447 antioxidante já que os valores se apresentaram abaixo do limite de detecção (dados não
448 apresentados). É importante destacar que no grupo tratado com AL, os músculos
449 responderam positivamente após três e quatro semanas de suplementação

450 Os tecidos de carpa comum avaliados neste experimento responderam diferentemente
451 frente à suplementação com α -ácido lipóico e tempos de administração. Os resultados da
452 atividade da enzima GST no intestino, fígado e músculo são apresentados na **Fig. 1**.

453 No intestino, a atividade da enzima GST foi influenciada pelo tratamento e pelo
454 tempo, sendo significativamente maior ($p<0,05$) em duas semanas no grupo tratado
455 quando comparado ao respectivo controle e a seu homólogo em quatro semanas **Fig. 1a**.
456 Em fígados e músculos a resposta da GST não foi significativamente diferente dos
457 respectivos controles ($p>0,05$) como pode ser observado nas **Fig. 1b–1c**, respectivamente.

458 Como se observa na **Fig. 2a**, a concentração de GSH no intestino foi
459 significativamente maior ($p<0,05$) no grupo tratado após duas semanas (verificado por
460 contrastes ortogonais). Entretanto, no fígado evidenciou-se um aumento significativo
461 ($p<0,05$) na concentração de GSH no grupo tratado durante duas e quatro semanas com
462 relação ao controle **Fig. 2b**. No músculo, um incremento significativo ($p<0,05$) nos níveis
463 de GSH do grupo tratado foi observado em três semanas quando comparado ao controle
464 **Fig. 2c**.

465 Os resultados da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil em amostras de
466 intestino, fígado e músculo são apresentados na **Fig. 3**. Uma evidente diminuição da
467 capacidade antioxidante total foi observada no intestino de ambos grupos ao final do
468 experimento, indicada pelo aumento da área relativa ($p<0,05$) na quarta semana. Durante
469 as primeiras três semanas de suplementação não foram detectadas diferenças entre
470 amostras de intestino de ambos grupos ($p>0,05$) **Fig. 3a**.

471 A capacidade antioxidante total do fígado não teve nenhuma variação, já que não
472 foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre tratamentos e tempos (**Fig. 3b**).
473 O músculo, no entanto, mostrou maior competência antioxidante contra peroxi radicais
474 em quatro semanas, evidenciado pela menor área relativa com relação ao respectivo
475 controle ($p<0,05$) **Fig. 3c**.

476 Os níveis de peroxidação lipídica no intestino apresentaram-se em função do tempo,
477 porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$). O grau
478 de peroxidação lipídica no intestino de ambos grupos foram significativamente maiores
479 ($p<0,05$) na quarta semana quando comparados aos níveis obtidos durante as três
480 primeiras semanas de experimentação **Fig. 4a**.

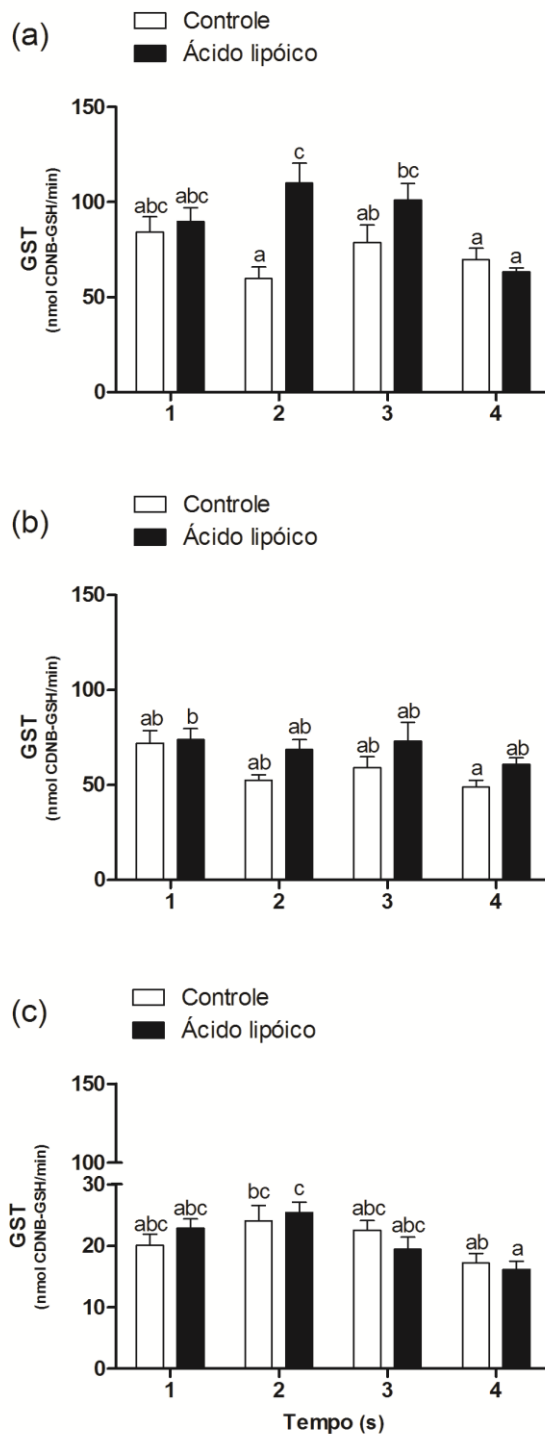
481 No fígado, após três semanas de experimentação, foram observados os menores níveis
482 de dano lipídico quando comparados aos valores observados na primeira semana, no
483 entanto nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos ($p>0,05$) **Fig. 4b**.

484 No músculo, um padrão de resposta similar ao fígado foi observado, sendo a terceira
485 semana o tempo no qual foram observados os menores níveis de lipoperoxidação em
486 ambos grupos ($p<0,05$). No entanto os teores de peroxidação no músculo voltaram a
487 aumentar na quarta semana **Fig. 4c**.

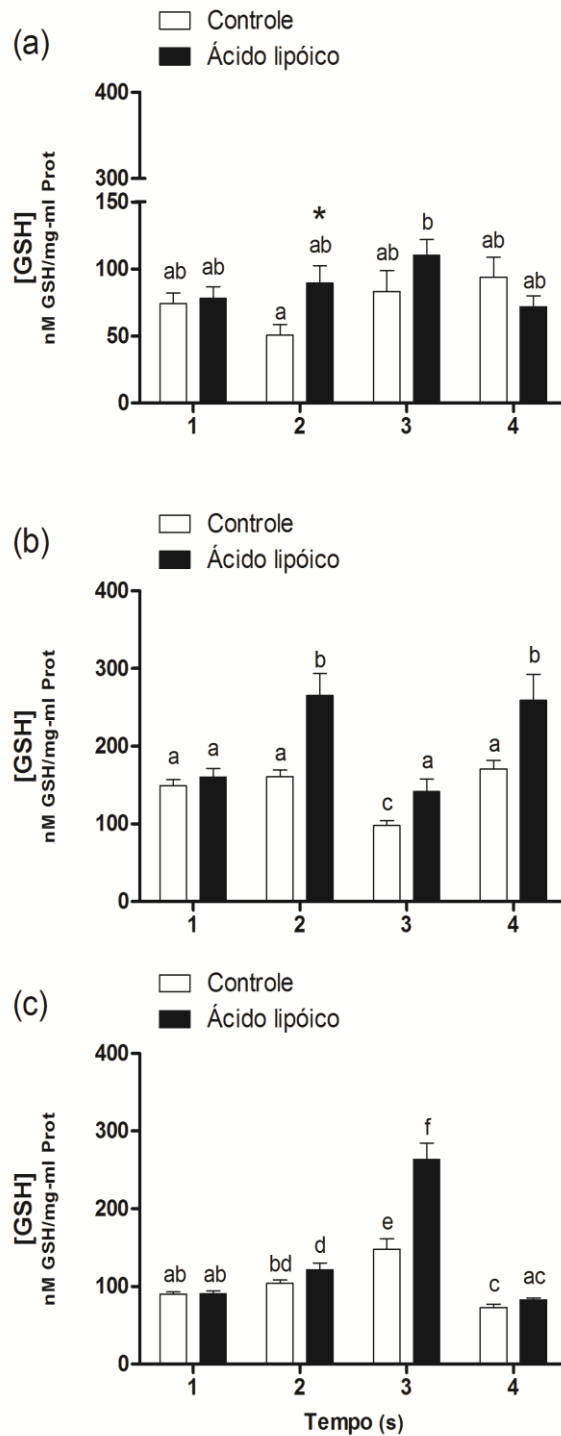
488 **Tabela 1.** Parâmetros zootécnicos em juvenis de carpa comum alimentados com rações
489 suplementadas ou não com α -ácido lipóico.

Tratamentos	Pi (g)	Pf (g)	Gp (%)	TCE (%d)
Ácido Lipóico	46,75 \pm 0,99	68,65 \pm 3,47	48,15 \pm 5,80	1,40 \pm 0,14
Controle	45,56 \pm 1,20	69,79 \pm 4,90	53,67 \pm 8,50	1,52 \pm 0,20

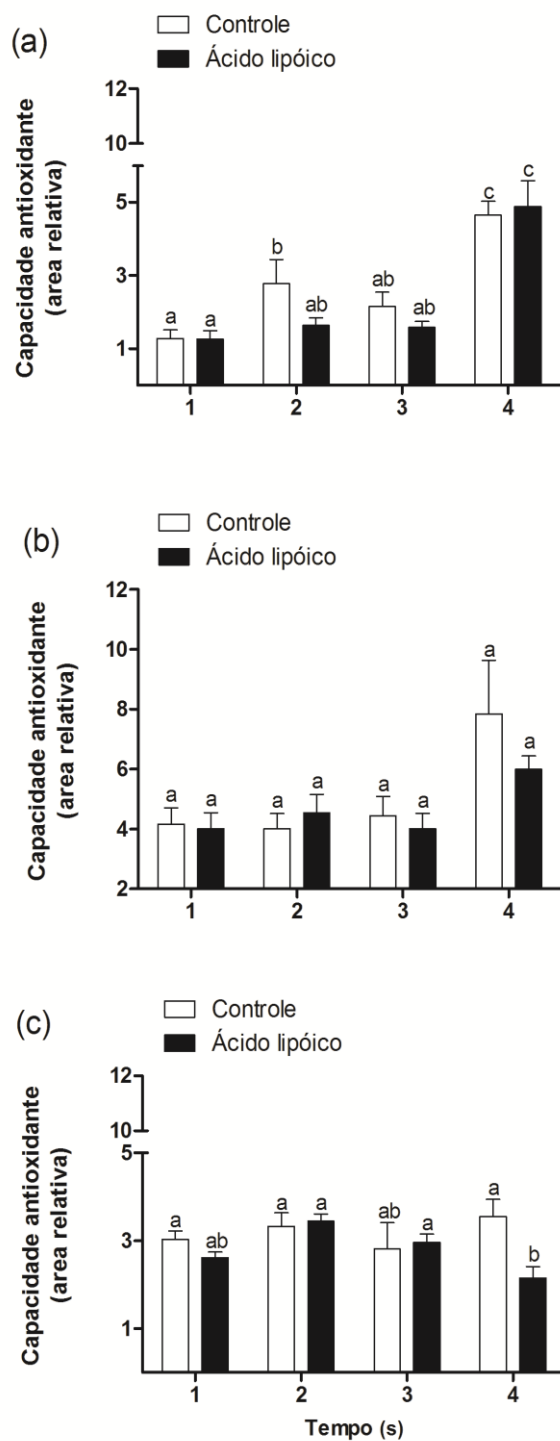
490 *Dados apresentados como média \pm erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$). Pi-*
491 *peso inicial, Pf- peso final, Gp- ganho de peso, TCE- taxa de crescimento específico.*



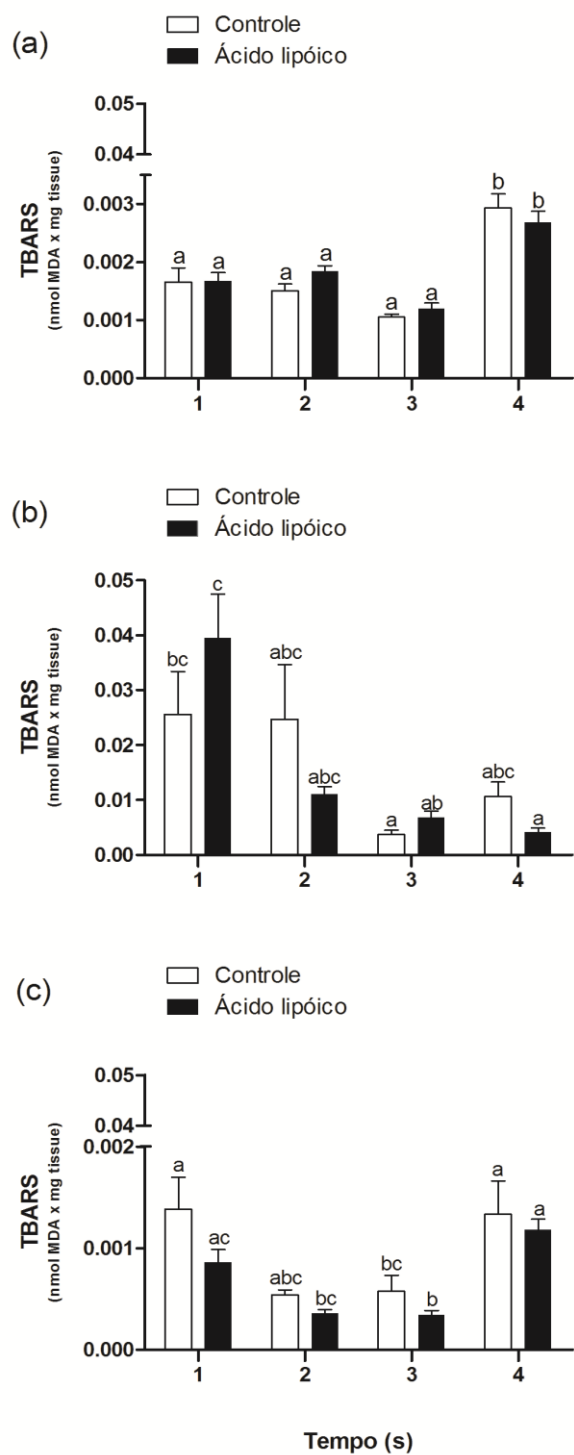
492 **Fig. 1.** Atividade da enzima glutationa-S-transferase GST (nanomoles de conjugado CDNB-GSH/min) em
 493 *C. carpio* alimentadas com rações suplementadas ou não com α -ácido lipóico durante quatro semanas. (a)
 494 intestino, (b) fígado, (c) músculo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os
 495 tratamentos.



496 **Fig. 2.** Concentração de glutathiona reduzida GSH (nM GSH/mg-ml prot) em *C. carpio* alimentadas com
 497 rações suplementadas ou não com α -ácido lipóico durante quatro semanas. (a) intestino, (b) fígado, (c)
 498 músculo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos. Asterisco indica
 499 diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle verificado por contrastes ortogonais.



500 **Fig. 3.** Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil em *C. carpio* alimentadas com rações
 501 suplementadas ou não com α -ácido lipóico durante quatro semanas. (a) intestino, (b) fígado, (c) músculo.
 502 Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos.



503 **Fig. 4.** Peroxidação lipídica em (a) intestino, (b) fígado, (c) músculo de *C. carpio* alimentadas com rações
 504 suplementadas ou não com α -ácido lipóico durante quatro semanas. Letras diferentes indicam diferenças
 505 significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos.

506 5 DISCUSSÃO

507 O AL sendo um composto de origem natural está presente em vários itens alimentícios
508 incluindo vegetais e tecidos animais embora seja em baixas concentrações (Durrani et al.
509 2010). Assim, a suplementação deste composto é na forma sintética produzida
510 industrialmente. Porém, a determinação quantitativa em amostras biológicas e
511 suplementos alimentícios é importante para entender seu papel bioquímico a nível celular.

512 No presente trabalho, foi realizada extração e determinação de AL na ração
513 suplementada com 1 g/kg (dose nominal) e no músculo de juvenis de carpa comum
514 alimentadas com está ração. O teor de AL detectado na ração apresentou uma diminuição
515 de 56% da dose nominal. Aparentemente, está diminuição pode ter sido o resultado da
516 reação do AL com a fração lipídica ou um reflexo da sensibilidade da técnica de extração
517 usada para este fim. Uma diminuição similar foi reportada recentemente Kütter et al.
518 (2012) usando a mesma técnica de extração e determinação do AL suplementado em
519 dietas para *Trachinotus marginatus*. Afinal, a determinação quantitativa do AL em rações
520 e amostras biológicas é importante já que fornece evidência teórica das interações entre
521 a dose real do composto, a resposta bioquímica e a bioacumulação nos tecidos.

522 Por outro lado, sabe-se que os efeitos bioquímicos do AL são dose-dependentes.
523 Vários estudos têm fornecido evidências dos efeitos negativos deste composto sob
524 parâmetros biológicos como consumo alimentar e peso em diferentes organismos
525 modelos (Seo et al. 2012). Em peixes, Kütter et al (2012) reportaram uma diminuição no
526 consumo alimentar e a taxa de crescimento com o aumento da dose real de AL na dieta
527 (316, 524, 890 e 1367 mg/kg) e em consequência o peso final também foi negativamente
528 afetado. Interessantemente, os autores sugeriram 524 como dose segura já que não afetou
529 o peso final após 42 dias de suplementação. Do mesmo modo, os resultados apresentados
530 no presente trabalho (**Tabela 1**) indicam que a dose de AL detectada aqui (439,84±6,71
531 mg/kg) não afetou nenhuma das variáveis biológicas avaliadas em juvenis de carpa
532 comum. Portanto, está dose pode ser considerada segura para juvenis de carpa comum,
533 ao menos nas condições experimentais descritas.

534 ERO e ERN são constantemente produzidas em função da atividade metabólica e
535 outras condições fisiológicas inerente a cada tecido. Declínios na capacidade da
536 maquinaria antioxidante endógena para interceptar ou degradar os pro-oxidantes
537 correlaciona positivamente com elevados índices de estresse oxidativo em células e
538 tecidos (Halliwell & Guttridge 2007). Contudo, evidências experimentais indicam que
539 a administração de antioxidantes exógenos potencializa respostas antioxidantes
540 endógenas e atenua os índices de dano oxidativo. Assim, o presente trabalho foi delineado
541 para avaliar respostas antioxidantes ao longo do tempo em órgãos de carpa comum
542 alimentadas com rações suplementadas com o antioxidante AL ou não. Com o intuito de
543 entender as respostas antioxidantes exercidas pela suplementação com AL, foi
544 determinada a atividade da enzima GST, a concentração de GSH, a capacidade
545 antioxidante total e o nível de peroxidação lipídica entre ambos grupos.

546 GST é uma enzima de detoxificação de fase II que confere proteção às células contra
547 os efeitos nocivos de xenobioticos ambientais e produtos tóxicos endógenos resultantes
548 da oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Schlenk et al. 2011). GSH é um tiol
549 de baixa massa molecular importante na defesa celular contra ERO e outros peróxidos,
550 além de servir como substrato para outras enzimas detoxificadoras (Srikanth et al. 2013).
551 A capacidade antioxidante total, um enfoque holístico que reflete a competência de
552 organismos, órgãos e tecidos para interceptar e degradar ERO (Amado et al. 2009). Em
553 outras palavras, um indicador *in situ* da ação conjunta de diferentes substancias
554 antioxidantes num determinado órgão. O nível de lipoperoxidação, um indicador de
555 oxidação lipídica. Em conjunto, todos estes metabolitos proveem evidências bioquímicas
556 razoáveis para a interpretação das respostas antioxidantes provocadas pela suplementação
557 com AL em intestino, fígado e músculo da carpa comum.

558 O intestino de peixes agástricos como *C. carpio*, funciona como local de digestão e
559 absorção de nutrientes (Yan & Qiu-Zhou 2006). Porém, é um órgão propenso à exposição
560 de pro-oxidantes de origem dietético (Fe, Cu, hemoproteínas, lipídios peroxidados), ou
561 de natureza inflamatória como resultado da ativação de fagócitos (Halliwell et al. 2005).
562 Dessa forma a manutenção do estado redox é fundamental para a viabilidade,
563 funcionamento e integridade estrutural das células intestinais, as quais atuam como defesa

564 contra toxinas luminais e oxidantes dietéticos (Shoveller et al. 2005). Além disso, um
565 crescente corpo de evidências sugere que a função intestinal e o estado redox intestinal
566 estão estreitamente relacionados (Chen et al. 2009; Jiang et al. 2010; Hu et al. 2011; Deng
567 et al. 2014).

568 Entretanto, dados reportando interações entre AL e respostas antioxidantes no
569 intestino de peixes são inexistentes, portanto resulta difícil comparar os resultados das
570 variáveis bioquímicas analisadas neste órgão com outros estudos. À luz das evidências os
571 resultados obtidos aqui mostram pela primeira vez que duas semanas de suplementação
572 com AL medido efetivamente na ração (439,84 mg/kg) aumentaram significativamente a
573 atividade da enzima GST, indicando uma maior capacidade detoxificadora frente a
574 condições fisiológicas oxidantes no intestino de carpa comum. De acordo com Yang et
575 al. (2014), os mecanismos moleculares pelos quais o AL exerce suas funções
576 antioxidantes envolve a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear eritróide
577 2 (Nrf2). Este fator de transcrição Nrf2 atua como molécula sinalizadora redox sensível,
578 sendo fundamental na defesa contra estresse oxidativo. Após exposição aos insultos
579 oxidantes ou agentes quimiopreventivos como AL, o Nrf2 se dissocia da Keap1
580 deslocando-se até o núcleo onde interage com elementos de resposta antioxidante (ERA)
581 para mediar a transcrição gênica de enzimas antioxidantes como GST.

582 Recentemente Deng et al. (2014) estabeleceram que a condição nutricional influencia
583 a transcrição de genes que codificam para enzimas antioxidantes no intestino e
584 simultaneamente melhora o crescimento em carpa herbívora. De maneira similar,
585 Fontagné-Dicharry et al. (2014), postularam que a regulação gênica de enzimas
586 antioxidantes em peixes é governada por fatores de transcrição como o (Nrf2) e o fator
587 NF-kB. Por outro lado, vários estudos indicam que o AL confere efeitos gastro protetivos
588 em mamíferos. Ainda, Kaplan et al. (2012) reportaram que 300 mg AL-kg peso corpóreo
589 revertem a diminuição da atividade da enzima GST induzida por indometacina,
590 concomitantemente com aumento de GSH. Karakoyun et al. (2009) mostraram que o pré-
591 tratamento com AL reverte lesões oxidativas da mucosa gástrica, restaura níveis de GSH
592 e reduz liberação de metabolitos tóxicos do oxigênio. Şehirli et al. (2008) concluíram que

593 o AL reduz efetivamente efeitos deletérios induzidos por etanol na mucosa gástrica
594 através de ação antioxidante.

595 Em contraste aos resultados da GST evidenciados no intestino, a suplementação com
596 AL ao longo de quatro semanas não suscitou nenhuma alteração na atividade da enzima
597 (GST) em fígados e músculos de carpa comum. Resultados similares foram reportados
598 por Kütter et al. (2013) em músculos de *Trachinotus marginatus* aplicando diferentes
599 doses de AL (via i.p). Em contrapartida cérebros e fígados nesse estudo responderam ao
600 tratamento com AL em forma dose-dependente considerando esta mesma enzima. Kütter
601 et al. (2012), usando AL suplementado na ração obtiveram resultados parecidos. Desta
602 vez a atividade da GST não apresentou resposta em fígados e músculos do mesmo modelo
603 animal. Similarmente Monserrat et al. (2008) mencionaram que *Corydora paleatus*
604 alimentadas durante quatro semanas com uma dieta enriquecida com AL (70 mg/kg peso)
605 não induziu a atividade da GST em fígados. No entanto, nos estudos de Kütter et al.
606 (2012) e Monserrat et al. (2008) os efeitos do AL foram avaliados unicamente ao final do
607 período experimental (42 e 28 dias respectivamente), dessa forma é possível que estejam
608 se desconsiderando respostas antioxidantes a curto prazo, enquanto que aqui foram
609 consideradas possíveis influências do AL ao longo do tempo de experimentação nas
610 variáveis bioquímicas analisadas.

611 Os resultados evidenciados no presente estudo e a literatura de apoio sugerem que o
612 AL atua de forma diferenciada entre órgãos e a resposta pode estar em função do tempo
613 de suplementação. Estas afirmações se sustentam com estudos prévios que explicam as
614 propriedades antioxidantes do AL através da modulação de enzimas antioxidantes em
615 órgãos e tecidos. No trabalho de Amado et al. (2011) a administração intraperitoneal de
616 AL (2 injeções com intervalos de 24 h) aumentaram consideravelmente a expressão
617 gênica de várias isoformas da GST no fígado e adicionalmente aumentaram a atividade
618 da GST no fígado e cérebro, protegendo estes órgãos contra estresse oxidativo induzido
619 por microcistina. Essa resposta do fígado nesse trabalho contrasta com os resultados
620 apresentados aqui, onde a atividade da GST no fígado não evidenciou nenhuma alteração
621 ao longo do tempo de suplementação. Provavelmente estas diferenças são explicadas
622 pelas condições experimentais, rota de administração e dose utilizados por estes autores,

623 as quais diferiam das condições descritas aqui. Além disso, é bem sabido que a rota de
624 administração influencia a eficiência de absorção. Desta forma quando o AL é
625 suplementado na ração sua absorção e posteriores efeitos bioquímicos podem ser
626 limitados por competição com outros nutrientes pela passagem na proteína transportadora
627 (Shay et al. 2009).

628 Outras evidências apresentadas neste estudo mostraram que a concentração de GSH
629 foi significativamente maior no intestino de animais suplementados por duas semanas.
630 Este resultado, junto com o aumento na atividade da GST reportado anteriormente no
631 mesmo órgão, sugere uma maior competência para a detoxificação. Isto claramente indica
632 que a suplementação com AL proporciona proteção no intestino através do aumento
633 cooperativo das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Estudos prévios
634 conduzidos por Martensson et al. (1990) corroboram a importância da GSH na
635 manutenção do estado redox e função intestinal ao estabelecer que deficiências em GSH
636 provocam degeneração de células epiteliais em ratos.

637 Do mesmo modo, a suplementação com AL induziu oscilações na resposta da GSH
638 no fígado manifestando incrementos significativos em duas e quatro semanas com relação
639 ao controle. Também é importante ressaltar que na terceira semana o nível de GSH no
640 fígado diminuiu até valores basais. Este comportamento parece uma resposta regulatória
641 do fígado a estímulos redutivos característicos do AL embora os mecanismos subjacentes
642 a estas respostas não sejam abordados aqui. Em concordância com estes resultados, Suh
643 et al. (2004) revelaram que o tratamento com AL induz ativação nuclear do Nrf2 e
644 acionamento de genes que codificam a expressão das subunidades moduladoras e
645 catalíticas da enzima GCL. Finalmente essa cascata de eventos se traduz em aumento da
646 atividade da enzima GCL em ratos (enzima limitante da síntese de GSH). Outro
647 mecanismo pelo qual o AL induz aumento dos níveis de GSH foi demonstrado por Han et
648 al. (1997) em células humanas, onde AL é reduzido a ADHL e este último reduz cistina
649 a cisteína, incrementando a síntese de GSH. Trabalhos com organismos aquáticos têm
650 demonstrado que níveis intracelulares de GSH podem ser mantidos pela ação antioxidante
651 do AL. Por exemplo, Zhang et al. (2010) observaram que a suplementação com AL (200

652 mg/Kg) incrementou significativamente a concentração de GSH no hepatopâncreas de
653 abalone *Haliotis discus hannai* Ino.

654 É importante salientar que o efeito mais pronunciado em termos da concentração de
655 GSH foi notado no músculo. Neste órgão a concentração de GSH aumentou em forma
656 progressiva e diferiu significativamente do controle após três semanas de suplementação.
657 Isto indica um papel indutor do AL sob o metabolismo da GSH, um componente essencial
658 do sistema de defesa antioxidante (não enzimático) capaz de neutralizar radicais livres e
659 proteger células e tecidos contra insultos oxidativos (Kleinkauf-Rocha et al. 2014).

660 Por outro lado, após quatro semanas de suplementação houve um aumento
661 significativo na capacidade antioxidante do músculo. Este aumento não coincide com os
662 teores de GSH que se apresentaram reduzidos na quarta semana quando comparado com
663 os níveis da terceira semana. Desta forma, o aumento da capacidade antioxidante na
664 quarta semana pode ter sido o resultado do aporte de outros antioxidantes diferentes do
665 GSH. Reciprocamente a capacidade antioxidante contra radicais peroxil não foi
666 significativamente influenciada em intestinos e fígados pelo tratamento com AL, embora
667 estes órgãos tenham apresentado concentrações de GSH significativamente diferentes dos
668 controles.

669 Neste estudo os níveis de MDA foram avaliados para elucidar se o AL reduz dano
670 oxidativo lipídico em amostras de intestinos, fígados e músculos de carpa comum.
671 Contudo, o tratamento com AL (dose real $439,84 \pm 6,71$ mg-kg de ração) não foi efetivo
672 para reduzir a concentração de MDA nos tecidos avaliados. Este resultado foi inesperado
673 já que previamente Kütter et al. (2012) estabeleceram que doses entre 316 e 524 mg
674 AL/kg alimento seco reduziam significativamente o nível de peroxidação lipídica no
675 fígado sem afetar o crescimento de *T. marginatus*. Nesse trabalho os autores
676 argumentaram que a diminuição do teor de lipídios da carcaça nos grupos alimentados
677 com 316 e 524 mg AL/kg poderiam explicar a redução dos níveis de TBARS.

678 Por outro lado, Hong et al (2013), indicaram que várias espécies de carpas incluído
679 *C. carpio* apresentam baixos teores de lipídios (composição centesimal). Isto poderia

680 explicar parcialmente a baixa concentração em termos de TBARS observada no presente
681 trabalho, os quais, por outro lado foram baixos em órgãos como o músculo se comparados
682 com os registrados por Kütter et al. (2012) utilizando a mesma metodologia para sua
683 determinação. Estas afirmações também poderiam ser reforçadas por estudos prévios que
684 mostram o efeito hipolipidêmico do AL em ratos ao reduzir a atividade e expressão de
685 enzimas lipogênicas e conseqüentemente diminuindo a biossíntese de lipídios (Huong &
686 Ide 2008; Ide et al. 2013). Por tanto, aqui cabe propor a determinação de dano oxidativo
687 proteico para obter outra medida de dano oxidativo em outra macromolécula.

688 Finalmente, antioxidantes como o AL melhoram a qualidade dos alimentos de origem
689 animal além de acumular-se em diversos tecidos (Yasin et al. 2012) tornando-os
690 alimentos funcionais. Evidências em organismos aquáticos confirmam o potencial do AL
691 na busca de alternativas para melhorar o valor nutricional de produtos provenientes de
692 aquicultura. Nas bases desse pressuposto e levando em consideração os resultados obtidos
693 no presente trabalho (CAPR e GSH) em músculos de carpa, vários métodos analíticos
694 foram testados aqui para detectar quantitativamente a presença de AL em tecido muscular
695 de carpa comum suplementadas por três e quatro semanas. No entanto, as tentativas se
696 mostraram ineficazes para a detecção deste composto embora seus efeitos bioquímicos
697 foram observados em três e quatro semanas (GSH e CAPR respectivamente).

698 Provavelmente, o AL ingressou no músculo, acumulou-se em baixas concentrações
699 ou próximas às fisiológicas, promoveu seus efeitos bioquímicos e acabou sendo
700 metabolizado, reduzindo assim as chances de ser detectado. Aqui cabe propor a
701 determinação de AL em outros tecidos como intestino e fígado, os quais representam
702 sítios de absorção e metabolização deste composto. Além disso, em mamíferos sabe-se
703 que após absorção do AL por células e tecidos, o composto é rapidamente metabolizado
704 até ADHL (Shay et al. 2009). De acordo com Durrani et al. (2010) o teor de AL em
705 amostras biológicas é muito baixo e o percentual de recuperação depende do método de
706 extração utilizado. Seguindo estes autores, uma dificuldade na detecção está relacionada
707 ao fato deste composto e seus metabolitos não possuir cromóforos para sua determinação
708 por métodos fluorimétricos ou cromatográficos. Da mesma maneira, Lodge et al. (1997)
709 estabeleceram que o teor de AL em tecidos animais está em função do metabolismo

710 energético inerente a cada tecido, desta forma tecidos com maior densidade mitocondrial
711 como coração, fígado e rim sejam os principais sítios de acúmulo. Futuros estudos devem
712 ser feitos para esclarecer se o AL experimenta organotropismo em animais aquáticos e se
713 essa afinidade está relacionada às características metabólicas de cada tecido. Ainda outras
714 técnicas de extração e determinação devem ser avaliadas, incluído determinação
715 eletroquímica.

716 **6 CONCLUSÃO**

717 Em conclusão, a suplementação com 439,84 mg AL/kg de ração é efetiva para induzir
718 respostas antioxidantes e melhorar o estado antioxidante no intestino, fígado e músculos
719 de juvenis de carpa comum. As respostas são específicas para cada tecido e dependentes
720 do tempo de suplementação. De acordo com os resultados obtidos, no mínimo duas
721 semanas de suplementação com AL é necessário para induzir aumentos na atividade da
722 enzima GST e concentração de GSH no intestino e fígado. Por outro lado, três semanas,
723 no mínimo, são necessárias para incrementar o nível de GSH intramuscular e quatro
724 semanas para aumentar a capacidade antioxidante total em músculo. Não foi possível
725 concluir que o AL se acumula em músculos de carpa com a técnica de extração utilizada
726 neste trabalho, ainda que os efeitos bioquímicos sugerem o ingresso deste antioxidante
727 neste órgão.

728 **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

729 AMADO, LL, ML GARCIA, PB RAMOS, RF FREITAS, B ZAFALON, JL FERREIRA,
730 JS YUNES & JM MONSERRAT. 2009. A method to measure total antioxidant
731 capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate
732 microcystins toxicity. *Sci Total Environ.*, 407: 2115-23.

733 AMADO LL, ML GARCIA, TC PEREIRA, JS YUNES, MR BOGO & JM
734 MONSERRAT. 2011. Chemoprotection of lipoic acid against microcystin-
735 induced toxicosis in common carp (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae). *Comp Biochem*
736 *Phys C.*, 154: 146-153.

737 ANTONOPOULOU, E, E KENTEPOZIDOU, K FEIDANTSIS, C ROUFIDOU, S
738 DESPOTI & S CHATZIFOTIS. 2013. Starvation and re-feeding affect Hsp
739 expression, MAPK activation and antioxidant enzymes activity of European sea
740 bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Phys A.*, 165: 79-88.

741 AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC. International. 17th. v. II.

742 AOUADI, D, G LUCIANO, V VASTA, S NASRI, DM BROGNA, S ABIDI, A PRIOLO
743 & HB SALEM. 2014. The antioxidant status and oxidative stability of muscle
744 from lambs receiving oral administration of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus*
745 *officinalis* essential oils. *Meat Sci.*, 97: 237-243.

746 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1985. Standard Methods for the
747 Examination of Water and Waste Water, 13th ed. New York. 1193 pp.

748 BENDERSCHNEIDER, K & RJ ROBINSON. 1952. A new spectrophotometric method
749 for determination of nitrate in sea water. *Journal of Marine Research* 1: 69-87.

750 BAYIR, A, AN SIRKECIOGLU, M BAYIR, HI HALILOGLU, EM KOCAMAN & NM
751 ARAS. 2011. Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and
752 refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: oxidative stress and antioxidant
753 defenses. *Comp Biochem Phys B.*, 159: 191-196.

- 754 BETANCOR, MB, MJ CABALLERO, G TEROVA, R SALEH, E ATALAH, T
755 BENÍTEZ-SANTANA, JG BELL & M IZQUIERDO. 2012. Selenium inclusion
756 decreases oxidative stress indicators and muscle injuries in sea bass larvae fed
757 high-DHA microdiets. *Brit J Nutr.*, 108: 2115-2128.
- 758 CAO, L, W HUANG, J LIU, X YIN & S DOU. 2010. Accumulation and oxidative stress
759 biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium
760 exposure. *Comp Biochem Phys C.*, 151: 386-392.
- 761 CHATZIFOTIS, S, M PAPADAKI, S DESPOTI, C ROUFIDOU & E
762 ANTONOPOULOU. 2011. Effect of starvation and re-feeding on reproductive
763 indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass
764 (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 316: 53-59.
- 765 CHEN, P, QG MA, C JI, JY ZHANG, LH ZHAO, Y ZHANG & YZ JIE. 2011. Dietary
766 lipoic acid influences antioxidant capability and oxidative status of broilers. *Int J*
767 *Mol Sci.*, 12: 8476-8488.
- 768 CHEN, J, XQ ZHOU, L FENG, Y LIU & J JIANG. 2009. Effects of glutamine on
769 hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells of Jian
770 carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*, 288: 285-289.
- 771 DENG, YP, WD JIANG, Y LIU, J JIANG, SY KUANG, L TANG, P WU, YA ZHANG,
772 L FENG & XQ ZHOU. 2014. Differential growth performance, intestinal
773 antioxidant status and relative expression of Nrf2 and its target genes in young
774 grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with graded levels of leucine.
775 *Aquaculture*, 434: 66-73.
- 776 DI GIULIO, R & JN MEYER. 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. In:
777 DI GIULIO, RT & DE HINTON. (Ed). *The toxicology of fishes*. CRC Press,
778 Chap. 6: 273-324.
- 779 DURRANI, AI, H SCHWARTZ, M NAGL & G SONTAG. 2010. Determination of free
780 a-lipoic acid in foodstuffs by HPLC coupled with CEAD and ESI-MS. *Food*
781 *Chem.*, 120: 1143-1148.

- 782 FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 223 pp
- 783 FAO 2004-2014. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Cyprinus carpio*.
784 Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Peteri, A. In: FAO
785 Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 1 January 2004.
786 http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es. [Cited 17
787 September 2014]
- 788 FAO/WHO. 2011. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and
789 Benefits of Fish Consumption. Rome, Food and Agriculture Organization of the
790 United Nations; Geneva, World Health Organization, 50 pp.
- 791 FONTAGNÉ-DICHARRY, S, E LATAILLADE, A SURGET, L LARROQUET, M
792 CLUZEAUD & S KAUSHIK. 2014. Antioxidant defense system is altered by
793 dietary oxidized lipid in first-feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
794 *Aquaculture*. 424-425: 220-227.
- 795 GAO, J, & S KOSHIO. 2014. Effect of dietary lipid oxidation with vitamin C and E
796 supplementation on fillet quality of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck &
797 Schlegel) during storage. *Aquac Res.*, 2014: 1-10.
- 798 HABIG WH & WB JACOBY. 1981. Glutathione S-Transferase (rat and human).
799 *Methods Enzymol.*, 77: 218-223.
- 800 HALLIWELL B & JMC GUTTERIDGE. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*.
801 4th Ed, London, Oxford Univ. Press. 704 p.
- 802 HALLIWELL, B, J RAFTER & A JENNER. 2005. Health promotion by flavonoids,
803 tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects?
804 Antioxidant or not?. *Am J Clin Nutr.*, 8: 268S-76S.
- 805 HAMRE, K, R CHRISTIANSEN, R WAAGBØ, A MAAGE, BE TORSTENSEN, B
806 LYGREN, Ø LIE, E WATHNE & S ALBREKTSSEN. 2004. Antioxidant vitamins,
807 minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): effects on
808 growth performance and fillet quality. *Aquacult Nutr.*, 10: 113-123.

- 809 HAN, D, G HANDELMAN, L MARCOCCI, CK SEN, S ROY, H KOBUCHI, HJ
810 TRITSCHLER, L FLOHÉ & L PACKER. 1997. Lipoic acid increases de novo
811 synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *BioFactors*, 6:
812 321-338.
- 813 HERMES-LIMA, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals.
814 In: STOREY, KB. (Ed.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*.
815 John Wiley & Sons, New York, Chap. 12: 319-368.
- 816 HERNÁNDEZ, A, B GARCÍA, MJ JORDÁN & MD HERNÁNDEZ. 2014. Improved
817 conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence
818 of doses of rosemary extract added to feed. *Aquaculture*. 426-427: 31-40.
- 819 HONG, H, Y ZHOU, H WU, Y LUO, & H SHEN. 2014. Lipid Content and Fatty Acid
820 Profile of Muscle, Brain and Eyes of Seven Freshwater Fish: a Comparative
821 Study. *J Am Oil Chem Soc.*, 91: 795 – 804.
- 822 HÖHN, A, J KÖNIG, T GRUNE. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized
823 proteins. *J Proteomics.*, 92: 132-159.
- 824 HU, K, W HE, L FENG, J JIANG, Y LIU, WD JIANG, SH LI & XQ ZHOU. 2011.
825 Effects of pyridoxine on antioxidative parameters in juvenile Jian carp (*Cyprinus*
826 *carpio* var. Jian). *Aquacult Nutr.*, 17: e226-e232.
- 827 HUONG, DT & T IDE. 2008. Dietary lipoic acid-dependent changes in the activity and
828 mRNA levels of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Br J Nutr.*, 100: 79-87.
- 829 IDE, T, A AZECHI, S KITADE, Y KUNIMATSU, N SUZUKI & C NAKAJIMA. 2013.
830 Combined effect of sesamin and a-lipoic acid on hepatic fatty acid metabolism in
831 rats. *Eur J Nutr.*, 52: 1015-1027.
- 832 JIANG, WD, L FENG, Y LIU, J JIANG, K HU, SH LI & XQ ZHOU. 2010. Lipid
833 peroxidation, protein oxidant and antioxidant status of muscle, intestine and
834 hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels
835 of myo-inositol. *Food Chem.*, 120: 692-697.

- 836 KAPLAN, KA, F ODABASOGLU, Z HALICI, M HALICI, E CADIRCI, F ATALAY,
837 O AYDIN & A CAKIR. 2012. Alpha-lipoic acid protects against indomethacin-
838 induced gastric oxidative toxicity by modulating antioxidant system. J Food Sci.
839 77(11): H224-H230.
- 840 KARAKOYUN, B, M YÜKSEL, F ERCAN, C ERZİK & BÇ YEĞEN. 2009. Alpha-
841 lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats.
842 Inflammation. 32: 37-46.
- 843 KLEINKAUF-ROCHA, J, LD BOBERMIN, PDM MACHADO, CA GONÇALVES, C
844 GOTTFRIED & A QUINCOZES-SANTOS. 2014. Lipoic acid increases
845 glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6
846 astrocyte cell line. Int J Dev Neurosci., 31: 165-170.
- 847 KÜTTER, MT, JM MONSERRAT, EG PRIMEL, SS CALDAS & MB TESSER. 2012.
848 Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant
849 status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae).
850 Aquaculture. 368-369: 29-35.
- 851 KÜTTER, MT, JM MONSERRAT, RA SANTOS & MB TESSER. 2013. Dose-response
852 effects of the antioxidant α -lipoic acid in the liver and brain of pompano
853 *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). J Appl Ichthyol., 29: 1123-1128.
- 854 KÜTTER, MT, LA ROMANO, J VENTURA-LIMA, MB TESSER & JM
855 MONSERRAT. 2014. Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-
856 lipoic acid in aquatic organisms. Comp Biochem Physiol C., 162: 70-76.
- 857 LESSER, MP. 2012. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: ABELE D, JP
858 VÁZQUEZ-MEDINA & T ZENTENO-SAVÍN. (Ed). Oxidative stress in aquatic
859 ecosystems. Blackwell Publishing, Chap. 1: 9-19
- 860 LI, Y, QG MA, LH ZHAO, H WEI, GX DUAN, JY ZHANG & C JI. 2014. Effects of
861 lipoic acid on immune function, the antioxidant defense system, and
862 inflammation-related genes expression of broiler chickens fed aflatoxin
863 contaminated diets. Int J Mol Sci., 15: 5649-5662.

- 864 LIVINGSTONE, DR. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution
865 and aquaculture. *Rev Med Vet.*, 6: 427-430.
- 866 LODGE, JK, HD YOUN, GJ HANDELMAN, T KONISHI, S MATSUGO, VV
867 MATHUR & L PACKER. 1997. Natural sources of lipoic acid: Determination of
868 lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid
869 chromatography incorporating electrochemical detection. *Journal of Applied*
870 *Nutrition*. 49: 3-11.
- 871 LUO, Z, B WANG, M LIU, K JIANG, M LIU & L WANG. 2014. Effect of dietary
872 supplementation of vitamin C on growth, reactive oxygen species, and antioxidant
873 enzyme activity of *Apostichopus japonicus* (Selenka) juveniles exposed to nitrite.
874 *Chin J Oceanol Limn.*, 32: 749-763.
- 875 LUSHCHAK VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.
876 *Aquat Toxicol.*, 101: 13-30.
- 877 MÅRTENSSON, J, A JAIN, A MEISTER. 1990. Glutathione is required for intestinal
878 function. *P Natl Acad Sci Usa.*, 87: 1715-1719.
- 879 MONSERRAT, JM, JV LIMA, JL FERREIRA, D ACOSTA, ML GARCIA, PB
880 RAMOS, TB MORAES, LC DOS SANTOS & LL AMADO. 2008. Modulation
881 of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish
882 *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comp Biochem Physiol C.*, 148: 287-292.
- 883 MONSERRAT, JM, ML GARCIA, J VENTURA-LIMA, M GONZÁLEZ, ML
884 BALLESTEROS, KS MIGLIORANZA, MV AMÉ & DA WUNDERLIN. 2014.
885 Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia*
886 *multidentata* (Anablapidae) and its influence on endosulfan accumulation and
887 toxicity. *Pestic Biochem Phys.*, 108: 8-15.
- 888 NAVARI-IZZO, F, MF QUARTACCI & C SGHERRI. 2002. Lipoic acid: a unique
889 antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Bioch.*,
890 40: 463-470.

- 891 NAVARRO-YEPES, J, M BURNS, A ANANDHAN, O KHALIMONCHUK, LM Del
892 RAZO, B QUINTANILLA-VEGA, A PAPPAS, M PANAYIOTIDIS & R
893 FRANCO. 2014. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: Cell death
894 versus survival. *Antioxid Redox Sign.*, 21: 66-85.
- 895 OAKES, KD, GJ VAN DER KRAAK. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting
896 oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to
897 pulp mill effluent. *Aquat Toxicol.*, 63: 447-463.
- 898 PACKER, L, EH WITT & HJ TRITSCHLER. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological
899 antioxidant. *Free Radical Bio Med.*, 19: 227-250.
- 900 POLJSAK, B, D ŠUPUT, & I MILISAV. 2013. Achieving the balance between ROS and
901 antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and*
902 *Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 956792.
- 903 RUST, MB. 2003. Nutritional Physiology. In: Halver, JE & RW Hardy. (Ed.). *Fish*
904 *Nutrition*. Academic Press. Chap. 7: 367-452.
- 905 SAHIN, K, C ORHAN, H YAZLAK, M TUZCU & N SAHIN. 2014. Lycopene improves
906 activation of antioxidant system and Nrf2/HO-1 pathway of muscle in rainbow
907 trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different stocking densities. *Aquaculture*. 430:
908 133-138.
- 909 SCHLENK, D, M CELANDER, EP GALLAGHER, S GEORGE, M JAMES, SW
910 KULLMAN, P VAN DEN HURK & K WILLETT. Biotransformation in Fishes.
911 In: DI GIULIO, RT & DE HINTON. (Ed). *The toxicology of fishes*. CRC Press,
912 Chap. 4: 153-234.
- 913 SEO, EY, AW HA & WK KIM. 2012. α -Lipoic acid reduced weight gain and improved
914 the lipid profile in rats fed with high fat diet. *Nutr Res Pract.*, 6: 195-200.
- 915 ŞEHIRLI, Ö, E TATLIDEDE, M YÜKSEL, C ERZİK, S ÇETINEL, BÇ YEĞEN & G
916 ŞENER. 2008. Antioxidant effect of alpha-lipoic acid against ethanol-induced
917 gastric mucosal erosion in rats. *Pharmacology*. 81: 173-180.

- 918 SHAY, KP, RF MOREAU, EJ SMITH, AR SMITH & TM HAGEN. 2009. Alpha-lipoic
919 acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential.
920 *Biochim Biophys Acta.*, 1790: 1149-1160.
- 921 SHOVELLER, AK, B STOLL, RO BALL & DG BURRIN. 2005. Nutritional and
922 functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J Nutr.*, 135:
923 1609-1612.
- 924 SIES, H. 1991. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *AM J MED.*,
925 91(3): S31-S38. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2).
- 926 SRIKANTH, K, E PEREIRA, AC DUARTE & I AHMAD. 2013. Glutathione and its
927 dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish-
928 a review. *Environ Sci Pollut R.*, 20: 2133–2149.
- 929 SUH, JH, SHENVI SV, DIXON BM, LIU H, JAISWAL AK, LIU RM & HAGEN TM.
930 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of
931 glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *P Natl Acad Sci Usa.*,
932 101: 3381-3386.
- 933 SZELAĞ, M, D MIKULSKI & M MOLSKI. 2012. Quantum-chemical investigation of
934 the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites. *J*
935 *Mol Model.*, 18: 2907-2916.
- 936 TERJESEN, BF, K PARK, MB TESSER, MC PORTELLA, Y ZHANG & K
937 DABROWSKI. 2004. Lipoic acid and ascorbic acid affect plasma free amino
938 acids selectively in the teleost fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *J Nutr.*, 134:
939 2930-2934.
- 940 TRATTNER, S, J PICKOVA, KH PARK, J RINCHARD & K DABROWSKI. 2007.
941 Effects of α -lipoic and ascorbic acid on the muscle and brain fatty acids and
942 antioxidant profile of the South American pacu *Piaractus mesopotamicus*.
943 *Aquaculture.* 273: 158-164.

- 944 UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual
945 and Guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France
- 946 VALAVANIDIS, A, T VLAHOGIANNI, M DASSENAKIS & M SCOULLOS. 2006.
947 Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic
948 environmental pollutants. *Ecotox Environ Safe.*, 64: 178-189.
- 949 WHITE, CC, H VIERNES, CM KREJSA, D BOTTA & TJ KAVANAGH. 2003.
950 Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity.
951 *Anal. Biochem.*, 318: 175-180.
- 952 YAN, L, & X QIU-ZHOU. 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure
953 and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian).
954 *Aquaculture*. 256: 389-394.
- 955 YANG, Y, W LI, Y LIU, Y SUN, Y LI, Q YAO, J LI, Q ZHANG, Y GAO, L GAO & J
956 ZHAO. 2014. Alpha-lipoic acid improves high-fat diet-induced hepatic steatosis
957 by modulating the transcription factors SREBP-1, FoxO1 and Nrf2 via the
958 SIRT1/LKB1/AMPK pathway. *J Nutr Biochem.*, pii: S0955-2863(14)00133-8.
959 doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.06.001.[Epub ahead of print].
- 960 YASIN, M, A ASGHAR, FM ANJUM, MS BUTT, MI KHAN, MS ARSHAD, M
961 SHAHID, AH EL-GHORAB & T SHIBAMOTO. 2012. Oxidative stability
962 enhancement of broiler bird meats with a-lipoic acid and a-tocopherol acetate
963 supplemented feed. *Food Chem.*, 131: 768-773.
- 964 ZHANG, W, Q CHEN, K MAI, W XU, X WANG & Z LIUFU. 2010. Effects of dietary
965 α -lipoic acid on the growth and antioxidative responses of juvenile abalone
966 *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquac Res.*, 41: e781-e787.