



JOÃO PAULO LIMA DE OLIVEIRA

**EFFECTS OF *Litchi chinensis* SUBPRODUCTS ON
METABOLIC PARAMETERS AND ANTIOXIDANT DEFENSE
IN ADULT ZEBRAFISH**

**LAVRAS-MG
2024**

JOÃO PAULO LIMA DE OLIVEIRA

**EFFECTS OF *Litchi chinensis* SUBPRODUCTS ON METABOLIC PARAMETERS
AND ANTIOXIDANT DEFENSE IN ADULT ZEBRAFISH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutor.

Prof^a. Dr^a. Elisângela Elena Nunes Carvalho
Orientadora

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Coorientador

Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, João Paulo Lima de.

Effects of *Litchi chinensis* subproducts on metabolic
parameters and antioxidant defense in adult zebrafish / João Paulo
Lima de Oliveira. - 2024.

107 p.

Orientador(a): Elisângela Elena Nunes Carvalho.

Coorientador(a): Luis David Solis Murgas, William Franco
Carneiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Bioactive Compounds. 2. Oxidative Stress. 3. Lychee. I.
Carvalho, Elisângela Elena Nunes. II. Murgas, Luis David Solis. III.
Carneiro, William Franco. IV. Título.

JOÃO PAULO LIMA DE OLIVEIRA

**EFFECTS OF *Litchi chinensis* SUBPRODUCTS ON METABOLIC PARAMETERS
AND ANTIOXIDANT DEFENSE IN ADULT ZEBRAFISH**

**EFEITOS DOS SUBPRODUTOS DE *Litchi chinensis* SOBRE PARÂMETROS
METABÓLICOS E DEFESA ANTIOXIDANTE EM ZEBRAFISH ADULTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de março de 2024.

Prof. Dr. Ralph Gruppi Thomé UFSJ
Prof. Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna UFPR
Prof^a. Dr^a. Isabela Coelho de Castro UFLA
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Prof^a. Dr^a. Elisângela Elena Nunes Carvalho
Orientadora

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Coorientador

Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

“A minha querida Mãe, irmã e meu avô Ayporê Magalhães Furtado (in memoriam)”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a Virgem Maria, a todos Anjos e Santos da corte celestial por terem me sustentado até aqui e renovado minhas forças tantas vezes ao longo desta jornada. Agradeço por terem tornado esse sonho possível.

À minha mãe e minha irmã por todo carinho e apoio, por nunca terem duvidado da minha capacidade e nas horas de desespero e descrença manterem minha vontade de continuar lutando.

À minha orientadora Elisângela Elena Nunes Carvalho pelo acolhimento e por contribuir pelo meu crescimento profissional.

Agradeço em especial o meu coorientador Luis David Solis Murgas por ter me acolhido e ter aceitado a proposta do experimento, obrigado por todo o acompanhamento e suporte, você esteve presente nos momentos mais caóticos do processo, e sempre teve calma e soube me ajudar a resolver. Meu eterno agradecimento!

Agradeço o apoio incondicional da minha amiga Kiara, Moisés e do meu coorientador William. Vocês foram fundamentais em cada etapa do meu aprendizado e minha evolução. Obrigado pela paciência e pelo suporte, sem vocês eu não teria o sucesso almejado.

Agradeço os amigos que conheci no Departamento de Ciência de Alimentos, Gil, Ingrid e Bia, que foram fundamentais para o meu aprendizado e são grandes exemplos de vida. Aprendi muito com vocês.

À Universidade Federal de Lavras por dispor de infraestrutura e profissionais de alta competência para minha formação acadêmica. Agradeço ao corpo docente e todos os profissionais do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinas, Aromáticas e Condimentares, em especial a coordenadora Luciane Vilela Resende.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa.

Por fim, agradeço a todos que me apoiaram nesses anos e me ajudaram a conquistar esse título tão sonhado. Todos vocês foram e são essenciais na minha vida. Muito obrigado!!!

Que nada te perturbe,
nada te amedronte.
Tudo passa.
A paciência tudo alcança...
a quem tem Deus,
nada falta.
Só Deus basta.

(Santa Tereza D'avila)

RESUMO GERAL

A obesidade é uma doença complexa e multifatorial, frequentemente associada ao aumento excessivo da adiposidade e considerada um risco para a saúde. Paralelamente, a indústria agroalimentar gera muitos resíduos que contêm compostos bioativos com propriedades antioxidantes, úteis em áreas como alimentação, saúde, farmácia, cosmética e meio ambiente. Deste modo, os objetivos do presente estudo foram avaliar o impacto da farinha da casca e da semente da lichia em parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo em zebrafish adultos. No primeiro experimento, foram utilizados 225 zebrafish. Os animais foram alimentados com uma dieta rica em carboidrato suplementada com diferentes concentrações de farinha da casca de lichia (2, 4 e 6%), sendo divididos em cinco grupos (Controle, High Carbohydrate (HC), HC2%, HC4% e HC6%). Durante as quatro primeiras semanas foi fornecido artêmia liofilizada uma vez ao dia e nas quatro últimas semanas artêmia liofilizada com glicose, exceto para o grupo controle. Ao final do ensaio de alimentação foram determinados os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL, lactato, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Também foram avaliadas a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e a concentração de glutathione (GSH) e peroxidação lipídica. Os resultados mostraram que o grupo HC6% apresentou uma diminuição significativa nos níveis de glicose e triglicerídeos em comparação com o grupo HC. Além disso, o grupo HC6% apresentou atividades aumentadas das enzimas antioxidantes CAT e SOD, juntamente com níveis reduzidos de malonaldeído (MDA). Estas descobertas sugerem que a suplementação dietética com 6% de farinha de casca de lichia pode modular significativamente a homeostase da glicose e o metabolismo lipídico no zebrafish. No segundo experimento, foram utilizados 200 zebrafish adultos. Os animais foram alimentados com uma dieta com alto teor de lipídio suplementada com diferentes concentrações da farinha da semente de lichia (2, 4 e 6%) por 12 semanas. Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo eles: controle, High Fat Diet (HFD), HFD2%, HFD4% e HFD6%. Ao final das 12 semanas foram avaliados os parâmetros bioquímicos (glicemia, triglicerídeos, colesterol total, HDL, ALT, AST e cortisol). Os biomarcadores do estresse oxidativo avaliados foram CAT, SOD, glutathione S-transferase (GST), GSH e espécies reativas de oxigênio (ERO's). Além disso, foi avaliado o diâmetro médio do tecido adiposo visceral e a análise histopatológica do tecido hepático. Os resultados mostraram que o grupo HFD6% apresentou o menor peso final e o menor ganho de peso. A ração contendo 6% da farinha da semente da lichia acarretou da redução da glicemia e aumento do HDL. Menor atividade da CAT e GST foram observadas no grupo HFD4%, além disso, a diminuição de ERO's ocorreu nos grupos HFD4% e HFD6%. A ingestão da farinha a longo prazo demonstrou uma diminuição no tecido adiposo visceral do grupo HFD4% e esteatose discreta no grupo HFD6%. Conclui-se que a farinha da semente de lichia pode ter efeitos benéficos em parâmetros bioquímicos e marcadores de estresse oxidativo, o que sugere potenciais aplicações em alimentos e suplementos.

Palavras-chaves: Compostos Bioativos. Estresse Oxidativo. Lichia. Atividade Antioxidante. *Danio rerio*.

GENERAL SUMMARY

Obesity is a complex and multifactorial disease, often associated with excessive increase of adiposity and considered a health risk. Parallely, the agro-food industry generates many residues that contain bioactive compounds with antioxidant properties, useful in areas such as food, health, pharmacy, cosmetics and environment. Thus, the objectives of the present study were to evaluate the impact of lychee peel and seed flour on biochemical parameters and oxidative stress in adult zebrafish. In the first experiment, 225 zebrafish were used. The animals were fed a high-carbohydrate diet supplemented with different concentrations of lychee peel flour (2, 4 and 6%), being divided into five groups (Control, High Carbohydrate (HC), HC2%, HC4% and HC6%). During the first four weeks, freeze-dried artemia was provided once a day and in the last four weeks freeze-dried artemia with glucose, except for the control group. At the end of the feeding trial, the levels of glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL, lactate, creatinine, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined. The activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), and the concentration of glutathione (GSH) and lipid peroxidation were also evaluated. The results showed that the HC6% group presented a significant decrease in glucose and triglyceride levels compared to the HC group. In addition, the HC6% group presented increased activities of the antioxidant enzymes CAT and SOD, along with reduced levels of malondialdehyde (MDA). These findings suggest that dietary supplementation with 6% lychee peel flour can significantly modulate glucose homeostasis and lipid metabolism in zebrafish. In the second experiment, 200 adult zebrafish were used. The animals were fed a high-fat diet supplemented with different concentrations of lychee seed flour (2, 4 and 6%) for 12 weeks. The animals were divided into five groups, namely: control, High Fat Diet (HFD), HFD2%, HFD4% and HFD6%. At the end of the 12 weeks, the biochemical parameters (glycemia, triglycerides, total cholesterol, HDL, ALT, AST and cortisol) were evaluated. The oxidative stress biomarkers evaluated were CAT, SOD, glutathione S-transferase (GST), GSH and reactive oxygen species (ROS). In addition, the average diameter of visceral adipose tissue and the histopathological analysis of liver tissue were evaluated. The results showed that the HFD6% group presented the lowest final weight and the lowest weight gain. The feed containing 6% of lychee seed flour resulted in the reduction of glycemia and increase of HDL. Lower activity of CAT and GST were observed in the HFD4% group, in addition, the decrease of ROS occurred in the HFD4% and HFD6% groups. The long-term intake of the flour showed a decrease in visceral adipose tissue of the HFD4% group and mild steatosis in the HFD6% group. It is concluded that lychee seed flour may have beneficial effects on biochemical parameters and oxidative stress markers, suggesting potential applications in food and supplements.

Key-words: Bioactive Compounds. Oxidative Stress. Lychee. Antioxidant Activity. *Danio rerio*.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Doenças crônicas não-transmissíveis e obesidade	12
2.2	Subprodutos da indústria de alimentos	13
2.3	Compostos bioativos	14
2.4	Estresse oxidativo	15
2.5	Litchi chinensis Soonerat.....	16
2.6	O modelo zebrafish (Danio rerio)	19
2.6.1	Dietas com alto teor de gordura para o zebrafish e utilização de plantas medicinais	20
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS	24
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	29
	ARTIGO 1 – Zebrafish and bioactive compounds: a bibliometric review	29
	ARTIGO 2 – Diet with different concentrations of lychee peel flour modulates oxidative stress parameters and antioxidant activity in zebrafish	47
	ARTIGO 3 – Potencial antiobesogênico e antioxidante da farinha de semente de lichia em zebrafish alimentados com dieta hiperlipídica.....	80

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A indústria agroalimentar produz um enorme volume de subprodutos que são considerados um importante problema mundial devido seus efeitos nocivos e impactos ambientais (PAVLIĆ et al., 2023). A valorização de subprodutos da indústria de alimentos tem ganhado visibilidade recentemente, sendo uma importante ferramenta para atender os critérios de sustentabilidade (NIRMAL et al., 2023). As frutas e vegetais são subprodutos da produção agrícola que geram resíduos durante o processamento, distribuição e consumo, e mesmo sendo utilizados como combustível, materiais de construção ou ração animal, ressalta-se que a maior parte é descartada (AQILAH et al., 2023).

Existem muitos subprodutos da indústria alimentícia que demonstraram ter altos atributos nutricionais (LAU; SABRAN; SHAFIE, 2021). Durante a produção de frutas e vegetais muitos resíduos são produzidos, sendo esses subprodutos transformados em novos ingredientes. Os novos ingredientes são fontes de fibras e compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos, esses por sua vez apresentam inúmeros efeitos benéficos, como atividade prebiótica, antioxidante, neuroprotetora, anticarcinogênica e diminuição de riscos cardiovasculares (NÚÑEZ-GÓMEZ; GONZÁLEZ-BARRIO; PERIAGO, 2023).

Os compostos bioativos naturais representam um grupo especial de moléculas de amplo efeito a saúde humana que poderiam ser aplicados em uma diversidade de classes de alimentos, como alimentos funcionais, nutracêuticos, suplementos alimentares, e utilizados como aditivos alimentares propiciando aos consumidores uma alternativa natural e sustentável em detrimento dos produtos sintéticos (VILAS BOAS; PINTADO; OLIVEIRA, 2021).

Um planejamento alimentar direcionado para fontes vegetais oferece uma perspectiva promissora para melhorar a saúde e bem-estar da população global, através dos seus efeitos protetores mediados por compostos bioativos, podendo contribuir para a prevenção de condições fisiológicas como aterosclerose, doenças crônicas não-transmissíveis e síndrome metabólica (PEÑA-JORQUERA et al., 2023).

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) é uma árvore subtropical de porte médio com caule brilhante e acinzentado, pertencente à família Sapindaceae (ZHANG et al., 2021). O pericarpo, polpa e sementes de *Litchi chinensis*, tem sido utilizado no tratamento de doenças na medicina chinesa em virtude de suas propriedades biológicas (ZHAO et al., 2020), se destacando como uma planta medicinal em função de seus efeitos analgésicos, anticâncer, antisséptico,

hipoglicêmico, anti-hiperlipidêmico, antiplaquetário, antipirético, diurético, antiviral e hemostático (UPADHYAYA; UPADHYAYA, 2017). A polpa da lichia detém um cheiro floral e um sabor doce (EMANUELE et al., 2017). No entanto, durante o processamento do fruto ou após o consumo, imensos volumes de cascas e sementes da lichia são obtidos como subprodutos ou partes não comestíveis, que rotineiramente são descartados (CHUKWUMA et al., 2021). Todavia, a lichia é constituída de uma ampla variedade de compostos bioativos na casca, polpa e semente, incluindo flavonoides, antocianinas e ácidos fenólicos (YAO et al., 2021).

Conforme disposto acima, a lichia apresenta uma variedade de compostos bioativos que podem exercer importantes propriedades biológicas. Sendo assim, o modelo experimental zebrafish tem sido alvo de pesquisas com plantas medicinais para a avaliação de toxicidade e no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças em humanos (CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020). O zebrafish é um modelo animal bem mais econômico em comparação com qualquer outro modelo de roedor, além disso, necessita de menos espaço para se abrigar, menor custeio em termos de sua necessidade de alimentação e são fáceis de transportar, principalmente os embriões, entre os laboratórios (CHOWDHURY; SAIKIA, 2022).

Diante do exposto, em um primeiro momento este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de uma dieta rica em carboidratos com diferentes concentrações de farinha da casca de lichia em parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo do metabolismo usando o modelo zebrafish. Adicionalmente, foi induzida a obesidade no zebrafish através de uma dieta com alto teor de gordura contendo diferentes concentrações de farinha da semente de lichia, e avaliado parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo, análise histológica do tecido adiposo e histopatológica do fígado, e regeneração da nadadeira caudal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças crônicas não-transmissíveis e obesidade

No último século, houve um grande impacto no estilo de vida e nos hábitos alimentares da população em todo o mundo (DI DANIELE, 2019). As doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT's) podem ser classificadas em doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças respiratórias crônicas, sendo as principais causas de morte global e correspondendo 74% dos óbitos em todo o mundo (WHO, 2022b). O uso do tabaco, dieta inadequada, falta de atividade física e ingestão excessiva de álcool, são fatores de risco para o desenvolvimento de DCNT's, pois desencadeiam o sobrepeso e obesidade, aumento da pressão arterial e dos níveis de colesterol e, conseqüentemente no desenvolvimento de doenças (WHO, 2022b).

As DCNT's são as principais causas de incapacidade evitável em todo o mundo, expondo homens e mulheres a desigualdades sociais, de gênero e sendo a causa de morte de 70% da população que vive em países de baixa e média renda, além sobrecarregar os sistemas de saúde e governo (WHO, 2022a).

A obesidade é uma doença multifatorial de alta complexidade determinada pelo aumento excessivo da adiposidade, sendo considerada um risco para a saúde (WHO, 2022c). A obesidade está associada a outras doenças, como diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica e esteatose hepática (KOLIAKI; DALAMAGA; LIATIS, 2023).

O Atlas da Federação Mundial de Obesidade de 2023 apresenta uma estimativa a nível mundial de que 4 bilhões de indivíduos poderão estar com sobrepeso ou com obesidade até 2035, quando comparado com mais de 2,6 bilhões em 2020 (WOF, 2023).

Os hábitos alimentares são um dos fatores de risco para o aumento da obesidade. Sendo assim, na meta-análise conduzida por Vitale et al. (2024) foi observada uma associação positiva entre a alta ingestão de alimentos ultraprocessados e um risco aumentado de desenvolver diabetes (37%), hipertensão (32%), hipertrigliceridemia (47%), baixo HDL (43%) e obesidade (32%). Por outro lado, a ingestão de vegetais, frutas, sementes e peixes e/ou suplementos ricos em polifenóis e ácidos graxos poli-insaturados são fortemente relacionados com a diminuição da obesidade e da prevalência de doenças metabólicas associadas (SIROMA et al., 2022).

Evidências sugerem que a utilização dos subprodutos da indústria de alimentos poderiam indicar uma estratégia inovadora para prevenir ou tratar a obesidade e a síndrome metabólica em associação com uma abordagem tradicional, pois nesses subprodutos são encontrados compostos bioativos, como flavanóis, alcaloides, isômeros do ácido linoléico

conjugado, taninos e antocianinas, com propriedades anti-inflamatórias, antiobesogênicas, antioxidantes e sensibilizadores de insulina (JERIA et al., 2023).

2.2 Subprodutos da indústria de alimentos

O setor agroalimentar gera milhões de toneladas de resíduos durante os estágios da produção de alimentos (ČOLOVIĆ et al., 2019). Durante a produção, transporte e o processamento de produtos agrícolas, as empresas agrícolas produzem um número considerável de subprodutos (RADHA et al., 2023). Os subprodutos da indústria alimentícia são compostos de cascas, sementes, folhas e outros fragmentos não comestíveis, que são descartados devido ao seu baixo valor nutricional e a presença de características sensoriais indesejáveis (ČOLOVIĆ et al., 2019). Durante o processamento de produtos de origem animal e vegetal são produzidos volumes significativos de subprodutos agroindustriais, o que torna factível a implementação de estratégias para a conversão em produtos de maior atributo (RADHA et al., 2023).

Nos últimos anos, houve um crescimento na utilização de subprodutos oriundos da agricultura e da fabricação de alimentos. Os subprodutos de frutas e vegetais, incluem casca, grãos, sementes e folhas, e tais partes das plantas podem proporcionar uma infinidade de efeitos benéficos, como propriedades antioxidantes e antimicrobianas, assim como moléculas bioativas que podem ser utilizadas em uma gama de aplicações (AQILAH et al., 2023).

As cascas das frutas são um dos subprodutos descartados durante o consumo (textura áspera e sabor amargo) ou na etapa de fabricação. Além disso, as sementes, só são ingeridas se juntamente com as frutas, como é o caso da melancia e o kiwi. Por outro lado, as sementes maiores são quase sempre descartadas depois que a polpa é consumida (LAU; SABRAN; SHAFIE, 2021).

A grande maioria dos subprodutos da indústria alimentícia gerados durante a industrialização, são dotados de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antibacterianas, e tais características têm incentivado o desenvolvimento de procedimentos para sua valorização, contribuindo assim, para a sustentabilidade desse setor (NIRMAL et al., 2023).

Os subprodutos obtidos de frutas e vegetais, que compreendem partes comestíveis e não comestíveis são constituídos de compostos bioativos, metabólitos secundários, polissacarídeos, enzimas, lipídios, minerais, vitaminas e aminoácidos, entre outros, reconhecidos por deterem propriedades antioxidantes, antimicrobianas ou anti-inflamatórias. Além disso, a composição destes subprodutos oferece uma vasta área de aplicação para produção de produtos de maiores atributos e comercializáveis, como também a priorização de recursos naturais renováveis e

alternativas mais saudáveis aos produtos sintéticos que são altamente nocivos nas áreas de alimentos, saúde, farmacêutica, cosmética e ambiental (BERENGUER et al., 2023).

A inserção de compostos bioativos como suplementos dietéticos advindos da casca de subprodutos da indústria de alimentos diminui o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e distúrbios fisiológicos (RIFNA; MISRA; DWIVEDI, 2023). Segundo Nirmal et al. (2023) alguns subprodutos de frutas contêm maiores teores de compostos bioativos do que a própria fruta *in natura*, entretanto, como são considerados resíduos, rotineiramente são descartados.

O potencial da indústria agroalimentar de reduzir os desperdícios e criar produtos de alto valor tem sido subestimado e negligenciado. A valorização de subprodutos e resíduos através da utilização de seus compostos bioativos tem sido reconhecido como uma forma importante de aumentar a sustentabilidade na produção para criar oportunidades de mercado (PAVLIĆ et al., 2023). Vários compostos químicos oriundos de subprodutos da indústria de alimentos influenciam positivamente a saúde humana, sendo utilizados como nutracêuticos ou para melhorar os parâmetros tecnológicos dos alimentos (MESSINESE et al., 2023).

2.3 Compostos bioativos

Compostos bioativos são substâncias químicas encontradas em alimentos e outras fontes naturais que podem causar efeitos benéficos para a saúde humana (LIU et al., 2023). Tais compostos podem ser incorporados na dieta através dos alimentos ou a base de medicamentos, propiciando efeitos favoráveis na função dos órgãos e sistemas do organismo humano (LEICHTWEIS et al., 2021). Os fitoquímicos são compostos bioativos nutricionais ou não, provenientes de frutas, legumes, cereais e outros alimentos vegetais. Além de serem inseridos na alimentação básica, exercem a função de proteção e manutenção da saúde, pois atuam na diminuição do risco de desenvolvimento de DCNT's. Os principais fitoquímicos encontrados nas plantas são carotenóides, polifenóis, isoprenóides, fitoesteróis, saponinas e polissacarídeos (KUMAR et al., 2023).

O estudo dos compostos bioativos representa uma seção nova e inovadora para área da biotecnologia, proporcionando o aumento da qualidade de vida dos seres humanos. Por meio dos extratos naturais um amplo espectro de compostos bioativos é obtido, e através desses novos produtos, muitas doenças crônicas podem ser aliviadas (VAMANU, 2022).

Os compostos bioativos são fitoquímicos, produzidos a partir do metabolismo primário e secundário de uma célula vegetal que desempenham um papel crucial no crescimento e desenvolvimento vegetal (BANWO et al., 2021).

Os polifenóis ou compostos fenólicos são produtos naturais derivados dos metabólitos secundários de plantas, sendo amplamente subdivididos em ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos e lignanas. Alguns dos compostos fenólicos são responsáveis pelo aroma, cor e propriedades antioxidantes das frutas, legumes, sementes e nozes que ingerimos, além de demonstrar benefícios para a saúde humana (HANO; TUNGMUNNITHUM, 2020).

O consumo frequente de compostos fenólicos presentes nas plantas está associado a um menor risco de desenvolver doenças crônicas, por esta razão, fortes evidências demonstraram que alguns compostos fenólicos apresentam efeito protetor no tratamento e prevenção de DCNT's, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, cânceres e complicações decorrentes da obesidade (ZEKRUMAH et al., 2023).

Evidências científicas comprovaram a eficácia dos compostos bioativos para a saúde através de ensaios experimentais com humanos e animais. A medida que nosso conhecimento acerca da patogênese de doenças associadas a obesidade, doenças neurológicas e envelhecimento aumenta, também cresce o interesse para a identificação de novos compostos bioativos que exerçam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, tornando as pesquisas na área da biomedicina, nutrição e ciência de alimentos crucial para atender essa finalidade (BAEK et al., 2021).

2.4 Estresse oxidativo

Em condições normais, a produção de radicais livres é relativamente baixa e um sistema defesa antioxidante de muita eficiência, remove os radicais que causam deterioração as estruturas e funcionalidades da célula (MEO; VENDITTI; NAPOLITANO, 2022).

Espécies reativas de oxigênio (ERO's) são moléculas que contêm oxigênio, como o radical (ânion superóxido) e não radical (peróxido de hidrogênio) que variam muito em suas capacidades químicas e reatividade química com biomoléculas (KOTHA et al., 2022). Radicais livres derivados do oxigênio (ERO's) são de grande preocupação e relevância para pesquisadores da área da química (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A enzima que protege a célula com seu alto poder antioxidante é a superóxido dismutase (SOD). Ela é uma enzima endógena que participa do primeiro sistema de defesa contra as ERO's. Ela é responsável por catalisar a dismutação de duas moléculas de ânion superóxido ($*O_2$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), fazendo com que o ânion superóxido se torne menos prejudicial ao organismo (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A catalase é uma das enzimas antioxidantes fundamentais para a manutenção da homeostase celular, pois esta decompõe duas moléculas de peróxido de hidrogênio em uma molécula de oxigênio e duas moléculas de água em uma reação de duas etapas (NANDI et al., 2019).

As glutathione-S-transferases (GST's) são um grupo de enzimas de desintoxicação de fase II que catalisam a conjugação da glutathione (GSH) a uma variedade de compostos eletrolíticos endógenos e exógenos. As GST's estão amplamente distribuídas nos seres vivos, desde organismos unicelulares, como bactérias, plantas, animais e humanos. São conhecidas por atuarem no metabolismo endógeno de substâncias importantes, como prostaglandinas e leucotrienos (PRYSYAZHNYUK et al., 2021).

A glutathione (GSH) é conhecida como um tiol não proteico com a principal função de defesa contra o estresse oxidativo, além de ter um papel fundamental na sinalização redox, via de desintoxicação de xenobióticos, modular a atividade de proliferação celular, apoptose, função imunológica e fibrogênese (LU, 2013).

2.5 *Litchi chinensis* Soonerat

Litchi chinensis Soan. (Sapindaceae) popularmente conhecida como lichia é uma fruta tropical e subtropical originário da China e do norte do Vietnã, comercialmente produzido em mais de 20 países, sendo a China o maior produtor, seguido da Índia (PAREEK, 2016). A *L. chinensis* é amplamente consumida nos países asiáticos e exportada para outras partes do mundo devido seu delicioso sabor, notáveis propriedades nutricionais e abundantes atividades biológicas que pode exercer no corpo humano (PUNIA; KUMAR, 2021).

De acordo com Koul e Singh (2017), a *L. chinensis* é uma árvore perene de até 30 metros de altura com tronco atarracado curto. Já as folhas são alternativas e compostas, com dois a cinco folíolos. Os folhetos são oblongos e com 5-15 centímetros de comprimento. As inflorescências são panículas ramificadas, cada uma contendo uma ou mais folhas e até 3.000 flores, formando entre 5-80 frutos na colheita. As flores são pequenas, brancas amareladas, sendo que as flores masculinas possuem entre 6-10 estames. Os frutos são altamente variáveis, apresentando aspecto redondo, oval ou em formato de coração de 2,0 a 3,5 centímetros de diâmetro. A casca pode ter aspecto liso ou áspero com protuberâncias distintas, grossas ou finas com coloração rosa vermelha, vermelho brilhante ou vermelho púrpura. O arilo é geralmente branco translúcido, suculento ou firme, e doce e aromático. A fruta apresenta uma única

semente marrom-escura com 6-12 milímetros de largura e 10-23 milímetros de comprimento (KOUL; SINGH, 2017).

A lichia é uma fruta muito famosa no Sul na China e utilizado na medicina tradicional chinesa por longos anos. A polpa, casca e raiz são componentes utilizados para fins medicinais. Na medicina popular chinesa é utilizada para tontura, dor no peito, irritabilidade, flatulência, dor epigástrica, dor nevralgica, dor de dente, hérnia, inchaço no testículo, obesidade, tosse, sangramento e eczema (CHEN et al., 2017).

Estudos etnofarmacológicos têm reportado importantes atividades biológicas da *L. chinensis*, demonstrando considerável atividade antioxidante, efeito hipoglicemiante, hepatoprotetor, atividade anticarcinogênica, hipolipemiante e antiobesidade (IBRAHIM; MOHAMED, 2015; ZHAO et al., 2020).

A aplicação de extratos utilizando diferentes solventes e partes do fruto da lichia tem sido investigado como agentes terapêuticos para tratar várias doenças crônicas *in vitro* e/ou *in vivo*, como diabetes, hipertensão, hiperglicemia, hiperlipidemia, aterosclerose e câncer (YAO et al., 2021).

A casca e a semente da lichia, assim como seus compostos isolados, apresentaram atividade antidiabética, melhorando o controle glicêmico e sinalização insulínica. Os subprodutos da lichia foram eficazes em conter a hipercolesterolemia, reduzindo o perfil sérico de lipídios do sangue. A atividade anti-inflamatória, antioxidante e proliferação tecidual são propriedades da casca e das sementes de lichia que atuam nos efeitos neuroprotetores, cardioprotetores, renal e hepatoprotetor (CHUKWUMA et al., 2021).

A semente de lichia provou ser um ingrediente atrativo para o desenvolvimento de alimentos funcionais em função de suas características nutracêuticas e composição fitoquímica. Contudo, propriedades anticarcinogênicas, anti-hiperglicêmica, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antiobesogênica e anti-inflamatória foram comprovadas através de ensaios utilizando a semente de lichia (PUNIA; KUMAR, 2021). Queiroz et al. (2018) realizaram um estudo utilizando a farinha da casca da lichia nas concentrações de 5 e 10%, que foi adicionada a dieta hiperlipídica de ratos *Wistar* albinos, com o objetivo de avaliar o perfil lipídico e outros indicadores relacionados à obesidade. A farinha da casca de lichia reduziu a glicemia de ratos que receberam dieta com alto teor de gordura, além de apresentar atividade hipolipemiante (QUEIROZ et al., 2018).

A polpa da lichia é constituída principalmente de carboidratos, lipídios, proteínas, aminoácidos, fenóis, pectinas, minerais e vitaminas (PAREEK, 2016). O teor de açúcar da lichia apresenta uma alteração de acordo com a variedade da cultivar. Dependendo da cultivar e clima,

a fruta pode conter aproximadamente 60% de suco, 8% de bagaços, 19% de semente e 13% de casca. Em relação aos nutrientes, a lichia é composta por proteínas, gorduras, carboidratos, minerais, fibras, cálcio, fósforo, ferro e caroteno, além de ser rica em tiamina, riboflavina e vitamina C (KOUL; SINGH, 2017). O fruto *in natura* fornece cerca de 72 mg de vitamina C por 100 g da fruta, um valor que representa 86% do valor diário. Em média, ao consumir nove lichias um adulto conseguirá atender a recomendação diária de vitamina C. Além disso, uma porção de 100 g de lichia *in natura*, contém aproximadamente 7% de cobre, 4% de fósforo, 4% potássio, baixo teor de gordura e sódio (baseado em uma dieta de 2000 calorias) (KILARI; PUTTA, 2016).

Com a finalidade de determinar o perfil fitoquímico, uma análise qualitativa demonstrou uma baixa presença de alcaloides, antraquinonas e cumarinas na casca da lichia, no entanto, saponinas, taninos e triterpenoides foram encontrados em média quantidade (CONTRERAS-CASTRO et al., 2022).

As folhas, pericarpo, polpa e as sementes de lichia são importantes fontes de diferentes compostos fenólicos. Os principais compostos fenólicos reportados em diferentes partes da lichia foram proantocianidinas, antocianinas, flavonas, flavonóis, flavanonas e ácidos fenólicos (UPADHYAYA; UPADHYAYA, 2017).

L. chinensis é dotada de uma gama de compostos bioativos, como antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, lignanas, cumarinas e ésteres (CAO et al., 2020). Entre os compostos químicos já identificados na lichia, destacam-se os flavonoides e suas subclasses flavanóis, flavonóis e flavanonas. Os flavanóis são principalmente encontrados na semente e no pericarpo, sendo representado pelos compostos (epi)catequina e proantocianidinas tipo A/tipo B. Com relação a polpa, seguida da semente e do pericarpo, os flavonóis mais abundantes são representados pelos glicosídeos de quercetina, kaempferol e isorhamnetina. Na subclasse de flavanonas, pinocembrina e naringenina são os compostos mais abundantes na semente da lichia. Já no pericarpo são encontradas antocianinas, como, cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinósido, responsáveis pela coloração da casca. Em adição, compostos fenólicos, sesquiterpenos, triterpenos e lignanas constituem outras classes de compostos bioativos presentes no pericarpo e semente de lichia (YAO et al., 2021).

A casca da lichia é dotada de compostos fenólicos de estrutura orto-difenólica, lhe conferindo quatro pigmentos principais, como cianidina 3-rutinosídeo, cianidina glicosídeo, quercetina 3-rutinósido (rutina) e glicosídeo de quercetina (PAREEK, 2016).

Já foram reportados a presença de 96 compostos voláteis na lichia, sendo os mais comuns o linalol, *cis*-óxido de rosa, α -terpineol, β -citronelol, geraniol, p -cimeno, etanol, 3-

metil-3-buten-1-ol, 3-metil-2-buten-1-ol, 1-hexanol, (E)-2-hexen-1-ol, 2-etil-1-hexanol, 1-octen-3-ol, 1-octanol, acetato de etila, ρ , α -dimetilestireno e 3-terc-butil-4-hidroxianisol (PAREEK, 2016).

A lichia e seus compostos bioativos identificados demonstraram importantes aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e química, principalmente quando se trata de seus subprodutos casca e sementes, que detém de uma rica fonte de polifenóis e são sempre rejeitados, gerando enormes perdas e desperdícios. Ademais, a lichia é amplamente consumida globalmente e utilizada na medicina desde muitos anos (ZHAO et al., 2020).

2.6 O modelo zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish é um animal pequeno, mas robusto para ser utilizado como modelo animal, além disso, apresenta versatilidade para adoção de novas técnicas, tecnologias e campos de estudo (HORZMANN; FREEMAN, 2018). O zebrafish é uma das espécies de peixes mantidas em laboratórios amplamente utilizadas em pesquisas mundialmente, sendo uma espécie versátil para condução de estudos em várias áreas, como na biomedicina, genética, desenvolvimento biológico, farmacologia, toxicologia, fisiologia e evolução (SUNDIN et al., 2019). Além de ser considerado um modelo experimental econômico quanto a instalação e manutenção do local de execução do experimento quando comparado aos modelos de mamíferos (SARASAMMA et al., 2017).

Além de ser muito utilizado em pesquisas de toxicidade, há evidências da utilização do zebrafish em pesquisas para a avaliação de ingredientes bioativos em alimentos, já que o efeito destes compostos pode exercer importantes funcionalidades para o organismo humano, haja vista as diversas semelhanças entre o zebrafish e o ser humano já descritas (CARO et al., 2016). O zebrafish também consolidou sua aplicabilidade em estudos voltados para a área de propriedades antioxidantes, imunomodulação, atividade antiangiogênica, neuroproteção, síndrome metabólica e doença dos ossos (CARO et al., 2016).

Uma das vantagens da utilização do zebrafish é contribuir significativamente para o princípio dos três R's (*Replacement*-Substituição; *Reduction*-Redução; e *Refinement*-Refinamento) da humanização da experimentação animal (VAN de VENTER et al., 2021).

Segundo Sarasamma et al. (2017), o zebrafish é um modelo animal de referência para pesquisas devido a quatro características, sendo: (1) as larvas do zebrafish apresentam cor transparente, onde o período de fecundação dos ovos ocorre rapidamente e os embriões podem ser visualizados até o início do estágio larval, sendo assim, as células, órgãos e tecidos podem

ser facilmente visualizados *in vivo* e podem ser monitorados em tempo real; (2) o zebrafish apresenta alta fecundidade e embriogênese relativamente rápida, onde os embriões podem ser utilizados em estudos nas etapas de desenvolvimento, determinação do ciclo celular, organogênese e desenvolvimento neuronal; (3) o zebrafish é adequado para pesquisas de biologia molecular e expressão gênica por meio da rápida determinação da expressão espacial de um gene; e (4) embriões de zebrafish apresentam rápido desenvolvimento de um determinado órgão (geralmente menos de uma semana), como os principais órgãos do sistema cardiovascular, nervoso e digestivo.

Para manter um ambiente de pesquisa saudável, é crucial monitorar regularmente parâmetros como pH, temperatura, e qualidade da água (AVDESH et al., 2012). A alimentação e a reprodução também são fatores críticos a serem considerados, especialmente dado que um único casal pode produzir entre 100 a 300 embriões por ninhada (GOLDSMITH; JOBIN, 2012).

A utilização do modelo zebrafish em pesquisas no Brasil tem crescido gradativamente com o decorrer dos anos, sendo a primeira pesquisa realizada no ano de 1996 e já em 2019 foram publicados 573 artigos envolvendo pesquisas com o zebrafish (TRIGUEIRO et al., 2020). Ressalta-se que no Brasil a segunda maior área de pesquisa com o zebrafish é a farmacologia e toxicologia, o que de fato faz com que a produção de artigos brasileira tenha despertado o desenvolvimento de vários fármacos e possíveis tratamentos de grande importância global (TRIGUEIRO et al., 2020).

2.6.1 Dietas com alto teor de gordura para o zebrafish e utilização de plantas medicinais

De acordo com o experimento conduzido por Meguro, Hasumura e Hase (2015) zebrafish machos e fêmeas adultos foram separados de acordo com o sexo em dois grupos: grupo dieta com alto teor de gordura (HF2) e grupo HF2 + 5% de extrato de chá verde (peso/peso). Os animais receberam durante seis semanas a ração padrão para zebrafish Otohime B2, sendo que os zebrafish fêmeas receberam 80 mg (HF2) e 84 mg (HF2 + extrato de chá verde) duas vezes ao dia e os zebrafish machos receberam metade da quantidade da dieta (MEGURO; HASUMURA; HASE, 2015). Entre os resultados encontrados, não foram observadas diferenças entre grupos do mesmo sexo em relação a ingestão média de energia, além disso, tanto em zebrafish fêmeas quanto em machos, o peso corporal foi significativamente menor naqueles alimentados com dieta HF2 + extrato de chá verde quando comparado com aqueles alimentados com a dieta HF2. Nos zebrafish fêmeas a gordura corporal visceral, subcutânea e total e as proporções do volume de gordura corporal foram

significativamente menores nos peixes alimentados com a dieta HF2 + extrato de chá verde quando comparado aos alimentados com a dieta HF2. O resultado semelhante foi encontrado em zebrafish machos, exceto em relação ao volume de gordura corporal subcutânea que foi semelhante entre os dois grupos (MEGURO; HASUMURA; HASE, 2015).

No estudo conduzido por Wu et al. (2021), o extrato com as folhas de *Momordica charantia* foi utilizado para avaliar o efeito lipogênico. Os zebrafish foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: dieta normal, dieta rica em gordura (HFD), HFD + 10 µg do extrato e HFD + 20 µg do extrato. O grupo que se alimentava com a dieta normal recebia diariamente 26 mg de ração floculada e os grupos HFD recebiam 13 mg de artêmia + 13 mg de ração floculada por oito semanas (WU et al., 2021). Os resultados demonstraram que os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total diminuíram significativamente independente da dose nos grupos tratados com o extrato, o que evidencia que o extrato de *Momordica charantia* mostrou potencial efeito para diminuir a hiperlipidemia quando comparada a uma dieta HFD (WU et al., 2021).

Xiang et al. (2022) conduziram um estudo utilizando a semente da lichia utilizando uma ração comercial (SYSE Bio-tecnologia Co., Ltd (Changzhou, China) e a dieta HFD, que por sua vez, foi suplementada com 8% de banha de porco na ração comercial e a indução de obesidade ocorreu por oito semanas. Os grupos foram tratados duas vezes ao dia, sendo: com a lichia em pó (1,4 mg por peixe/dia), extrato etanólico da semente de lichia (0,35 mg por peixe/dia) e extrato aquoso de semente de lichia (42 mg L⁻¹ – administrado em banho maria) (XIANG et al., 2022). O resultados mostraram que o grupo HFD apresentou um aumento significativo no peso corporal, ganho de peso e Índice de Massa Corporal quando comparado ao grupo controle, além disso, a administração da semente de lichia em pó inibiu significativamente o ganho de peso do zebrafish, como também, o grupo que recebeu o extrato etanólico da semente de lichia apresentou menor peso que o peso inicial (XIANG et al., 2022).

No estudo de Ghaddar et al. (2022) foi utilizado o extrato aquoso de *Psiloxylon mauritianum* para prevenção da obesidade e suas complicações associadas. Zebrafish adultos foram divididos em três grupos: controle, indução de obesidade (DIO), DIO + 0,25 g/L de *Psiloxylon mauritianum*. O grupo controle recebia diariamente 15 mg/peixe/dia de ração comercial e 6 mg/peixe/dia de artêmia fresca, já os grupos DIO e DIO + *P. mauritianum* eram alimentados seis vezes ao dia com 52,5 mg/peixe/dia de ração seca e três vezes ao dia com 30 mg/peixe/dia de artêmia fresca (GHADDAR et al., 2022). A intervenção com o extrato aquoso de *Psiloxylon mauritianum* era adicionado nos aquários as 18:00 horas e era mantido até as 08:00 do dia posterior, e o experimento teve duração de quatro semanas (GHADDAR et al.,

2022). Os resultados apontaram que o extrato aquoso de *P. mauritianum* exibiu efeito protetor contra ganho de peso, aumento do Índice de Massa Corporal, hiperglicemia e exerceu um efeito preventivo sobre o acúmulo de lipídios no fígado em comparação com o grupo DIO (GHADDAR et al., 2022).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A casca e semente da lichia são um subproduto da indústria alimentícia que possuem abundantes quantidades de compostos bioativos que podem ser utilizados como suplemento alimentar ou alimento funcional, principalmente devido sua poderosa propriedade antioxidante.

O zebrafish tem se consolidado como um modelo para o estudo da obesidade e síndrome metabólica. A utilização de extratos de plantas medicinais como forma de prevenção da obesidade e síndrome metabólica utilizando o modelo zebrafish é uma forma eficaz de explorar os recursos naturais em benefício da saúde e se faz necessário para o desenvolvimento de fitoterápicos como tratamento adjuvante e/ou para substituir as drogas sintéticas.

REFERÊNCIAS

'AQILAH, N. M. N. et al. A review on the potential bioactive components in fruits and vegetable wastes as value-added products in the food industry. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2631, 2023.

AVDESH, A. et al. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. **Journal of Visualized Experiments**, v. 69, p. 1-8, 2012.

BAEK, S. J. et al. Natural products in the prevention of metabolic diseases: lessons learned from the 20th KAST frontier scientists workshop. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 1881, 2021.

BANWO, K. et al. Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101320, 2021.

BERENGUER, C. V. et al. Current challenges in the sustainable valorisation of agri-food wastes: a review. **Processes**, v. 11, n. 1, p. 20, 2022.

CAO, S. et al. Mapping pharmacological network of multi-targeting litchi ingredients in cancer therapeutics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 451, 2020.

CARO, M. et al. Zebrafish dives into food research: Effectiveness assessment of bioactive compounds. **Food & function**, v. 7, n. 6, p. 2615-2623, 2016.

CHAHARDEHI, A. M.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. **Plants**, v. 9, n. 1345, p. 1-34, 2020.

CHEN, Y. et al. Anti-myocardial ischemia effect and components of litchi pericarp extracts. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 9, p. 1384-1391, 2017.

CHOWDHURY, S.; SAIKIA, S. K. Use of zebrafish as a model organism to study oxidative stress: a review. **Zebrafish**, v. 19, n. 5, p. 165-176, 2022.

CHUKWUMA, C. I. et al. A review on the medicinal potential, toxicology, and phytochemistry of litchi fruit peel and seed. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 12, 2021.

ČOLOVIĆ, D. et al. Plant food by-products as feed: characteristics, possibilities, environmental benefits, and negative sides. **Food Reviews International**, v. 35, n. 4, p. 363-389, 2019.

CONTRERAS-CASTRO, A. I. et al. Chemical Characterization and Evaluation of the Antihyperglycemic Effect of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Brewster. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 1, p. 61-69, 2022.

DI DANIELE, N. The role of preventive nutrition in chronic non-communicable diseases. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1074, 2019.

DI MEO, S.; VENDITTI, P.; NAPOLITANO, G. Physiological and Pathological Role of ROS: Benefits and Limitations of Antioxidant Treatment 2.0. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9437, 2022.

EMANUELE, S. et al. *Litchi chinensis* as a functional food and a source of antitumor compounds: an overview and a description of biochemical pathways. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 992, 2017.

GHADDAR, B. et al. Aqueous Extract of *Psiloxylon Mauritianum*, Rich in Gallic Acid, Prevents Obesity and Associated Deleterious Effects in Zebrafish. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, p. 1309, 2022.

GOLDSMITH, J. R.; JOBIN, C. Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

HANO, C.; TUNGMUNNITHUM, D. Plant polyphenols, more than just simple natural antioxidants: Oxidative stress, aging and age-related diseases. **Medicines**, v. 7, n. 5, p. 26, 2020.

HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v.163, n. 1, p. 5-12, 2018.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

JERIA, N. et al. Beneficial Effects of Bioactive Compounds Obtained from Agro-Industrial By-Products on Obesity and Metabolic Syndrome Components. **Food Reviews International**, v. 39, n. 7, p. 3753-3782, 2023.

KILARI, E. K.; PUTTA, S. Biological and phytopharmacological descriptions of *Litchi chinensis*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 19, p. 60, 2016.

KOLIAKI, C.; DALAMAGA, M.; LIATIS, S. Update on the Obesity Epidemic: After the Sudden Rise, Is the Upward Trajectory Beginning to Flatten? **Current Obesity Reports**, v. 12, n. 4, p. 514-527, 2023.

KOTHA, R. R. et al. Oxidative stress and antioxidants—A critical review on in vitro antioxidant assays. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2388, 2022.

KOUL, B.; SINGH, J. Lychee Biology and Biotechnology. In: KUMAR, M.; KUMAR, V.; PRASAD, R.; VARMA, A. (org.). **The Lychee Biotechnology**. Springer: Singapore, 2017.

KUMAR, A. et al. Major phytochemicals: Recent advances in health benefits and extraction method. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 887, 2023.

LAU, K. Q.; SABRAN, M. R.; SHAFIE, S. R. Utilization of vegetable and fruit by-products as functional ingredient and food. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 661693, 2021.

LEICHTWEIS, M. G. et al. Sustainable recovery of preservative and bioactive compounds from food industry bioresidues. **Antioxidants**, v. 10, n. 11, p. 1827, 2021.

LIU, Z. et al. Valorization of Food Waste to Produce Value-Added Products Based on Its Bioactive Compounds. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 840, 2023.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, 2013.

MEGURO, S.; HASUMURA, T.; HASE, T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015.

MESSINESE, E. et al. By-Products as Sustainable Source of Bioactive Compounds for Potential Application in the Field of Food and New Materials for Packaging Development. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1-22, 2023.

NANDI, A. et al. Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 11, 9613090, 2019.

NIRMAL, N. P. et al. Valorization of Fruit Waste for Bioactive Compounds and Their Applications in the Food Industry. **Foods**, v. 12, n. 3, p. 556, 2023.

NÚÑEZ-GÓMEZ, V.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; PERIAGO, M. J. Interaction between dietary fibre and bioactive compounds in plant by-products: impact on bioaccessibility and bioavailability. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 976, 2023.

PAREEK, S. Nutritional and Biochemical Composition of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) Cultivars. IN. SIMMONDS, M. S. J.; PREEDY, V. R. (org.). **Nutritional Composition of Fruit Cultivars**. Academic Press, 2016. Cap. 17, p. 395-418.

PAVLIĆ, B. et al. Sustainable raw materials for efficient valorization and recovery of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 193, p. 116167, 2023.

PEÑA-JORQUERA, H. et al. Plant-Based Nutrition: Exploring Health Benefits for Atherosclerosis, Chronic Diseases, and Metabolic Syndrome—A Comprehensive Review. **Nutrients**, v. 15, n. 14, p. 3244, 2023.

PRYSYAZHNYUK, V. et al. Glutathione-S-transferases genes-promising predictors of hepatic dysfunction. **World Journal of Hepatology**, v. 13, n. 6, p. 620, 2021.

PUNIA, S.; KUMAR, M. Litchi (*Litchi chinensis*) seed: Nutritional profile, bioactivities, and its industrial applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 58-70, 2021.
QUEIROZ, E. R. et al. Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) peel flour: effects on hepatoprotection and dyslipidemia induced by a hypercholesterolemic diet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 267-281, 2018.

RADHA, A. et al. The way forward to produce nutraceuticals from agri-food processing residues: obstacle, solution, and possibility. **Journal of Food Science and Technology**, 2023.

RIFNA, E. J.; MISRA, N. N.; DWIVEDI, M. Recent advances in extraction technologies for recovery of bioactive compounds derived from fruit and vegetable waste peels: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 719-752, 2023.

SARASAMMA, S. et al. Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario. **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 589-605, 2017.

SIROMA, T. K. et al. Polyphenols and ω -3 PUFAs: Beneficial outcomes to obesity and its related metabolic diseases. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 781622, 2022.

SUNDIN, J. et al. On the Observation of Wild Zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 16, n. 6, p. 546-553, 2019.

TRIGUEIRO, N. S. S. et al. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish**, v. 17, n. 6, p. 412-425, 2020.

UPADHYAYA, D. C.; UPADHYAYA, C. P. **Bioactive Compounds and Medicinal Importance of *Litchi chinensis***. In: Kumar, M. (Ed.). *The Lychee Biotechnology* (pp. 333–361). Springer: Singapore, 2017.

VAMANU, E. Bioactive compounds from natural products: separation, characterization, and applications. **Applied Sciences**, v. 12, n. 8, p. 3922, 2022.

VAN DE VENTER, M. et al. Wild-Type Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae as a Vertebrate Model for Diabetes and Comorbidities: A Review. **Animals**, v. 11, n. 54, p. 1-21, 2021.

VILAS-BOAS, A. A.; PINTADO, M.; OLIVEIRA, A. L. S. Natural bioactive compounds from food waste: toxicity and safety concerns. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1564, 2021.

VITALE, M. et al. Ultra-Processed Foods and Human Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. **Advances in Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 100121, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health literacy development for the prevention and control of noncommunicable diseases: Volume 1. Overview**. Geneva: World Health Organization; 2022a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Noncommunicable diseases progress monitor 2022**. Geneva: World Health Organization; 2022b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO European Regional Obesity Report 2022**. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022c.

WORLD OBESITY FEDERATION. **World Obesity Atlas 2023**. London: World Obesity Federation; 2023.

WU, S. et al. *Momordica charantia* leaf extract reduces hepatic lipid accumulation and diet-induced dyslipidemia in zebrafish through lipogenesis and beta-oxidation. **Journal of Functional Foods**, v. 87, p. 104857, 2021.

XIANG, J. Y. et al. *Litchi chinensis* seed prevents obesity and modulates the gut microbiota and mycobiota compositions in high-fat diet-induced obese zebrafish. **Food & Function**, v. 13, n. 5, p. 2832-2845, 2022.

YAO, P. et al. Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A comprehensive review of phytochemistry, medicinal properties, and product development. **Food & Function**, v. 12, n. 20, p. 9527-9548, 2021.

ZEKRUMAH, M. et al. Role of dietary polyphenols in non-communicable chronic disease prevention, and interactions in food systems: An overview. **Nutrition**, v. 112, p. 112034, 2023.

ZHANG, Y. et al. Lychee seed as a potential hypoglycemic agent, and exploration of its underlying mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 73780, 2021.

ZHAO, L. et al. Nutrient components, health benefits, and safety of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2139-2163, 2020.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 – Zebrafish and bioactive compounds: a bibliometric review

Artigo elaborado conforme as normas NBR 6022 (ABNT 2018)

ABSTRACT

Bibliometrics has become a fundamental tool to evaluate and analyze the production of researchers. In the last decades, zebrafish has been used in the area of biology and medicine, demonstrating its potential to study disorders related to oxidative stress and the use of medicinal plants has been essential to achieve this purpose, since they are endowed with bioactive compounds with antioxidant properties. Thus, the objective of the study was to perform a bibliometric review to analyze the evolution of the publications of the concepts “zebrafish” and “bioactive compounds”. The Web of Science (WoS) database was used. Data on authors, countries, most cited journals, co-authorship between countries and authors, co-occurrence of keywords, co-occurrence of keywords based on the year of publication and co-citation of references were analyzed using the VOSviewer software. A total of 140 documents were retrieved, equivalent to the year 2004 and 2023. Jean Luc Wolfender, United States and Plos One stand out among the author, country and journal with the most citations, respectively. Among the co-occurrence of keywords, the highlights were: zebrafish (n=52), bioactive compounds (n=8), antioxidant (n=7), oxidative stress (n=7), anti-inflammatory (n=6) and toxicity (n=6). It is concluded that in the year 2022 the highest number of documents published was observed. In addition, there was a growth from the year 2019 of researches with the use of the zebrafish model and bioactive compounds, in which we can observe the evidence of the Pharmacy/Pharmacology area for the development of new drugs, where we have a very strong appeal for the use of medicinal plants.

Keywords: *Danio rerio*. Natural products. Secondary metabolites. Plants.

1. INTRODUCTION

The zebrafish is a small animal, but endowed with a robust organism to be used as an animal model, besides, it presents versatility for the adoption of new techniques, technologies and fields of study (HORZMANN; FREEMAN, 2018). The zebrafish is a much more economical animal model compared to any other rodent model, besides, it requires less space to shelter, lower cost in terms of its feeding needs and are easy to transport, especially the embryos, between the laboratories (CHOWDHURY; SAIKIA, 2022).

In the last decades, the zebrafish has been used in the area of biology and medicine, and the insertion of the model in this field was due to different reasons: (i) ideal size for microscopic visualization; (ii) potential for genetic manipulation and transparency of its embryos; and (iii) genetic similarity with the human species. In addition, several natural and synthetic drugs were tested on the zebrafish demonstrating its potential to study disorders related to oxidative stress (ABBATE et al., 2021).

Plants are endowed with various bioactive compounds (phytochemicals, aromas, pigments, essential oils and nutraceuticals), which are extensively used in different departments (pharmaceutical and food) (ZIA et al., 2022). The bioactive compounds derived from plants are known as secondary metabolites from plant metabolism, such metabolites have important characteristics, presenting promising therapeutic properties, mainly antioxidant properties (SAMTIYA et al., 2021). Due to the increasing demand for the use of bioactive compounds in the pharmaceutical, food, nutraceutical, cosmetic and agricultural sectors, the extraction of bioactive compounds from plant sources has become a matter of interest for the scientific community (FUAD; NADZIR; KAMARUDDIN, 2021).

Bibliometrics has become a primordial instrument to evaluate and analyze the production of researchers, the cooperation between universities, the support of state funding in science, the development of research and educational efficiency, among other applications (MORAL-MUÑOZ et al., 2020). Carefully conducted bibliometric research can contribute to the advancement of a certain area in a significant way, as it enables researchers to (1) achieve a unique overview, (2) detect gaps in knowledge, (3) acquire new ideas for investigation and (4) position their planned contributions to the study area (DONTHU et al., 2021).

A very useful tool in bibliometrics is the use of the VOSviewer software. VOSviewer is a program developed to construct and visualize bibliometric maps, such software can be used to create maps of authors or journals using co-citation data or create maps of keywords using

co-occurrence data. The software provides a high-quality visualization, thus, the bibliometric maps can be examined in detail (VAN ECK; WALTMAN, 2010).

Given the above, the objective of the study was to conduct a bibliometric review to analyze the evolution of the publications of the concepts “zebrafish” and “bioactive compounds”.

2. METHODS

This research focused on the identification of bibliometric descriptors, using the Web of Science (WoS) database with the descriptors “zebrafish” AND “bioactive compounds” in English. The research was conducted on November 14, 2023 by JLPO and WFC, the preliminary search required consensus among the researchers to proceed. Thus, a file in TXT format “full record and cited references” was exported and imported to the VOSviewer software version 1.6.18 (LIN; WANG; HUANG, 2023). The analyses were performed in two phases, data on years of publication, top 10 research areas, top 10 institutions and top 10 most cited articles were analyzed using the data available in WoS. Data on authors, countries, most cited journals, co-authorship between countries and authors, co-occurrence of keywords, co-occurrence of keywords based on year of publication and co-citation of references were analyzed through the VOSviewer software version 1.6.18. Original articles were included in the analyses and review articles, early access papers and abstracts submitted to congresses were excluded. The data collection flowchart is shown in Figure 1.

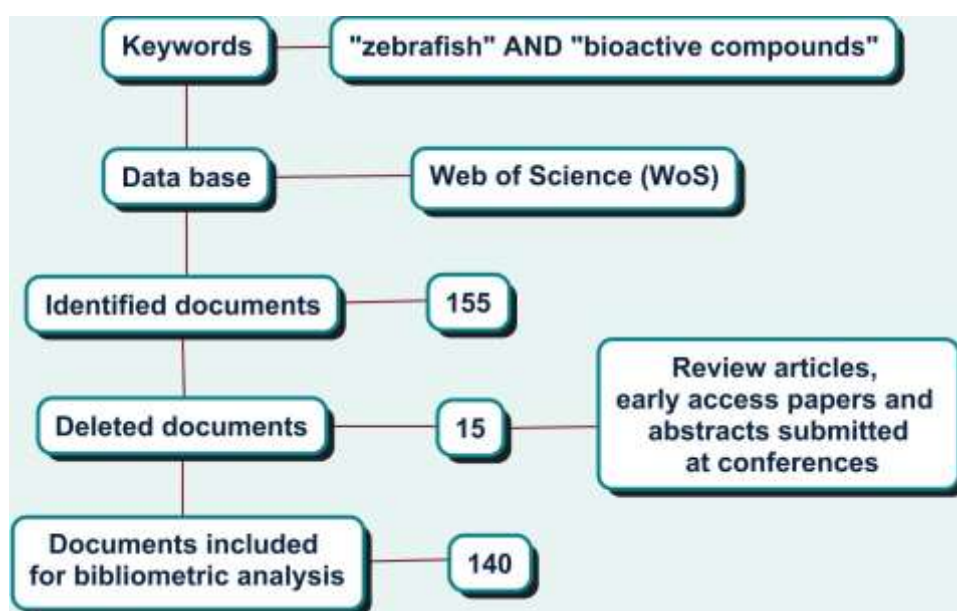


Figure 1 - Data collection flowchart

3. RESULTS

Figure 2 shows the data related to the publication of documents equivalent to the period from 2004 to 2023. The first document related to the theme of zebrafish and bioactive compounds was published in 2004 (n=1), and from 2020 (n=21) there was a greater growth of research on the theme, reaching its highest peak in 2022 (n=31).

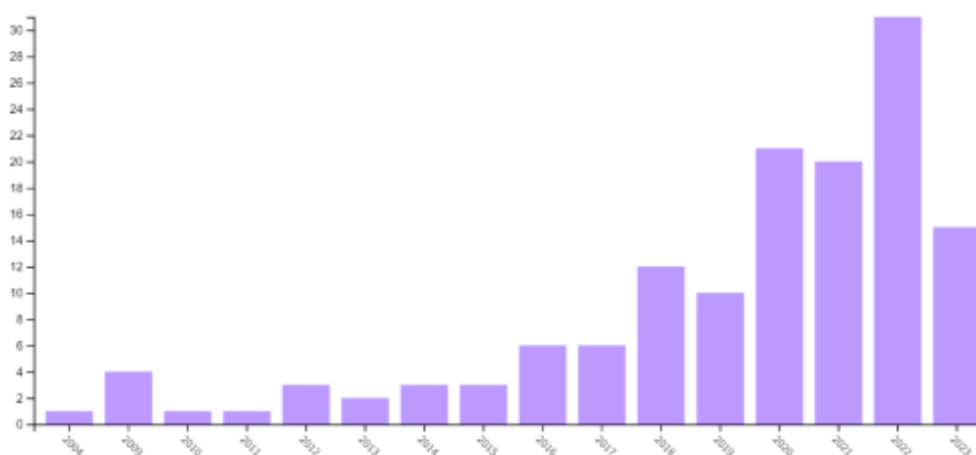


Figure 2 - Publication of documents on zebrafish and bioactive compounds

Figure 3 shows the top 10 knowledge areas defined by WoS that publish the most documents associated with zebrafish and bioactive compounds. It is evident that the area of Pharmacology Pharmacy leads (n=31), followed by Biochemistry Molecular Biology (n=22), on the other hand, the areas of Pant Sciences (n=9), Nutrition Dietetics (n=8) and Marine freshwater Biology (n=7) were less representative in this aspect.



Figure 3 - Top 10 documents published by knowledge areas

In Figure 4 we can observe that there is not a very large discrepancy between the number of documents published when we compare among the institutions (n=3 to 5). However, it is worth noting that Figure 3 shows two Brazilian institutions (Federal University of Ceará/n=5 and State University of Ceará/n=4) referring to the production of documents originating from the theme of zebrafish and bioactive compounds.



Figure 4 - Relevant institutions publishing in the area of zebrafish and bioactive compounds

As shown in Table 1, the most cited document is authored by Wolman et al. (2011) with accumulates 123 citations. It is worth noting that the first document identified was published in

2004 by Behra et al. (2004) with 49 citations. Finally, the most recent document, from this list belongs to the collaborators Guru et al. 2021 with 47 citations.

Table 1 - Top 10 most cited documents related to zebrafish and bioactive compounds

Document title	Authors	Journal Title	Year of Publication	Citations
Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish	Wolman et al. (2011)	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	2011	123
Identification of FDA-Approved Drugs and Bioactives that Protect Hair Cells in the Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) Lateral Line and Mouse (<i>Mus musculus</i>) Utricle	Ou et al. (2009)	JARO-Journal of the Association for Research in Otolaryngology	2009	87
Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> and <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , to the zebrafish (<i>Danio rerio</i>) embryos	Berry et al. (2009)	Toxicon	2009	73
An in vivo chemical library screen in <i>Xenopus</i> tadpoles reveals novel pathways involved in angiogenesis and lymphangiogenesis	Kälin et al. (2009)	Blood	2009	56
The use of zebrafish mutants to identify secondary target effects of	Behra et al. (2004)	Toxicological Sciences	2004	49

acetylcholine esterase inhibitors Bruton's Tyrosine Kinase Revealed as a Negative Regulator of Wnt- β -Catenin Signaling	James et al. (2009)	Science Signaling	2009	48
Intracellular ROS scavenging and antioxidant regulation of WL15 from cysteine and glycine-rich protein 2 demonstrated in zebrafish in vivo model	Guru et al. (2021)	Developmental and Comparative Immunology	2021	47
Mesoporous silica nanoparticles as a compound delivery system in zebrafish embryos	Sharif et al. (2012)	International Journal of Nanomedicine	2012	47
Gender-Specific Toxicological Effects of Chronic Exposure to Pure Microcystin-LR or Complex Microcystis aeruginosa Extracts on Adult Medaka Fish	Le Manach et al. (2016)	Environmental Science & Technology	2016	46
Zebrafish Bioassay-Guided Microfractionation Identifies Anticonvulsant Steroid Glycosides from the Philippine Medicinal Plant <i>Solanum torvum</i>	Challal et al. (2014)	ACS Chemical Neuroscience	2014	45

According to Table 2, the author with the highest number of published documents and citations is Jean Luc Wolfender (n=5; 128), followed by Alexander D. Crawford (n=4; 126). Regarding the most influential countries in the number of published documents, we have China

that ranks first (n=27), however, in terms of citations, the United States is in first place overall (496). It is important to highlight Brazil in third place with expressive 15 published documents and Germany in tenth place (n=8; 236), but with a significant volume of citations. The journals with the most published documents are Plos one (n=6; 120), Frontiers in Pharmacology (n=5; 56) and International Journal of Molecular Sciences (n=5; 53), on the other hand, the journal Chemosphere ranks ninth in publication of documents (n=2; 61), but in relation to the number of citations there is a relevant difference when compared to position two and three of the ranking.

Table 2 - Top 10 most influential authors, countries and journals on the subject based on the number of citations

Items	Ranking	Variables	Documents (n)	Citations
Authors	1	Jean Luc Wolfender	5	128
	2	Alexander D. Crawford	4	126
	3	Franciso Ernani Alves Magalhães	4	40
	4	Saima Rehman	4	3
	5	Vismanath Kiron	4	3
	6	Jorge M. O. Fernandes	4	3
	7	Camila V. Esguerra	3	109
	8	Peter A. M. de Witte	3	109
	9	Laurence Marcourt	3	103
	10	Klara Hilscherova	3	93
Countries	1	China	27	186
	2	United States	15	496
	3	Brazil	15	113
	4	Italy	12	158
	5	Portugal	12	110
	6	Spain	11	74
	7	Switzerland	10	226
	8	South Korea	10	125
	9	India	10	64
	10	Germany	8	236
Journals	1	Plos One	6	120
	2	Frontiers in Pharmacology	5	56
	3	International Journal of Molecular Sciences	5	53
	4	Marine Drugs	5	24
	5	Frontiers in Nutrition	4	11
	6	Scientific Reports	3	32
	7	Plants-Basel	3	22
	8	Molecules	3	8
	9	Chemosphere	2	61
	10	International Journal of Nanomedicine	2	48

A total of 50 countries were identified, of which a country should have at least three published documents. For better visualization of the data, 29 countries met the criterion (Figure 5) and it was possible to observe the formation of five clusters. China (n=27), United States (n=15) and Brazil (n=15) are the countries that collaborate the most with the research from the point of view of the analysis performed.

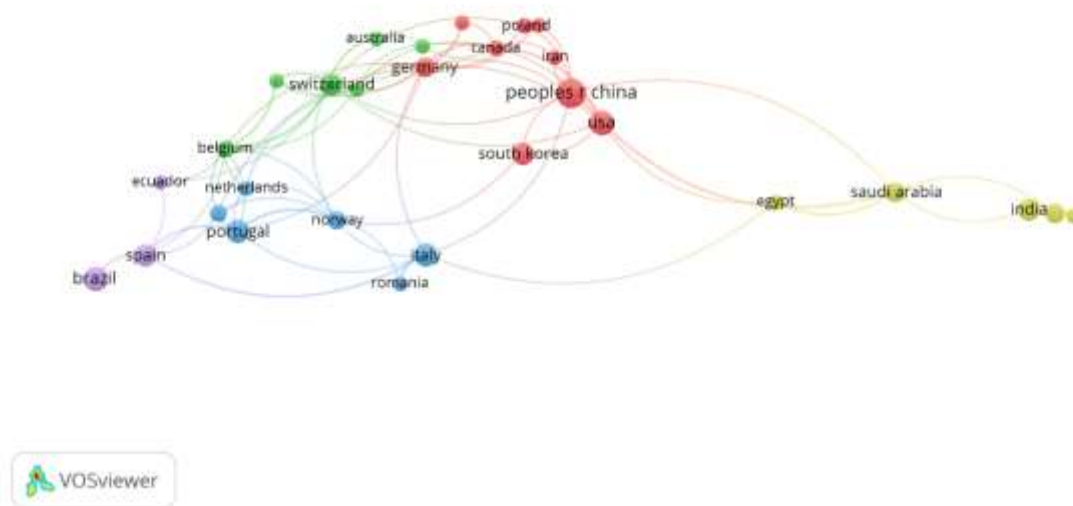


Figure 5 - Collaboration between countries publishing documents on zebrafish and bioactive compounds

A total of 1014 authors work to publish documents on zebrafish and bioactive compounds. From a collaborative point of view, 51 authors form a map containing five clusters (Figure 6). The author Francisco Ernani Alves Magalhães appears in the center as the main collaborator among the other clusters (Figure 6).

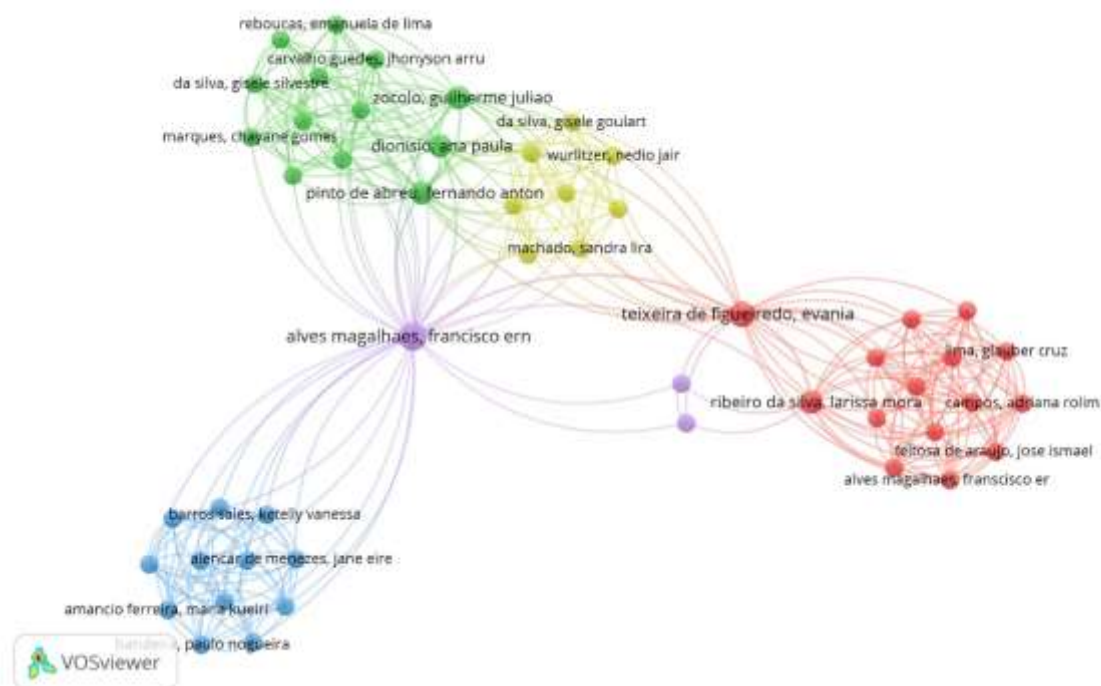


Figure 6 - Collaboration between authors publishing documents on zebrafish and bioactive compounds

520 keywords used by authors were identified, of which a keyword should occur at least three times in each published document. Based on this premise, 23 keywords met the established criterion. In Figure 7, we can observe the formation of six clusters and the occurrence of the main keywords: zebrafish (n=52), bioactive compounds (n=8), antioxidant (n=7), oxidative stress (n=7), anti-inflammatory (n=6) and toxicity (n=6).

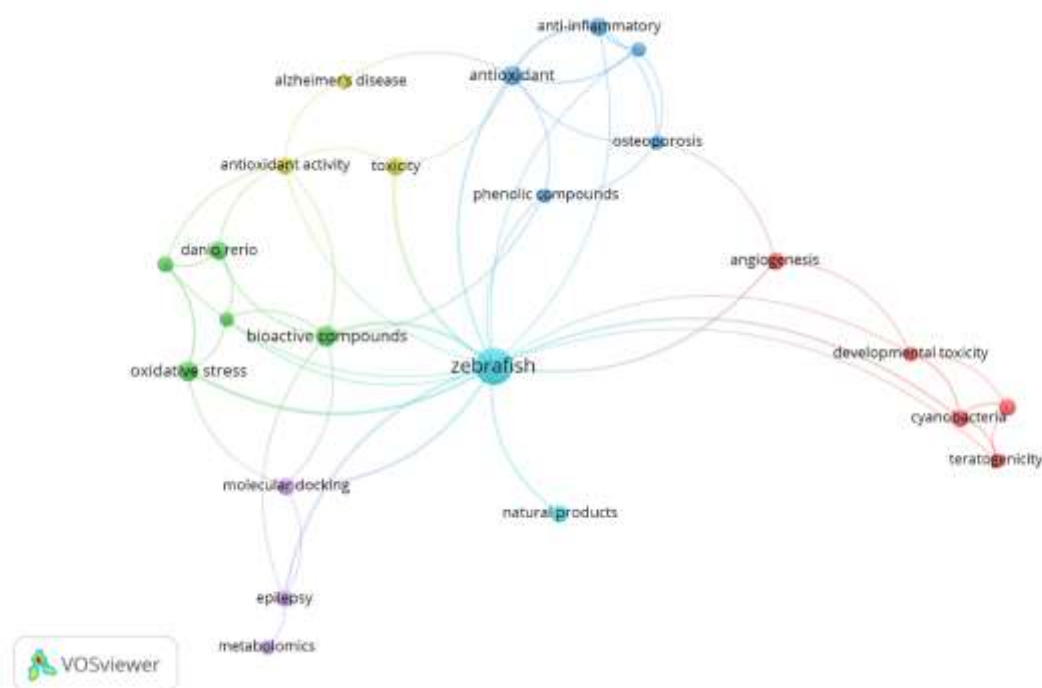


Figure 7 - Keywords used by authors publishing documents on zebrafish and bioactive compounds

Figure 8 shows a timeline of the use of keywords according to the year the documents were published. According to the colors of the legend, the keyword zebrafish shows us that publications with the species started from the year 2019. Research with bioactive compounds started from the year 2021, as well as research with oxidative stress, phenolic compounds, polyphenols and antioxidants.

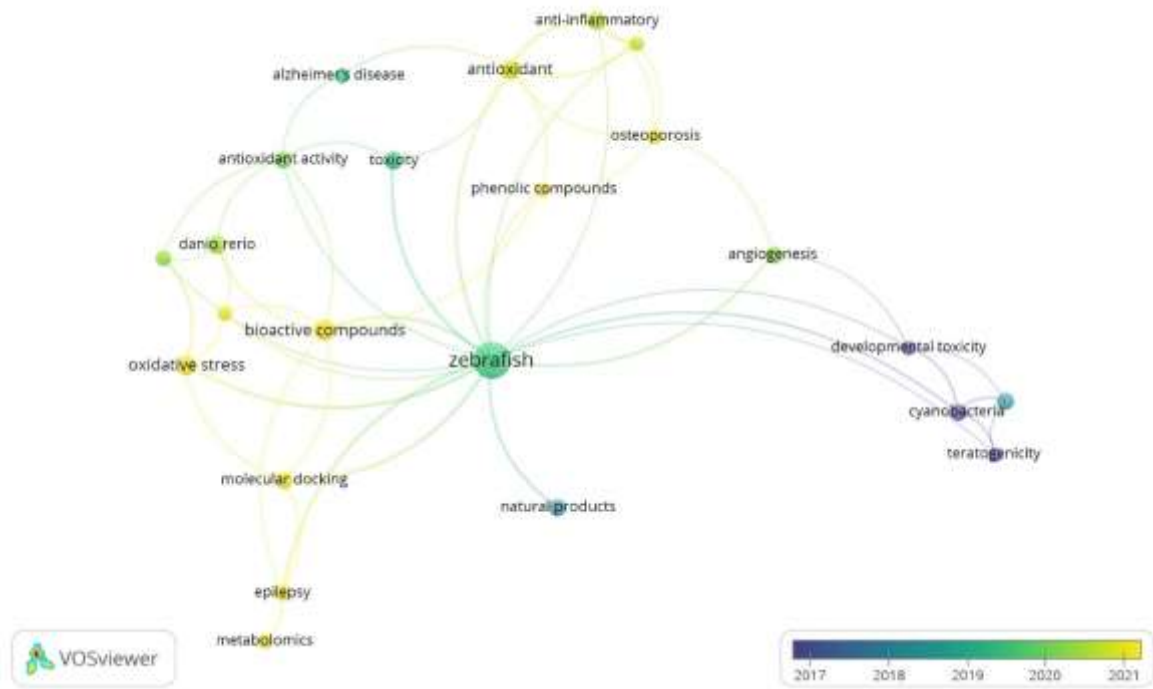


Figure 8 - List of keywords based on year of publication

Figure 9 shows the co-citation data among references. We can observe the formation of four clusters, in which each cluster represents the main references cited in the research and that these same references are always cited together in a scientific article.

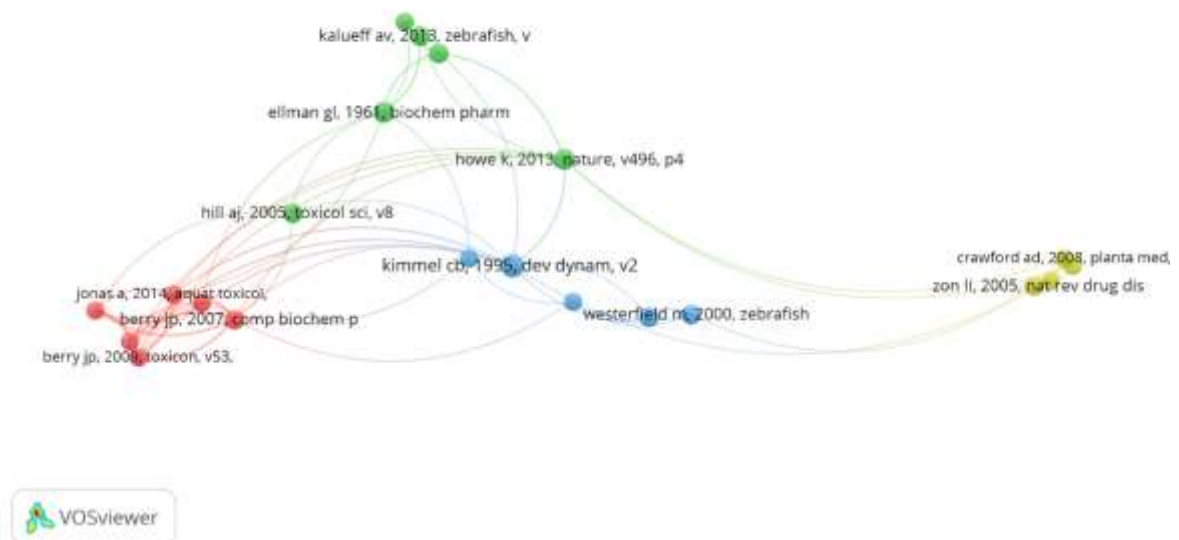


Figure 9 - Cocitation of references that publish documents on zebrafish and bioactive compounds

4. DISCUSSION

In the present study, we identified the publication of 140 documents between the years 2004 and 2023, highlighting a significant increase in the number of publications on zebrafish and bioactive compounds between 2020 and 2022. Bibliometric analysis is a widely used tool to have a general perspective of a certain topic, investigate its quantitative development and assist in the decision of future research (SILVA; BRENELLI; MARIUTTI, 2023). The robustness and reliability of these analyses depend crucially on a transparent methodology, including the precise definition of inclusion and exclusion criteria, a meticulous record of the selection process and the verification of duplicates, especially when several bibliographic sources are consulted (ROMANELLI et al., 2021).

Zebrafish is an animal model that has a great advantage in chemical and pharmacological toxicity assays (HORZMANN; FREEMAN, 2018). This model can provide more accurate information for the identification of the toxicity mechanisms of medicinal plants, enhancing the development of new drugs for the treatment of human diseases (CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020). In a brief analysis, two Brazilian institutions stood out in the theme portrayed in this review. In Brazil, the second largest area of research with zebrafish is pharmacology and toxicology, which in fact makes the production of Brazilian articles have aroused the development of several drugs and possible treatments of great global importance (TRIGUEIRO et al., 2020).

Regarding the collaboration among authors, it was observed that the researcher Francisco Ernani Alves Magalhães occupies the central position in the network map, playing an essential role in the theme “zebrafish” and “bioactive compounds”, besides being interconnected with the other clusters. Francisco Ernani Alves Magalhães has five publications of great relevance according to the theme addressed in the present study (GUIMARÃES et al., 2020; LIMA et al., 2022; LIRA et al., 2020; SILVA et al., 2020; SOUSA et al., 2021).

The co-occurrence of keywords highlighted the close association between “zebrafish” and “natural products”, emphasizing the relevance of natural product classes such as flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, phenols and terpenoids. These classes have been the object of special attention, with compounds such as quercetin and rutin receiving wide coverage in the literature due to their properties (YEUNG et al., 2020). In addition, in the dark blue cluster the

word “zebrafish” is linked with the word “phenolic compounds” which represents great relevance in this research. Phenolic compounds are the most abundant class of secondary metabolites of plants, with about 10,000 different chemicals already researched in the last sixteen years, such substances exert comprehensive biological activities that act from plants to humans (RANA et al., 2022).

In the co-citation analysis, it was possible to observe the formation of four clusters, and in the cluster of “red” and “yellow” color it is evident the proximity of these references indicating that in the publications these references are always cited in the same article, which in fact, we can suggest that the theme addressed in one reference resembles the other references. The co-citation analysis is used to identify research that has received recognition through peer review indicated by citation patterns (TRUJILLO; LONG, 2018). The co-citation analysis enables the recognition of relevant literature and academic communities that may be overlooked in standard approaches in bibliographic research (TRUJILLO; LONG, 2018).

5. CONCLUSION

It is concluded that the year 2022 had the highest number of publications on the theme of zebrafish and bioactive compounds, as well as the area that stands out the most is Pharmacy/Pharmacology. The most cited document has 123 citations, China is the country with the largest number of published documents and the United States represents the country with the largest number of citations. There was a growth from the year 2019 of researches with the use of the zebrafish model and bioactive compounds, in which we can observe the evidence of the Pharmacy/Pharmacology area for the development of new drugs, where we have a very strong appeal for the use of medicinal plants.

,

REFERENCES

- ABBATE, F.; MAUGERI, A.; LAURÀ, R.; LEVANTI, M.; NAVARRA, M.; CIRMI, S.; GERMANÀ, A. Zebrafish as a Useful Model to Study Oxidative Stress-Linked Disorders: Focus on Flavonoids. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 668, 2021.
- BEHRA, M.; ETARD, C.; COUSIN, X.; STRÄHLE, U. The use of zebrafish mutants to identify secondary target effects of acetylcholine esterase inhibitors. **Toxicological Sciences**, v. 77, n. 2, p. 325–333, 2004.
- BERRY, J. P.; GIBBS, P. D. L.; SCHMALE, M. C.; SAKER, M. L. Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Toxicol**, v. 53, n. 2, p. 289–299, 2009.
- CHAHARDEHI, A. M.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1–35, 2020.
- CHALLAL, S.; BUENAFE, O. E. M.; QUEIROZ, E. F.; MALJEVIC, S.; MARCOURT, L.; BOCK, M.; KLOETI, W.; DAYRIT, F. M.; HARVEY, A. L.; LERCHE, H.; ESGUERRA, C. V.; DE WITTE, P. A. M.; WOLFENDER, J. L.; CRAWFORD, A. D. Zebrafish bioassay-guided microfractionation identifies anticonvulsant steroid glycosides from the Philippine medicinal plant *Solanum torvum*. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 993–1004, 2014.
- CHOWDHURY, S.; SAIKIA, S. K. Use of Zebrafish as a Model Organism to Study Oxidative Stress: A Review. **Zebrafish**, v. 19, n. 5, p. 165–176, 2022.
- DONTHU, N.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, D.; PANDEY, N.; LIM, W. M. How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. **Journal of Business Research**, v. 133, p. 285–296, 1 set. 2021.
- FUAD, F. M.; NADZIR, M. M.; KAMARUDDIN, A. H. Hydrophilic natural deep eutectic solvent: A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds. **Journal of Molecular Liquids**, v. 339, p. 116923, 2021.
- GUIMARÃES, T. L. F.; DA SILVA, L. M. R.; DE BRITO LIMA, C.; MAGALHÃES, F. E. A.; DE FIGUEIREDO, E. A. T. Antimicrobial activity of microcapsules with aqueous extract of chambá (*Justicia pectoralis* Jacq). **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, n. 2, p. e20186471, 2020.
- GURU, A.; LITE, C.; FREDDY, A. J.; ISSAC, P. K.; PASUPULETI, M.; SARASWATHI, N. T.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; ARSHAD, A.; AROCKIARAJ, J. Intracellular ROS scavenging and antioxidant regulation of WL15 from cysteine and glycine-rich protein 2 demonstrated in zebrafish in vivo model. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 114, 2021.
- HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 5–12, 2018.

JAMES, R. G.; BIECHELE, T. L.; CONRAD, W. H.; CAMP, N. D.; FASS, D. M.; MAJOR, M. B.; SOMMER, K.; YI, X.; ROBERTS, B. S.; CLEARY, M. A.; ARTHUR, W. T.; MACCOSS, M.; RAWLINGS, D. J.; HAGGARTY, S. J.; MOON, R. T. Bruton's tyrosine kinase revealed as a negative regulator of Wnt-beta-catenin signaling. **Science Signaling**, v. 2, n. 72, 2009.

KÄLIN, R. E.; BÄNZIGER-TOBLER, N. E.; DETMAR, M.; BRÄNDLI, A. W. An in vivo chemical library screen in *Xenopus* tadpoles reveals novel pathways involved in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 1110–1122, 2009.

LE MANACH, S.; KHENFECH, N.; HUET, H.; QIAO, Q.; DUVAL, C.; MARIE, A.; BOLBACH, G.; CLODIC, G.; DJEDIAT, C.; BERNARD, C.; EDERY, M.; MARIE, B. Gender-Specific Toxicological Effects of Chronic Exposure to Pure Microcystin-LR or Complex *Microcystis aeruginosa* Extracts on Adult Medaka Fish. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 15, p. 8324–8334, 2016.

LIMA, J. dos R.; FERREIRA, M. K. A.; SALES, K. V. B.; DA SILVA, A. W.; MARINHO, E. M.; MAGALHÃES, F. E. A.; MARINHO, E. S.; MARINHO, M. M.; DA ROCHA, M. N.; BANDEIRA, P. N.; TEIXEIRA, A. M. R.; DE MENEZES, J. E. S. A.; DOS SANTOS, H. S. Diterpene Sonderianin isolated from *Croton blanchetianus* exhibits acetylcholinesterase inhibitory action and anxiolytic effect in adult zebrafish (*Danio rerio*) by 5-HT system. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 40, n. 24, p. 13625–13640, 2022.

LIN, X.; WANG, S.; HUANG, J. A Bibliometric Analysis of Alternate-Day Fasting from 2000 to 2023. **Nutrients**, v. 15, n. 17, p. 3724, 2023.

LIRA, S. M.; DIONÍSIO, A. P.; HOLANDA, M. O.; MARQUES, C. G.; SILVA, G. S. da; CORREA, L. C.; SANTOS, G. B. M.; DE ABREU, F. A. P.; MAGALHÃES, F. E. A.; REBOUÇAS, E. de L.; GUEDES, J. A. C.; OLIVEIRA, D. F. de; GUEDES, M. I. F.; ZOCCOLO, G. J. Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. **Food Research International**, v. 127, 2020.

MORAL-MUÑOZ, J. A.; HERRERA-VIEDMA, E.; SANTISTEBAN-ESPEJO, A.; COBO, M. J. Software tools for conducting bibliometric analysis in science: An up-to-date review. **El Profesional de la Información**, v. 29, n. 1, p. e290103, 2020.

OU, H. C.; CUNNINGHAM, L. L.; FRANCIS, S. P.; BRANDON, C. S.; SIMON, J. A.; RAIBLE, D. W.; RUBEL, E. W. Identification of FDA-approved drugs and bioactives that protect hair cells in the zebrafish (*Danio rerio*) lateral line and mouse (*Mus musculus*) utricle. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO**, v. 10, n. 2, p. 191–203, 2009.

RANA, A.; SAMTIYA, M.; DHEWA, T.; MISHRA, V.; ALUKO, R. E. Health benefits of polyphenols: A concise review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. e14264, 2022.

ROMANELLI, J. P.; GONÇALVES, M. C. P.; DE ABREU PESTANA, L. F.; SOARES, J. A. H.; BOSCHI, R. S.; ANDRADE, D. F. Four challenges when conducting bibliometric reviews and how to deal with them. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 43, p. 60448–60458, 2021.

SAMTIYA, M.; ALUKO, R. E.; DHEWA, T.; MORENO-ROJAS, J. M. Potential Health Benefits of Plant Food-Derived Bioactive Components: An Overview. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 839, 2021.

SHARIF, F.; PORTA, F.; MEIJER, A. H.; KROS, A.; RICHARDSON, M. K. Mesoporous silica nanoparticles as a compound delivery system in zebrafish embryos. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1875–1890, 2012.

SILVA, L. M. R. Da; LIMA, J. D. S. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; CAMPOS, A. R.; ARAÚJO, J. I. F. De; BATISTA, F. L. A.; ARAÚJO, S. M. B. De; SOUSA, P. H. M. H. De; LIMA, G. C.; HOLANDA, D. K. R.; ROLIM, R. C.; FIGUEIREDO, R. W. De; FIGUEIREDO, E. A. T. De; DUARTE, A. S. G.; RICARDO, N. M. P. S. Graviola Fruit Bar Added Acerola By-Product Extract Protects Against Inflammation and Nociception in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Medicinal Food**, v. 23, n. 2, p. 173–180, 2020.

SILVA, P. B. V. da; BRENELLI, L. B.; MARIUTTI, L. R. B. Waste and by-products as sources of lycopene, phytoene, and phytofluene - Integrative review with bibliometric analysis. **Food Research International**, v. 169, p. 112838, 2023.

SOUSA, J. M. S.; DE ABREU, F. A. P.; RUIZ, A. L. T. G.; DA SILVA, G. G.; MACHADO, S. L.; GARCIA, C. P. G.; FILHO, F. O.; WURLITZER, N. J.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; MAGALHÃES, F. E. A.; MUNIZ, C. R.; ZOCOLO, G. J.; DIONÍSIO, A. P. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from a by-product of juice processing: assessment of its toxicity, antiproliferative and antimicrobial activities. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 764–776, 2021.

TRIGUEIRO, N. S. S.; CANEDO, A.; BRAGA, D. L.S.; LUCHIARI, A. C.; ROCHA, T. L. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish**, v. 17, n. 6, p. 412–425, 2020.

TRUJILLO, C. M.; LONG, T. M. Document co-citation analysis to enhance transdisciplinary research. **Science Advances**, v. 4, n. 1, p. e1701130, 2018.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, v. 84, n. 2, p. 523–538, 2010.

WOLMAN, M. A.; JAIN, R. A.; LISS, L.; GRANATO, M. Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. 15468–15473, 2011.

YEUNG, A. W. K.; HEINRICH, M.; KIJJOA, A.; TZVETKOV, N. T.; ATANASOV, A. G. The ethnopharmacological literature: An analysis of the scientific landscape. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, p. 112414, 2020.

ZIA, S.; KHAN, M. R.; SHABBIR, M. A.; ASLAM MAAN, A.; KHAN, M. K. I.; NADEEM, M.; KHALIL, A. A.; DIN, A.; AADIL, R. M. An Inclusive Overview of Advanced Thermal and Nonthermal Extraction Techniques for Bioactive Compounds in Food and Food-related Matrices. **Food Reviews International**, v. 38, n. 6, p. 1166–1196, 2022.

ARTIGO 2 – Diet with different concentrations of lychee peel flour modulates oxidative stress parameters and antioxidant activity in zebrafish

Artigo submetido na Revista

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology

Online ISSN 1879-1107

Impact Factor: 2.2

João Paulo Lima de Oliveira^a, William Franco Carneiro^b, Kiara Cândido Duarte da Silva^b, Moises Silvestre de Azevedo Martins^b, Stefania Priscilla de Souza^c, Bárbara do Carmo Rodrigues Virote^b, Isaac Filipe Moreira König^b, Eduardo Valério de Barros Vilas Boas^d, Luis David Solis Murgas^d, Elisângela Elena Nunes Carvalho^d

^aLavras School of Agricultural Sciences, Department of Agriculture, Federal University of Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

^bFaculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

^cFaculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Department of Animal Science, Federal University of Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

^dLavras School of Agricultural Sciences, Department of Food Science, Federal University of Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

* Corresponding author.

E-mail address: elisnunes10@gmail.com (E. E. N. Carvalho)

University Campus, Post office 3037, Zip code 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brasil

Abstract

The agri-food industry generates substantial waste, leading to significant environmental impacts. Lychee (*Litchi chinensis* Sonnerat), which is rich in bioactive compounds in its peel, pulp, and seeds, offers an opportunity for waste use. This study aimed to evaluate the effects of supplementing a high-carbohydrate diet with varying levels of lychee peel flour on lipid metabolism biomarkers and oxidative stress in a zebrafish model. A total of 225 zebrafish, approximately four months old, were divided into five groups: control, high-carbohydrate (HC), HC2%, HC4%, and HC6%. The study did not find significant differences in the growth performance of zebrafish in any group. However, the HC6% group exhibited a significant decrease in glucose and triglyceride levels compared with the HC group. Furthermore, this group showed enhanced activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), along with reduced levels of malondialdehyde (MDA). Increased antioxidant activity was also evidenced by DPPH⁻, ABTS⁺, and β -carotene/Linoleic acid assays in the HC6% group. A positive correlation was identified between SOD/CAT activity and in vitro antioxidant assays. These findings suggest that dietary supplementation with 6% lychee peel flour can significantly modulate glucose homeostasis, lipid metabolism, and antioxidant activity in zebrafish.

Keywords: By-products. Bioactive compounds. Phenolic compounds. Antioxidants. Oxidative stress. *Litchi chinensis*.

Abbreviations

ABTS⁺: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid);

ALT: Alanine aminotransferase;

AST: Aspartate aminotransferase;

BHT: Butyl hydroxy toluene;

CAT: Catalase;

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl;

DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid);

GSH: Glutathione;

HC: High carbohydrate;

HDL: High density lipoprotein;

HPLC: High-performance liquid chromatography;

MDA: Malondialdehyde;

SOD: Superoxide dismutase.

1. Introduction

The current challenges of agro-food production, such as climatic instability, water scarcity and soil infertility, have led to a revaluation of the waste from this sector (Berenguer et al., 2023). The by-products of the food industry, which generate environmental impacts and suffer from undervaluation, are endowed with bioactive compounds that have been studied for their beneficial effects on human health and important biological activities (Pavlić et al., 2023). Importantly, the use of fruit and vegetable waste as a source of these compounds is gaining attention for its role in preventing and treating chronic diseases (Sorrenti et al., 2023).

Lychee (*Litchi chinensis* Sonnerat), a member of the Sapindaceae family, is renowned for its distinct flavor, appealing appearance, and nutritional value, leading to its widespread global consumption (Chukwuma et al., 2021; Queiroz et al., 2018). The fruit is particularly rich in bioactive compounds such as flavonoids, anthocyanins, and phenolic acids, recognized for their potent antioxidant properties (Yao et al., 2021). Additionally, *L. chinensis* is valued for its medicinal benefits, including analgesic, anticancer, and antiseptic effects (Upadhyaya and Upadhyaya, 2017).

The lychee peel constitutes 15% of the fruit weight, and is considered a by-product of the food industry that is routinely discarded (Jiang et al., 2021; Luo et al., 2020). Although the lychee peel is not palatable, the extraction of bioactive substances can be used for medicinal purposes or other application perspectives, as the lychee peel contains considerable antioxidant compounds, such as caffeic acid, ferulic acid, procyanidin B2, procyanidin A2, epicatechin and isoquercetin (Zeng et al., 2019).

Zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as an essential model organism in various scientific fields, including biomedicine, genetics, and toxicology, due to its genetic similarity to humans and cost-effectiveness in studies (Lin et al., 2022; Sundin et al., 2019). Its use in pre-

clinical studies for natural product evaluation, especially in the context of food science, has been increasingly acknowledged (Caro et al., 2016; Chahardehi et al., 2020; Choi et al., 2021).

Although lychee peel bioactive compounds have demonstrated beneficial health properties, their potential effects on metabolism have yet to be thoroughly investigated. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of supplementing a high-carbohydrate diet with graded levels of lychee peel extract on biomarkers of lipid metabolism and oxidative stress using a zebrafish model.

2. Material and Methods

2.1. Ethical approval

The present study was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Lavras, under protocol no. 040/21 and the experimental assay conducted according to the recommendations of the National Council for Animal Experimentation Control.

2.2. Fruit acquisition

The fruits were acquired in the local market, and later washed and sanitized with sodium hypochlorite at 300 ppm for 15 minutes. Next, the fruits were manually separated into peel, pulp and seed. The peels were dried in an oven with forced air circulation (Solab, SL-102, Piracicaba, São Paulo, Brazil) at 55°C until they reached constant weight. To obtain the flour, the dried peels were ground in a mill (TECNAL, R-TE-650/1, Piracicaba, São Paulo, Brazil), passed through a 0.03 mm sieve and stored in an ultra freezer until the formulation of the diets.

2.3. Determination of bioactive compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC)

An amount of 1g of peel flour was weighed and added to 10 mL ultrapure water. The sample was then homogenized in an electronic shaker (Bioevopeak SHK-O0310III) for 30 minutes. Afterward, the sample was transferred to an ultrasonic bath (UltraCleaner 1600A) for another 30 minutes. The extraction was performed three times for each treatment. Bioactive compounds were quantified and identified using a Shimadzu high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD/UVVis) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with four high-pressure pumps (model LC-20AT), a diode array detector (model SPD-M20A), a degasser (model DGU-20A5), a CBM-20A interface, a CTO-20AC oven and an automatic sampler (model SIL-20A). Separations were performed using a Shimadzu Shim-pack ODS GVP-C18 column (4.6 x 250 mm, 5 mm) connected to a pre-column (Shimadzu pack ODS GVP-C18, 4.6 x 10 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in deionized water (Mobile Phase A) and 70:28:2 (v/v) methanol/water/acetic acid (Mobile Phase B), at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹ with a gradient elution program and a run time of 65 min. The injection volume was 20 μ L. The bioactive compounds were detected at 280 nm. The standard solutions were diluted in methanol and calibration curves were obtained from injections of ten different concentrations, in duplicate. The bioactive compounds were identified by comparing the retention times of the sample peaks with those of the available standards. The results are expressed in mg of the bioactive compound (100 mg⁻¹ of the sample).

2.4. Experimental diets

Two semi-purified isonitrogenous experimental diets were formulated for this study: a control diet and a high-carbohydrate (HC) diet (Table 1). The primary differentiator between the diets was the corn starch level, which modulated the carbohydrate content. The control diet contained 3.8% corn starch, whereas the HC diet contained a higher concentration of corn starch, resulting in a level of 11.2%. Both diets were prepared in-house: ingredients were precisely weighed, finely ground, and homogenized according to their respective formulations. After homogenization, approximately 40% water by weight (w/w) was added to the dry mixture. The mixture was then pelletized using a 2-mm extruder die (Inbramaq®, Labor PQ30). The wet pellets were subsequently dried at 55°C for 12 h in a forced air circulation oven (Solab, SL-102) and stored in sealed bags before experimental use to ensure stability. In addition to the two base diets, lychee peel flour was introduced as a dietary supplement specifically to the HC diet at varied concentrations of 2%, 4%, and 6%, based on the total diet mass.

The proximate composition of the diets (Control and HC) and lychee peel flour was determined following the methods recommended by AOAC (2016). The moisture content was determined by drying in an oven at 105°C. The determination of the ether extract was performed using the Soxhlet method. The crude protein content was determined using the Kjeldahl method. The determination of the crude fiber was performed using the gravimetric method. The determination of ashes was performed using the gravimetric method of incineration in a muffle furnace at 550°C. The total carbohydrate content was calculated by the difference using Equation 1. The results of the analyses are expressed as percentages.

$$\text{Total carbohydrate} = 100 - (\% \text{ moisture} + \% \text{ lipid} + \% \text{ protein} + \% \text{ fiber} + \% \text{ ash})$$

2.5. Experimental design and morphometric analysis

225 wild-type zebrafish (*D. rerio*) of both sexes of approximately four months of age from LABFISH located at the Federal University of Jataí (UFJ) were provided. The animals underwent a 10-day acclimatization period in a 500 L tank and were fed twice a day with flaked feed (crude protein 45% and ether extract 5% - Alcon[®], Camboriú, Santa Catarina, Brazil) in the fish wing of the Central Animal Facility of the Federal University of Lavras (UFLA). After the acclimatization period, fishes were randomly distributed in a system composed of 3L polycarbonate aquariums (11.5 cm × 34.5 cm × 15.5 cm), connected to a specific rack for the species (Hidrus Rack, model ZEB-60, Alesco, São Paulo, Brazil), with automated temperature control, pH and conductivity control. The water from the aquaria was displaced by gravity until reaching the reservoir consisting of filters, composed of three polypropylene bags with the intention of filtering particles of 100 µm and three felt filters designated for the retention of particles of 50 µm. Throughout the experiment, a light/dark photoperiod of 12h:12h was established. The parameters of temperature, pH and conductivity were measured daily, with averages of $27.9 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 7.1 ± 0.2 and $470 \pm 0.1 \mu\text{S}$ respectively. The measurement of total ammonia was performed weekly, obtaining an average of $0.05 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$.

The 225 animals ($240.87 \pm 11.96 \text{ mg}$) were divided into five groups (Control, HC, HC2%, HC4% and HC6%) and three replicates, each containing 15 animals. The experiment lasted 58 days, in the first four weeks, the animals were fed the experimental diets (four times a day) and lyophilized Artemia (once a day). In the last four weeks, the feeding was the same, differing only that the fish from groups HC, HC2%, HC4% and HC6% received lyophilized Artemia enriched with dextrose.

Artemia were hatched in graduated polycarbonate incubators in 1 L, where they remained until 48 hours, later they were filtered and transferred to a container with a 20%

dextrose solution and remained for about 12 hours with constant oxygenation. Subsequently, they were washed and frozen with liquid nitrogen, and finally kept in a freezer at -80°C . After freezing, the *Artemia* were lyophilized at a temperature of -50°C , and the samples were kept in the lyophilizer for approximately 50 hours, and later stored in a freezer at -80°C until the time of use.

On the last day of the experiment, the final standard length (mm) and final weight of each animal (mg) was recorded. Thus, parameters such as weight gain (mg) and survival rate (%) were measured according to the following equations (2 to 3):

$$\text{Weight gain} = \text{final weight} - \text{initial weight} \quad (2)$$

$$\text{Survival rate} = 1000 \times (\text{Initial number of fish})/(\text{Final number of fish}) \quad (3)$$

2.6. Reducing Sugars Test in *Artemia*

To quantify the content of reducing sugars in *artemia salina* enriched with anhydrous dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 0.2 g of lyophilized control *artemia* and the same amount of the enriched version were weighed. To each sample, 10 mL of distilled water was added. The procedure followed the method proposed by Nelson (1944) with adaptations from Maldonado et al. (2013). Aliquots of the samples were transferred to microplates with 96 wells and the reading was performed on the microplate reader (EZ Read 2000, Biochrom[®], Cambridge, United Kingdom), at 540nm. The results were expressed in mg equivalents of dextrose per 100 g^{-1} . The determination of the assay was performed in triplicates.

2.7. Biochemical parameters and oxidative stress

Three specimens from each replicate were euthanized in a tricaine solution (250 mg L⁻¹). After euthanasia, the animals' brains were dissected and stored in cryogenic tubes and frozen in liquid nitrogen. The bodies without the head and tail were also collected, stored and frozen. Subsequently, the tissues were homogenized with phosphate buffer (pH 7.6; 1:3 weight/weight - brain; 1:9 weight/weight - body) and centrifuged (Megafuge™ 16R Centrifuge, ThermoFischer Scientific, Germany) at 4°C, 5500 rpm for 30 min, for collection of supernatants, which were used for biochemical and oxidative stress analyses.

The biochemical analyses of blood glucose (K082-Bioclin), triglycerides (BT1001000-BioTécnica), total cholesterol (K083-Bioclin), High-density lipoprotein (HDL) (K015-Bioclin), lactate (BT9003500-BioTécnica), Creatinine (K016-Bioclin), alanine aminotransferase (ALT) (K049-Bioclin) and aspartate aminotransferase (AST) (K048-Bioclin), were evaluated using the whole body samples of the animals following the manufacturer's instructions.

The activity of catalase (CAT), in the body and brain, was measured at 240nm (Aebi, 1984). In this method, there is a decrease in absorbance at 240nm due to the degradation of hydrogen peroxide into oxygen and water. The results were expressed in nmol of H₂O₂ degraded per minute per mg of protein. The absorbance readings were performed every 15 seconds for 3 minutes.

The activity of superoxide dismutase (SOD), in the body and brain, was performed according to Madesh and Balasubramanian (1997), based on the autoxidation of pyrogallol. The activity of SOD was expressed in units per mg of protein, where one unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme required to produce 50% of dismutation of the superoxide radical per minute, with the reading performed at 570nm.

The activity of glutathione (GSH), in the body, was measured by precipitation of proteins and subsequent reaction of non-protein thiols with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) generating a product that absorbs light at 415nm (Sedlak and Lindsay, 1968). The results were expressed in $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ of protein.

The lipid peroxidation, of the body, was determined by the formation of TBARS according to the method proposed by Buege and Aust (1978). The malondialdehyde (MDA) formed from the degradation of polyunsaturated fatty acids was used as an index to determine the extent of lipid peroxidation considering its reaction with thiobarbituric acid, which forms a reddish solution with absorbance at 535nm (Buege and Aust, 1978). All samples were read on microplates with 96 flat-bottomed wells and the readings were performed on a spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, United States).

The analyses were performed in duplicates. Bovine serum albumin was used as a standard to calculate protein concentrations using the Bradford method, at 595nm (Bradford, 1976).

The antioxidant activity was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) (Brand-Williams et al., 1995), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) radical (Re et al., 1999), of the phosphomolybdenum complex (Prieto et al., 1999) and the β -carotene/Linoleic acid system (Marco, 1968). The DPPH[•] and ABTS⁺ results were expressed as % inhibition. The phosphomolybdenum complex in mg ascorbic acid equivalent per mg of sample ($\text{mg AAE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) and β -carotene/linoleic acid in % inhibition of oxidation. Aliquots of the samples were transferred to microplates with 96 wells, flat bottom, and the readings were performed on the microplate reader (EZ Read 2000, Biochrom[®], Cambridge, United Kingdom), at 515, 734, 695 and 470nm, respectively. The determinations of the assays were performed in triplicates.

2.8. Statistical Analysis

For the evaluation of data normality, the Shapiro-Wilk test ($p > 0.05$) was used. For the comparison of means and standard deviation, the analysis of variance (ANOVA one-way) was used, followed by Tukey's Test at a significance of $p < 0.05$. The variables that did not present normal distribution, were transformed in Box-Cox, by the Box-Cox method. The data were tabulated and analyzed by the software Minitab Statistical Software version 21.2 (State College, Pennsylvania, United States). The graphs were plotted on the software GraphPad Prism version 9.0.2 (San Diego, California, United States).

3. Results

3.1. Determination of bioactive compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC)

In Table 2, the bioactive compounds identified and quantified by HPLC are represented. Seven bioactive compounds were identified, with *o*-Coumaric Acid (0.75 ± 0.31) and Resveratrol (0.39 ± 0.16) the most prevalent. On the other hand, Caffeic acid (0.05 ± 0.02) and Gallic acid (0.05 ± 0.02) were the least abundant of detectable compounds.

3.2. Reducing Sugars Test in Artemia

The content of reducing sugars in the lyophilized Artemia of the control group was 1.78 ± 0.11 mg of dextrose equivalents per 100 g^{-1} of dry weight. In contrast, lyophilized Artemia

enriched with dextrose showed a concentration of 8.82 ± 0.55 mg of dextrose equivalents per 100 g^{-1} of dry weight.

3.3. Morphometric parameters

Table 3 shows the biometric parameters and survival rate of the different groups treated with lychee peel flour. The parameters final weight (mg), weight gain (mg) and survival rate (%) did not show significant differences. However, for the standard length (mm), significant differences were observed, with the control group showing the highest values when compared with the groups HC and HC6%.

3.4. Biochemical parameters

According to the data presented in Table 4, a variation in glycemic levels was observed among the groups treated with lychee peel flour, with values ranging from 49.05 ± 0.91 to 71.13 ± 4.64 mg/dL. The highest levels of glycemia were observed in the HC treatment when compared to the others, while the HC6% presented the lowest level when compared to the other treatments.

Regarding the lipid profile, the levels of total cholesterol and HDL (mg/dL) did not differ statistically among the treatments (Table 4). Therefore, for triglyceride levels, it was observed that the control group presented higher serum levels when compared to groups HC2% and HC6%, on the other hand, group HC6% presented the lowest levels when compared to the other groups (Table 4). However, no statistical difference was evidenced between groups HC and HC4%, as well as between HC2% and HC6%.

There was no significant statistical difference in lactate levels among the treatments (Table 4).

Creatinine levels showed a variation from 0.26 ± 0.01 to 0.77 ± 0.03 mg/dL. The results presented in Table 4 showed a significant statistical difference among the treatments. The highest creatinine level was noted in group HC4% and the lowest in group HC2%. In the control and HC groups, there was a variation of 0.1 mg/dL.

Regarding the results of AST (Table 4), group HC obtained the highest serum levels when compared to the other groups, however, group HC6% presented the lowest serum level compared to the other treatments. It was observed that group Control and HC presented the highest serum levels for ALT when compared to the other groups, while group HC6% obtained lower serum level when compared to the other treatments (Table 4).

3.5. Oxidative stress

A higher activity of CAT was observed in the HC6% group when compared to the other groups (Fig. 1A). No significant differences were observed between the HC2% and HC4% groups. However, the HC2% and HC4% groups differed from the control and HC groups.

A higher activity of SOD was observed in the HC6% group when compared with the HC2%, HC and control groups (Fig. 1B). On the other hand, the lowest activity of SOD was observed in the control group when compared to the HC4% and HC6% groups.

There was a significant increase in the concentration of GSH in the HC6% group compared to the other groups (Fig. 1C). No statistical difference was observed between the control and HC groups. The HC2% group had a lower concentration of GSH when compared to the HC6% group. The lowest concentration of GSH was observed in the HC4% group when compared to the other groups.

Higher concentrations of MDA were observed in the control, HC and HC2% groups, on the other hand, lower concentrations were noted in the HC4% and HC6% groups (Fig. 1D). No significant differences were observed in the MDA concentrations in the control, HC and HC2% groups, as well as in the HC4% and HC6% groups.

Table 5 shows the results of SOD and CAT activity in the zebrafish brain. The SOD activity was significantly higher in the HC2% group when compared to the HC6% and HC groups (Table 5).

The CAT activity was significantly higher in the HC2% group, when compared to the other treatments (Table 5). In addition, the control group was significantly higher than the 4 and 6% groups (Table 5).

The results of the DPPH[•] assay showed that the % of radical inhibition was lower in the control group compared to the HC and HC6% groups (Fig. 2A). On the other hand, the HC6% group obtained the highest % of radical inhibition when compared to the other groups (Fig. 2A).

The ABTS^{•+} radical inhibition was significantly higher in the HC6% group, when compared to the other groups (Fig. 2B). While the antioxidant activity by the phosphomolybdenum complex method was significantly higher in the HC4% group, when compared to the control, HC and HC2% groups (Fig. 2C).

Regarding the β -Carotene/Linoleic Acid assay, the % of inhibition of linoleic acid oxidation was higher in the HC6% group, where a significant statistical difference was observed when compared to the other groups (Fig. 2D).

The results showed a positive correlation between SOD and CAT, while for MDA there was a negative correlation for the antioxidant enzymes (Fig. 3). In addition, the antioxidant markers showed a positive correlation for CAT and SOD (Fig. 3).

4. Discussion

Lychee is widely cultivated and popular worldwide due to its nutritional attributes and the presence of bioactive compounds. These compounds have potential biological properties for developing new drugs (Ibrahim and Mohamed, 2015). In general, lychee is composed of a myriad of secondary metabolites, including anthocyanins, flavonoids, phenolic acids, terpenes, fatty acids, sterols, lignans, coumarins, and esters that span its different parts (peels, pulp, seeds, leaves, and flowers) (Cao et al., 2020).

In this study, we identified and quantified six different phenolic acids and one stilbene, specifically resveratrol. Phenolic compounds are abundant in plants and are recognized for their various biological activities, including antioxidant and anti-inflammatory properties (Sehrawat et al., 2022). Resveratrol, in particular, has received considerable attention due to its potential role in promoting health and preventing diseases (Singh et al., 2019). Although we identified protective bioactive compounds in lychee peel flour, their effects in an animal model needed to be investigated.

In this study, we evaluated the effects of lychee peel flour supplementation in a high-carbohydrate diet on zebrafish. Despite this intervention, the results indicated that the high carbohydrate content and different levels of lychee peel flour in the diet did not significantly affect the growth performance of zebrafish. These findings are consistent with previous research, including the study by Xi et al. (2023), which similarly reported no significant variation in zebrafish growth when fed diets containing differing levels of carbohydrates. Although supplementing zebrafish diets with lychee peel meal has not shown a significant impact on growth, it is essential to consider additional factors to fully understand the metabolic implications of these diets. In this context, the evaluation of biochemical parameters is critical,

as it offers a more comprehensive understanding of the potential metabolic effects of lychee flour, beyond its impact on growth.

Biochemical parameters are essential measures for evaluating the general health conditions of fish, especially in situations of nutritional imbalance. In this study, a HC diet was found to result in the highest levels of glucose. However, the groups supplemented with 2% and 4% lychee peel flour (HC2% and HC4%) showed glucose levels that were statistically similar to those of the control group. In particular, the group supplemented with 6% lychee peel flour (HC6%) exhibited the lowest glucose levels compared with all other groups. Furthermore, a decrease in triglyceride levels was observed in the HC2% and HC6% groups. This result may be attributed to the high fiber content in the lychee flour diet, which can influence carbohydrate and lipid metabolism. These effects are likely mediated by the regulation of intestinal transit, increased viscosity of the chyme, and increased microbial fermentation, as elucidated by Chanmuang et al. (2022) and Tsitsou et al. (2023). Consequently, these findings are consistent with the hypoglycemic properties of *Litchi chinensis* flour documented by Queiroz et al. (2018) in a rodent study. Reinforcing this perspective, Xiang et al. (2022) also reported a decrease in triglyceride levels in zebrafish after dietary supplementation with lychee seed extract flour. These results suggest that lychee flour supplementation may significantly modulate glucose homeostasis and lipid metabolism in zebrafish.

ALT levels are a well-established biomarker of liver function, with increases in serum ALT indicative of liver or other organ damage (Dufour et al., 2000). Similarly, AST, present in nearly all tissues except bone, shows elevated serum levels after hepatocellular injury (Yadav et al., 2022). In this study, the HC6% group exhibited significantly lower ALT and AST levels, suggesting reduced liver injury. These results imply a potential beneficial impact of flour, which offers a protective effect against hepatocellular damage.

Antioxidants are crucial in shielding cells from damage caused by free radicals, and a variety of molecules and enzymes contribute to this protective mechanism (Ali et al., 2020). These include small molecules such as GSH, thioredoxin, and ascorbic acid, along with enzymes such as SOD, glutathione peroxidase (GPx), and CAT. Their fundamental role involves mitigating oxidative stress, thereby safeguarding cellular biomolecules (Ali et al., 2020).

In our study, a significant increase in CAT activity was observed in the HC6% group, which received the highest concentration of lychee peel flour. Given the role of CAT in counteracting oxidative stress, this improvement could be attributed to the polyphenolic content of lychee residues, especially flavonoids found in the peel (Chukwuma et al., 2021). Polyphenols, as secondary metabolites of plants, are recognized for their robust antioxidant abilities that influence various cellular processes (Rojas-García et al., 2023). These processes include regulating angiogenesis and cell proliferation, modulating transcription factors and kinases, controlling endogenous oxidants, and inhibiting various signaling pathways (Rana et al., 2022).

Furthermore, SOD activity was also higher in the HC6% group than in the HC2%, HC, and control groups. Zhu et al. (2019) reported that lychee peel extract, which is rich in phenolic compounds such as anthocyanins and flavonols, acts as a natural antioxidant. These compounds reduce oxidation by chelating metal ions, forming metal pigmentation complexes, and directly neutralizing superoxide anions.

In this study, the HC6% group had the highest GSH concentration compared to the other groups. This observation suggests effective protection against free radicals provided by lychee peel flour in the diet. This is corroborated by the positive results in the antioxidant assays DPPH[•], ABTS⁺, and β -Carotene/Linoleic Acid antioxidant assays.

Interestingly, diets containing 2%, 4%, and 6% lychee peel flour increased GSH levels, which agrees with the findings of Chauhan et al. (2021) in a study with rats. The bioactive compounds in lychee, such as caffeic acid, are probably responsible for this antioxidant effect (Zeng et al., 2019). In particular, in the HC4% and HC6% groups, lower concentrations of MDA were observed, indicating a reduction in lipid peroxidation. This effect can be attributed to the presence of caffeic acid and resveratrol in the flour. Resveratrol showed particular efficacy on the activity of SOD and CAT in the brain of zebrafish, as indicated in previous studies (Cicero et al., 2019; Sadi and Konat, 2015).

Furthermore, a positive correlation was identified between the antioxidant enzymes SOD and CAT and the DPPH-, ABTS+ and β -Carotene/Linoleic Acid assays, suggesting the usefulness of these assays as reliable indicators of antioxidant capacity in zebrafish fed the enriched diet. However, the phosphomolybdenum complex is not an effective method for assessing antioxidant capacity in zebrafish due to its lack of significant correlation with antioxidant enzymes. This finding highlights the importance of selecting appropriate assay methods that are sensitive and specific to the biological model studied (Munteanu and Apetrei, 2021).

In summary, the results obtained suggest that diets enriched with lychee peel flour were able to activate enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses in zebrafish. This antioxidant activity was evidenced by the positive correlation between SOD/CAT and in vitro tests, in addition to variations in GSH and MDA levels. This multifaceted profile corroborates the importance of a comprehensive approach to assessing antioxidant capacity, as emphasized by Munteanu and Apetrei (2021).

Therefore, we emphasize the need for an accurate selection of the methodologies used to assess the antioxidant potential depending on the biological system adequately. Although more studies are needed to elucidate the molecular mechanisms, the antioxidant assays used

proved useful in quickly assessing the impact of bioactive dietary compounds on the total antioxidant capacity in zebrafish, reflecting the redox status. These assays can be used as an important initial screening tool to identify promising functional ingredients with potential applications in the formulation of foods or nutraceutical products enriched with antioxidant properties.

5. Conclusion

In this study, it was verified that dietary supplementation with lychee peel flour modulates biochemical and oxidative parameters in the zebrafish animal model. With the inclusion of 6% lychee peel flour in the diet, it resulted in a significant decrease in blood glucose and plasma triglycerides, as well as an increase in the activity of antioxidant enzymes CAT and SOD, and the antioxidant activity proven by means of the DPPH⁻, ABTS⁺ and β -Carotene/Linoleic Acid assays in zebrafish. These findings have potentially important implications for the development of dietary therapies and drugs targeted at metabolic and oxidative conditions. However, it is important to consider the limitations of the animal model used and the duration of the study. Future work may focus on validating these results in other animal models and in clinical trials. The responses related to the physiological modulations that were shown in this study will serve as a basis for current and future studies, filling gaps on the potential of lychee peel flour as a bioactive ingredient to improve metabolic parameters.

Funding

None.

Competing Interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

CRediT authorship contribution statement

J. P. L. de Oliveira: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft. W. F. Carneiro: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. K. C. D. da Silva: Investigation, Methodology. M. S. de A. Martins: Investigation, Methodology, Writing – original draft. S. P. de Souza: Investigation, Formal analysis. B. do C. R. Virote: Conceptualization, Writing – original draft. I. F. M. König: Investigation, Methodology. E. V. de B. Vilas Boas: Resources, Supervision, Writing - Review & Editing. L. D. S. Murgas: Methodology, Resources, Supervision, Writing - Review & Editing. E. E. N. Carvalho: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing - Review & Editing.

Data availability

The authors declare that the data will be provided on request.

Acknowledgments

This study was supported by grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – 88887.497139/2020-00. The authors would like to thank the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras, and

Finep, Fapemig, CNPq e Capes for supplying the equipment and technical support for experiments involving chromatographic analyzes. The authors would like to thank the company Bioclin (Belo Horizonte, Brazil) for donating the kits for analyzing the biochemical parameters.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ali, S.S., Ahsan, H., Zia, M.K., Siddiqui, T., Khan, F.H., 2020. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem* 44, e13145. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>
- Association Of Official Analytical Chemists (AOAC), 2016. Official methods of analysis, 20th ed. AOAC International, Rockville.
- Berenguer, C. V., Andrade, C., Pereira, J.A.M., Perestrelo, R., Câmara, J.S., 2023. Current Challenges in the Sustainable Valorisation of Agri-Food Wastes: A Review. *Processes* 11, 20. <https://doi.org/10.3390/pr11010020>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Sci Technol* 28, 25–30.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Cao, S., Han, Y., Li, Q., Chen, Y., Zhu, D., Su, Z., Guo, H., 2020. Mapping Pharmacological Network of Multi-Targeting Litchi Ingredients in Cancer Therapeutics. *Front Pharmacol* 11, 451. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00451>
- Caro, M., Iturria, I., Martinez-Santos, M., Pardo, M.A., Rainieri, S., Tueros, I., Navarro, V., 2016. Zebrafish dives into food research: effectiveness assessment of bioactive compounds. *Food Funct* 7, 2615–2623. <https://doi.org/10.1039/C6FO00046K>
- Chahardehi, A.M., Arsad, H., Lim, V., 2020. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants* 9, 1–35. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9101345>

- Chanmuang, S., Nguyen, Q.A., Kim, H.J., 2022. Current Research on the Effects of Non-Digestible Carbohydrates on Metabolic Disease. *Appl Sci* 12, 3768. <https://doi.org/10.3390/APP12083768>
- Chauhan, S., Gupta, S., Yasmin, S., Saini, M., 2021. Antihyperglycemic and Antioxidant Potential of Plant Extract of Litchi chinensis and Glycine max. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* 11, 225–223. https://doi.org/10.4103/ijnpnd.ijnpnd_13_21
- Choi, T.-Y., Choi, T.-I., Lee, Y.-R., Choe, S.-K., Kim, C.-H., 2021. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med* 53, 310–317. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5>
- Chukwuma, C.I., Izu, G.O., Chukwuma, M.S., Samson, M.S., Makhafola, T.J., Erukainure, O.L., 2021. A review on the medicinal potential, toxicology, and phytochemistry of litchi fruit peel and seed. *J Food Biochem* 45, e13997. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13997>
- Cicero, A.F.G., Ruscica, M., Banach, M., 2019. Resveratrol and cognitive decline: A clinician perspective. *Arch Med Sci* 15, 936–943. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.85463>
- Dufour, D.R., Lott, J.A., Nolte, F.S., Gretch, D.R., Koff, R.S., Seeff, L.B., 2000. Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. II. Recommendations for Use of Laboratory Tests in Screening, Diagnosis, and Monitoring. *Clin Chem* 46, 2050–2068. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.12.2050>
- Ibrahim, S.R.M., Mohamed, G.A., 2015. Litchi chinensis: medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 174, 492–513. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.054>
- Jiang, L., Luo, Z., Liu, H., Wang, F., Li, H., Gao, H., Zhang, H., 2021. Preparation and characterization of chitosan films containing lychee (*Litchi chinensis* sonn.) pericarp powder and their application as active food packaging. *Foods* 10, 2834. <https://doi.org/10.3390/foods10112834>
- Lin, F.-J., Li, H., Wu, D.-T., Zhuang, Q.-G., Li, H.-B., Geng, F., Gan, R.-Y., 2022. Recent development in zebrafish model for bioactivity and safety evaluation of natural products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 62, 8646–8674. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1931023>
- Luo, M., Zhang, R., Liu, L., Chi, J., Huang, F., Dong, L., Ma, Q., Jia, X., Zhang, M., 2020. Preparation, stability and antioxidant capacity of nano liposomes loaded with procyanidins from lychee pericarp. *J Food Eng* 284. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110065>
- Madesh, M., Balasubramanian, K., 1997. A microtiter plate assay for superoxide using MTT reduction method. *Indian Journal of Biochemistry Biophysics* 34, 535–539.
- Maldonado, I.R., Carvalho, P.G.B., Ferreira, N.A., Moulin, B.S.F., 2013. Comunicado Técnico 86 Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Embrapa.

- Marco, G.J., 1968. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 45, 594–598.
- Munteanu, I.G., Apetrei, C., 2021. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* 22, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153, 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7)
- Pavlič, B., Aćimović, M., Sknepnek, A., Miletić, D., Mrkonjić, Ž., Kljakić, A.C., Jerković, J., Mišan, A., Pojić, M., Stupar, A., Zeković, Z., Teslić, N., 2023. Sustainable raw materials for efficient valorization and recovery of bioactive compounds. *Ind Crops Prod* 193, 116167. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116167>
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal Biochem* 269:337–341.
- Queiroz, E.R., Abreu, C.M.P. DE, Rocha, D.A., Sousa, R.V. DE, Fráguas, R.M., Braga, M.A., César, P.H.S., 2018. Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) peel flour: effects on hepatoprotection and dyslipidemia induced by a hypercholesterolemic diet. *An Acad Bras Cienc* 90, 267–281. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150638>
- Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., Aluko, R.E., 2022. Health benefits of polyphenols: A concise review. *J Food Biochem* 46, e14264. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231–1237.
- Rojas-García, A., Fernández-Ochoa, Á., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., 2023. Neuroprotective Effects of Agri-Food By-Products Rich in Phenolic Compounds. *Nutrients* 15, 449. <https://doi.org/10.3390/nu15020449>
- Sadi, G., Konat, D., 2015. Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol* 1–8. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1056311>
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25, 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Sehrawat, R., Rathee, P., Akkol, E.K., Khatkar, S., Lather, A., Redhu, N., Khatkar, A., 2022. Phenolic Acids - Versatile Natural Moiety with Numerous Biological Applications. *Curr Top Med Chem* 22, 1472–1484. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220623114450>

- Singh, A.P., Singh, R., Verma, S.S., Rai, V., Kaschula, C.H., Maiti, P., Gupta, S.C., 2019. Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Med Res Rev* 39, 1851–1891. <https://doi.org/10.1002/MED.21565>
- Sorrenti, V., Burò, I., Consoli, V., Vanella, L., 2023. Recent Advances in Health Benefits of Bioactive Compounds from Food Wastes and By-Products: Biochemical Aspects. *Int J Mol Sci* 24, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms24032019>
- Sundin, J., Morgan, R., Finnøen, M.H., Dey, A., Sarkar, K., Jutfelt, F., 2019. On the Observation of Wild Zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish* 16, 546–553. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1778>
- Tsitsou, S., Athanasaki, C., Dimitriadis, G., Papakonstantinou, E., 2023. Acute Effects of Dietary Fiber in Starchy Foods on Glycemic and Insulinemic Responses: A Systematic Review of Randomized Controlled Crossover Trials. *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 2383 15, 2383. <https://doi.org/10.3390/NU15102383>
- Upadhyaya, D.C., Upadhyaya, C.P., 2017. Bioactive Compounds and Medicinal Importance of *Litchi chinensis*, in: Kumar, M. (Ed.), *The Lychee Biotechnology*. Springer Singapore, Singapore, pp. 333–361. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3644-6_13
- Xiang, J.Y., Chi, Y.Y., Han, J.X., Kong, P., Liang, Z., Wang, D., Xiang, H., Xie, Q., 2022. *Litchi chinensis* seed prevents obesity and modulates the gut microbiota and mycobiota compositions in high-fat diet-induced obese zebrafish. *Food Funct* 13, 2832–2845. <https://doi.org/10.1039/d1fo03991a>
- Xi, L., Lu, Q., Liu, Y., Gong, Y., Liu, H., Jin, J., Zhang, Z., Yang, Y., Zhu, X., Han, D., Xie, S., 2023. Study on Carbohydrate Metabolism in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Aquac Nutr* 2023, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2023/1397508>
- Yadav, S., Jangra, R., Sharma, B.R., Sharma, M., 2022. Current Advancement in Biosensing techniques for determination of Alanine aminotransferase and Aspartate aminotransferase-a Mini Review. *Process Biochem* 114, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.010>
- Yao, P., Gao, Y., Simal-Gandara, J., Farag, M.A., Chen, W., Yao, D., Delmas, D., Chen, Z., Liu, K., Hu, H., Xiao, J., Rong, X., Wang, S., Hu, Y., Wang, Y., 2021. *Litchi* (*Litchi chinensis* Sonn.): a comprehensive review of phytochemistry, medicinal properties, and product development. *Food Funct* 12, 9527–9548. <https://doi.org/10.1039/D1FO01148K>
- Zeng, Q., Xu, Z., Dai, M., Cao, X., Xiong, X., He, S., Yuan, Y., Zhang, M., Dong, L., Zhang, R., Su, D., 2019. Effects of simulated digestion on the phenolic composition and antioxidant activity of different cultivars of lychee pericarp. *BMC Chem* 13. <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0544-4>

Zhu, X., Wang, H., Sun, J., Yang, B., Duan, X., Jiang, Y., 2019. Pericarp and seed of litchi and longan fruits: constituent, extraction, bioactive activity, and potential utilization. *J Zhejiang Univ Sci B* 20, 503–512. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900161>

Table 1 – Ingredients (%) of adult zebrafish (*Danio rerio*) diets and proximate composition of feeds (Control and HC) and lychee peel flour (%)

Ingredients (%)	Diet designation		
	Control	HC	
Concentrated soy protein	5.0	5.0	
Casein	37.0	37.0	
Fish meal	2.0	2.0	
Albumin	24.0	24.0	
Dextrin	2.00	2.00	
Caulin	1.58	1.58	
Agar	0.10	0.10	
Sucrose	0.10	0.10	
Fish oil	5.00	2.50	
Rapeseed oil	2.00	1.00	
Corn starch	3.80	11.20	
Cellulose	1.00	1.00	
Soybean oil	7.30	3.40	
Monocalcium phosphate	5.04	5.04	
Monosodium phosphate	5.50	2.50	
Premix *	1.50	1.50	
BHT	0.08	0.08	
Proximal composition (%)	Control	HC	Lychee peel flour
Moisture	5.64	5.61	6.08
Ether extract	8.49	5.21	2.21
Crude protein	57.17	54.30	5.18
Crude fiber	1.00	1.58	16.53
Ash	9.67	10.36	2.49
Carbohydrates	18.03	22.94	67.52
Crude energy (kcal/kg)	5.31	4.78	-

HC = High carbohydrate.

BHT = Butyl hydroxy toluene.

* Guaranteed vitamin and mineral supplement levels per kilogram of product: Vit. A = 1200,000 IU; Vit. D3 = 200,000 IU; Vit. E = 12,000 mg; Vit. K3 = 2400 mg; Vit. B1 = 4800 mg; Vit. B2 = 4800 mg; Vit. B6 = 4000 mg; Vit. B12 = 4800 mg; Folic acid = 1200 mg; Calcium pantothenate = 12,000 mg; Vit. C = 48,000 mg; Biotin = 48 mg; Choline = 65,000 mg; Niacin = 24,000 mg; Fe = 10,000 mg; Cu = 6000 mg; Mn = 4000 mg; Zn = 6000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Se = 20 mg.

Table 2 – Bioactive compounds identified and quantified by HPLC from the aqueous extract of *Litchi chinensis* peel flour

mg Bioactive compounds.100 mg⁻¹ Lychee peel flour (Mean ± Standard Deviation)	
Caffeic Acid	0.05 ± 0.02
Gallic Acid	0.05 ± 0.02
Chlorogenic Acid	ND
Ferulic Acid	ND
<i>m</i> -Coumaric Acid	0.10 ± 0.03
<i>o</i> -Coumaric Acid	0.75 ± 0.31
<i>p</i> -Coumaric Acid	0.29 ± 0.05
Rosmarinic Acid	ND
Syringic Acid	ND
Trans-cinnamic acid	ND
Vanillin	0.10 ± 0.01
Catechin	ND
Resveratrol	0.39 ± 0.16
Theobromine	ND
Total	1.73 ± 0.60

ND = Non Detected.

Table 3 – Morphometric parameters and survival rate of the experimental groups

Parameters	Control	HC	HC2%	HC4%	HC6%	p-value
Final weight (mg)	297.50 ± 19.10	328.70 ± 18.90	324.60 ± 21.30	305.23 ± 13.75	309.90 ± 33.40	0.430
Standard length (mm)	25.28 ± 0.52 ^a	23.98 ± 0.17 ^b	24.84 ± 0.23 ^{ab}	24.43 ± 0.12 ^{ab}	23.91 ± 0.64 ^b	0.007*
Weight gain (mg)	51.42 ± 12.11	96.20 ± 18.40	67.30 ± 18.40	78.64 ± 5.63	68.10 ± 34.80	0.173
Survival rate (%)	95.55 ± 3.85	84.44 ± 10.18	91.25 ± 3.98	87.22 ± 10.58	97.78 ± 3.85	0.210

HC = High Carbohydrate.

* p-value = <0.05.

Table 4 – Whole body biochemical parameters of zebrafish from the different groups treated with lychee peel flour

Variables	Control	HC	HC2%	HC4%	HC6%	P-value
Blood glucose (mg/dL)	54.04 ± 0.74 ^b	71.13 ± 4.64 ^a	52.84 ± 1.36 ^b	53.87 ± 0.77 ^b	49.05 ± 0.91 ^c	0,000*
Total cholesterol (mg/dL)	53.49 ± 1.22	51.41 ± 0.49	51.67 ± 1.77	53.75 ± 3.94	52.90 ± 2.11	0,624
Triglycerides (mg/dL)	83.22 ± 3.59 ^a	81.03 ± 4.49 ^{ab}	74.14 ± 2.07 ^b	80.00 ± 1.38 ^{ab}	73.33 ± 2.22 ^b	0,008*
HDL (mg/dL)	36.82 ± 1.57	36.65 ± 0.73	37.65 ± 0.73	38.00 ± 0.73	36.01 ± 1.64	0,295
Creatinine (mg/dL)	0.47 ± 0.02 ^d	0.57 ± 0.03 ^c	0.26 ± 0.01 ^e	0.77 ± 0.03 ^a	0.69 ± 0.02 ^b	0,000*
Lactate (mmol/L)	11.35 ± 0.69	11.10 ± 0.64	13.17 ± 0.92	12.14 ± 0.60	11.38 ± 1.21	0,070
AST (u/mL)	73.33 ± 3.55 ^a	86.75 ± 17.75 ^a	71.25 ± 1.75 ^a	70.00 ± 2.00 ^a	59.75 ± 0.25 ^b	0,001*
ALT (u/mL)	93,67 ± 3,69 ^a	95,00 ± 7,00 ^a	86,75 ± 2,75 ^{ab}	86,75 ± 6,75 ^{ab}	79,50 ± 1,00 ^b	0,018*

HC = High Carbohydrate.

HDL = High density lipoprotein.

AST = Aspartate aminotransferase.

ALT = Alanine aminotransferase.

* p-value = <0.05.

Table 5 – SOD and CAT activity in the zebrafish brain among the control, HC and treated groups with different concentrations of flour

Variables	Control	HC	HC2%	HC4%	HC6%	P-value
SOD (U/mg/protein)	51.10 ± 14.89 ^{ab}	39.02 ± 3,11 ^b	62.14 ± 4.89 ^a	47.86 ± 3.89 ^{ab}	37.13 ± 0.84 ^b	0.012*
CAT (nmol/min/mg/protein)	25.35 ± 3.23 ^b	19.66 ± 0.17 ^{b^c}	35.33 ± 4.01 ^a	13.33 ± 1.20 ^c	14.89 ± 4.16 ^c	0.000*

HC = High Carbohydrate.

SOD = Superoxide dismutase.

CAT = Catalase.

* p-value = <0.05.

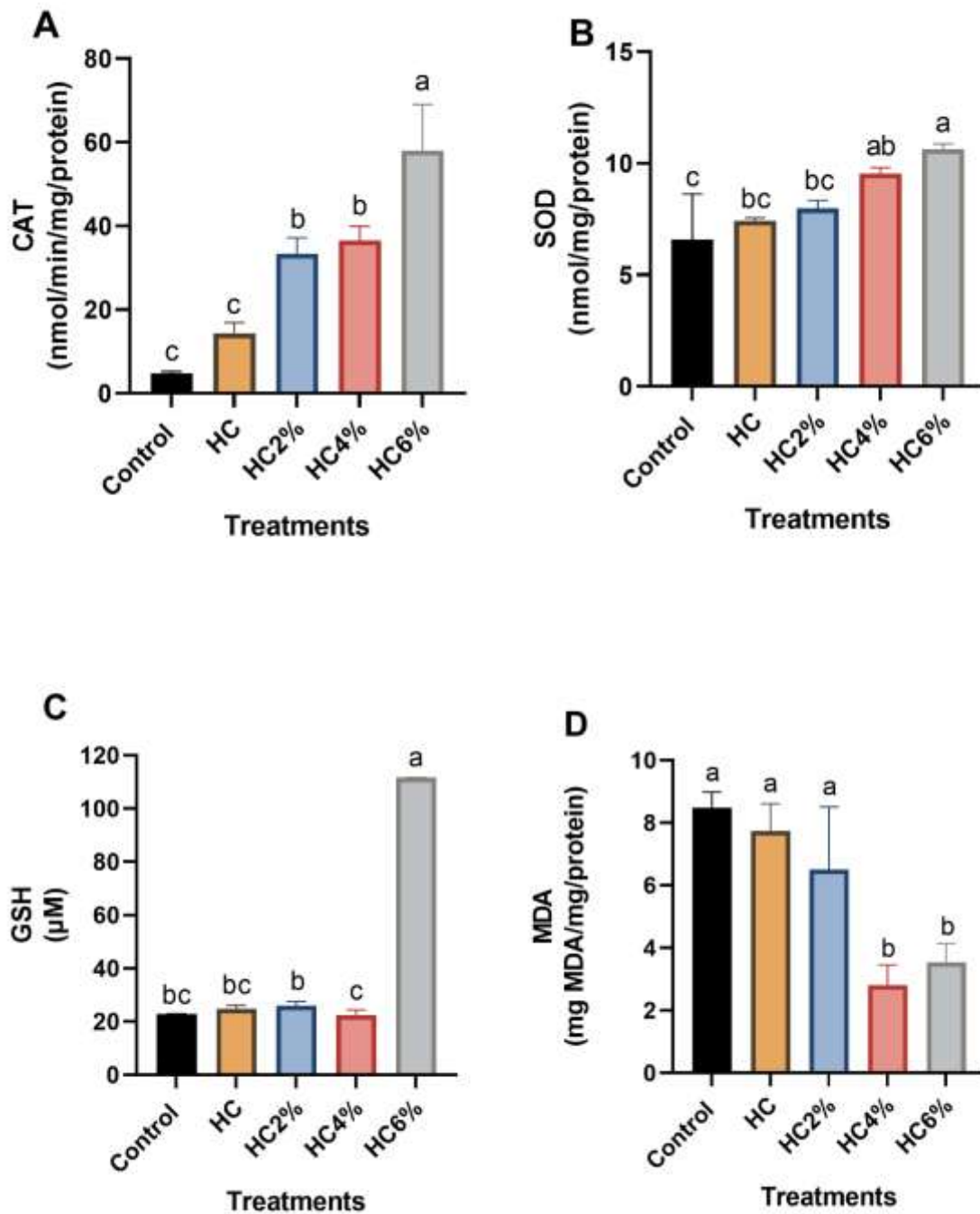


Figure 1: Effect of lychee peel flour on oxidative stress of CAT (A), SOD (B), GSH (C) and MDA (D) for each treatment in the whole body of zebrafish. Data is expressed as mean \pm standard deviation. Different letters indicate between-group differences at $p < 0.05$ as indicated by the Tukey post hoc test.

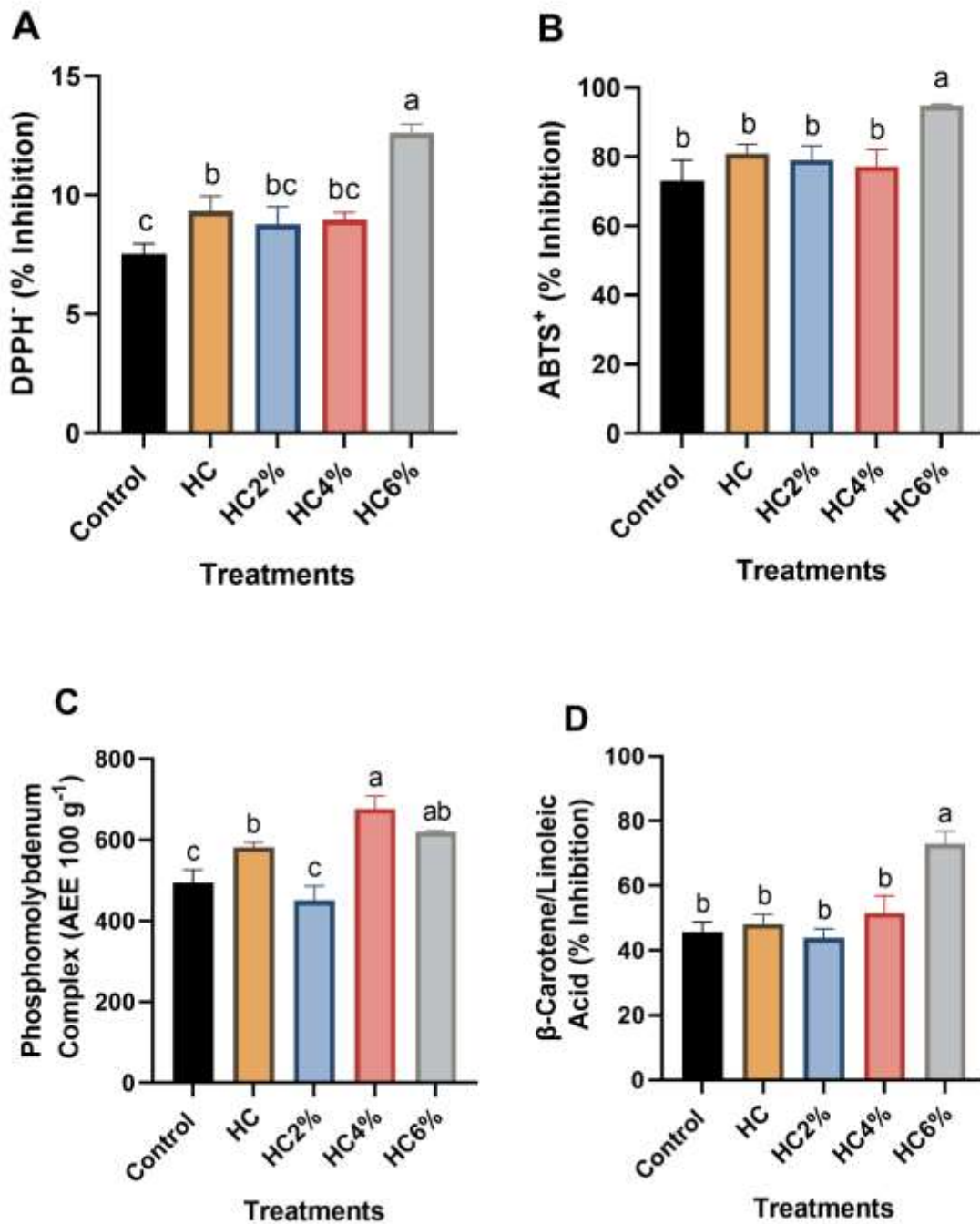


Figure 2: Total antioxidant capacity of lychee peel flour in the whole body of zebrafish according to the DPPH[•] (A), ABTS^{•+} (B), Phosphomolybdenum Complex (C) and β-Carotene/Linoleic Acid (D) assays for each treatment. Data is expressed as mean ± standard deviation. Different letters indicate between-group differences at $p < 0.05$ as indicated by the Tukey post hoc test.

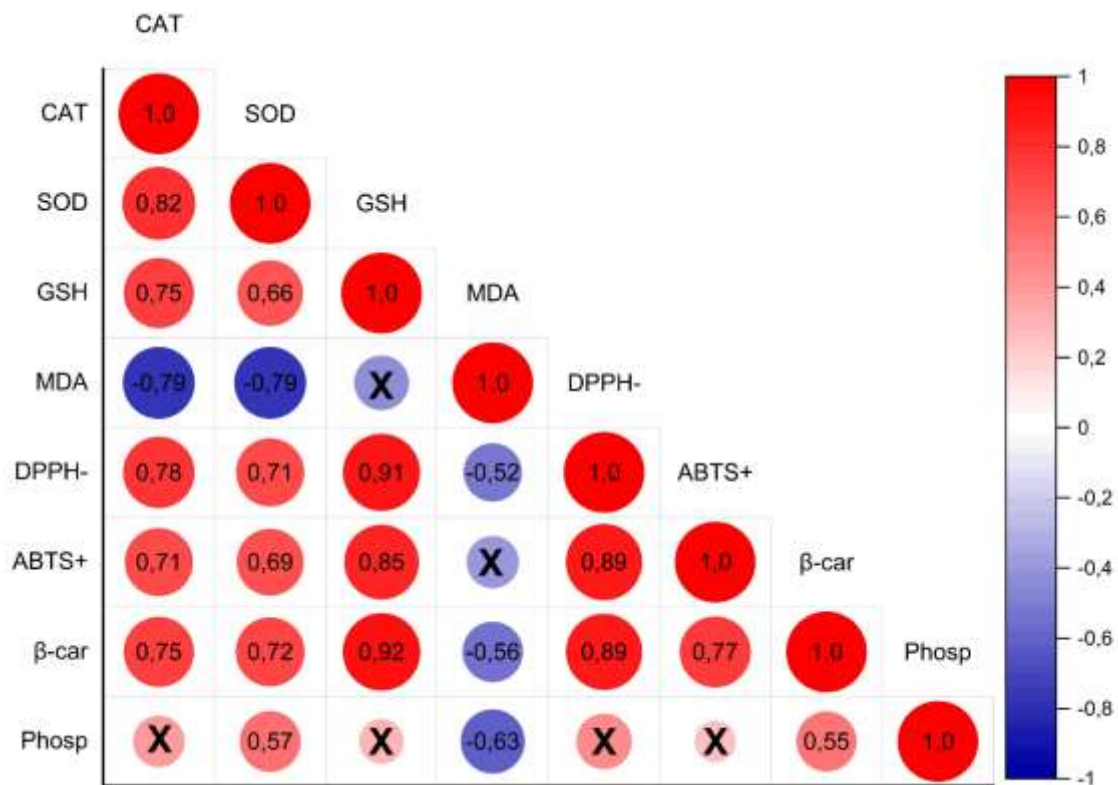


Figure 3: Correlation heatmap between antioxidant enzyme activity and oxidation markers. β-car. = β-Carotene/Linoleic Acid; Phosp = Phosphomolybdenum Complex. The “X” represents no significant difference $p < 0.05$. The activities of the antioxidant enzymes were compared in pairs with the oxidative biomarkers, with a color gradient and circle size denoting the Pearson correlation coefficients.

**ARTIGO 3 – Potencial antiobesogênico e antioxidante da farinha de semente de lichia
em zebrafish alimentados com dieta hiperlipídica**

Artigo elaborado conforme as normas NBR 6022 (ABNT 2018)

RESUMO

A obesidade tornou-se um dos principais problemas de saúde pública na atualidade, estando associada a comorbidades como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, hipertensão, doença hepática, câncer, sarcopenia e apneia obstrutiva do sono. As sementes de lichia são consideradas atualmente um ingrediente promissor para desenvolvimento de alimentos funcionais devido à sua importante propriedade nutracêutica e composição fitoquímica. O presente estudo teve como objetivo induzir a obesidade no zebrafish com uma dieta com alto teor de gordura contendo diferentes concentrações de farinha da semente de lichia, e avaliar parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo, tecido adiposo e regeneração da nadadeira caudal. Foram utilizados 200 zebrafish adultos. Os animais foram alimentados com uma dieta com alto teor de lipídio suplementada com diferentes concentrações da farinha da semente de lichia (2, 4 e 6%) por 12 semanas. Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo eles: controle, high fat diet-HFD, HFD2%, HFD4% e HFD6%. Ao final das 12 semanas foram avaliados os parâmetros bioquímicos (glicemia, triglicerídeos, colesterol total, HDL, ALT, AST e cortisol). Os biomarcadores do estresse oxidativo avaliados foram Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Glutathione-S transferase (GST), Glutathione (GSH) e espécies reativas de oxigênio (ERO's). Os menores níveis glicêmicos foram observados nos HFD4% e HFD6%. O grupo HFD6% obteve os maiores níveis de HDL quando comparado aos grupos HFD e HFD2%. O grupo HFD apresentou o maior nível de cortisol quando comparado ao grupo controle. Maior atividade da CAT foi observada no grupo HFD6% quando comparado aos demais grupos exceto no grupo controle. Foi observada maior atividade da SOD no grupo HFD quando comparada ao grupo controle e HFD4%. A maior atividade da GST foi observada no grupo HFD6% quando comparada ao grupo HFD. Houve um maior aumento da concentração da GSH no grupo HFD2% quando comparada aos grupos controle e HFD. Baixas concentrações de ERO's foram evidenciadas nos grupos HFD4% e HFD6%. A média do diâmetro dos adipócitos viscerais no grupo HFD4% foi significativamente menor quando comparado aos grupos controle, HFD e HFD2%. Houve maior predomínio de esteatose acentuada a moderada nos grupos HFD, HFD2% e HFD4% e esteatose discreta no grupo HFD6%. Conclui-se que a adição de 4 a 6% de farinha da semente de lichia pode ter efeitos benéficos em parâmetros bioquímicos e marcadores de estresse oxidativo, o que sugere potenciais aplicações em alimentos e suplementos.

Palavras-chaves: Compostos fenólicos. Defesa antioxidante. Esteatose. Obesidade.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade tornou-se um dos principais problemas de saúde pública na atualidade, fazendo com que vários fatores bioquímicos e imunológicos atuem de forma integralizada. A disseminação do tecido adiposo está relacionada ao aumento da resposta inflamatória sendo um ponto culminante para o desenvolvimento de algumas doenças crônicas. Esta condição é caracterizada pelo aumento da expressão de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1) e (IL-6), que estão associadas a comorbidades como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, hipertensão, doença hepática, câncer, alergias, osteoporose, sarcopenia e apneia obstrutiva do sono (BARAKAT; ALMEIDA, 2021).

O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da obesidade, alterando a função de fatores reguladores da atividade mitocondrial, modificando a concentração de moléculas que participam da inflamação. Isso está relacionado ao tamanho e número dos adipócitos, promovendo a lipogênese e estimulando a diferenciação dos pré-adipócitos durante o processo de amadurecimento que ocorre na adipogênese e no controle dos neurônios hipotalâmicos que desempenham um papel fundamental na regulação do apetite (PÉREZ-TORRES *et al.*, 2021).

Existem fortes evidências que compostos bioativos como polifenóis, fitoesteróis, saponinas e fitatos apresentam mecanismos capazes de modular doenças crônicas não-transmissíveis através de suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias, além de melhorar o perfil lipídico. Essa associação nutrição e saúde é crucial no processo saúde-doença (RIBEIRO *et al.*, 2019).

Frutas e hortaliças são produtos da indústria de alimentos que geram resíduos na pós-colheita, processamento, distribuição e consumo ('AQILAH *et al.*, 2023). A *Litchi chinensis* (lichia) é uma das frutas que contribuem para a geração de resíduos em todo o mundo, entretanto evidências mostram que os resíduos (casca e semente) da lichia exibem importantes propriedades biológicas que podem ser utilizadas para finalidades medicinais (CHUKWUMA *et al.*, 2021).

As sementes de lichia são consideradas atualmente um ingrediente promissor para desenvolvimento de alimentos funcionais devido à sua importante propriedade nutracêutica e composição fitoquímica. As propriedades da semente de lichia foram estudadas quanto seu potencial antioxidante, antitumoral, antibacteriano, antiviral, anti-hiperglicêmico, hepatoprotetor e atividades imunoestimulantes (PUNIA; KUMAR, 2021).

Nos últimos anos, o zebrafish (*Danio rerio*) emergiu como um dos modelos experimentais mais utilizados na farmacologia e toxicologia, especialmente para testes na descoberta de novos compostos (DANDIN *et al.*, 2022). Um estudo recente utilizou a semente da lichia em zebrafish alimentado com uma dieta com alto teor de gordura (HFD) por oito semanas. Os tratamentos incluíram pó de semente de lichia (1,4 mg por peixe/dia), extrato etanólico de semente de lichia (0,35 mg por peixe/dia) e extrato aquoso de semente de lichia (42 mg/L, administrado em banho-maria) (XIANG *et al.*, 2022). Os resultados indicaram que o grupo HFD teve um aumento significativo no peso corporal, ganho de peso e no Índice de Massa Corporal em comparação ao grupo controle, enquanto a administração da semente de lichia em pó reduziu significativamente o ganho de peso do zebrafish, assim como o grupo que recebeu o extrato etanólico da semente de lichia apresentou menor peso em relação ao peso inicial (XIANG *et al.*, 2022).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo testar diferentes concentrações de farinha da semente de lichia em um modelo de zebrafish (*D. rerio*) obeso, além disso, avaliar parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo, tecido adiposo e regeneração da nadadeira caudal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Químicos e reagentes

O Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Trizma[®] base), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CNDB), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺), 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), riboflavina, ácido linoleico, β -caroteno, cloreto de tetrazólio-nitrozul (NBT), fast blue salt e tricaína foram adquiridos da empresa Sigma (Darmstadt, Germany). O Triton X-100, ácido tricloroacético, fosfato de potássio, metionina e peróxido de hidrogênio foram adquiridos da empresa Synth. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido clorídrico (HCl) e álcool metílico foram adquiridos da empresa Vetec. A glutatona reduzida (GSH), clorofórmio, xilol histológico, eter etílico foram adquiridos da empresa Êxodo Científica (Sumaré, Brasil). O reagente de Bradford foi adquirido da empresa Perfyl Tech (São Bernardo do Campo, Brasil). Os kits de glicose, triglicerídeos e colesterol total foram adquiridos da empresa Kovalent (São Gonçalo, Brasil). Os kits de High-density lipoprotein (HDL), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram adquiridos da empresa Bioclin (Belo Horizonte, Brasil). O kit de cortisol foi adquirido da empresa Monobind Inc.[®] (California, United States).

2.2 Aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob protocolo nº 040/21 e o ensaio experimental conduzido conforme recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.3 Obtenção dos frutos

Os frutos foram adquiridos no comércio local e, posteriormente, lavados e sanitizados utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a 300 ppm durante 15 minutos. A seguir, os frutos foram separados manualmente em casca, polpa e semente. As sementes foram secas em uma estufa com circulação de ar forçado (Solab, SL-102, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 55°C até atingirem peso constante. Para obter a farinha, as sementes secas foram moídas em moinho (TECNAL, R-TE-650/1, Piracicaba, São Paulo, Brasil), passadas por uma peneira de 0,03 mm e armazenadas em um ultra freezer até a formulação das rações.

2.4 Preparo do extrato

Para o preparo do extrato, foram pesados 3 g da farinha da semente de lichia para um volume de 30 mL de água destilada. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, e acondicionadas no banho ultrassônico (SolidSteel, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 30 min. Posteriormente, os extratos foram transferidos para a centrífuga (Hettich-Rotina 380 R, Tuttlingen, Germany) a 4°C, 13328 g e mantidos por 5 min. Os sobrenadantes foram separados e armazenados em vidros âmbar até o momento das análises.

2.5 Compostos bioativos e atividade antioxidante

O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando o método proposto por Medina (2011), com algumas modificações. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico. 100g⁻¹ (mg EAG. 100g⁻¹) e a leitura determinada a 420 nm.

Para a determinação dos flavonoides totais, foi utilizado o método proposto por Arvouet-Grand et al., (1994) com modificações. Em um microplaca de 96 poços, fundo chato, foi adicionado 150 µl de cloreto de alumínio a 2% e 150 µl da amostra. A seguir foi deixado por uma hora em temperatura ambiente para reação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro

a 420 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina.100 g⁻¹ (mg EQ. 100 g⁻¹).

Para determinação da atividade antioxidante total foi utilizado o ensaio do radical 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) (RE *et al.*, 1999). A solução ABTS⁺ foi preparada através da reação do sal 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (192 mg) com persulfato de potássio (378,4 mg) à temperatura ambiente durante 16 h. A solução obtida foi então diluída em etanol até uma absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734nm e as amostras deixadas seis minutos para reagir. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical.

A determinação da atividade antioxidante por meio do método β-caroteno/Ácido linoleico fundamenta-se na oxidação do β-caroteno (descoloração) induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (MARCO, 1968). Alíquotas de 22μL do extrato foram transferidos para uma microplaca de 96 poços de fundo chato, onde uma alíquota de 278 μL de solução sistema de β-caroteno/Ácido linoleico foi adicionada. No espectrofotômetro, uma leitura a 470nm foi realizada no tempo 0, e posteriormente a microplaca contendo a solução foi mantida em estufa a 40°C, sendo realizada outra leitura após o intervalo de 120 minutos. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação.

As leituras foram realizadas no leitor de microplacas (EZ Read 2000, Biochrom®, Cambridge, Reino Unido). As determinações dos ensaios foram realizadas em triplicata.

2.6 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas com diferentes concentrações da farinha de semente de lichia: 2%, 4% e 6% (Tabela 1). Os ingredientes foram pesados, peneirados em uma peneira de 0,3 mm e posteriormente misturados. A mistura foi umedecida com aproximadamente 40% de água antes de ser processada em uma peletizadora experimental com abertura de 2 mm (Inbramaq®, Labor PQ30, São Paulo, Brasil). Após a peletização, as dietas foram secas em estufa com circulação de ar forçado (Solab, SL-102, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 55°C, por aproximadamente 24 horas. Em seguida, as dietas foram moídas em tamanho apropriado e armazenadas a uma temperatura entre 2 e 8 °C até serem usadas.

A composição centesimal das rações formuladas (Tabela 1) foram determinadas conforme métodos propostos pela AOAC (2016). Para medir o teor de umidade, as amostras foram secas em estufa a 105°C. O método Soxhlet foi usado para extrair o conteúdo de lipídeos. O método de Kjeldahl foi aplicado para quantificar a proteína bruta. O teor de cinzas foi obtido

por incineração gravimétrica, em mufla a 550°C e a energia bruta foi determinada utilizando uma bomba calorimétrica (Parr Instrument Company, Parr 1261, Moline, Illinois, United States). Os valores das análises foram expressos em porcentagem.

Tabela 1 – Componentes da dieta de zebrafish adultos

Ingredientes	Designação da dieta (g/kg)				
	Controle	HFD	HFD2%	HFD4%	HFD6%
Albumina	441,4	448,6	448,0	448,0	447,7
Caseína	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Amido de milho	290,2	182,3	163,0	143,4	123,9
Óleo de peixe	96,3	47,1	47	46,6	46,4
Banha de porco	0	150	150	150	150
Gelatina	20	20	20	20	20
Fosfato bicálcico	30	30	30	30	30
Celulose	10	10	10	10	10
Premix-APP	10	10	10	10	10
BHT	2	2	2	2	2
Farinha da semente de lichia	0	0	20	40	60
Composição Centesimal (%)	Controle	HFD	HFD2%	HFD4%	HFD6%
Umidade	9,99	10,53	10,61	10,24	11,83
Extrato Etéreo	2,97	10,30	11,36	12,52	10,28
Proteína Bruta	47,11	49,47	50,65	49,85	47,66
Cinzas	4,91	5,28	4,64	5,17	5,03
Energia bruta (kcal/kg)	4,95	5,06	5,14	5,30	5,17

HFD = High Fat Diet

BHT = Hidroxitolueno

2.7 Delineamento experimental e análise morfológica

Foram adquiridos 200 zebrafish linhagem selvagem (*Danio rerio*) de ambos os sexos com aproximadamente quatro meses de idade de um fornecedor de Muriaé-MG. Posteriormente, os animais permaneceram em aclimatação por dez dias em um tanque de 500 L, recebendo duas vezes ao dia ração floclada (proteína bruta 45% e extrato etéreo 5% - Alcon[®], Camboriú, Santa Catarina, Brasil).

Após o período de aclimatação, os animais foram transferidos para um sistema composto por aquários de policarbonato de 3L (11,5 cm × 34,5 cm × 15,5 cm), conectado a um rack específico para a espécie (Hidrus Rack, modelo ZEB-60, Alesco, São Paulo, Brasil), com controle de temperatura, pH e condutividade automatizados. A água dos aquários deslocava por gravidade até alcançar o reservatório constituído de filtros, compostos por três sacos de

polipropileno com o intuito de filtrar partículas de 100 µm e três filtros de feltro designadas para retenção das partículas de 50 µm. Ao longo do experimento foi estabelecido um fotoperíodo claro/escuro 12h:12h. Os parâmetros de temperatura, pH e condutividade foram mensurados diariamente, com médias de $27,5 \pm 2,2^\circ\text{C}$, $8,1 \pm 0,2$ e $800 \pm 0,1 \mu\text{S}$ respectivamente. A mensuração da amônia total e nitrito foi realizada semanalmente em um fotocolorímetro (Alfakit, AT-100PB, Florianópolis, Brasil) com uma média de $0,024 \pm 0,025 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,002 \pm 0,003 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

O peso inicial e o comprimento padrão dos animais foram $153,73 \pm 3,12 \text{ mg}$ e $18,25 \pm 3,01 \text{ mm}$, respectivamente. Os 200 zebrafish foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, sendo eles: controle, *high fat diet* (HFD), HFD2%, HFD4% e HFD6%. Cada grupo foi distribuído aleatoriamente, sendo que cada aquário fosse composto por dez animais e quatro replicatas. As dietas foram fornecidas cinco vezes ao dia (08:00, 10:00, 12:00, 14:00 e 16:00) durante 12 semanas até saciedade aparente.

No término do experimento, o comprimento padrão (mm) e o peso de cada animal (mg) foi registrado. Sendo assim, parâmetros como ganho de peso (mg) e taxa de sobrevivência (%) foram mensurados de acordo com as seguintes equações (2 a 3):

$$\text{Ganho de peso} = \text{Ganho de peso final} - \text{Ganho de peso inicial} \quad (2)$$

$$\text{Taxa de sobrevivência} = 1000 \times (\text{Número inicial de peixes}) / (\text{Número final de peixes}) \quad (3)$$

2.8 Parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo

Três espécimes de cada replicata foram eutanasiados em uma solução de triclaína (250 mg L^{-1}). Em seguida, os corpos inteiros foram armazenados em tubos criogênicos e congelados em nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer a -80°C até o preparo das amostras. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato salino (PBS) (1:9 peso/peso) e centrifugado (Megafuge™ 16R Centrifuge, ThermoFischer Scientific, Germany) a 4°C , 5500 g por 15 min, onde foram coletados os sobrenadantes para análises dos biomarcadores bioquímicos e do estresse oxidativo.

A partir dos sobrenadantes foram realizadas as análises de glicemia (107091-Kovalent), triglicerídeos (107096-Kovalent), colesterol total (107087-Kovalent), HDL (K015-Biocrin), ALT (K049-Biocrin) e AST (K048-Biocrin) utilizando kits comerciais, conforme as instruções

dos fabricantes. Alíquotas das amostras foram transferidas para microplacas com 96 poços, fundo chato, e as leituras foram realizadas no leitor de microplacas (EZ Read 2000, Biochrom®, Cambridge, Reino Unido). As determinações dos ensaios foram realizadas em triplicata.

As concentrações de proteína foram estimadas pelo método de Bradford (1976), utilizou-se a albumina de soro bovino como padrão, e a leitura foi realizada a 595nm.

Seguindo o método de Aebi (1984), a atividade da Catalase (CAT) foi determinada a 240nm, onde a redução da absorbância em 240nm indica a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A quantidade de H₂O₂ degradado por minuto por mg de proteína foi calculada em μ /mol e as absorbâncias foram medidas a cada 15 segundos durante 3 minutos.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com Beauchamp & Fridovich (1971). A atividade da SOD foi expressa em unidades por mg de proteína, onde uma unidade de atividade da SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT, sendo a leitura realizada a 560nm.

A atividade da Glutathione-S-transferase (GST) foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno estimada pela redução da absorbância a 340 nm por 3 min, em espectrofotômetro (HABIG; JAKOBY, 1981). Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

A concentração da glutathione reduzida (GSH) baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) gerando um produto que absorve luz a 415nm (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Os resultados foram expressos em μ M/min/mg de proteína.

Para a determinação das espécies reativas de oxigênio (ERO's), 4 μ l de DCF foi adicionado a 3996 μ l de PBS, a seguir a solução foi agitada em vórtex. Em uma microplaca de 96 poços foi pipetado 20 μ l das amostras e 80 μ l da solução preparada anteriormente em ambiente escuro. A seguir, a microplaca foi armazenada em estufa a 37°C por 30 min e a leitura realizada em espectrofotômetro de fluorescência com excitação em 485nm e emissão em 530nm (DRIVER; KODAVANTI; MUNDY, 2000). Os resultados foram expressos em μ mol DCF/mg/protein/min. A leitura foi realizada no espectrofotômetro TECAN Infinite (M200, Männedorf, Switzerland).

2.9 Cortisol

Para a extração do cortisol do corpo inteiro do zebrafish foi utilizado o protocolo de Canavello et al., (2011). Dois animais de cada grupo mantidos congelados em tubos criogênicos

a -80°C foram previamente pesados e cortados em pequenos pedaços, a seguir 1000 µl de tampão fosfato salino (PBS) foi adicionado no recipiente e com o auxílio de um homogeneizador (IKA, T10 Basic, United States), as amostras foram homogeneizadas e 500 µl de PBS foi utilizado entre uma amostra e outra para retirar qualquer resíduo do rotor. Cada amostra foi transferida para um tubo de ensaio identificado e 5 mL de éter etílico foi adicionado em cada tubo. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e depois centrifugadas (Megafuge™ 16R Centrifuge, ThermoFischer Scientific, Germany) a 5000 rpm por 15 min. Após a centrifugação, a camada orgânica contendo o cortisol foi removida de cada amostra e transferido para o tubo de ensaio. As amostras foram mantidas durante a noite em uma capela para permitir a evaporação do éter.

Para a mensuração dos níveis de cortisol nas amostras foi utilizado o Kit Accu Bind (Monobind Inc, Lake Forest, CA, United States), e seguiu as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) e os resultados foram expressos em µg/g de peso corporal.

2.10 Corte e regeneração da cauda

Na 10ª semana de experimentação, oito animais de cada grupo foram selecionados aleatoriamente e transferidos para um béquer contendo uma solução anestésica de triclaína (100 mg L⁻¹). Posteriormente, os animais foram submetidos a um procedimento de amputação parcial da nadadeira caudal conforme metodologia proposta por Carvalho *et al.* (2021). Os animais foram fotografados imediatamente após amputação utilizando um Microscópio Estereoscópico Binocular com câmera acoplada (Opton, China) (dia 0). A regeneração da nadadeira caudal foi monitorada e registrada nos dias 5, 10 e 15 após o procedimento. A regeneração caudal foi mensurada em mm através dos registros imagéticos e quantificados por meio do software ImageJ versão 1.54 (National Institutes of Health, United States). A área do dia 0 foi considerada como 100%, e as dos dias subsequentes foi realizada uma proporção.

2.11 Análise histológica

Para análise histológica, seis animais por grupo foram fixados em formalina tamponada a 10%, embebidos em parafina e seccionados no plano transversal em micrótomo (5 µm). Secções da região visceral foram coradas com hematoxilina-eosina. Imagens de microscopia foram obtidas utilizando o software Motic Image Plus 3.0 (Motic, Hong Kong, China). Para a

análise morfométrica dos adipócitos seguiu-se o método proposto por Virote *et al.* (2020), com adaptações. Seis lâminas contendo tecido adiposo visceral foram avaliadas, sendo considerado o diâmetro superior e inferior de dez adipócitos de maneira aleatória determinado de maneira cega. Os diâmetros inferiores e superiores dos adipócitos viscerais foram determinados em μm utilizando o software ImageJ versão 1.54 (National Institutes of Health, United States).

Para a análise histopatológica do fígado em relação aos tratamentos, a médica veterinária patologista MSV avaliou as lâminas de forma cega, sendo estas classificadas com a seguinte pontuação: esteatose discreta (+), esteatose moderada (++) e esteatose acentuada (+++). Imagens histológicas foram capturadas utilizando o microscópio óptico com câmera acoplada (Motic BA210, Hong Kong, China).

2.12 Análise estatística

Para a avaliação da normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação das médias e desvio padrão foi utilizada a análise de variância (ANOVA one way), seguido de Teste de Tukey a uma significância de $p < 0,05$. As variáveis que não apresentaram distribuição normal, foram transformadas pelo método Box-Cox. Os dados foram tabulados e analisados através do software Minitab version 21.2 (State College, Pensilvânia, United States).

3. RESULTADOS

3.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos totais pelo método de fast blue foi capaz de quantificar $1677 \pm 124,03 \text{ mg GAE.}100 \text{ g}^{-1}$ (Tabela 2). Em relação aos flavonoides totais o extrato aquoso da farinha da semente de lichia possui um teor de $58,46 \pm 2,11 \text{ mg EQ.}100 \text{ g}^{-1}$ (Tabela 2).

Em relação a atividade antioxidante foi observado um percentual de inibição de $77,45 \pm 9,53$ do radical ABTS^+ e um percentual de $41,63 \pm 3,35$ de inibição da oxidação pelo ensaio β -Caroteno/Ácido Linoleico (Tabela 2).

Tabela 2 – Determinação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato aquoso da farinha da semente de lichia

Ensaio	Resultados (média ± desvio padrão)
Fast Blue (mg GAE.100 g ⁻¹)	1677 ± 124,03
Flavonoides totais (mg QE.100 g ⁻¹)	58,46 ± 2,11
ABTS ⁺ (% de inibição)	77,45 ± 9,53
β-Caroteno/Ácido Linoleico (% de inibição)	41,63 ± 3,35

ABTS⁺ = 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

3.2 Parâmetros morfométricos

Os resultados dos parâmetros biométricos são resumidos na Tabela 3. No que tange ao peso final foi observado que os grupos HFD e HFD2% apresentaram os maiores pesos finais quando comparado ao grupo HFD6% (Tabela 3). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação ao comprimento final (Tabela 3).

O grupo HFD apresentou maior ganho de peso quando comparado aos grupos controle e HFD6%, em contrapartida, o grupo HFD6% apresentou o menor ganho de peso quando comparado aos grupos HFD e HFD2% (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros biométricos e taxa de sobrevivência dos grupos experimentais

Parâmetros	Controle	HFD	HFD2%	HFD4%	HFD6%	Valor-p
Peso final (mg)	214,74 ± 0,72 ab	250,00 ± 9,28 a	247,14 ± 3,23 a	198,22 ± 40,19 ab	192,64 ± 15,86 b	0,013*
Comprimento padrão (mm)	22,72 ± 0,76	22,81 ± 0,36	22,84 ± 0,79	22,02 ± 1,05	22,78 ± 0,42	0,240
Ganho de peso (mg)	58,17 ± 9,99 bc	100,77 ± 19,02 a	91,51 ± 5,12 ab	63,26 ± 17,24 abc	40,89 ± 18,64 c	0,002*
Taxa de sobrevivência (%)	77,50 ± 12,58	72,50 ± 12,58	80,00 ± 8,16	85,00 ± 12,91	92,50 ± 9,57	0,179

*Valor-P = p<0,05.

3.3 Parâmetros bioquímicos

Em relação aos níveis glicêmicos a Tabela 4, demonstra que o grupo HFD apresentou os maiores níveis glicêmicos quando comparado aos demais grupos. No que tange ao grupo

controle e o grupo HFD2% pode ser observado que não houve diferença estatística entre eles (Tabela 4). Os menores níveis glicêmicos foram observados nos HFD4% e HFD6% quando comparados aos demais grupos (Tabela 4).

Para os níveis de triglicerídeos e colesterol total não foi evidenciada diferença estatística em relação grupos (Tabela 4). Por outro lado, em relação aos níveis de HDL o grupo HFD6% obteve os maiores níveis quando comparado aos grupos HFD e HFD2% (Tabela 4). Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e HFD4% para os níveis de HDL, como também entre os grupos HFD e HFD2% (Tabela 4).

Com relação aos níveis das enzimas ALT e AST não foi observada diferença estatística entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do corpo inteiro do zebrafish alimentados com diferentes concentrações da farinha da semente de lichia

Parâmetros	Controle	HFD	HFD2%	HFD4%	HFD6%	Valor -P
Glicemia (mg/dL)	56,35 ± 0,02 b	61,36 ± 0,69 a	56,48 ± 1,40 b	46,40 ± 0,23 c	47,23 ± 0,32 c	0,000 *
Triglicerídeos (mg/dL)	117,72 ± 0,62	115,60 ± 17,20	118,95 ± 5,14	114,95 ± 2,16	115,15 ± 1,95	0,864
Colesterol total (mg/dL)	68,66 ± 1,63	69,51 ± 2,16	70,58 ± 10,86	73,00 ± 7,76	74,01 ± 3,90	0,812
HDL (mg/dL)	45,12 ± 0,52 ab	42,14 ± 1,56 b	43,33 ± 2,05 b	46,59 ± 3,30 ab	49,42 ± 1,86 a	0,012 *
ALT (u/mL)	78,58 ± 0,56	76,91 ± 4,26	75,95 ± 3,86	78,54 ± 3,90	74,10 ± 2,06	0,447
AST (u/mL)	42,78 ± 3,85	44,94 ± 1,93	49,20 ± 8,70	41,61 ± 1,48	46,89 ± 0,65	0,287

HDL = High density lipoprotein.

AST = Aspartate aminotransferase.

ALT = Alanine aminotransferase.

*Valor-P = p<0,05.

3.4 Cortisol

O grupo HFD apresentou o maior nível de cortisol quando comprado ao grupo controle (Fig. 1A). Os grupos HFD2%, HFD4% e HFD6% não diferiram estatisticamente entre si (Fig. 1A).

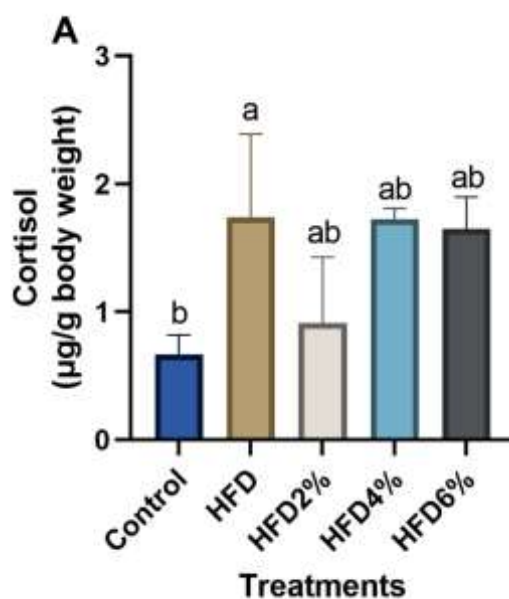


Figura 1 – Níveis de cortisol do corpo inteiro do zebrafish (A). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças entre grupos em $p < 0,05$, conforme indicado pelo teste post hoc de Tukey.

3.5 Estresse oxidativo

Maior atividade da CAT foi observada no grupo HFD6% quando comparado aos demais grupos exceto no grupo controle (Fig. 2A). Por outro lado, foi observada menor atividade da CAT no grupo HFD quando comparado aos grupos HFD6%, HFD2% e grupo controle (Fig. 2A).

Foi observada maior atividade da SOD no grupo HFD quando comparada ao grupo controle e HFD4% (Fig. 2B). Em contrapartida, menor atividade da SOD foi notada no grupo HFD4% em relação aos grupos HFD2% e HFD (Fig. 2B).

A maior atividade da GST foi observada no grupo HFD6% quando comparada ao grupo HFD (Fig. 2C). Nos grupos controle, HFD2% e HFD4% não foi observado diferença estatística (Fig. 2C).

Houve um maior aumento da concentração da GSH no grupo HFD2% quando comparada aos grupos controle e HFD (Fig. 2D). Por outro lado, não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e HFD, como também entre os grupos HFD4% e HFD6% em relação a concentração de GSH (Fig. 2D).

As concentrações mais elevadas de ROS foram observadas nos grupos controle, HFD e HFD2%, por outro lado, baixas concentrações de ROS foram evidenciadas nos grupos HFD4% e HFD6% (Fig. 2E).

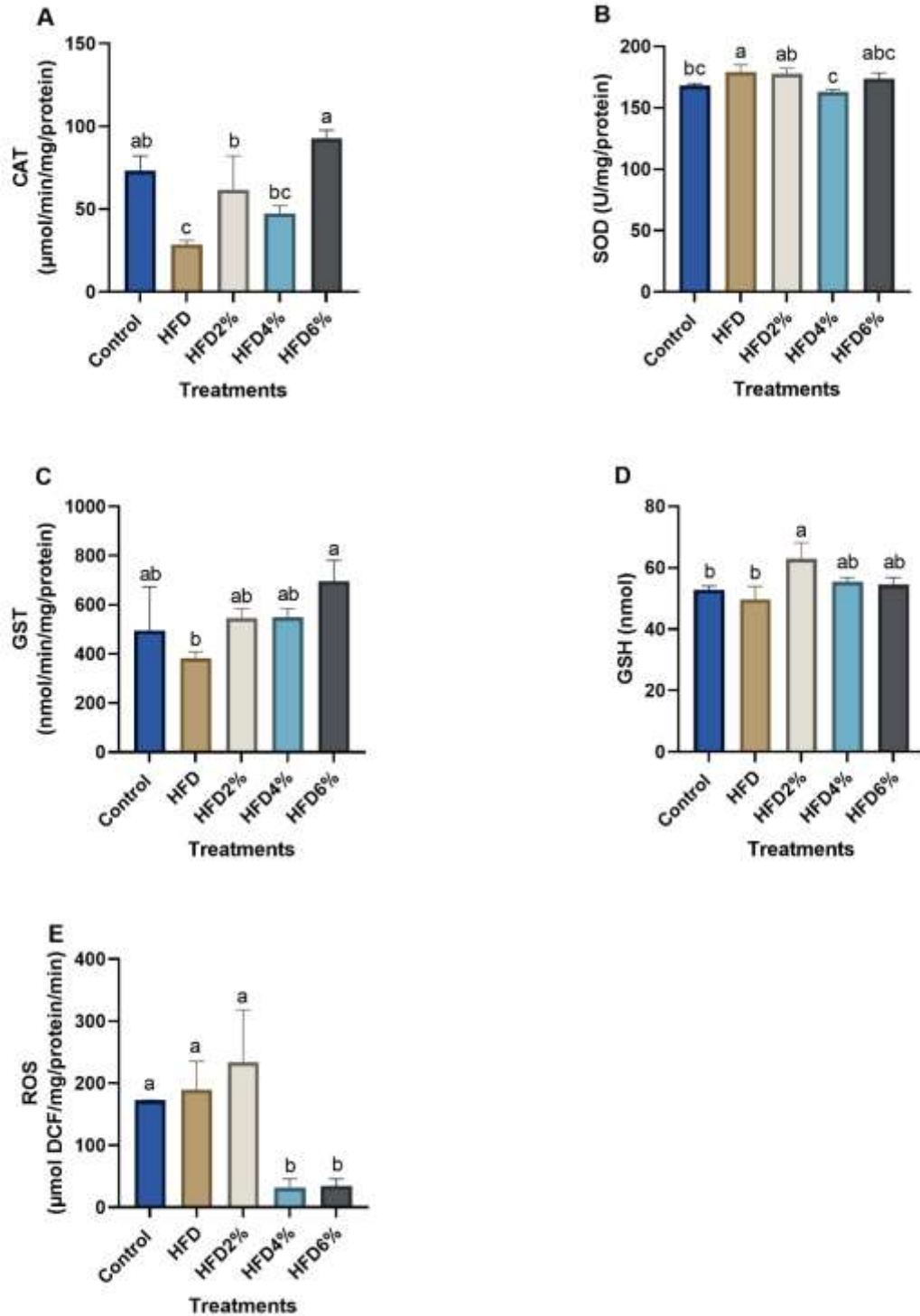


Figura 2 – Efeito da farinha da semente de lichia na atividade da Catalase (CAT) (A), Superóxido dismutase (SOD) (B), Glutathione-S-transferase (GST) (C), nos níveis de Glutathione reduzida GSH (D) e Reactive oxygen species (ROS) (E). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças entre grupos em $p < 0,05$, conforme indicado pelo teste post hoc de Tukey.

3.6 Corte e regeneração da cauda

Conforme apresentado na Tabela 5, não foram observadas diferenças significativas na regeneração da cauda dos zebrafish entre os grupos experimentais nos três pontos de tempo avaliados: cinco, dez e quinze dias pós-amputação (Fig. 3).

Tabela 5 – Percentual de regeneração da cauda dos grupos experimentais (5, 10 e 15 dias)

Tratamento	Regeneração da Cauda (%)		
	5 dias (Média \pm Desvio Padrão)	10 dias (Média \pm Desvio Padrão)	15 dias (Média \pm Desvio Padrão)
Controle	38,25 \pm 7,44	72,64 \pm 17,05	86,64 \pm 15,24
HFD	41,03 \pm 10,36	73,33 \pm 17,02	87,99 \pm 11,23
HFD2%	43,72 \pm 15,44	79,11 \pm 18,00	92,70 \pm 11,98
HFD4%	42,56 \pm 13,73	81,43 \pm 18,06	89,43 \pm 16,73
HFD6%	41,75 \pm 11,63	77,98 \pm 12,40	94,24 \pm 7,96
Valor-p	0,949	0,834	0,654

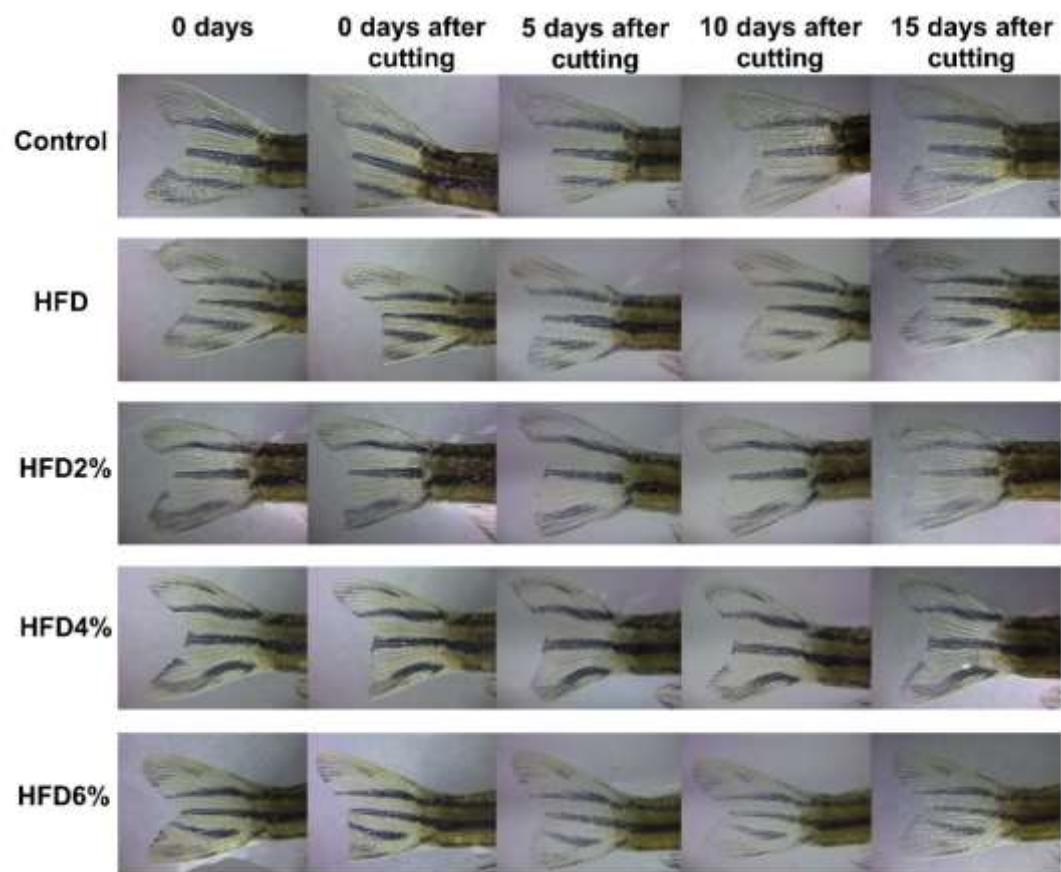


Figura 3 – Corte e regeneração da cauda dos grupos experimentais: zero, cinco, dez e quinze dias pós-amputação

3.7 Análise histológica

A média do diâmetro dos adipócitos viscerais no grupo HFD4% foi significativamente menor quando comparado aos grupos controle, HFD e HFD2% (Fig. 4A).

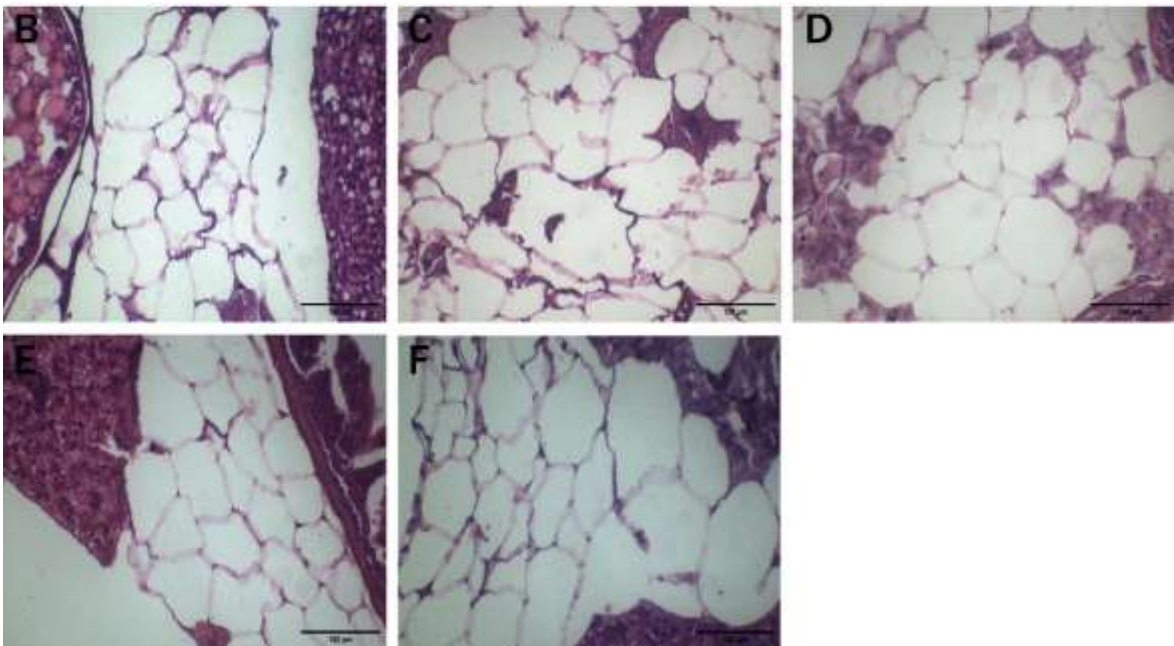
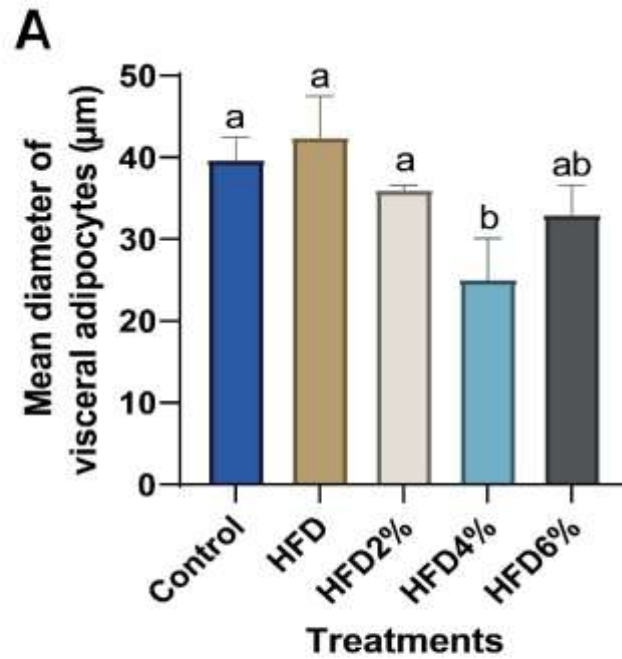


Figura 4 – Média do diâmetro dos adipócitos viscerais dos tratamentos (μm) (A). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças entre grupos em $p < 0,05$, conforme indicado pelo teste post hoc de Tukey. Tecido adiposo Visceral: Controle (B), HFD (C), HFD2% (D), HFD4% (E) e HFD6% (F).

Na Figura 5A, pode ser observado uma frequência de 50% de esteatose acentuada e moderada tanto no grupo controle quanto no grupo HFD. Já no grupo HFD2% houve uma maior

frequência (50%) de esteatose moderada. No grupo HFD4% e HFD6% foi observada uma frequência de esteatose moderada (100%) e discreta (100%), respectivamente.

Na Figura 5B, foi possível observar uma esteatose acentuada (+++), devido ao aumento do volume dos hepatócitos, com vacuolização citoplasmática acentuada, culminando no deslocamento de 80 a 100% dos núcleos para a periferia da célula.

A Figura 5C, apresenta uma esteatose moderada (++), com núcleo predominantemente central e intercalados por hepatócitos com discreta vacuolização ou sem alteração. Além disso, foi perceptível as mesmas alterações já mencionadas na Figura 5B.

Na Figura 5F ainda pode ser visto um núcleo predominantemente central. No entanto, há um predomínio de hepatócitos com discreta vacuolização intracitoplasmática, núcleo central e sem distorção dos cordões de hepatócitos e raras células com moderada vacuolização, o que caracteriza uma esteatose discreta.

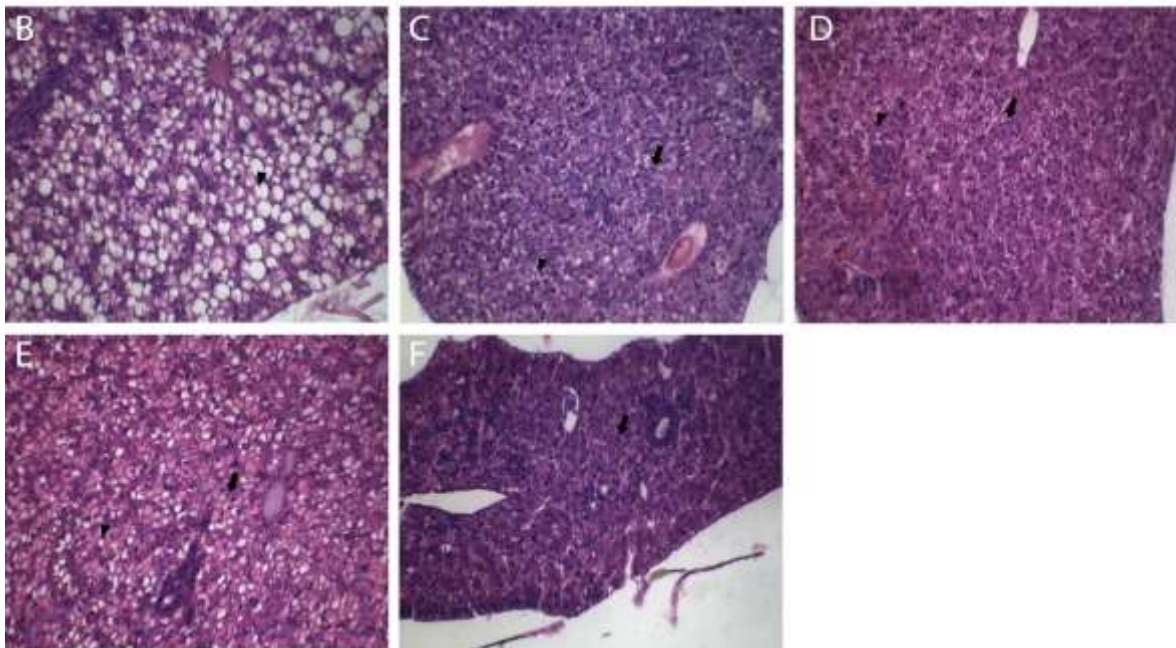
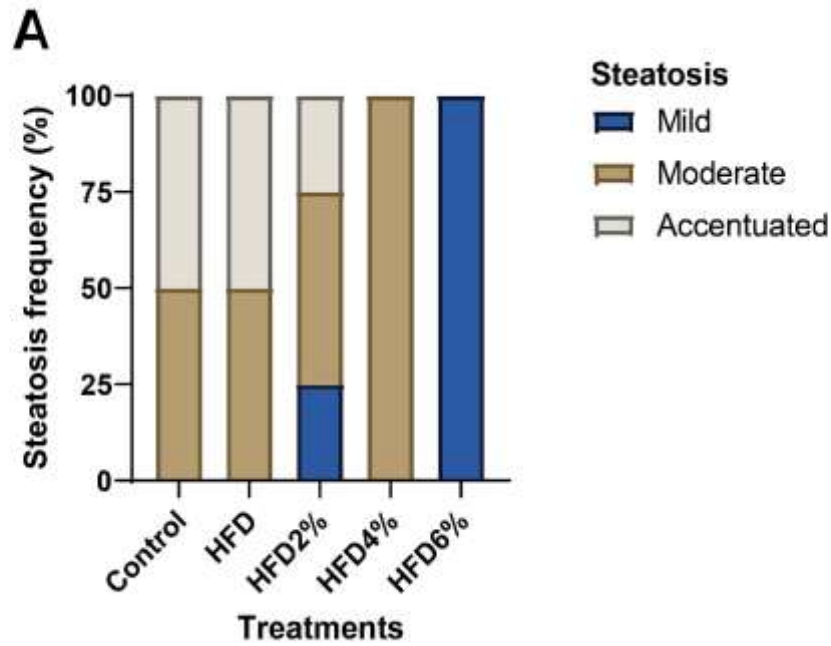


Figura 5 – frequência de esteatose hepática entre os tratamentos (A). Nas Figuras B (Controle), C (HFD), D (HFD2%) e E (HFD4%) o ▼ representa uma esteatose acentuada (+++), devido ao aumento do volume dos hepatócitos, com vacuolização citoplasmática acentuada, culminando no deslocamento de 80 a 100% dos núcleos para a periferia da célula. Nas Figuras C (HFD), D (HFD2%) e F (HFD6%) a ↓ representa uma esteatose moderada (++), com núcleo predominantemente central e intercalados por hepatócitos com discreta vacuolização ou sem alteração.

4. DISCUSSÃO

Vasco et al. (2008) classificaram o teor de compostos fenólicos totais em três categorias, sendo baixo (<100 mg GAE.100 g^{-1}), intermediário (100-500 mg GAE.100 g^{-1}) e muito alto (>500 mg GAE.100 g^{-1}). No presente estudo, o teor de compostos fenólicos totais se encontra na categoria muito alto ($1677 \pm 124,03$ mg GAE.100 g^{-1}). O teor de flavonoides totais no presente estudo foi de $58,46 \pm 2,11$ mg QE.100 g^{-1} e no estudo conduzido por Qi et al. (2015) foi de 306 mg equivalentes de rutina g^{-1} . Ambos métodos empregados representam que o extrato aquoso da farinha da casca da lichia representa níveis consideráveis de compostos fenólicos, visto que cada metodologia utilizada dispõe de diferentes reações químicas e a individualidade do composto químico testado. Os compostos fenólicos são caracterizados como os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas, sendo estes amplamente distribuídos nas plantas (XU *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos são geralmente classificados em cinco categorias: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos (JIANG *et al.*, 2021).

Dois métodos foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso da farinha da semente da lichia e ambas metodologias demonstraram que o extrato apresenta atividade antioxidante. No presente estudo, a atividade antioxidante pelo ensaio ABTS⁺ foi de $77,45 \pm 9,53\%$ de inibição do radical, já no estudo de Contreras-Castro et al. (2022) utilizando o extrato metanólico da semente do estágio de maturação I foi de $21,414 \pm 4049$ e no II $24,129 \pm 7218$ mg equivalente de ácido ascórbico por 100 g de peso seco. Em ambos estudos, o solvente utilizado e os dados resultantes da análise do radical ABTS⁺ foram expressos de forma diferente, entretanto, demonstraram que a semente da lichia apresenta atividade antioxidante. Ressalta-se que o radical ABTS⁺ reage com maior precisão com certos grupos de antioxidantes, principalmente aqueles com estrutura fenólica (ILYASOV *et al.*, 2020). Hassimotto et al. (2005) classificaram como alta ($>70\%$), intermediária (40-70%) e baixa ($<40\%$) a capacidade de inibição da oxidação do sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico, o que no presente estudo, o extrato da farinha da semente de lichia se encontra na faixa intermediária ($41,63 \pm 3,35$).

No presente estudo, o ganho de peso foi maior no grupo HFD enquanto que no grupo HFD6% foi observado o menor ganho de peso. Uma explicação para o menor ganho de peso do grupo HFD6% é devido a presença de flavonoides na semente da lichia, o que de fato, duas revisões da literatura retratam que os flavonoides apresentam importantes mecanismos para a redução da gordura corporal em modelos de zebrafish obesos e o estudo da obesidade e síndrome metabólica (MONTALBANO *et al.*, 2021; RUSSO *et al.*, 2023). No estudo conduzido por Xiang et al. (2022), os zebrafish que receberam uma dieta HFD por oito semanas

apresentaram uma significativa inibição do ganho de peso após ingestão da semente de lichia em pó, além disso, o grupo que recebeu o extrato etanólico da semente de lichia também apresentaram menor peso que o peso inicial.

Foram observados maiores níveis glicêmicos no grupo HFD e menores níveis glicêmicos nos grupos HFD4% e HFD6%. A redução da glicemia nos grupos HFD4% e HFD6% se deve a ação das catequinas encontradas na semente de lichia (MAN *et al.*, 2017). Os principais compostos investigados com ação hipogliceminante são as flavanonas, flavonóis, proantocianidinas e dihidrochalconas presentes na semente de lichia (ZHANG *et al.*, 2021). Man *et al.* (2016) conduziram um experimento fornecendo uma dieta HFD para ratos com diabetes mellitus tipo 2 utilizando 30 mg/kg do extrato da semente da lichia. O extrato da semente de lichia diminuiu os níveis glicêmicos incluindo importantes parâmetros metabólicos como glicólise, gliconeogênese e metabólitos referentes aos ácidos graxos (MAN *et al.*, 2016).

No presente estudo, foi evidenciado que o grupo HFD6% apresentou o maior nível de HDL entre os demais tratamentos. O consumo de alimentos que contem gorduras mono e poli-insaturadas são um dos fatores que aumentam o colesterol HDL, sendo assim, a semente da lichia é composta em média de 14,67 por ácidos graxos monoinsaturados e 63,35 por ácidos graxos poli-insaturados (MORENO LUZIA; JORGE, 2011).

Os níveis de cortisol foram maiores do grupo HFD quando comparado ao grupo controle., assim como, houve uma tendência de redução nos grupos em que houve a adição da farinha da semente da lichia. No entanto, há relatos na literatura, que o aumento da ação dos glicocorticoides pode estar relacionado ao estresse e a obesidade, principalmente a composição corporal (VAN DER VALK; SAVAS; VAN ROSSUM, 2018).

No que tange ao estresse oxidativo, foi observado que o grupo HFD6% teve maior atividade da CAT e GST em ambas análises realizadas, em contrapartida, no grupo HFD houve uma diminuição da atividade da CAT e GST. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de a semente da lichia ser composta por vários fitoquímicos que estimulam as defesas antioxidantes. Os fitoquímicos são compostos bioativos derivados de frutas, vegetais, cereais e outros alimentos vegetais, atuando principalmente na proteção de doenças crônicas não-transmissíveis (KUMAR *et al.*, 2023). No estudo conduzido por Adjoumani *et al.* (2017) nos peixes *Megalobrama amblycephala* também foi observado o aumento da atividade da CAT quando comparado ao grupo HFD que receberam as dietas com betaína nas concentrações 0,6%, 1,2%, e 1,8%, o que de fato não vai de encontro com o presente estudo é que não houve diferença estatística nas diferentes concentrações utilizadas quando comparadas com o grupo HFD.

Maior atividade da SOD no grupo HFD deve ter ocorrido devido ao desbalanço redox. Moléculas inorgânicas e orgânicas podem sofrer a ação das ERO's, que por sua vez podem alterar sua estrutura e função de forma definitiva. Essas moléculas incluem proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (DI MEO; VENDITTI; NAPOLITANO, 2022).

Maior concentração de GSH foi observada particularmente no grupo HFD2% devido aos compostos antioxidantes presentes na farinha. A GSH é um antioxidante endógeno não enzimático, produzida pelo metabolismo do nosso organismo (KOTHA *et al.*, 2022). Na espécie *Megalobrama amblycephala* a adição de betaína na dieta nas concentrações 0,6%, 1,2% e 1,8% também aumentou a concentração da GSH quando comparado ao grupo HFD, o que se assemelha ao presente estudo (ADJOUMANI *et al.*, 2017).

Houve um aumento na produção de ERO's nos grupos controle, HFD e HFD2% em detrimento dos grupos HFD4% e HFD6%. No grupo HFD e HFD2% a composição da ração foi a mesma, variando apenas a adição da farinha da semente de lichia. Por outro lado, nos grupos, HFD4% e HFD6% a adição de 4 e 6% da farinha foi o suficiente para diminuir a produção de ERO's devido a presença de compostos fenólicos e antioxidantes já elucidados anteriormente. A lichia é considerada um dos frutos com as maiores propriedades antioxidantes (SATHYA *et al.*, 2023). Basicamente, a lichia é composta principalmente de polifenóis. No estudo conduzido por (JIANG *et al.*, 2021) do total de cinco genótipos de diferentes cultivares de lichias os flavonóides, flavonóis, hidroxicinamofílas e catequinas representaram 80,23% do total de polifenóis principais da pesquisa realizada.

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatísticas na regeneração da cauda do zebrafish, o que de fato, sugere que nenhum composto bioativo presente na farinha foi capaz de auxiliar no processo de regeneração da cauda. Em um estudo em que foi utilizado o composto fenólico ácido rosmarínico os zebrafish tratados com 160 μ L do extrato aquoso apresentaram regeneração máxima (0,9 mm) no sétimo dia e com a concentração mínima de 20 μ L reestabeleceram a regeneração máxima de comprimento (1,2 mm) (MARGRET *et al.*, 2022).

A respeito da histologia, o grupo HFD4% obteve a média do diâmetro dos adipócitos viscerais menor quando comparado aos outros grupos. No entanto, a semente da lichia em pó foi capaz de reduzir a gordura visceral de ratos alimentados com uma dieta HFD (XIANG *et al.*, 2022), o que corrobora com o presente estudo. Além disso, a farinha da semente de lichia é rica em compostos fenólicos, e dentre a classe de substâncias fenólicas as que mais geram interesse pelas suas propriedades antiobesogênicas são: galato de epigallocatequina, resveratrol,

catequina, quercetina, procianidinas e antocianinas (RODRÍGUEZ-PÉREZ; SEGURA-CARRETERO; DEL MAR CONTRERAS, 2019).

No presente estudo, esteatose acentuada e moderada foi predominante nos tratamentos HFD, HFD2% e HFD4%, podendo ser observada esteatose discreta no grupo tratado com 6% da farinha da semente de lichia. No estudo de Li *et al.* (2023) o grupo de zebrafish com indução a obesidade (DIO) alimentados com 60 g de artemia por dia e o grupo HFD que recebiam uma combinação de 5 g de artemia + 30g de gema de ovo por dia apresentaram a esteatose acentuada, o que de fato se assemelha com os dados apresentados neste estudo. De acordo com o estudo de Zhou *et al.* (2019) 25 mg/L do flavonoide naringina foi capaz de reverter a esteatose hepática severa de larvas de zebrafish. A partir desse achado, podemos sugerir que a esteatose discreta no grupo HFD6% tenha tido tal ação devido as propriedades dos flavonoides, pois conforme já evidenciado neste estudo, o extrato da farinha da semente da lichia tenha apresentado teores de flavonoides totais, no entanto, para a identificação destes compostos seria necessário a realização da cromatografia líquida de alta performance.

5. CONCLUSÃO

A adição de 4 e 6% de farinha de semente de lichia trouxe benefícios metabólicos e bioquímicos em zebrafish adultos. A ração contendo a farinha da semente da lichia acarretou da redução da glicemia e aumento do HDL. Menor atividade da CAT e GST foram observadas no grupo HFD4%, além disso, a diminuição de ERO's ocorreu nos grupos HFD4% e HFD6%. A ingestão da farinha a longo prazo demonstrou uma diminuição no tecido adiposo visceral do grupo HFD4% e esteatose discreta no grupo HFD6%. Um estudo mais aprofundado seja necessário para identificar quais compostos presentes na farinha da semente da lichia sejam responsáveis por exercer essa propriedade antiobesogênica.

REFERÊNCIAS

- ADJOURMANI, J. J. Y.; WANG, K.; ZHOU, M.; LIU, W.; ZHANG, D. Effect of dietary betaine on growth performance, antioxidant capacity and lipid metabolism in blunt snout bream fed a high-fat diet. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1733–1745, 2017.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ‘AQILAH, N. M. N.; ROVINA, K.; FELICIA, W. X. L.; VONNIE, J. M. A Review on the Potential Bioactive Components in Fruits and Vegetable Wastes as Value-Added Products in the Food Industry. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2631, 2023.
- ARVOUET-GRAND, A.; VENNAT, B.; POURRAT, A.; LEGRET, P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. **Journal de pharmacie de Belgique**, v. 49, n. 6, p. 462–468, 1994.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 20. ed. Rockville: AOAC International, 2016.
- BARAKAT, B.; ALMEIDA, M. E. F. Biochemical and immunological changes in obesity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 15, n. 708, p. 108951, 2021.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CANAVELLO, P. R.; CACHAT, J. M.; BEESON, E. C.; LAFFOON, A. L.; GRIMES, C.; HAYMORE, W. A. M.; ELEGANTE, M. F.; BARTELS, B. K.; HART, P. C.; ELKHAYAT, S. I. Measuring endocrine (cortisol) responses of zebrafish to stress. **Zebrafish neurobehavioral protocols**, p. 135–142, 2011.
- CARVALHO, P. L. P. F.; ALMEIDA, P. H. V.; XAVIER, W. dos S.; VICENTE, I. S. T.; GUIMARÃES, M. G.; RODRIGUES, E. J. D.; ITO, P. I.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Vitamin C supplementation improves growth performance and caudal fin regeneration in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 27, n. S1, p. 115–123, 2021.
- CHUKWUMA, C. I.; IZU, G. O.; CHUKWUMA, M. S.; SAMSON, M. S.; MAKHAFOLA, T. J.; ERUKAINURE, O. L. A review on the medicinal potential, toxicology, and phytochemistry of litchi fruit peel and seed. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 12, 2021.
- CONTRERAS-CASTRO, A. I.; OIDOR-CHAN, V. H.; BUSTAMANTE-CAMILO, P.; PELAYO-ZALDÍVAR, C.; DÍAZ DE LEÓN-SÁNCHEZ, F.; MENDOZA-ESPINOZA, J. A. Chemical Characterization and Evaluation of the Antihyperglycemic Effect of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Brewster. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 1, p. 61–69, 2022.

DANDIN, E.; ÜSTÜNDAĞ, Ü. V.; ÜNAL, İ.; ATEŞ-KALKAN, P. S.; CANSIZ, D.; BELER, M.; AK, E.; ALTURFAN, A. A.; EMEKLI-ALTURFAN, E. Stevioside ameliorates hyperglycemia and glucose intolerance, in a diet-induced obese zebrafish model, through epigenetic, oxidative stress and inflammatory regulation. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 16, n. 1, p. 23–29, 2022.

DIMEO, S.; VENDITTI, P.; NAPOLITANO, G. Physiological and Pathological Role of ROS: Benefits and Limitations of Antioxidant Treatment 2.0. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9437, 2022.

DRIVER, A. S.; KODAVANTI, P. R. S.; MUNDY, W. R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, n. 2, p. 175–181, 2000.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398–405, 1981.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928–2935, 2005.

ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V. L.; SELIVANOVA, I. A.; TEREKHOV, R. P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1131, 2020.

JIANG, N.; ZHU, H.; LIU, W.; FAN, C.; JIN, F.; XIANG, X. Metabolite Differences of Polyphenols in Different Litchi Cultivars (*Litchi chinensis* Sonn.) Based on Extensive Targeted Metabonomics. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1181, 2021.

KOTHA, R. R.; TAREQ, F. S.; YILDIZ, E.; LUTHRIA, D. L. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2388, 2022.

KUMAR, A.; P, N.; KUMAR, M.; JOSE, A.; TOMER, V.; OZ, E.; PROESTOS, C.; ZENG, M.; ELOBEID, T.; K, S.; OZ, F. Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 887, 2023.

LI, X.; GE, G.; SONG, G.; LI, Q.; CUI, Z. Effects of Nutritionally Induced Obesity on Metabolic Pathways of Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1850, 2023.

MAN, S.; MA, J.; WANG, C.; LI, Y.; GAO, W.; LU, F. Chemical composition and hypoglycaemic effect of polyphenol extracts from *Litchi chinensis* seeds. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 313–324, 2016.

MARCO, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594–598, 1968.

MARGRET, A. A.; MAHESWARI, R.; ROSITA, A. S.; JESUCASTIN, E. Discerning the regulated wound healing potential of *Ocimum americanum* by probing the rosmarinic acid

content-a paradigm on zebrafish caudal fin regeneration. **Trends in Phytochemical Research**, v. 6, n. 2, p. 106–115, 2022.

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 79–87, 2011.

MONTALBANO, G.; MHALHEL, K.; BRIGLIA, M.; LEVANTI, M.; ABBATE, F.; GUERRERA, M. C.; D'ALESSANDRO, E.; LAURÀ, R.; GERMANÀ, A. Zebrafish and Flavonoids: Adjuvants against Obesity. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 3014, 2021.

MORENO LUZIA, D. M.; JORGE, N. Evaluating of the activity antioxidant and fatty acids profile of lychee seeds (*Litchi chinensis* SONN.). **Nutrition & Food Science**, v. 41, n. 4, p. 261–267, 2011.

PÉREZ-TORRES, I.; CASTREJÓN-TÉLLEZ, V.; SOTO, M. E.; RUBIO-RUIZ, M. E.; MANZANO-PECH, L.; GUARNER-LANS, V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1786, 2021.

PUNIA, S.; KUMAR, M. Litchi (*Litchi chinensis*) seed: Nutritional profile, bioactivities, and its industrial applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, p. 58–70, 2021.

QI, S.; HUANG, H.; HUANG, J.; WANG, Q.; WEI, Q. Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) seed water extract as potential antioxidant and anti-obese natural additive in meat products. **Food Control**, v. 50, p. 195–201, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, P. V. de M.; ANDRADE, P. A.; HERMSDORFF, H. H. M.; DOS SANTOS, C. A.; COTTA, R. M. M.; ESTANISLAU, J. de A. S. G.; CAMPOS, A. A. de O.; ROSA, C. de O. B. Dietary non-nutrients in the prevention of non-communicable diseases: Potentially related mechanisms. **Nutrition**, v. 66, n. 22–28, 2019.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; DEL MAR CONTRERAS, M. Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 8, p. 1212–1229, 2019.

RUSSO, C.; MAUGERI, A.; MUSUMECI, L.; DE SARRO, G.; CIRMI, S.; NAVARRA, M. Inflammation and Obesity: The Pharmacological Role of Flavonoids in the Zebrafish Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2899, 2023.

SATHYA, R.; VALAN ARASU, M.; ILAVENIL, S.; REJINIEMON, T. S.; VIJAYARAGHAVAN, P. Cosmeceutical potentials of litchi fruit and its by-products for a sustainable revalorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102683, 2023.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

VAN DER VALK, E. S.; SAVAS, M.; VAN ROSSUM, E. F. C. Stress and Obesity: Are There More Susceptible Individuals? **Current Obesity Reports**, v. 7, n. 2, p. 193–203, 2018.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816–823, 2008.

VIROTE, B. do C. R.; MOREIRA, A. M. S.; SILVA SOUZA, J. G. da; CASTRO, T. F. D.; MELO, N.; CARNEIRO, W. F.; DRUMMOND, C. D.; VIANNA, A. R. da C. B.; MURGAS, L. D. S. Obesity induction in adult zebrafish leads to negative reproduction and offspring effects. **Reproduction**, v. 160, n. 6, p. 833–842, 2020.

XIANG, J. Y.; CHI, Y. Y.; HAN, J. X.; KONG, P.; LIANG, Z.; WANG, D.; XIANG, H.; XIE, Q. Litchi chinensis seed prevents obesity and modulates the gut microbiota and mycobiota compositions in high-fat diet-induced obese zebrafish. **Food & function**, v. 13, n. 5, p. 2832–2845, 2022.

XU, C. C.; WANG, B.; PU, Y. Q.; TAO, J. S.; ZHANG, T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 721–731, 2017.

ZHANG, Y.; JIN, D.; AN, X.; DUAN, L.; DUAN, Y.; LIAN, F. Lychee Seed as a Potential Hypoglycemic Agent, and Exploration of its Underlying Mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 12, p. 737803, 2021.

ZHOU, C.; LAI, Y.; HUANG, P.; XIE, L.; LIN, H.; ZHOU, Z.; MO, C.; DENG, G.; YAN, W.; GAO, Z.; HUANG, S.; CHEN, Y.; SUN, X.; LV, Z.; GAO, L. Naringin attenuates alcoholic liver injury by reducing lipid accumulation and oxidative stress. **Life Sciences**, v. 216, p. 305–312, 2019.