



STEFÂNIA BARROS ZAUZA

**BIOFORTIFICAÇÃO DE MORANGO COM SELÊNIO,
FERRO E ZINCO: EFEITOS NO MODELO ZEBRAFISH (*Danio
rerio*)**

**LAVRAS – MG
2024**

STEFÂNIA BARROS ZAUZA

**BIOFORTIFICAÇÃO DE MORANGO COM SELÊNIO, FERRO E ZINCO: EFEITOS
NO MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Profª. Dra. Luciane Vilela Resende
Orientadora

Prof. Dr. Luis David Solís 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).

Zauza, Stefânia Barros.

Biofortificação de morango com selênio, ferro e zinco: efeitos
no modelo zebrafish (*Danio rerio*) / Stefânia Barros Zauza. - 2024.
75 p. : il.

Orientador(a): Luciane Vilela Resende.

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

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

Bibliografia.

1. Biofortificação. 2. Micronutrientes. 3. Zebrafish. I. Resende,
Luciane Vilela. II. Murgas, Luis David Solís. III. Carneiro, William
Franco. IV. Título.

STEFÂNIA BARROS ZAUZA

**BIOFORTIFICAÇÃO DE MORANGO COM SELÊNIO, FERRO E ZINCO: EFEITOS
NO MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**BIOFORTIFICATION OF STRAWBERRY WITH SELENIUM, IRON AND ZINC:
EFFECTS ON THE ZEBRAFISH MODEL (*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de maio de 2024.

Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA
Dr. Luis David Solís Murgas	UFLA
Dra. Maria Ligia de Souza Silva	UFLA
Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna	UFPR
Dra. Stefania Priscilla de Souza	UFLA

Profª. Dra. Luciane Vilela Resende
Orientadora

Prof. Dr. Luis David Solís Murgas
Coorientador

Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS - MG
2024**

À Deus.

Aos meus pais Flávio Zauza e Fátima Zauza.

Ao meu irmão Hugo.

Ao meu querido e amado namorado.

Aos meus amigos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo à Deus, pela força divina que me concedeu para aguentar os obstáculos da vida, me livrando de todo mal e iluminando meu caminho até aqui e, por mais um degrau alcançado;

Aos meus pais, Flávio Olaércio Zauza e Fátima Paes Barros Zauza, por todo o incentivo, carinho, cuidado, amor, por caminharem sempre ao meu lado, pelas oportunidades ao longo de toda a minha vida, por vibrarem a cada conquista minha e, por sempre me mostrarem a importância do estudo;

Ao meu irmão Hugo Leonardo Barros Zauza por todo carinho e incentivo;

Ao meu querido namorado Filipe Aiura Namorato por todos esses anos de carinho, companheirismo e incentivo, caminhando sempre ao meu lado e subindo cada degrau juntos;

À minha querida orientadora Luciane Vilela Resende, por ser sempre uma “mãe de todos” com seu coração enorme. Obrigada por todo o carinho, amizade, confiança, ajuda e suporte oferecidos, e por ter aberto as portas de sua casa junto à sua família em meio à pandemia, para que o experimento em casa de vegetação fosse realizado;

Ao professor Wilson Magela Gonçalves, por ter aberto as portas de sua casa para a realização do experimento com o morango, nos ajudando em todas as etapas e, por toda a troca de conhecimentos, amizade e carinho de sempre;

Ao professor Luis David Solís Murgas por ter fornecido toda a infraestrutura necessária dentro do biotério para a realização do experimento com os peixes;

Ao funcionário Felipe, por toda a ajuda no experimento com o morango em casa de vegetação;

Aos colegas de pós-graduação por sempre estarem disponíveis em ajudar, em especial à Janina, por toda a troca de conhecimento, apoio e ajuda;

Aos amigos de Lavras, em especial à grande e querida amiga Vanêssa, que sempre irei levar no coração. Obrigada pela amizade, apoio, conversas, carinho e por contribuir para que a vida fosse mais leve e mais divertida;

A todos os professores, técnicos e funcionários da UFLA que auxiliaram com sua ajuda e conhecimentos;

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realizar o doutorado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia / Fitotecnia, pela oportunidade;

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio à pesquisa;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

MEU MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A biofortificação é uma estratégia que visa a segurança alimentar de toda a população mundial. Com isso, o uso de modelos animais que demonstrem seus efeitos positivos e adversos no organismo humano são necessários para demonstrar os impactos dessa abordagem na saúde. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da dieta com morango biofortificado com ferro, selênio e zinco isolados ou em associação em juvenis de zebrafish (*Danio rerio*). A ração comercial Alcon Basic® foi suplementada com 6% de morango seco, sendo que os tratamentos com as dietas experimentais consistiram em sete grupos de animais tratados com morangos biofortificados com minerais isolados e em associação, a citar ferro (Fe); selênio (Se); zinco (Zn); Fe + Se; Fe + Zn; Se + Zn; Fe + Se + Zn; um grupo tratado com morango não biofortificado e um grupo controle tratado somente com ração comercial Alcon Basic®. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia. Ao final do período experimental de 45 dias, os peixes foram anestesiados, pesados e medidos, para a realização da análise de desempenho de crescimento. Além disso, foram avaliados os parâmetros bioquímicos; histologia do intestino, fígado e músculo; estresse oxidativo e acúmulo de Fe, Se e Zn por Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). Os resultados mostraram que houve aumento significativo da largura das vilosidades intestinais dos peixes que receberam dieta suplementada com Se, Zn, Fe+Se, Fe+Zn e Fe+Se+Zn. Foi observado aumento significativo da atividade de todas as enzimas avaliadas, com a suplementação da dieta com morango biofortificado com Zn, além do aumento significativo da formação de EROs e dos níveis de MDA. A dieta suplementada com morango não biofortificado levou ao aumento da produção de EROs, entretanto não houve aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Já a dieta suplementada com Fe+Zn, aumentou a atividade das enzimas SOD, GST e GPx, enquanto os três microminerais Fe, Se e Zn em associação na dieta (Fe+Se+Zn), levaram ao aumento da atividade da GPx, sendo observado ligeiro aumento dos níveis de peroxidação lipídica com essas dietas que, no entanto, não levaram ao aumento na formação de EROs. Além disso, foi verificado através dos resultados da EDS, que houve maior absorção dos microminerais Fe, Se e Zn nos peixes que receberam dieta suplementada com os mesmos, quando comparado com o tratamento Controle, sendo o Fe, o elemento mais presente no organismo dos animais em todas as dietas. Sendo assim, o morango biofortificado com Fe+Zn e Fe+Se+Zn nos níveis estudados, pode ser recomendado para a suplementação da alimentação, uma vez que exerce efeitos positivos no sistema antioxidante, através do aumento da atividade enzimática. Ainda, através dos resultados da EDS, há um indicativo de que o morango foi biofortificado, além de demonstrar que a suplementação da dieta com morango biofortificado com Fe, Se e Zn, isolados e/ou em associação pode beneficiar a saúde dos animais, sem comprometer o desenvolvimento normal do organismo, como visto através dos resultados dos demais parâmetros analisados neste estudo.

Palavras-chave: biofortificação; morangueiro; ferro; selênio; zinco; zebrafish.

ABSTRACT

Biofortification is a strategy that aims to ensure food security for the entire world population. Therefore, the use of animal models that demonstrate its positive and adverse effects on the human body is necessary to demonstrate the impacts of this approach on health. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of dietary supplementation with strawberries biofortified with iron, selenium and zinc, isolated or in combination, in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). The commercial diet Alcon Basic® was supplemented with 6% dried strawberries, and the treatments with the experimental diets consisted in seven groups of animals treated with strawberries biofortified with minerals isolated and in combination, namely iron (Fe); selenium (Se); zinc (Zn); Fe + Se; Fe + Zn; Se + Zn; Fe + Se + Zn; one group treated with non-biofortified strawberries and a control group treated only with commercial diet Alcon Basic®. The animals were fed four times a day. At the end of the experimental period of 45 days, the fish were anesthetized, weighed and measured for growth performance analysis. In addition, biochemical parameters were evaluated; histology of the intestine, liver and muscle; oxidative stress and accumulation of Fe, Se and Zn by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The results showed a significant increase in the width of the intestinal villi of fish that received a diet supplemented with Se, Zn, Fe+Se, Fe+Zn and Fe+Se+Zn. A significant increase in the activity of all enzymes evaluated was observed with the supplementation of the diet with strawberries biofortified with Zn, in addition to a significant increase in the formation of ROS and MDA levels. The diet supplemented with non-biofortified strawberries led to an increase in ROS production, however there was no increase in lipid peroxidation levels. The diet supplemented with Fe+Zn increased the activity of the enzymes SOD, GST and GPx, while the three microminerals Fe, Se and Zn in association in the diet (Fe+Se+Zn) led to an increase in the activity of GPx, with a slight increase in the levels of lipid peroxidation being observed with these diets, which, however, did not lead to an increase in the formation of ROS. In addition, it was verified through the EDS results that there was a greater absorption of the microminerals Fe, Se and Zn in the fish that received a diet supplemented with them, when compared to the Control treatment, with Fe being the most present element in the organism of the animals in all diets. Therefore, the strawberry biofortified with Fe+Zn and Fe+Se+Zn at the levels studied can be recommended for supplementation of the diet, since it exerts positive effects on the antioxidant system, through the increase in the enzymatic activity. Furthermore, through the EDS results, there is an indication that the strawberry was biofortified, in addition to demonstrating that supplementing the diet with strawberries biofortified with Fe, Se and Zn, isolated and/or in combination, can benefit the health of animals, without compromising the normal development of the organism, as seen through the results of the other parameters analyzed in this study.

Keywords: biofortification; strawberry; iron; selenium; zinc; zebrafish.

INDICADORES DE IMPACTO

A biofortificação de culturas é uma estratégia para a mitigação da fome oculta que tem impacto social e econômico, atingindo toda a população mundial, principalmente populações carentes de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, que sofrem com problemas de deficiências de micronutrientes por falta de acesso aos mesmos, sendo uma alternativa viável economicamente. Além disso, o impacto dessa abordagem vai muito além, já que influencia diretamente na saúde das populações. Nesse contexto, pesquisas que demonstrem os efeitos da biofortificação com minerais no organismo humano através de estudos preditivos são necessárias para certificar os benefícios e riscos dessa abordagem, além do seu impacto direto e em potencial para as comunidades. Sendo assim, o uso de modelos animais, como o zebrafish, modelo utilizado nesse estudo, se mostrou promissor ao demonstrar os efeitos que os minerais ferro, selênio e zinco adicionados ao morango através da biofortificação agrônômica, têm sobre diversas funções fisiológicas do organismo desse modelo estudado, como as defesas antioxidantes, parâmetros de crescimento e bioquímicos, acúmulo no fígado e, efeitos sobre a histologia do fígado, músculo e intestino. Apesar de ser um estudo preditivo, como o zebrafish apresenta grande similaridade genética com o ser humano, os resultados desse trabalho demonstram de antemão os impactos que essa abordagem agrônômica tem sobre a saúde humana, podendo ser utilizados como referência para estudos futuros em humanos.

IMPACT INDICATORS

Crop biofortification is a strategy for mitigating hidden hunger that has a social and economic impact, reaching the entire world population, especially needy populations in underdeveloped and developing countries, who suffer from problems of micronutrient deficiencies due to lack of access to them, being an economically viable alternative. Furthermore, the impact of this approach goes much further, as it directly influences the health of populations. In this context, research that demonstrates the effects of biofortification with minerals on the human body through predictive studies is necessary to certify the benefits and risks of this approach, in addition to its direct and potential impact on communities. Therefore, the use of animal models, such as zebrafish, the model used in this study, proved promising by demonstrating the effects that the minerals iron, selenium and zinc added to strawberries through agronomic biofortification, have on various physiological functions of the organism in this model studied, such as antioxidant defenses, growth and biochemical parameters, accumulation in the liver and

effects on the histology of the liver, muscle and intestine. Despite being a predictive study, as zebrafish have great genetic similarity with humans, the results of this work demonstrate in advance the impacts that this agronomic approach has on human health, and can be used as a reference for future studies in humans.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	1
1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	A cultura do morango e sua importância na saúde humana	3
2.2	Biofortificação de culturas: uma estratégia para a mitigação da deficiência de micronutrientes na população	5
2.3	O ferro na saúde humana	6
2.4	O zinco na saúde humana	7
2.5	O selênio na saúde humana	9
2.6	O modelo zebrafish	10
	REFERÊNCIAS	13
	CAPÍTULO 2 – ARTIGO	23
1	INTRODUÇÃO	26
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1	Cultivo do morango e delineamento experimental	28
2.2	Declaração de ética	29
2.3	Origem e manutenção do zebrafish	29
2.4	Dieta experimental	29
2.5	Desempenho de crescimento	31
2.6	Preparo do homogenato	32
2.7	Parâmetros bioquímicos	32
2.8	Avaliação de estresse oxidativo	32
2.8.1	Determinação da atividade enzimática e de espécies reativas de oxigênio (EROs)	32
2.8.2	Biomarcadores de dano oxidativo	33
2.9	Análise da histomorfologia do intestino, músculo e fígado de zebrafish	33
2.10	Acúmulo de Fe, Se e Zn por Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)	34
2.11	Processamento de dados e análise estatística	34
3	RESULTADO	35
3.1	Desempenho de crescimento	35
3.2	Parâmetros bioquímicos	35
3.3	Avaliação de estresse oxidativo	38
3.3.1	Atividades de enzimas antioxidantes e formação de EROs	38
3.3.2	Biomarcadores de dano oxidativo	38

3.4	Histomorfologia do intestino, músculo e fígado	41
3.5	Acúmulo de Fe, Se e Zn por EDS	46
4	DISCUSSÃO	48
4.1	Parâmetros de desempenho e bioquímicos	48
4.2	Estresse oxidativo.....	49
4.3	Histomorfologia.....	51
4.4	Acúmulo de Fe, Se e Zn por EDS	52
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	55
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pertencente à família Rosaceae, o morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne) é consumido em todo o mundo, tanto *in natura*, quanto processado, na forma de geleias, sorvetes, iogurtes, compotas e em outras sobremesas, além de ser utilizado na indústria de cosméticos (Giampieri et al., 2015). Possui diversos benefícios para a saúde, representando uma boa fonte de potássio, sódio, manganês, iodo, magnésio, cobre, ferro, zinco, fósforo e cálcio (Giampieri et al., 2015; Nour et al., 2017). Além disso, o morango apresenta inúmeros compostos bioativos, que o caracteriza como alimento funcional, representados principalmente por flavonóides, com destaque para as antocianinas, seguidos de ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico, dos quais atuam na prevenção de diversas doenças (Forbes-Hernandez et al., 2016; Rothwell et al., 2013). Também apresenta significativo teor de vitamina C, cerca de 60 mg por 100 g de fruta fresca, e outras vitaminas em menor quantidade, como a vitamina B1, B2, B3 e B6, além das vitaminas A, E e K (Giampieri et al., 2015; Nour et al., 2017). Seu notável efeito antioxidante se deve ao alto teor de vitamina C e compostos polifenólicos (Ahouagi et al., 2021), principalmente as antocianinas, que apresentam propriedades antioxidantes (Ichikawa et al., 2001; Liu et al., 2024), anticarcinogênicas (Duthie, 2007), vasoprotetoras (Xu et al., 2004) e anti-inflamatórias (Seeram et al., 2001).

Devido ao seu elevado conteúdo nutricional e amplo consumo, o morangueiro tem se destacado como uma das culturas alvo de pesquisas relacionadas à biofortificação (Antoniou et al., 2021; Farid et al., 2020; Huang et al., 2023; Mimmo et al., 2017). Nesse contexto, a biofortificação tem sido utilizada como estratégia no combate às deficiências nutricionais que atingem toda a população mundial, principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, podendo ser definida como um processo em que se aumenta a concentração biodisponível de elementos essenciais e benéficos aos seres humanos e animais em partes comestíveis de plantas cultivadas, por meio da intervenção agrícola e/ou da seleção genética (White e Broadley, 2005). O ferro (Fe), selênio (Se) e zinco (Zn) estão entre os nutrientes mais deficientes na população em geral (Beal et al., 2017; FAO 2020; Kumssa et al., 2015), sendo que a baixa ingestão dietética desses nutrientes em inúmeras regiões do mundo tem sido associada a diversos problemas de saúde humana. Sendo assim, abordagens que visam aumentar o conteúdo desses minerais nos alimentos são ótimas alternativas para sanar esse problema que tem grande impacto na saúde das populações.

Dito isso, o uso de modelos animais em estudos preditivos relacionados à saúde humana se mostra importante e vem crescendo ao longo dos anos. Sendo assim, um modelo que apresenta bastante potencial é o modelo zebrafish (*Danio rerio*), e seu uso tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos, já que sua utilização está de acordo com os princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento) em relação à pesquisa animal (Tannenbaum e Bennett, 2015). Além disso, apresenta diversas vantagens em relação aos modelos com utilização de mamíferos, o que atrai ainda mais pesquisadores na exploração do seu uso. Dentre essas vantagens pode-se citar o desenvolvimento externo dos embriões, que possibilita o acompanhamento do ciclo de vida do peixe (Chen et al., 2020); fácil reprodução, gerando centenas de embriões por semana (Veldman e Lin, 2008); baixo custo de manutenção; facilidade de manipulação, alta taxa de sobrevivência larval e curto intervalo de geração (Meyers, 2018; Padilla e Glaberman, 2020). Devido a sua semelhança genética com o ser humano (aproximadamente 70%), em que cerca de 84% dos seus genes estão relacionados à doenças, o zebrafish tem tido sucesso como modelo experimental na pesquisa científica, pois muitas das características anatômicas e fisiológicas desses animais são altamente homólogas às dos seres humanos (Espinosa, 2016).

Considerando que a biofortificação é uma estratégia que visa a segurança alimentar de toda a população mundial, o uso de modelos animais que demonstrem seus efeitos positivos e adversos no organismo humano são necessários para demonstrar os impactos dessa abordagem na saúde. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da dieta com morango biofortificado com ferro, selênio e zinco isolados ou em associação em juvenis de zebrafish (*Danio rerio*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do morango e sua importância na saúde humana

O morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne) é considerado um dos frutos mais bem valorizados e consumidos no mundo, sendo muito apreciado, já que possui gosto e perfume característicos (Fan et al., 2021). O cultivo em larga escala do morangos é marcado pela necessidade de tecnologia avançada e por uma demanda significativa por mão de obra, o que leva a geração de diversos empregos, demonstrando a importância econômica e social da cultura (Duarte Filho et al., 2007).

Nativo das regiões de clima temperado da Europa e das Américas, a espécie de morangueiro comercialmente produzida nos dias atuais é um híbrido resultante do cruzamento que ocorreu de forma natural e acidental no século XVIII, entre a variedade chilena (*Fragaria chiloensis*) e a variedade virginiana, proveniente da América do Norte (*Fragaria virginiana*) (Darrow, 1966).

A cultura é classificada como uma angiosperma dicotiledônia, pertencente à família Rosaceae, uma família da qual inclui diversas espécies produtoras de frutos de considerável valor para o consumo humano, como maçãs, pêssegos, framboesas e amoras (Galletta e Bringhurst, 1990). De maneira geral, as plantas pertencentes ao gênero *Fragaria* são herbáceas, embora suas raízes e caules adquiram certa lignificação após um ano. Os aquênios, geralmente confundidos com sementes, são considerados os frutos verdadeiros, resultantes da fecundação dos óvulos, os quais estimulam o engrossamento do receptáculo, que quando se transforma em carnoso, constitui um pseudofruto ou infrutescência (Branzanti, 1989). As plantas apresentam altura que varia entre 15 cm e 30 cm, podendo ser rasteiras ou eretas, formando pequenas touceiras que, à medida que a planta amadurece, aumentam de tamanho. Por questões sanitárias e fisiológicas, embora a cultura seja perene, esta é cultivada como planta anual (Ronque, 1998).

O morango é uma das frutas mais valorizadas e apreciadas, não só pelo seu alto conteúdo de vitaminas e minerais, mas também por suas características sensoriais, como sabor, aroma e aparência, além da cor intensa e tamanhos volumosos, possuindo elevado valor econômico. É consumido *in natura* e em produtos processados, incluindo iogurtes, bebidas, geleias e sorvetes, além de ser bastante utilizado em sobremesas (Giampieri et al., 2015).

Além de suas características sensoriais, os frutos do morango destacam-se por seus inúmeros benefícios para a saúde, uma vez que possuem diversos compostos bioativos, representados principalmente por flavonóides, com destaque para as antocianinas, seguidos de

ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico, dos quais atuam na prevenção de muitas doenças (Forbes-Hernandez et al., 2016; Rothwell et al., 2013). Além disso, apresentam alto teor de vitamina C, cerca de 60 mg por 100 g de fruta fresca, e outras vitaminas em menor quantidade, como a vitamina B1, B2, B3 e B6, além das vitaminas A, E e K. Entre os frutos, os morangos são uma das fontes naturais de folato mais ricas (43 µg por 100 g de fruta fresca) e apresentam uma atividade antioxidante notavelmente elevada. Também representam uma boa fonte de manganês, iodo, magnésio, cobre, ferro e fósforo (Giampieri et al., 2015; Nour et al., 2017).

Os frutos de morango possuem efeito antioxidante no organismo, que se deve ao alto teor de compostos polifenólicos e vitamina C. As antocianinas, pertencentes à classe dos flavonóides, principal classe de polifenóis nos morangos, são responsáveis pela intensa cor vermelha brilhante dos frutos de morango e apresentam propriedades antioxidantes (Ichikawa et al., 2001; Liu et al., 2024), anticarcinogênicas (Lala et al., 2006; Wu et al., 2007), vasoprotetoras (Xu et al., 2004) e anti-inflamatórias (Seeram et al., 2001), além de ter sido relatada melhora na visão (Mercier et al., 1965) e na memória (Joseph et al., 2003) e, efeitos no tratamento da obesidade (Tsuda et al., 2003).

Os antioxidantes são substâncias capazes de prevenir, impedir ou reduzir os danos oxidativos causados ao DNA, às proteínas e aos lipídios. Eles agem neutralizando espécies reativas de oxigênio (EROs) prejudiciais, que são responsáveis pelo desenvolvimento ou progressão de várias doenças (Diplock et al., 1998). Esses compostos ajudam a evitar distúrbios associados ao excesso de radicais livres, tais como doenças cardíacas, arteriosclerose, certos tipos de câncer, Alzheimer e diabetes (Takao et al., 1994; Valko et al., 2006; Vera-Ramirez et al., 2011). Estudos têm sugerido que os radicais livres e outros compostos oxidantes são responsáveis pelo processo de envelhecimento e pelas doenças degenerativas que estão relacionadas ao envelhecimento, tais como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, comprometimento do sistema imunológico e disfunções cerebrais (Almada Filho, 2002).

As atividades biológicas e funcionais das moléculas com ação antioxidante presentes no morango, como os polifenóis, estão ligadas à sua capacidade antioxidante e à regulação de diversas funções celulares, envolvendo processos relacionados ao metabolismo, sobrevivência e defesas antioxidantes, além da regulação de enzimas antioxidantes, como a catalase e superóxido dismutase, e de moléculas antioxidantes, como o glutathione, entre outras (Forbes-Hernandez et al., 2016; Martínez-Ferri et al., 2023).

Dessa forma, o aumento do consumo de fontes naturais com elevado conteúdo de compostos antioxidantes, como frutas e hortaliças, demonstra ser uma ótima estratégia para

reduzir a incidência de doenças associadas aos radicais livres. Além disso, pelo fato de apresentar elevado conteúdo nutricional, o que o leva a ser considerado um alimento funcional, e também pelo seu elevado valor econômico e consumo, o morangueiro tem sido uma das culturas alvo de pesquisas relacionadas à biofortificação (Antoniou et al., 2021; Farid et al., 2020; Huang et al., 2023; Mimmo et al., 2017), estratégia da qual aumenta ainda mais seus benefícios e, por conseguinte, reduz as deficiências de minerais na população.

2.2 Biofortificação de culturas: uma estratégia para a mitigação da deficiência de micronutrientes na população

São necessários pelo menos 22 minerais para o bom funcionamento do organismo humano, sendo que estes podem ser obtidos através da ingestão de alimentos em uma dieta balanceada (Welch e Graham, 2004; White e Broadley, 2005). No entanto, uma grande parcela da população mundial é deficiente em diversos nutrientes, devido ao fato de que muitas culturas são cultivadas em áreas com baixa disponibilidade de minerais e / ou as culturas básicas consumidas apresentam baixas concentrações de minerais nos seus tecidos (Gibson, 2006) (Poletti et al., 2004; White e Broadley, 2005).

Atualmente, a desnutrição mineral é considerada um dos maiores desafios enfrentados pela humanidade, podendo ser reduzida através de estratégias como a diversificação alimentar, a suplementação mineral, a fortificação de alimentos e / ou a biofortificação de culturas. Entretanto, as estratégias para aumentar a diversificação alimentar, a suplementação mineral e a fortificação de alimentos nem sempre foram viáveis. Assim, a biofortificação de culturas por meio da aplicação de fertilizantes minerais, combinada com o melhoramento de variedades com maior capacidade de absorção de minerais, é considerada uma estratégia imediata, não apenas com o objetivo de aumentar as concentrações de minerais em culturas comestíveis, mas também buscando melhorar os rendimentos em solos de baixa fertilidade (Bouis et al., 2003; Genc et al., 2005; Graham et al., 2001; Pfeiffer e McClafferty, 2007; White e Broadley, 2005). Além disso, é de grande importância implementar estratégias que busquem o desenvolvimento de políticas governamentais para promover uma melhor ingestão nutricional de grupos menos favorecidos (Gómez e Ricketts, 2013).

Como consequência, a biofortificação pode ajudar a minimizar os problemas causados pela deficiência de nutrientes na população humana. Esta prática pode ser definida como um processo em que se aumenta a concentração biodisponível de elementos essenciais e benéficos aos seres humanos e animais em partes comestíveis de plantas cultivadas, por meio da intervenção agrícola e/ou da seleção genética (White e Broadley, 2005).

Sendo assim, de forma geral, a biofortificação pode ser realizada de duas formas, através do melhoramento genético, com a seleção de materiais geneticamente mais aptos, o que constitui a biofortificação genética e/ou, por meio da intervenção agrícola, com a utilização de práticas que melhorem a disponibilidade destes elementos às plantas, o que caracteriza a biofortificação agrônômica (Cakmak, 2008). Além disso, pode ser feito a adição dos minerais de interesse de forma aquosa em cultivo hidropônico; a partir da aplicação foliar e em frutas; por meio da embebição de sementes por solução rica no mineral de interesse antes das mesmas serem semeadas; através da adubação via solo; com fertilizantes NPK enriquecidos e mediante o melhoramento genético (Cakmak, 2008; Puccinelli et al., 2017).

A deficiência de micronutrientes, também conhecida como fome oculta, é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo e, contribui significativamente para o fardo global das doenças, sendo que as deficiências mais comuns incluem o ferro (Fe), zinco (Zn), iodo (I), selênio (Se), cálcio (Ca) e vitaminas como folato e vitamina A (Beal et al., 2017; FAO 2020; Kumssa et al., 2015). Dito isso, a biofortificação é uma estratégia que pode auxiliar na manutenção dos níveis adequados de micronutrientes no organismo, sendo que a maioria dos estudos de biofortificação de culturas tem se concentrado em cinco nutrientes minerais essenciais, dentre eles o Fe, Zn e Se (Gómez-Galera et al., 2010).

2.3 O ferro na saúde humana

Os alimentos constituem ótimas fontes de Fe para o organismo, sendo que o fígado de boi, carnes vermelhas de modo geral, feijão, nozes e hortaliças com folhas verdes apresentam alto conteúdo de Fe. Entretanto, a capacidade de absorção de Fe pelo organismo pode variar de acordo com diversos fatores (Hurrell e Egli, 2010; EFSA e NDA, 2015). Sendo assim, a absorção do Fe presente nos alimentos é influenciada pela quantidade, forma química do Fe presente, consumo de alimentos contendo fatores facilitadores ou inibidores da absorção de Fe, além do estado de saúde em geral e nutricional desse mineral no indivíduo (Bortolini e Fisberg, 2010).

O Fe heme e o Fe não heme são as duas formas de Fe presentes nos alimentos. O Fe heme é constituinte da hemoglobina e da mioglobina e está presente nas carnes e nos seus subprodutos, contribuindo com uma pequena fração do total de Fe ingerido. Já o Fe não heme, é considerado a forma mais consumida, sendo encontrado em diferentes concentrações em todos os alimentos de origem vegetal (OMS, 1989) e, sua absorção depende da solubilização do Fe ingerido no estômago e da redução à forma ferrosa no intestino. As carnes (Engelmann

et al., 1998; Hallberg et al., 2003), a vitamina C (Vitolo e Bortolini, 2007; Cook e Reddy, 2001) e a vitamina A (García-Casal et al., 1998) são considerados potentes facilitadores da absorção do Fe não heme e, os fitatos, polifenóis, cálcio e fosfatos podem inibir a sua absorção (Troesch et al., 2009; Hurrell, 1997). Já o Fe heme, apresenta melhor e mais rápida absorção, além desta ser pouco influenciada pelos componentes da dieta, sofrendo influência apenas da proteína animal, que facilita sua absorção, e pelo cálcio, que pode diminuí-la (Hallberg et al., 1993; Uzel e Conrad, 1998).

O Fe desempenha um papel fundamental no transporte de oxigênio, em várias reações de oxidação-redução e no crescimento celular, sendo essencial para a síntese de hemoglobina (Galan et al., 2011). A hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalases e peroxidases constituem importantes compostos biológicos que apresentam Fe em sua estrutura. Além disso, o Fe compõe várias metaloenzimas heme e não heme que desempenham diversas funções vitais em processos respiratórios e oxidativos (Melki et al., 1987).

A ingestão diária recomendada de Fe para mulheres é de 18 mg e para homens é de 8 mg (FNB, 2001). Apesar disso, grande parte da população é deficiente em Fe, sendo que a anemia é o principal distúrbio nutricional relacionado a esse nutriente, do qual afeta grandes grupos populacionais em todo o mundo, incluindo crianças, adolescentes, mulheres grávidas e lactantes e idosos (OMS, 2014). Os desafios fisiológicos desse distúrbio ocasionado pela deficiência de Fe, principalmente aqueles que afetam o crescimento e a reprodução, levam à necessidade do aumento da ingestão diária de Fe para estes grupos demográficos. As demandas diárias de Fe desses grupos vulneráveis geralmente não são atendidas devido à ingestão insuficiente desse mineral, baixa biodisponibilidade, baixa absorção devido à presença de inibidores na dieta, ou perda crônica de sangue, entre outros (García López et al., 2011). Sendo assim, a biofortificação é uma estratégia que pode ser utilizada no combate a anemia, principal doença relacionada à deficiência desse mineral no organismo.

2.4 O zinco na saúde humana

Outro elemento utilizado na biofortificação e que também apresenta diversos benefícios para a saúde humana é o Zn, um micronutriente com diversas funções e que teve sua essencialidade estabelecida para o ser humano em 1961 (Roohani et al., 2013). Está envolvido no funcionamento de mais de 300 enzimas, das seis classes, sendo elas as hidrolases, liases, ligases, isomerases, oxidoreduções e transferases (Maret, 2013; Zastrow & Pecoraro, 2014).

O Zn é o segundo micronutriente mais abundante no corpo humano depois do Fe (Maret, 2016; Lim et al., 2013) e, sabe-se que este desempenha um papel importante em diversas doenças metabólicas e crônicas, incluindo diabetes, câncer (por exemplo, câncer do esôfago, hepatocelular, câncer da mama, câncer do cólon), doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, e doenças intestinais, como a doença inflamatória intestinal e a síndrome do intestino irritável (Samuel et al., 2022; Wan e Zhang, 2022; Bitirim, 2021; Chasapis et al., 2020; Maret, 2017; Wessels et al., 2017).

A deficiência de Zn pode levar ao comprometimento do aprendizado, do crescimento físico e da saúde reprodutiva, além da diminuição da resistência imunológica e aumento na taxa de infecção (Verma et al., 2021; Wessels e Rink, 2020), sendo que há evidências que ligam a deficiência desse micronutriente à várias doenças infecciosas, como malária, HIV, tuberculose, sarampo e infecções respiratórias, como pneumonia por COVID-19 (Maret, 2013a; Wessels et al., 2022; Plum et al., 2010).

Nesse sentido, estima-se que aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo são afetadas pela deficiência de Zn, acarretando sérias consequências para a saúde, afetando todos os órgãos do corpo humano, assim como o sistema imunológico (Haase e Rink, 2014). Atualmente, é amplamente reconhecido que a deficiência de Zn é comum em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento, sendo que nos países ocidentais, essa deficiência afeta cerca de 30% da população idosa, principalmente (Baarz e Rink, 2022).

A ingestão diária de Zn recomendada depende de fatores como idade, sexo, peso e conteúdo de fitato na dieta, uma vez que esse último pode inibir a absorção de Zn dos alimentos. Sendo assim, os níveis recomendados variam. Mas, de modo geral, recomenda-se uma ingestão de 11 mg/dia para homens adultos e 8 mg/dia para mulheres adultas. Durante a gravidez e lactação são recomendados 11 mg/dia a 12 mg/dia. Para bebês e crianças, a recomendação é de 3 mg/dia para ambos os sexos (FNB, 2001).

Os níveis de fitato são levados em consideração pela Organização Mundial da Saúde (OMS), já que possuem efeito inibitório na absorção de Zn dos alimentos. Sendo assim, as dietas são divididas em três grupos de acordo com a sua capacidade potencial de absorção de Zn por razão molar fitato-Zn: alta (<5), moderada (5–15) e baixa (>15) biodisponibilidade de Zn (OMS, 1973).

O Zn é encontrado em diversas fontes alimentares como a carne vermelha, vísceras, ostras e mariscos, cereais fortificados e produtos integrais, além de ovos e produtos lácteos (Ross et al., 2012), sendo que as ostras apresentam o maior teor de Zn. No entanto, nos países ocidentais, a carne bovina contribui com 20% da ingestão de Zn dos alimentos já que seu

consumo é maior (Huth et al., 2013). Feijões, nozes e grãos integrais possuem Zn em sua composição, entretanto, apresentam menor biodisponibilidade, já que os alimentos de origem vegetal possuem grandes quantidades de fitatos (Ross et al., 2012). Sendo assim, o Zn está presente em uma grande variedade de classes alimentares, mas a sua disponibilidade para o corpo humano pode variar, sendo que, em geral, a biodisponibilidade de Zn em alimentos de origem animal é maior quando comparada aos alimentos de origem vegetal (King et al., 2016). Com isso, a deficiência desse nutriente na população é comum e deve ser levada em consideração na abordagem de estratégias para sanar esse problema.

2.5 O selênio na saúde humana

O selênio, apesar de ainda não ter sua essencialidade comprovada para as plantas, nos seres humanos e animais é considerado essencial para a manutenção da saúde (Rayman, 2002; Sors et al., 2005), sendo classificado como um dos elementos mais deficientes na população, o que faz com que também venha sendo utilizado nos programas de biofortificação de culturas. Por apresentar relação bastante estreita entre teores tóxicos e de deficiência (cerca de 10 vezes), inicialmente, o Se foi considerado um elemento tóxico para os animais e humanos. No entanto, em 1957, teve sua essencialidade comprovada para humanos e animais, ao ser responsável pela prevenção de lesões no fígado, vasos sanguíneos, e músculos em ratos e galinhas (Schwarz e Foltz, 1957; Zeng, 2009).

A ingestão diária de Se varia geograficamente, sendo que aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o mundo consomem Se abaixo da dose recomendada de $55 \mu\text{g dia}^{-1}$ (Bañuelos et al., 2017; Mora et al., 2015), o que explica a ocorrência de deficiência desse nutriente na população humana. De acordo com a FAO (2017), mais de 2 bilhões de pessoas no mundo sofrem de deficiências.

Existem duas doenças diretamente ligadas à deficiência de selênio em seres humanos, a doença de Keshan e de Kashin-Beck. A primeira é caracterizada como uma cardiomiopatia endêmica que afeta crianças e mulheres em idade fértil e, ocorre do nordeste ao sudoeste da China, onde os solos têm baixos teores de selênio, resultando em níveis muito baixos desse elemento nos alimentos básicos (Combs, 2001). A segunda doença é uma osteoartropatia, que afeta crianças e leva à atrofia, degeneração e necrose do tecido cartilaginoso, resultando em deterioração das articulações (Rayman, 2012). Esta doença também ocorre principalmente na China, afetando crianças de cinco a treze anos e, com menor frequência, no sudeste da Sibéria (FAO, 2001).

Além disso, baixos níveis de Se no organismo podem levar ao comprometimento do desenvolvimento fetal, infertilidade em homens (Mistry et al., 2012a) e aumento do risco de asma devido à redução na defesa antioxidante e à diminuição da atividade da glutathiona peroxidase (GPx) (Fitzpatrick et al., 2012). Também há evidências de que a deficiência de Se enfraquece o sistema imunológico e afeta o bom funcionamento do sistema nervoso (Ellwanger et al., 2016).

O Se desempenha um papel importante, sendo o único elemento cuja incorporação em proteínas é geneticamente codificada, como parte constitutiva do 21º aminoácido, a selenocisteína. Na forma de selenocisteína, constitui as enzimas dependentes de Se (glutathiona peroxidases, tioredoxina redutases e iodotironina desiodinases). Proteínas que possuem pelo menos um resíduo de selenocisteína em sua estrutura são chamadas de selenoproteínas e, desempenham muitas funções fisiológicas importantes, sendo sua principal função a manutenção do equilíbrio redox nas células (Kuršvietienė et al., 2020).

O Se, como agente antioxidante, apresenta grande potencial para regulação redox e manutenção da homeostase e metabolismo celular (Wang et al., 2017a). Nos últimos anos, foi revelado o papel principal de um excesso de espécies reativas de oxigênio na complexa patogênese das doenças metabólicas (Carrier, 2017). Recentemente, vários estudos relataram que o nível sérico de Se está relacionado ao risco de doenças metabólicas, portanto, a suplementação de Se tem sido considerada uma abordagem promissora em pacientes com baixos níveis de Se. Além disso, foi relatado o papel crucial do Se em doenças metabólicas crônicas, incluindo doenças cardiovasculares (Yin et al., 2022), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Kohler et al., 2018) e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Xu et al., 2022).

Uma grande parte do selênio dietético em seres humanos deriva direta e indiretamente de plantas. Com isso, dada sua importância para a saúde humana, é fundamental conduzir estudos que investiguem os efeitos da biofortificação com micronutrientes em modelos animais. Essas pesquisas são essenciais para compreender como essa abordagem agrícola pode impactar na saúde das comunidades, sendo o uso do modelo zebrafish bastante promissor para esse tipo de investigação.

2.6 O modelo zebrafish

O peixe teleósteo *Danio rerio*, popularmente conhecido como zebrafish, é um modelo animal que vem sendo utilizado para minimizar o uso de mamíferos na pesquisa, como os roedores, dos quais são considerados os principais modelos animais empregados em estudos *in*

vivo com plantas. Isso se deve ao fato de que esses últimos possuem alto custo de manutenção e baixo rendimento, o que constitui uma desvantagem dentro da experimentação.

O zebrafish, pertencente à família Cyprinidae e à classe Actinopterygii, é um peixe tropical de água doce, que apresenta pequeno porte, medindo cerca de 3 a 5 cm quando adulto e, vive nos rios do Himalaia, no sul da Ásia (Arunachalam et al., 2013).

O uso do zebrafish como modelo animal tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos, já que sua utilização está de acordo com os princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento) em relação à pesquisa animal (Tannenbaum e Bennett, 2015). Em relação à substituição, as larvas de zebrafish podem ser empregadas em lugar de outros animais em alguns estudos. Já a redução, pode ser observada principalmente em estudos de toxicologia, uma vez que o zebrafish é utilizado para identificar substâncias tóxicas, permitindo que moléculas mais seguras sejam testadas em modelos mamíferos, reduzindo, assim, o número de animais necessários para testes. Quanto ao refinamento, estudos com embriões e larvas de zebrafish se destacam, pois sua fertilização é externa e sua transparência possibilita observações não invasivas (Cassar et al., 2020).

O zebrafish também apresenta uma série de outras vantagens e numerosas características importantes em comparação aos mamíferos que atraem ainda mais pesquisadores na exploração do uso desse modelo animal em pesquisas relacionadas à saúde e ao organismo humano. Os embriões se desenvolvem externamente, de maneira rápida e visível, devido à sua transparência, o que possibilita o acompanhamento do ciclo de vida do peixe (Chen et al., 2020). Se reproduzem facilmente, sendo que as fêmeas têm a capacidade de gerar centenas de embriões por semana (Veldman e Lin, 2008). Além disso, apresenta baixo custo de manutenção, curto intervalo de geração (3 a 4 meses para a maturidade sexual), facilidade de manipulação, tanto de matrizes quanto de embriões e alta taxa de sobrevivência larval (Meyers, 2018; Padilla e Glaberman, 2020).

Além das características mencionadas, o zebrafish tem se destacado como um modelo experimental na pesquisa científica devido à sua semelhança com os seres humanos. Aproximadamente 70% da sua genética é semelhante à humana, e cerca de 84% dos seus genes estão relacionados à doenças (Espinoza, 2016). Essa similaridade tem contribuído para o sucesso do zebrafish como modelo experimental na pesquisa científica, pois muitas das características anatômicas e fisiológicas desses animais são altamente homólogas às dos seres humanos. Sendo assim, com base na análise filogenética de peixes e genomas humanos, estes possuem morfologia e fisiologia semelhantes dos sistemas nervoso, cardiovascular e digestivo (Han et al., 2018). Além disso, muitos órgãos como o fígado, apresentam composição e

funcionalidades similares, sendo este totalmente funcional 5 dias após a fertilização do zebrafish, o que faz desse modelo animal uma ferramenta de alto rendimento para estudos (Goessling e Sadler, 2015), possibilitando a avaliação do acúmulo de substâncias nesse órgão, à citar os microminerais.

REFERÊNCIAS

- Ahouagi, V. B., Mequelino, D. B., Tavano, O. L., Garcia, J. A. D., Nachtigall, A. M., & VilasBoas, B. M. (2021). Physicochemical characteristics, antioxidant activity, and acceptability of strawberry-enriched ketchup sauces. *Food Chemistry*, *340*, 127925. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127925>
- Almada Filho, C. M. (2002). Antioxidantes e radicais livres. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*, 744-748.
- Antoniou, O., Chrysargyris, A., Xylia, P., & Tzortzakis, N. (2021). Effects of Selenium and/or Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculation on Strawberry Grown in Hydroponic Trial. *Agronomy*, *11*(4), 721. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040721>
- Arunachalam, M.; Raja, M.; Vijayakumar, C.; Malaiammal, P.; Mayden, R. L. (2013). Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, *10*, 1–14. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0803>
- Baarz, B. R., & Rink, L. (2022). Rebalancing the unbalanced aged immune system – A special focus on zinc. *Ageing Research Reviews*, *74*, 101541. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101541>
- Bañuelos, G. S., Lin, Z.-Q., & Broadley, M. (2017). *Selenium Biofortification* (pp. 231–255). https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0_14
- Beal, T., Massiot, E., Arsenault, J. E., Smith, M. R., & Hijmans, R. J. (2017). Global trends in dietary micronutrient supplies and estimated prevalence of inadequate intakes. *PLOS ONE*, *12*(4), e0175554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175554>
- Bitirim, C. V. (2021). The role of zinc transporter proteins as predictive and prognostic biomarkers of hepatocellular cancer. *PeerJ*, *9*, e12314. <https://doi.org/10.7717/peerj.12314>
- Bortolini, G. A., & Fisberg, M. (2010). Orientação nutricional do paciente com deficiência de ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, *32*, 105–113. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000070>
- Bouis, H. E., Chassy, B. M., & Ochanda, J. O. (2003). 2. Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. *Trends in Food Science & Technology*, *14*(5–8), 191–209. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00073-6)
- Branzanti, E. C. (1989). *La fresa*. Mundiprensa.
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil*, *302*(1–2), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9466-3>
- Carrier, A. (2017). Metabolic Syndrome and Oxidative Stress: A Complex Relationship. *Antioxidants & Redox Signaling*, *26*(9), 429–431. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6929>
- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., & Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery

Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95–118.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>

Chasapis, C. T., Ntoupa, P.-S. A., Spiliopoulou, C. A., & Stefanidou, M. E. (2020). Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Archives of Toxicology*, 94(5), 1443–1460.
<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02702-9>

Combs, G. F. (2001). Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85(5), 517–547. <https://doi.org/10.1079/BJN2000280>

Cook, J. D., & Reddy, M. B. (2001). Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(1), 93–98.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/73.1.93>

Darrow, G. M. (1966). The strawberry. History, breeding and physiology. In *New York, Holt, Rinehart and Winston* (Issue 1st edition).

Diplock, A. T., Charuleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., & Viña-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S77–S112.
<https://doi.org/10.1079/BJN19980106>

Duarte Filho, J., Antunes L., Pádua, J. (2007). Morango: conquistando novas fronteiras. *Informe Agropecuário*, 26, 20–23.

Duthie, S. J. (2007). Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 665–674. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600257>

EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (NDA). (2015). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *EFSA Journal*, 13(10), 4254.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4254>

Ellwanger, J. H., Franke, S. I. R., Bordin, D. L., Prá, D., & Henriques, J. A. P. (2016). Biological functions of selenium and its potential influence on Parkinson's disease. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 88(3 suppl), 1655–1674. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150595>

Engelmann, M. D. M., Sandström, B., & Michaelsen, K. F. (1998). Meat Intake and Iron Status in Late Infancy: An Intervention Study. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 26(1), 26–33. <https://doi.org/10.1097/00005176-199801000-00005>

Espinosa, M. B. (2016). The Zebrafish: A Tool in Education Resumen Introducción. *Revista de Educación En Biología.*, 19, 11–8.

Fan, Z., Hasing, T., Johnson, T. S., Garner, D. M., Schwieterman, M. L., Barbey, C. R., Colquhoun, T. A., Sims, C. A., Resende, M. F. R., & Whitaker, V. M. (2021). Strawberry sweetness and consumer preference are enhanced by specific volatile compounds. *Horticulture Research*, 8(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00502-5>

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (n.d.). *The State of Security and Nutrition in the World*. <http://www.fao.org/3/ca9692en/online/ca9692en.html#tab1>.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP, W. (2017). *The State of Food Security and Nutrition in the World 2017. Building resilience for peace and food security*.

Farid, M. Z., Qureshi, K. M., Shah, S. H., Qureshi, A. A., Shafiq, Umair, M. and Shafiq, H. (2020). Foliar application of micronutrients improves growth, productivity and fruit quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 30(4). <https://doi.org/10.36899/JAPS.2020.4.0106>

Fitzpatrick, A. M., Jones, D. P., & Brown, L. A. S. (2012). Glutathione Redox Control of Asthma: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(2), 375–408. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4198>

Food and Nutrition Board. (2001). *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10026>

Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparini, M., Afrin, S., Bompadre, S., Mezzetti, B., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(sup1), S46–S59. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1051919>

Galan, S., Kann, P., Gress, T., & Michl, P. (2011). *Listeria monocytogenes*-Induced Bacterial Peritonitis Caused by Contaminated Cheese in a Patient With Haemochromatosis. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 49(07), 832–835. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1245969>

Galletta, G. J., D. G. H. (1990). *Small Fruit Crop Management* (L. E. C. Gene J. Galletta, David Glenn Himelrick (Ed.); Prentice H).

García López, S., Rubio, A., Poza, V., Bermejo, & García López, S. (2011). Optimal management of iron deficiency anemia due to poor dietary intake. *International Journal of General Medicine*, 741. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S17788>

García-Casal, M. N., Layrisse, M., Solano, L., Barón, M. A., Arguello, F., Llovera, D., Ramírez, J., Leets, I., & Tropper, E. (1998). Vitamin A and β -Carotene Can Improve Nonheme Iron Absorption from Rice, Wheat and Corn by Humans. *The Journal of Nutrition*, 128(3), 646–650. <https://doi.org/10.1093/jn/128.3.646>

Genc, Y., Humphries, J. M., Lyons, G. H., & Graham, R. D. (2005). Exploiting genotypic variation in plant nutrient accumulation to alleviate micronutrient deficiency in populations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.005>

Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparini, M., Alvarez-Suarez, J. M., Afrin, S., Bompadre, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2015). Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & Function*, 6(5), 1386–1398. <https://doi.org/10.1039/C5FO00147A>

- Gibson, R. S. (2006). Zinc: the missing link in combating micronutrient malnutrition in developing countries. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(1), 51–60. <https://doi.org/10.1079/PNS2005474>
- Goessling, W., & Sadler, K. C. (2015). Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology*, 149(6), 1361–1377. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.034>
- Gómez, M. I., & Ricketts, K. D. (2013). Food value chain transformations in developing countries: Selected hypotheses on nutritional implications. *Food Policy*, 42, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2013.06.010>
- Gómez-Galera, S., Rojas, E., Sudhakar, D., Zhu, C., Pelacho, A. M., Capell, T., & Christou, P. (2010). Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Research*, 19(2), 165–180. <https://doi.org/10.1007/s11248-009-9311-y>
- Graham, R. D., Welch, R. M., & Bouis, H. E. (2001). *Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: Principles, perspectives and knowledge gaps* (pp. 77–142). [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(01\)70004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(01)70004-1)
- Haase, H., & Rink, L. (2014). Multiple impacts of zinc on immune function. *Metallomics*, 6(7), 1175. <https://doi.org/10.1039/c3mt00353a>
- Hallberg, L., Hoppe, M., Andersson, M., & Hulthén, L. (2003). The Role of Meat to Improve the Critical Iron Balance During Weaning. *Pediatrics*, 111(4), 864–870. <https://doi.org/10.1542/peds.111.4.864>
- Hallberg, L., Rossander-Hulthén, L., Brune, M., & Gleerup, A. (1993). Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *British Journal of Nutrition*, 69(2), 533–540. <https://doi.org/10.1079/BJN19930053>
- Han, H.-S., Jang, G. H., Jun, I., Seo, H., Park, J., Glyn-Jones, S., Seok, H.-K., Lee, K. H., Mantovani, D., Kim, Y.-C., & Edwards, J. R. (2018). Transgenic zebrafish model for quantification and visualization of tissue toxicity caused by alloying elements in newly developed biodegradable metal. *Scientific Reports*, 8(1), 13818. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32313-5>
- Huang, S., Gao, L., Fu, G., Du, S., Wang, Q., Li, H., & Wan, Y. (2023). Interactive Effects between Zinc and Selenium on Mineral Element Accumulation and Fruit Quality of Strawberry. *Agronomy*, 13(10), 2453. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102453>
- Hurrell, R. F. (1997). Bioavailability of iron. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51 Suppl 1, S4-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023471>
- Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1461S-1467S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674F>
- Huth, P. J., Fulgoni, V. L., Keast, D. R., Park, K., & Auestad, N. (2013). Major food sources of calories, added sugars, and saturated fat and their contribution to essential nutrient intakes in the U.S. diet: data from the national health and nutrition examination survey (2003–2006). *Nutrition Journal*, 12(1), 116. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-116>

- Ichikawa, H., Ichiyanagi, T., Xu, B., Yoshii, Y., Nakajima, M., & Konishi, T. (2001). Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract from Purple Black Rice. *Journal of Medicinal Food*, 4(4), 211–218. <https://doi.org/10.1089/10966200152744481>
- Joseph, J. A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Shukitt-Hale, B., Morgan, D., & Denisova, N. A. (2003). Blueberry Supplementation Enhances Signaling and Prevents Behavioral Deficits in an Alzheimer Disease Model. *Nutritional Neuroscience*, 6(3), 153–162. <https://doi.org/10.1080/1028415031000111282>
- King, J. C., Brown, K. H., Gibson, R. S., Krebs, N. F., Lowe, N. M., Siekmann, J. H., & Raiten, D. J. (2016). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND) — Zinc Review. *The Journal of Nutrition*, 146(4), 858S–885S. <https://doi.org/10.3945/jn.115.220079>
- Kohler, L. N., Florea, A., Kelley, C. P., Chow, S., Hsu, P., Batai, K., Saboda, K., Lance, P., & Jacobs, E. T. (2018). Higher Plasma Selenium Concentrations Are Associated with Increased Odds of Prevalent Type 2 Diabetes. *The Journal of Nutrition*, 148(8), 1333–1340. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy099>
- Kumssa, D. B., Joy, E. J. M., Ander, E. L., Watts, M. J., Young, S. D., Walker, S., & Broadley, M. R. (2015). Dietary calcium and zinc deficiency risks are decreasing but remain prevalent. *Scientific Reports*, 5(1), 10974. <https://doi.org/10.1038/srep10974>
- Kuršvietienė, L., Mongirdienė, A., Bernatoniene, J., Šulinskienė, J., & Stanevičienė, I. (2020). Selenium Anticancer Properties and Impact on Cellular Redox Status. *Antioxidants*, 9(1), 80. <https://doi.org/10.3390/antiox9010080>
- Lala, G., Malik, M., Zhao, C., He, J., Kwon, Y., Giusti, M. M., & Magnuson, B. A. (2006). Anthocyanin-Rich Extracts Inhibit Multiple Biomarkers of Colon Cancer in Rats. *Nutrition and Cancer*, 54(1), 84–93. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5401_10
- Lim, K., Riddell, L., Nowson, C., Booth, A., & Szymlek-Gay, E. (2013). Iron and Zinc Nutrition in the Economically-Developed World: A Review. *Nutrients*, 5(8), 3184–3211. <https://doi.org/10.3390/nu5083184>
- Liu, M., Liu, J., Li, G., Zhang, D., Qin, D., Wang, L., & Xu, Y. (2024). Functional properties, structural characteristics, and anti-complementary activities of two degraded polysaccharides from strawberry fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269, 132263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132263>
- Maret, W. (2013a). *Zinc and Human Disease* (pp. 389–414). https://doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8_12
- Maret, W. (2013b). Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Advances in Nutrition*, 4(1), 82–91. <https://doi.org/10.3945/an.112.003038>
- Maret, W. (2016). The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 66. <https://doi.org/10.3390/ijms17010066>

- Maret, W. (2017). Zinc in Pancreatic Islet Biology, Insulin Sensitivity, and Diabetes. *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(1), 1–8. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.1.1>
- Martínez-Ferri, E., Forbes-Hernandez, T. Y., Cervantes, L., Soria, C., Battino, M., & Ariza, M. T. (2023). Relation between Strawberry Fruit Redness and Bioactivity: Deciphering the Role of Anthocyanins as Health Promoting Compounds. *Foods*, 13(1), 110. <https://doi.org/10.3390/foods13010110>
- Melki, I. A., Bulus, N. M., & Abumrad, N. N. (1987). Invited Review: Trace Elements in Nutrition. *Nutrition in Clinical Practice*, 2(6), 230–240. <https://doi.org/10.1177/088453368700200605>
- Mercier, A., Perdriel, G., Rozier, J., & Chevaleraud, J. (1965). [Note concerning the action of anthocyanin glycosides on the human electroretinogram]. *Bulletin Des Societes d'ophthalmologie de France*, 65(12), 1049–1053. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5880825>
- Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1). <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- Mimmo, T., Tiziani, R., Valentinuzzi, F., Lucini, L., Nicoletto, C., Sambo, P., Scampicchio, M., Pii, Y., & Cesco, S. (2017). Selenium Biofortification in *Fragaria × ananassa*: Implications on Strawberry Fruits Quality, Content of Bioactive Health Beneficial Compounds and Metabolomic Profile. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01887>
- Mistry, H. D., Broughton Pipkin, F., Redman, C. W. G., & Poston, L. (2012a). Selenium in reproductive health. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.07.034>
- Mora, M., Durán, P., Acuña, J., Cartes, P., Demanet, R., & Gianfreda, L. (2015). Improving selenium status in plant nutrition and quality. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, ahead*, 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000041>
- Nour, V., Trandafir, I., & Cosmulescu, S. (2017). Antioxidant Compounds, Nutritional Quality and Colour of Two Strawberry Genotypes from *Fragaria × Ananassa*. *Erwerbs-Obstbau*, 59(2), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s10341-016-0307-5>
- Organização Mundial de Saúde (OMS). (1973). *Trace elements in human nutrition*.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). (1989). *The prevalence of anaemia through primary health care: a guide for health administrators and programme managers*. (D. E. e Cols (Ed.)).
- Organização Mundial de Saúde (OMS). (2014). *Micronutrient Deficiencies—Iron Deficiency Anaemia*. <http://www.who.int/%0Anutrition/topics/ida/en/#>
- Padilla, S., & Glaberman, S. (2020). The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. In *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology* (pp. 525–532). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813602-7.00037-5>

- Pfeiffer, W. H., & McClafferty, B. (2007). HarvestPlus: Breeding Crops for Better Nutrition. *Crop Science*, 47(S3). <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0020IPBS>
- Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. (2010). The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), 1342–1365. <https://doi.org/10.3390/ijerph7041342>
- Poletti, S., Gruissem, W., & Sautter, C. (2004). The nutritional fortification of cereals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(2), 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.03.002>
- Puccinelli, M., Malorgio, F., & Pezzarossa, B. (2017). Selenium Enrichment of Horticultural Crops. *Molecules*, 22(6), 933. <https://doi.org/10.3390/molecules22060933>
- Rayman, M. P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(2), 203–215. <https://doi.org/10.1079/PNS2002153>
- Rayman, M. P. (2012). Selenium and human health. *The Lancet*, 379(9822), 1256–1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)
- Ronque, E. R. V. (1998). *A cultura do morangueiro*. Emater.
- Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., & Schulin, R. (2013). Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18(2), 144–157. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23914218>
- Ross, AC; Caballero, BH; Primos, RJ; Tucker, KL; Ziegler, T. (2012). *Modern Nutrition in Health and Disease* (11th ed.). Wolters Kluwer Health Adis (ESP).
- Rothwell, J. A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Medina-Rejon, A., M'Hiri, N., Garcia-Lobato, P., Manach, C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D. S., & Scalbert, A. (2013). Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013, bat070–bat070. <https://doi.org/10.1093/database/bat070>
- Samuel, J., Georgia, F., Thirayost, N., Silvia, Z., Julia M.W., G., & Kathryn M., T. (2022). The importance of targeting signalling mechanisms of the SLC39A family of zinc transporters to inhibit endocrine resistant breast cancer. *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy*, 224–239. <https://doi.org/10.37349/etat.2022.00080>
- Schwarz, K., & Foltz, C. M. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 79(12), 3292–3293. <https://doi.org/10.1021/ja01569a087>
- Seeram, N. P., Bourquin, L. D., & Nair, M. G. (2001). Degradation Products of Cyanidin Glycosides from Tart Cherries and Their Bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4924–4929. <https://doi.org/10.1021/jf0107508>
- Sors, T. G., Ellis, D. R., & Salt, D. E. (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation

and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*, 86(3), 373–389.
<https://doi.org/10.1007/s11120-005-5222-9>

Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., & Sakata, K. (1994). A Simple Screening Method for Antioxidants and Isolation of Several Antioxidants Produced by Marine Bacteria from Fish and Shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(10), 1780–1783.
<https://doi.org/10.1271/bbb.58.1780>

Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 54(2), 120–132. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25836957>

Troesch, B., Egli, I., Zeder, C., Hurrell, R. F., de Pee, S., & Zimmermann, M. B. (2009). Optimization of a phytase-containing micronutrient powder with low amounts of highly bioavailable iron for in-home fortification of complementary foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(2), 539–544. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27026>

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. (2003). Dietary Cyanidin 3-O- β -D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2125–2130. <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2125>

Uzel, C., & Conrad, M. E. (1998). Absorption of heme iron. *Seminars in Hematology*, 35(1), 27–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460807>

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>

Veldman, M. B., & Lin, S. (2008). Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research. *Pediatric Research*, 64(5), 470–476.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318186e609>

Vera-Ramirez, L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M. C., Ramirez-Tortosa, C. L., Granados-Principal, S., Lorente, J. A., & Quiles, J. L. (2011). Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 80(3), 347–368.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.01.004>

Verma, P. K., Verma, S., Chakrabarty, D., & Pandey, N. (2021). Biotechnological Approaches to Enhance Zinc Uptake and Utilization Efficiency in Cereal Crops. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(3), 2412–2424. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00532-x>

Vitolo, M. R., & Bortolini, G. A. (2007). Iron bioavailability as a protective factor against anemia among children aged 12 to 16 months. *Jornal de Pediatria*, 83(1), 33–38.
<https://doi.org/10.2223/JPED.1577>

Wan, Y., & Zhang, B. (2022). The Impact of Zinc and Zinc Homeostasis on the Intestinal Mucosal Barrier and Intestinal Diseases. *Biomolecules*, 12(7), 900.
<https://doi.org/10.3390/biom12070900>

Wang, N., Tan, H.-Y., Li, S., Xu, Y., Guo, W., & Feng, Y. (2017). Supplementation of Micronutrient Selenium in Metabolic Diseases: Its Role as an Antioxidant. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/7478523>

Wang, N., Tan, H.-Y., Li, S., Xu, Y., Guo, W., & Feng, Y. (2017a). Supplementation of Micronutrient Selenium in Metabolic Diseases: Its Role as an Antioxidant. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/7478523>

Welch, R. M., & Graham, R. D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 353–364. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh064>

Wessels, I., & Rink, L. (2020). Micronutrients in autoimmune diseases: possible therapeutic benefits of zinc and vitamin D. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 77, 108240. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108240>

Wessels, I., Maywald, M., & Rink, L. (2017). Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. *Nutrients*, 9(12), 1286. <https://doi.org/10.3390/nu9121286>

Wessels, I., Rolles, B., Slusarenko, A. J., & Rink, L. (2022). Zinc deficiency as a possible risk factor for increased susceptibility and severe progression of Corona Virus Disease 19. *British Journal of Nutrition*, 127(2), 214–232. <https://doi.org/10.1017/S0007114521000738>

White, P., & Broadley, M. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science*, 10(12), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.001>

Wu, J., Yang, W., Song, R., Li, Z., Jia, X., Zhang, H., Zhang, P., Xue, X., Li, S., Xie, Y., Zhang, R., Ye, J., Zhou, Z., & Wu, C. (2023). Dietary Soybean Lecithin Improves Growth, Immunity, Antioxidant Capability and Intestinal Barrier Functions in Largemouth Bass *Micropterus salmoides* Juveniles. *Metabolites*, 13(4), 512. <https://doi.org/10.3390/metabo13040512>

Wu, Q. K., Koponen, J. M., Mykkänen, H. M., & Törrönen, A. R. (2007). Berry Phenolic Extracts Modulate the Expression of p21 WAF1 and Bax but Not Bcl-2 in HT-29 Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1156–1163. <https://doi.org/10.1021/jf062320t>

Xu, J.-W., Ikeda, K., & Yamori, Y. (2004). Cyanidin-3-glucoside regulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*, 574(1–3), 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.027>

Xu, L., Lu, Y., Wang, N., & Feng, Y. (2022). The Role and Mechanisms of Selenium Supplementation on Fatty Liver-Associated Disorder. *Antioxidants*, 11(5), 922. <https://doi.org/10.3390/antiox11050922>

Yin, T., Zhu, X., Xu, D., Lin, H., Lu, X., Tang, Y., Shi, M., Yao, W., Zhou, Y., Zhang, H., & Li, X. (2022). The Association Between Dietary Antioxidant Micronutrients and Cardiovascular Disease in Adults in the United States: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.799095>

Zastrow, M. L., & Pecoraro, V. L. (2014). Designing Hydrolytic Zinc Metalloenzymes. *Biochemistry*, 53(6), 957–978. <https://doi.org/10.1021/bi4016617>

Zeng, H. (2009). Selenium as an Essential Micronutrient: Roles in Cell Cycle and Apoptosis. *Molecules*, 14(3), 1263–1278. <https://doi.org/10.3390/molecules14031263>

CAPÍTULO 2 – ARTIGO**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA BIOFORTIFICAÇÃO DE MORANGO COM SELÊNIO, FERRO E ZINCO EM JUVENIS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Stefânia Barros Zauza^a, Thiago César Ribeiro Ferreira^a, Janina de Sales Guillarducci^a, Stefânia Priscilla de Souza^b, William Franco Carneiro^c, Isaac König^c, Maria Ligia de Souza Silva^d, Luis David Solis Murgas^c, Luciane Vilela Resende^a

^aDepartamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-900, Brasil.

^bDepartamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-900, Brasil.

^cDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-900, Brasil.

^dDepartamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-900, Brasil.

*Elaborado de acordo com as normas da UFLA

RESUMO

A biofortificação é uma das estratégias utilizadas para aumentar a biodisponibilidade de nutrientes em partes comestíveis de plantas cultivadas, podendo minimizar problemas de deficiências nutricionais na população. Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da dieta com morango biofortificado com ferro, selênio e zinco em juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) através da avaliação do desempenho, parâmetros bioquímicos, análises de marcadores do estresse oxidativo e histopatologia do fígado, músculo e intestino. A ração comercial Alcon Basic[®] foi suplementada com 6% de morango seco, sendo que os tratamentos com as dietas experimentais consistiram em sete grupos de animais tratados com morangos biofortificados com minerais isolados e em associação, a citar ferro (Fe); selênio (Se); zinco (Zn); Fe + Se; Fe + Zn; Se + Zn; Fe + Se + Zn; um grupo tratado com morango não biofortificado e um grupo controle tratado somente com ração comercial Alcon Basic[®]. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia. Ao final do período experimental de 45 dias, os peixes foram anestesiados, pesados e medidos, para a realização da análise de desempenho de crescimento. Além disso, foram avaliados os parâmetros bioquímicos; histologia do intestino, fígado e músculo; estresse oxidativo e acúmulo de Fe, Se e Zn por Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). Os resultados mostraram que houve aumento significativo da largura das vilosidades intestinais dos peixes que receberam dieta suplementada com Se, Zn, Fe+Se, Fe+Zn e Fe+Se+Zn. Foi observado aumento significativo da atividade de todas as enzimas avaliadas, com a suplementação da dieta com morango biofortificado com Zn, além do aumento significativo da formação de EROs e dos níveis de MDA. A dieta suplementada com morango não biofortificado levou ao aumento da produção de EROs, entretanto não houve aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Já a dieta suplementada com Fe+Zn, aumentou a atividade das enzimas SOD, GST e GPx, enquanto os três microminerais Fe, Se e Zn em associação na dieta (Fe+Se+Zn), levaram ao aumento da atividade da GPx, sendo observado ligeiro aumento dos níveis de peroxidação lipídica com essas dietas que, no entanto, não levaram ao aumento na formação de EROs. Além disso, foi verificado através dos resultados da EDS, que houve maior absorção dos microminerais Fe, Se e Zn nos peixes que receberam dieta suplementada com os mesmos, quando comparado com o tratamento Controle, sendo o Fe, o elemento mais presente no organismo dos animais em todas as dietas. Sendo assim, o morango biofortificado com Fe+Zn e Fe+Se+Zn nos níveis estudados, pode ser recomendado para a suplementação da alimentação, uma vez que exerce efeitos positivos no sistema antioxidante, através do aumento da atividade enzimática. Ainda, através dos resultados da EDS, há um indicativo de que o morango foi biofortificado, além de demonstrar que a suplementação da dieta com morango biofortificado com Fe, Se e Zn, isolados e/ou em associação pode beneficiar a saúde dos animais, sem comprometer o desenvolvimento normal do organismo, como visto através dos resultados dos demais parâmetros analisados neste estudo.

Palavras-chave: biofortificação; morangueiro; selênio; ferro; zinco; zebrafish; sistema antioxidante.

ABSTRACT

Biofortification is one of the strategies used to increase the bioavailability of nutrients in edible parts of cultivated plants, which can minimize problems of nutritional deficiencies in the population. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of dietary supplementation with strawberries biofortified with iron, selenium and zinc in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) by evaluating performance, biochemical parameters, analyses of oxidative stress markers and histopathology of the liver, muscle and intestine. The commercial Alcon Basic® diet was supplemented with 6% dried strawberries, and the treatments with the experimental diets consisted in seven groups of animals treated with strawberries biofortified with minerals alone and in combination, namely iron (Fe); selenium (Se); zinc (Zn); Fe + Se; Fe + Zn; Se + Zn; Fe + Se + Zn; one group treated with non-biofortified strawberries and a control group treated only with commercial Alcon Basic® diet. The animals were fed four times a day. At the end of the experimental period of 45 days, the fish were anesthetized, weighed and measured for growth performance analysis. In addition, biochemical parameters were evaluated; histology of the intestine, liver and muscle; oxidative stress and accumulation of Fe, Se and Zn by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The results showed a significant increase in the width of the intestinal villi of fish that received a diet supplemented with Se, Zn, Fe+Se, Fe+Zn and Fe+Se+Zn. A significant increase in the activity of all enzymes evaluated was observed with the supplementation of the diet with strawberries biofortified with Zn, in addition to a significant increase in the formation of ROS and MDA levels. The diet supplemented with non-biofortified strawberries led to an increase in ROS production, however there was no increase in lipid peroxidation levels. The diet supplemented with Fe+Zn increased the activity of the enzymes SOD, GST and GPx, while the three microminerals Fe, Se and Zn in association in the diet (Fe+Se+Zn) led to an increase in the activity of GPx, with a slight increase in the levels of lipid peroxidation being observed with these diets, which, however, did not lead to an increase in the formation of ROS. In addition, it was verified through the EDS results that there was a greater absorption of the microminerals Fe, Se and Zn in the fish that received a diet supplemented with them, when compared to the Control treatment, with Fe being the most present element in the organism of the animals in all diets. Therefore, the strawberry biofortified with Fe+Zn and Fe+Se+Zn at the levels studied can be recommended for supplementation of the diet, since it exerts positive effects on the antioxidant system, through the increase in the enzymatic activity. Furthermore, through the EDS results, there is an indication that the strawberry was biofortified, in addition to demonstrating that supplementing the diet with strawberries biofortified with Fe, Se and Zn, isolated and/or in combination, can benefit the health of animals, without compromising the normal development of the organism, as seen through the results of the other parameters analyzed in this study.

Keywords: biofortification; strawberry; selenium; iron; zinc; zebrafish; antioxidant system.

1 INTRODUÇÃO

A deficiência de nutrientes é um problema que afeta grande parte da população mundial, sendo que as deficiências de ferro (Fe), zinco (Zn), iodo (I) e selênio (Se) são as mais comuns, representando cerca de 60% da deficiência de Fe, 30% de Zn e I, e 15% de Se (Gomathi et al., 2017). Sendo assim, uma das estratégias mais promissoras para mitigar problemas relacionados à deficiência de nutrientes na dieta humana é a biofortificação, processo no qual se aumenta a biodisponibilidade e o conteúdo de nutrientes e elementos essenciais e benéficos aos seres humanos e animais, em partes comestíveis de plantas cultivadas (Broadley et al., 2006, 2010; White e Broadley, 2005). A biofortificação pode ser uma forma rentável e sustentável de abordar a desnutrição de micronutrientes a nível populacional, podendo ser particularmente importante nos países em desenvolvimento, onde as deficiências de micronutrientes são comuns e podem ter consequências graves para a saúde (Gomathi et al., 2017). A estratégia de biofortificar culturas com múltiplos micronutrientes é promissora, já que permite abordar simultaneamente múltiplas deficiências nutricionais, podendo maximizar os benefícios para a saúde. Além disso, ao combinar diferentes nutrientes nas culturas, ocorre um aumento da diversidade alimentar, uma vez que possibilita o consumo de uma gama mais ampla de nutrientes provenientes de alimentos básicos (Straeten et al., 2020).

O Fe e Zn são elementos essenciais para a sobrevivência de humanos, animais e plantas, enquanto o Se é essencial para os seres humanos e animais e, benéfico para as plantas. Para os animais e seres humanos, o Fe é um componente-chave da hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio nos glóbulos vermelhos (Yiannikourides e Latunde-Dada, 2019). Sua deficiência em humanos é considerada a mais difundida mundialmente, em termos nutricionais, impactando cerca de dois bilhões de pessoas e resultando em um milhão de mortes por ano (Magee e McCann, 2019), afetando o desenvolvimento cognitivo das crianças, a capacidade de trabalho dos adultos e o sistema imunológico dos indivíduos (Yiannikourides e Latunde-Dada, 2019). O Zn compõe cerca de 300 enzimas nos seres humanos, sendo o único metal presente em todas as seis classes de enzimas (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases). Estima-se que cerca de 17% da população mundial seja deficiente em Zn (Hacisalihoglu, 2020), ocorrendo, como consequência, prejuízo na função cerebral, enfraquecimento do sistema imunológico e atrofia no crescimento físico (Chasapis et al., 2020). Em relação ao Se, este desempenha um papel importante em processos fisiológicos, como regulação do hormônio tireoidiano (Wu et al., 2015), respostas inflamatórias e imunológicas (Broome et al., 2004; Wu et al., 2017), função cardiovascular (Casaril et al., 2017), manutenção

da saúde reprodutiva (Mistry et al., 2012b) e função cerebral (Gao et al., 2007; Skröder et al., 2017). Além disso, desempenha um papel nas infecções virais, com evidências de que pode ser benéfico para pacientes com COVID-19 (Zhang et al., 2020). Estima-se que um bilhão de pessoas em todo o mundo sofram de deficiência de Se (White, 2015). No Brasil, a deficiência de Se se deve, principalmente, aos baixos níveis de Se na maioria dos solos (Santos et al., 2023), o que reflete na baixa ingestão desse micronutriente pela população.

Uma das culturas que vem sendo alvo dos estudos de biofortificação é o morango, da qual apresenta grande importância econômica e social, além de inúmeros benefícios para a saúde, uma vez que seus frutos são ricos em compostos polifenólicos e vitamina C, possuindo efeito antioxidante. Os compostos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos do morango, possuem diversas atividades biológicas, desde anticancerígenas até atividades anti-inflamatórias, neuroprotetoras e antioxidantes (Tulipani et al., 2009; Afrin et al., 2016). Já a vitamina C, desempenha um papel importante em muitas funções metabólicas, sendo um antioxidante que protege o corpo dos efeitos nocivos dos radicais livres (Padayatty e Levine, 2016; Carr e Maggini, 2017).

Levando em consideração sua aplicação e relevância na saúde humana, estudos que avaliem os efeitos da biofortificação em modelos animais são necessários para descrever como essa estratégia agrícola pode impactar na saúde das populações. Sendo assim, o zebrafish (*Danio rerio*) vem sendo utilizado como referência como modelo animal (Lawrence, 2007), devido à sua rápida reprodução e à subsequente observação direta dos efeitos nos seus órgãos internos (White et al., 2008), sendo de fácil manutenção. Além disso, apresenta 70% de similaridade genética com o genoma humano e 84% de seus genes associados à doenças em humanos (Espinosa, 2016). Com isso, o zebrafish é considerado um dos melhores modelos preditivos para testar metabólitos, extratos ou matrizes alimentares, já que as quantidades de compostos necessários são mínimas e os custos são reduzidos. Todavia, estudos que avaliam os efeitos da inclusão de alimentos biofortificados na dieta de zebrafish são escassos. De fato, Akindoyeni et al. (2024) estudaram os efeitos da biofortificação da alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.) com Se em ratos Wistar. Entretanto, os efeitos do Fe, Se e Zn, isolados e/ou em associação, ainda não foram explorados.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da dieta com morango biofortificado com ferro, selênio e zinco isolados ou em associação em juvenis de zebrafish (*Danio rerio*). Para isso, uma série de parâmetros foram avaliados, tais como o desempenho dos animais, dosagens bioquímicas, atividade de enzimas e

marcadores do estresse oxidativo, análises histopatológicas do fígado, músculo e intestino, bem como a presença desses minerais no fígado dos animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo do morango e delineamento experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação em uma propriedade particular localizada no município de Itumirim, MG, Brasil (21°15'57"S 44°50'49"W; altitude 874 m).

Foram utilizadas duas cultivares de morango de dias neutros, San Andreas e Albion. As mudas foram adquiridas de um viveiro comercial registrado no MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), de modo a assegurar a sanidade e qualidade das mesmas. O transplântio das mudas foi realizado em maio de 2021, para calhas do tipo cocho, com a utilização de mulching de polietileno, sendo estas dispostas em espaçamento de 0,20 metros na linha, correspondente a distância dos gotejadores e, 1,00 metro entre calhas, correspondente ao corredor. Cada planta ocupou em média um volume de aproximadamente 8 litros de substrato. Foi utilizado sistema de cultivo semi-hidropônico, com substrato comercial Tropstrato HA[®] e composto orgânico disponível na propriedade, na proporção de 1:1.

A irrigação foi realizada três vezes ao dia, com turno de rega fixo de 5 minutos cada, com solução nutritiva preparada a partir de fertilizantes comerciais recomendados pela empresa Valagro[®], sendo que as fertirrigações e a condutividade elétrica variaram de acordo com o estágio fenológico da cultura, estabelecendo-se 1,10 mS/cm para fase vegetativa e 1,30 mS/cm para fase reprodutiva. A solução nutritiva da fase reprodutiva da cultura foi composta pelos produtos comerciais Master 3-11-38 (7,7%), sulfato de magnésio (2,8%), Ferrilene 6 (0,525%), Glimo (0,115%), Brexil Top (0,045%), Boroplus (0,030%), Alfanutritek CoMo (0,007%) e nitrato de cálcio (7,7%).

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, utilizando o esquema fatorial 2 × 8: duas cultivares (San Andreas e Albion), oito aplicações foliares com os elementos ferro (Fe), selênio (Se) e zinco (Zn) isolados e em associação (Fe; Se; Zn; Fe + Se; Fe + Zn; Se + Zn; Fe + Se + Zn e tratamento controle constituído por água destilada). O experimento foi realizado com três repetições, totalizando 48 parcelas experimentais com dez plantas em cada parcela. Os tratamentos foram aplicados quinzenalmente via foliar, nas seguintes fontes e doses: Se – selenito de sódio (Na₂SeO₃.5H₂O), 0,25 mg L⁻¹; Fe – Ferrilene, 100 mg L⁻¹ e Zn – Talento, 50 mg L⁻¹, diluídos em 1,5 L, totalizando 9 aplicações durante todo o experimento. As aplicações foliares iniciaram 78 dias após o transplântio das mudas, em agosto de 2021, período

do qual havia um dossel foliar uniforme e o início da produção de frutos em todas as parcelas. Foi utilizado pulverizador manual e volume fixo da solução, sendo 0,25 L para cada parcela experimental. Adicionou-se à solução espalhante adesivo comercial Agefix[®] na proporção de 0,25 ml L⁻¹.

A colheita dos frutos foi realizada no pico de produção e, após iniciada, foi realizada até duas vezes na semana. O experimento em casa de vegetação foi finalizado em dezembro de 2021.

2.2 Declaração de ética

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados em estrita conformidade com as normas institucionais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil, sob o nº 014/22, e atenderam às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal sobre o cuidado e uso de animais de laboratório.

2.3 Origem e manutenção do zebrafish

Foram utilizados adultos de zebrafish (*Danio rerio*) machos e fêmeas da linhagem AB, com aproximadamente 120 dias após a fertilização (dpf), os quais foram mantidos no Biotério Central da UFLA, onde foram realizadas todas as etapas experimentais com o modelo animal. Os peixes foram mantidos durante 15 dias antes do início dos ensaios em um tanque de água de polietileno de 500 L, acoplado a um sistema de recirculação, sendo alimentados três vezes ao dia com ração comercial floclulada Alcon Basic[®] (Alcon, Brasil).

Em seguida, os animais foram transferidos para o sistema experimental composto por vinte e sete aquários de policarbonato de 3 L (11,5 cm × 34,5 cm × 15,5 cm), conectado a uma rack espécie-específico (Hidrur Rack, modelo ZEB-40, Alesco, SP, BRA), com controles automatizados de temperatura, pH e condutividade, sistema de recirculação de água e, mantidos em fotoperíodo com ciclo claro/escuro de 14/10 horas (Luzeena Raja et al., 2019). Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente.

2.4 Dieta experimental

Os frutos de morango foram armazenados em freezer e, posteriormente, secos até peso constante em estufa de circulação de ar forçado a 50 °C. Após a secagem, os frutos foram macerados em cadinho de porcelana e triturados em liquidificador. Em seguida, foram

peneirados e misturados com ração comercial Alcon Basic[®]. Foi utilizada a cultivar de morango Albion na dieta experimental, uma vez que respondeu melhor aos tratamentos aplicados anteriormente no experimento em casa de vegetação.

Para preparação das dietas experimentais, foi utilizada balança analítica para pesagem das mesmas, suplementando a ração comercial Alcon Basic[®] com o morango seco. As informações sobre a composição da ração comercial Alcon Basic[®] são apresentados na Tabela 1.

Cada dieta experimental foi distribuída aleatoriamente entre três aquários replicados, e 10 peixes foram pesados e estocados em cada aquário. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia (9h, 12h, 15h e 17h) até saciedade aparente durante 45 dias. Foram utilizados 27 aquários, sendo 9 tratamentos e 3 repetições, contendo 10 peixes por aquário, totalizando 270 peixes. Os tratamentos com as dietas experimentais consistiram em: sete grupos de animais tratados com morangos biofortificados com minerais isolados e em associação (Fe; Se; Zn; Fe + Se; Fe + Zn; Se + Zn; Fe + Se + Zn); um grupo tratado com morango não biofortificado e um grupo controle tratado somente com ração comercial Alcon Basic[®].

Tabela 1 – Composição da ração comercial Alcon Basic®.

Composição*	Quantidade*
Vitamina A (UI kg ⁻¹)	30.000
Vitamina D2 (UI kg ⁻¹)	5.000
Vitamina E (UI kg ⁻¹)	83.3
Vitamina K3 (mg kg ⁻¹)	8.3
Vitamina B12 (mg kg ⁻¹)	6.7
Vitamina B2 (mg kg ⁻¹)	25.0
Vitamina B6 (mg kg ⁻¹)	6.7
Vitamina B12 (mcg kg ⁻¹)	33.3
Niacina (mg kg ⁻¹)	116.7
Pantotenato de cálcio (mg kg ⁻¹)	50.0
Biotina (mg kg ⁻¹)	0.33
Ácido fólico (mg kg ⁻¹)	2.5
Colina (mg kg ⁻¹)	520.0
Fe (mg kg ⁻¹)	83.3
Cu (mg kg ⁻¹)	8.3
Zn (mg kg ⁻¹)	83.3
Mn (mg kg ⁻¹)	66.7
Se (mg kg ⁻¹)	0.25
I (mg kg ⁻¹)	1.67
Metionina (mg kg ⁻¹)	833.3
Vitamina C (mg kg ⁻¹)	250.0
Proteína bruta (% mín.)	45.0
Lipídeos (% mín.)	5.0
Fibras (% máx.)	5.0

UI kg⁻¹: unidade internacional por kg; mg kg⁻¹: miligrama por quilo; mcg kg⁻¹: micrograma por quilo; % mín.: porcentagem mínima; % máx.: porcentagem máxima; Fe: ferro; Cu: cobre; Zn: zinco; Mn: manganês; Se: selênio; I: iodo. *Dados do fabricante.

2.5 Desempenho de crescimento

Ao final do experimento de alimentação, que durou 45 dias, os animais permaneceram em jejum por 24 horas e todos os peixes de cada aquário foram retirados e anestesiados até atingirem um estágio anestésico profundo com etil 3-aminobenzoato metanossulfonato (MS-

222 / tricaína 0,03%, Sigma Aldrich, Germany), sendo expostos ao produto por 2 minutos. Após anestesiados, os peixes foram secos com papel toalha, pesados individualmente com auxílio de balança analítica e medidos com paquímetro. Peso final, ganho de peso, ingestão diária de ração, comprimento total e taxa de sobrevivência foram determinados para cada aquário usando as seguintes fórmulas:

- Peso final (mg) = Peso úmido final individual
- Ganho de peso (mg) = (Peso úmido final individual - Peso úmido inicial individual)
- Ingestão diária de ração (%) = $(100 \times [\text{total de ração consumida/dias}])$
- Comprimento total (mm) = Medida da ponta da boca até o final dos raios médios da nadadeira caudal
- Taxa de sobrevivência (%) = $100 \times (\text{número final de peixes}) / (\text{número inicial de peixes})$

2.6 Preparo do homogenato

Amostras do corpo inteiro dos animais foram homogeneizadas com tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 7) e centrifugadas a 4000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até as análises, sendo utilizado nos ensaios bioquímicos e enzimáticos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro com leitor de microplacas (PowerWave XS, Biotek, Winooski, VT, EUA).

2.7 Parâmetros bioquímicos

Os níveis de glicose, colesterol total e triglicérides foram medidos com kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) (Kovalent, São Gonçalo, RJ, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância de cada amostra do ensaio foi lida em triplicata usando um espectrofotômetro Biotek Epoch (Biotek, Winooski, VT, EUA).

2.8 Avaliação de estresse oxidativo

2.8.1 Determinação da atividade enzimática e de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada conforme descrito por Dieterich et al. (2000), sendo que uma unidade de atividade da SOD (U) foi a quantidade de enzima necessária para causar 50% da oxidação do pirogalol a 570 nm. A atividade da catalase (CAT) foi avaliada a 240 nm, com leitura em espectrofotômetro realizada a cada 15 s durante

1 min, sendo que nesse comprimento de onda pode ser observada a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio pela diminuição da absorbância (Aebi, 1984; Nelson e Kiesow, 1972). A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) foi medida de acordo com o método de Habig et al. (1974), em que a GST catalisa a conjugação da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), formando um conjugado que é detectado a 340 nm. A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi avaliada monitorando a taxa de oxidação do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) a 340 nm pela reação acoplada com glutathione reductase (GR) (Sachett et al., 2021).

A formação de EROs no corpo inteiro dos animais é mensurado utilizando-se o 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). A conversão de DCFH-DA em DCF acontece na presença de EROs e sua fluorescência pode ser detectada por fluorimetria com excitação/emissão a 485/530 nm. O conteúdo de EROs é quantificado utilizando uma curva padrão de DCF (Driver et al., 2000).

Para determinar a concentração de proteína total dos homogenatos para a normalização dos dados, utilizou-se o método de Bradford com leitura no comprimento de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

2.8.2 Biomarcadores de dano oxidativo

Os níveis de glutathione reduzida (GSH) foram determinados de acordo com Sedlak e Lindsay (1968), e o método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB gerando um produto que absorve luz a 415 nm.

A peroxidação lipídica foi determinada usando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com leitura em espectrofotômetro a 535 nm (Buege e Aust, 1978). Uma curva padrão foi preparada utilizando tetraetoxipropano, que produz uma quantidade equimolar de malondialdeído (MDA), do qual é um importante subproduto da peroxidação lipídica que reage com o ácido tiobarbitúrico.

2.9 Análise da histomorfologia do intestino, músculo e fígado de zebrafish

Após a dissecação, os órgãos de 9 animais por tratamento foram imediatamente fixados em solução de formaldeído a 4% (p/v) por 24 h. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina. As seções foram cortadas com 4 μ m de espessura com um micrótomo manual (Microtome Reichert Jung HN 40, Leica).

Após a secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) (Aescht et al., 2010).

Para obtenção das medidas do intestino e músculo e, análise de danos hepáticos no fígado, foram obtidas imagens de cada lâmina utilizando uma combinação de microscópio (Nikon SMZ1500, Japão) e câmera (Moticam S6, Motic[®]), com ampliação de 10 × para análise do intestino e, 40 × para análise do músculo e fígado. Foi capturada uma imagem por animal, sendo três animais por repetição de cada tratamento. A partir dessas imagens, com auxílio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA), foram obtidos comprimento e largura individuais de vilosidades intestinais intactas, além da contagem de células caliciformes por vilosidade e, a área das fibras musculares. Foram capturadas 3 fotos para cada amostra e realizadas 50 medições de vilosidades intestinais e de área de fibras musculares. Os dados de comprimento e largura de vilosidades intestinais foram medidos de acordo com Karimi & Zhandi (2015). A altura de cada vilosidade foi delineada manualmente desde seu ápice até a túnica muscular e a largura das vilosidades foi medida através da base das vilosidades na túnica muscular, como representado na Figura 1J.

2.10 Acúmulo de Fe, Se e Zn por Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)

Os peixes foram liofilizados e foi feita a retirada da escama da região do fígado com auxílio de bisturi, a fim de facilitar a observação dessa área durante a análise. As amostras de peixes foram fixadas em “stubs” de alumínio com o auxílio de uma fita de carbono e colocadas em estufa para retirada da umidade. Em seguida, foram cobertas com carbono em um aparelho evaporador de carbono CED 020 (Bal- Tec, 1994) e, observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) STEM- FEG de ultra alta resolução, livre de campo, modelo CLARA (Tescan, 2021), com sistema de microanálise de raios-x XFLASH 6160 (Bruker, 2019). As amostras foram qualificadas e mapeadas quanto à composição química.

Através das imagens geradas por EDS, foi realizada a contagem do número de pontos coloridos que representavam os elementos Fe, Se e Zn, através da delimitação de 3 regiões dentro de cada imagem de cada tratamento, procedendo com a média das mesmas para obtenção dos dados finais.

2.11 Processamento de dados e análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste ESD (Desvio Estudentizado Extremo) para identificação de outliers. O software SPEEDSTAT 3.0[®] (Carvalho et al., 2020) foi utilizado

para realizar a análise de variância e para a confecção dos gráficos, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle composto por ração comercial Alcon Basic[®] utilizando o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADO

3.1 Desempenho de crescimento

A suplementação da dieta com morango biofortificado com Fe, Se e Zn não afetou de forma significativa os parâmetros relacionados ao desempenho de crescimento como peso final, ganho de peso, consumo diário de ração e comprimento total. A taxa de sobrevivência dos peixes foi superior a 80% e não foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos dietéticos ($p > 0.05$) (Tabela 2).

3.2 Parâmetros bioquímicos

A suplementação da dieta com morango biofortificado com Fe, Se e Zn não causou efeitos significativos nos níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol total dos peixes avaliados ($p > 0.05$) (Tabela 3).

Tabela 2 – Parâmetros de desempenho e sobrevivência de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com ração comercial suplementada com morango biofortificado com Fe, Se e Zn.

Parâmetros desempenho	Tratamentos								MNB*	P-valor
	Controle	Fe	Se	Zn	Fe + Se	Fe + Zn	Se + Zn	Fe + Se + Zn		
PI ¹ (mg)	125.11 ± 0.68	123.30 ± 1.39	124.65 ± 3.35	124.20 ± 0.30	126.75 ± 0.55	126.15 ± 0.35	125.20 ± 0.10	125.52 ± 1.16	124.77 ± 0.31	0.140
PF ² (mg)	211.95 ± 14.16 ^a	185.46 ± 9.66 ^a	185.97 ± 15.35 ^a	196.34 ± 59.36 ^a	165.53 ± 9.87 ^a	169.44 ± 26.42 ^a	198.99 ± 26.66 ^a	198.48 ± 15.00 ^a	213.11 ± 7.79 ^a	0.678
GP ³ (mg)	86.84 ± 14.83 ^a	62.16 ± 9.78 ^a	61.32 ± 16.04 ^a	72.14 ± 59.49 ^a	38.78 ± 9.32 ^a	43.29 ± 26.50 ^a	73.79 ± 26.74 ^a	72.96 ± 14.18 ^a	88.34 ± 8.06 ^a	0.278
CDR ⁴ (%)	7.70 ± 0.22 ^a	8.14 ± 0.76 ^a	8.10 ± 0.70 ^a	8.13 ± 0.15 ^a	7.24 ± 0.61 ^a	7.40 ± 0.70 ^a	7.03 ± 0.77 ^a	7.36 ± 0.53 ^a	6.49 ± 0.37 ^a	0.030
CT ⁵ (mm)	27.50 ± 0.52 ^a	25.85 ± 0.48 ^a	26.00 ± 0.40 ^a	25.67 ± 1.70 ^a	25.16 ± 1.02 ^a	25.44 ± 0.84 ^a	25.91 ± 1.17 ^a	25.73 ± 0.30 ^a	26.11 ± 1.02 ^a	0.228
Sobrevivência (%)	96.67 ± 5.77 ^a	96.67 ± 5.77 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	83.33 ± 15.28 ^a	96.67 ± 5.77 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	93.33 ± 5.77 ^a	93.33 ± 5.77 ^a	0.128

Os dados são expressos como as médias ± desvio padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

mg: miligrama; mm: milímetro.

*Morango não biofortificado.

¹Peso inicial. ²Peso final. ³Ganho de peso. ⁴Consumo diário de ração. ⁵Comprimento total.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com ração comercial suplementada com morango biofortificado com Fe, Se e Zn.

Parâmetros bioquímicos	Tratamentos								MNB ¹	P-valor
	Controle	Fe	Se	Zn	Fe + Se	Fe + Zn	Se + Zn	Fe + Se + Zn		
Glicose (mg dL ⁻¹)	52.72 ± 5.18 ^a	43.50 ± 3.80 ^a	49.32 ± 6.95 ^a	41.84 ± 1.44 ^a	50.87 ± 8.49 ^a	42.43 ± 5.99 ^a	49.90 ± 4.89 ^a	46.41 ± 3.03 ^a	56.80 ± 10.02 ^a	0.095
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	83.98 ± 2.41 ^a	76.81 ± 3.07 ^a	80.64 ± 6.05 ^a	76.97 ± 2.66 ^a	87.97 ± 11.27 ^a	78.09 ± 4.44 ^a	93.86 ± 6.93 ^a	87.33 ± 6.83 ^a	86.22 ± 10.03 ^a	0.067
Colesterol total (mg dL ⁻¹)	63.87 ± 3.11 ^a	59.85 ± 0.84 ^a	61.50 ± 1.38 ^a	60.77 ± 1.09 ^a	60.77 ± 0.95 ^a	60.95 ± 3.65 ^a	60.77 ± 0.00 ^a	62.23 ± 2.07 ^a	65.33 ± 2.70 ^a	0.088

Os dados são expressos como as médias ± desvio padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade (P < 0,05).

mg dL⁻¹: miligrama por decilitro.

¹Morango não biofortificado.

3.3 Avaliação de estresse oxidativo

3.3.1 Atividades de enzimas antioxidantes e formação de EROs

O status antioxidante e a formação de EROs em juvenis de zebrafish alimentados com diferentes dietas suplementadas com morango biofortificado com Fe, Se e Zn é mostrado na Figura 1. A atividade de todas as enzimas avaliadas, assim como a formação de EROs foram afetados significativamente pela suplementação da dieta ($p < 0.001$; $p = 0.002$).

Em relação à SOD, sua atividade foi superior nos peixes alimentados com morango biofortificado com Zn quando comparada aos demais grupos e ao controle ($p < 0.001$), seguida do grupo que recebeu dieta com Fe+Zn; controle, Se e Se+Zn; Fe+Se e Fe+Se+Zn e, por último, os grupos que receberam dieta com Fe e morango não biofortificado (Figura 1A). Considerando a atividade da CAT, os peixes que receberam o tratamento com Zn também foram superiores aos demais grupos e ao controle ($p < 0.001$), seguido dos grupos suplementados com Fe+Se, Fe+Zn, Se+Zn e controle, enquanto os demais tratamentos apresentaram os menores níveis da enzima (Figura 1B). A atividade da GST foi superior nos peixes que receberam dieta suplementada com Zn ($p < 0.001$) em comparação aos demais grupos e ao controle, seguida dos animais que receberam a dieta com Fe+Zn, enquanto o grupo alimentado com Fe+Se apresentou menor atividade da enzima quando comparado aos demais grupos e ao controle (Figura 1C). A atividade da enzima GPx também foi superior no grupo tratado com Zn em comparação aos demais e ao controle ($p < 0.001$), seguido dos animais do grupo Fe+Zn e Fe+Se+Zn, enquanto os animais dos demais tratamentos, incluindo grupo controle, demonstraram menor atividade da enzima (Figura 1D). A formação de EROs foi superior nos peixes que receberam dieta suplementada com morango biofortificado com Zn e morango não biofortificado quando comparado aos demais grupos e ao controle ($p = 0.002$) (Figura 1E).

Com isso, é possível observar que a atividade de todas as enzimas avaliadas foi significativamente superior nos peixes alimentados com morango biofortificado com Zn ($p < 0.001$) quando comparada aos demais tratamentos e ao controle, seguida do grupo que recebeu a dieta suplementada com Fe+Zn.

3.3.2 Biomarcadores de dano oxidativo

Em relação aos níveis de GSH, os peixes alimentados com morango biofortificado com Zn demonstraram níveis superiores ($p < 0.001$) quando comparados aos demais grupos e ao controle (Figura 2A). A suplementação da dieta com Zn também levou ao aumento significativo

dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nos peixes desse grupo ($p < 0.001$) quando comparados aos demais grupos e ao controle, seguido do grupo que recebeu dieta com Fe+Zn, enquanto os peixes dos grupos alimentados com Fe+Se e com morango não biofortificado, apresentaram níveis significativamente menores que os demais e, semelhantes ao controle (Figura 2B).

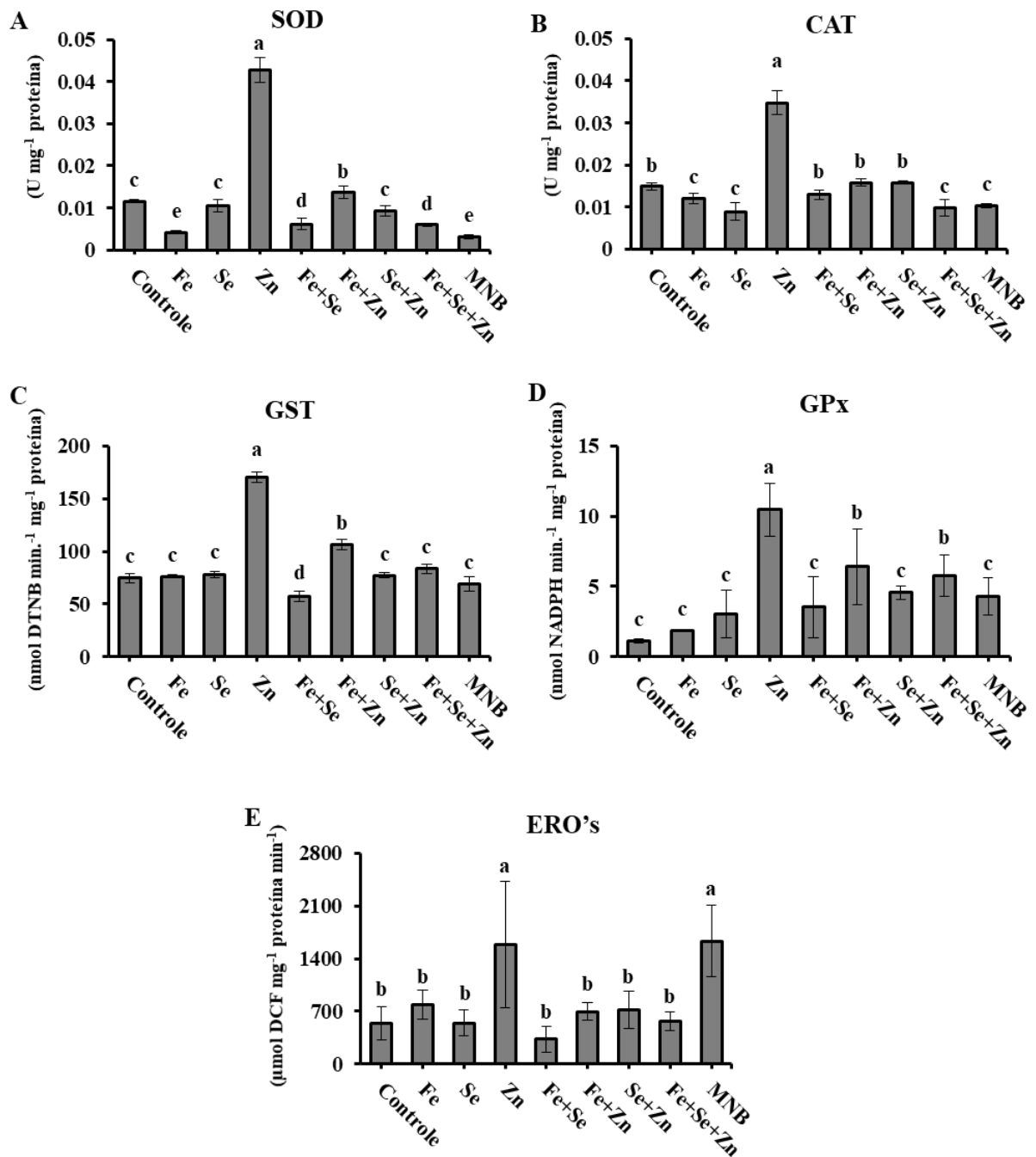


Figura 1. Efeito da suplementação da dieta de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) com morango biofortificado com Fe, Se e Zn na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A); catalase (CAT) (B), Glutathione S-transferase (GST) (C), Glutathione peroxidase (GPx) (D) e nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (E) após 45 dias de alimentação. As barras indicam a média \pm desvio padrão de três repetições (n = 3). Letras diferentes acima das colunas mostram diferenças significativas em $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott.

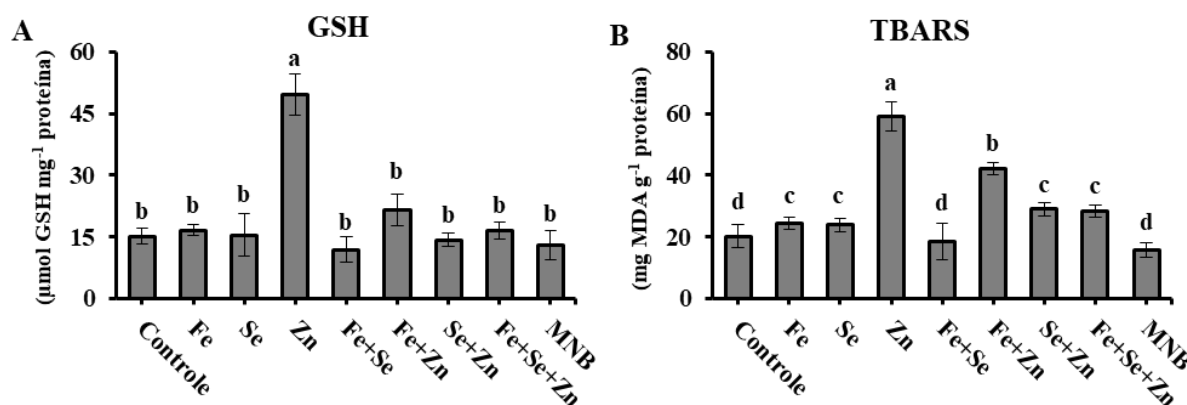


Figura 2. Efeito da suplementação da dieta de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) com morango biofortificado com Fe, Se e Zn nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (A) e na peroxidação lipídica (TBARS) (B) após 45 dias de alimentação. As barras indicam a média \pm desvio padrão de três repetições ($n = 3$). Letras diferentes acima das colunas mostram diferenças significativas em $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott.

3.4 Histomorfologia do intestino, músculo e fígado

As Figuras 3, 4 e 5 apresentam a análise histológica dos tecidos do intestino, músculo e fígado, respectivamente, de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) que receberam dieta suplementada com morango biofortificado com Fe, Se e Zn. O estudo da histologia intestinal, muscular e hepática de *Danio rerio* mostrou ausência de alterações morfológicas pronunciadas na estrutura dos tecidos. Seções intestinais de *Danio rerio* de todos os grupos mostraram vilosidades intestinais claramente definidas, incluindo células caliciformes e lâmina própria. A camada externa do intestino incluía camadas serosas e túnicas musculares (Figura 3). Quanto ao músculo, também não foram observadas alterações morfológicas pronunciadas (Figura 4). Observações microscópicas do fígado mostraram estrutura normal com citoplasma denso, núcleo localizado centralmente e hepatócitos dispostos de forma compacta, não sendo observados danos hepáticos nos animais em todos os tratamentos avaliados (Figura 5).

A suplementação da dieta não apresentou efeitos significativos nas medidas morfométricas realizadas no intestino dos peixes avaliados ($p > 0.05$), como altura das vilosidades e células globulares (Tabela 5). Entretanto, a suplementação da dieta com morango biofortificado com Se, Zn, Fe+Se, Fe+Zn e Fe+Se+Zn levou ao aumento significativo da largura das vilosidades intestinais em relação ao tratamento controle ($p = 0.031$) (Tabela 4). A medida da área das fibras musculares não foi afetada significativamente pelas dietas ($p > 0.05$) (Tabela 4).

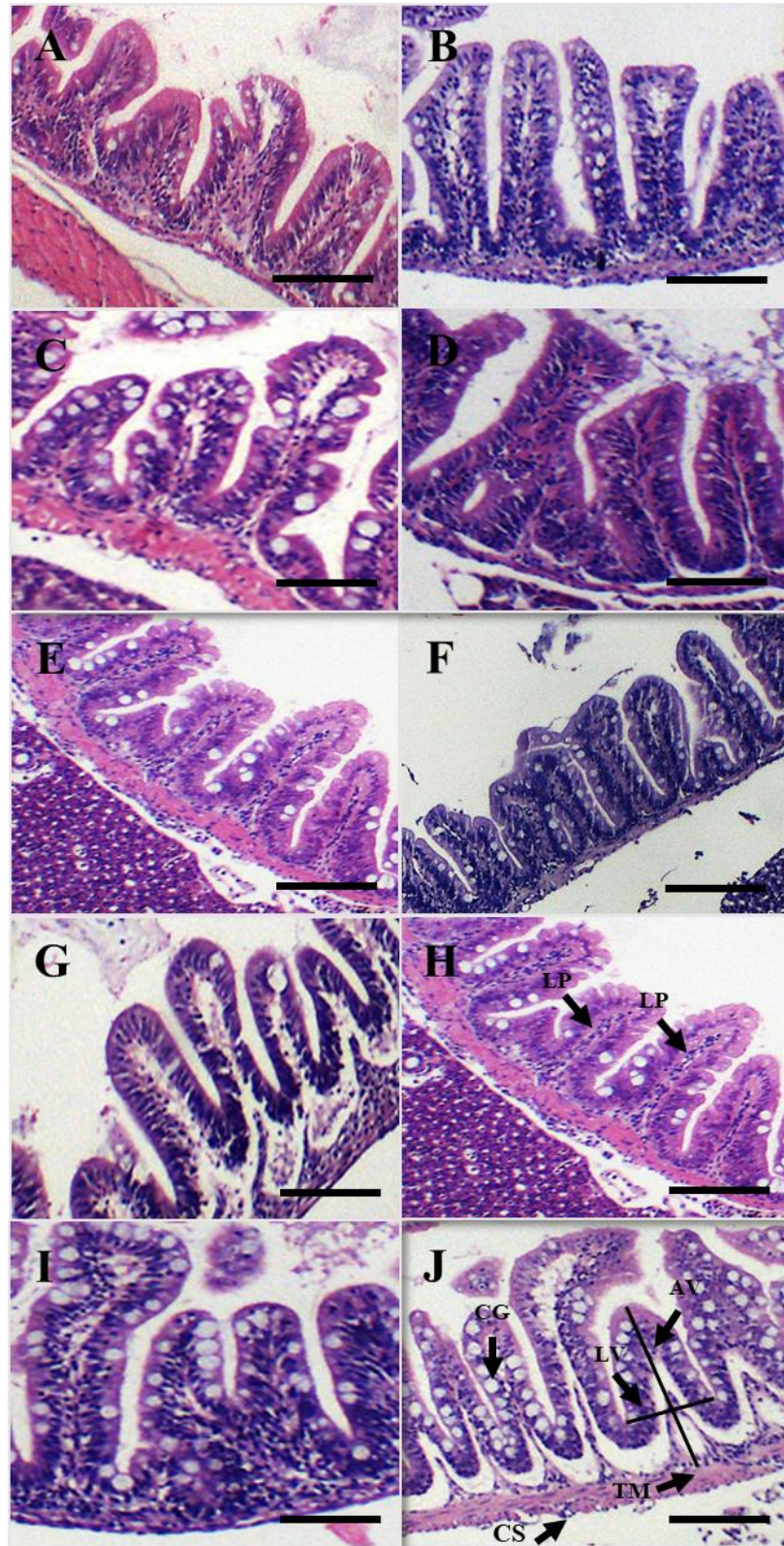


Figura 3. Fotomicrografias do intestino de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) corados com hematoxilina e eosina. Controle (A), Fe (B), Se (C), Zn (D), Fe+Se (E), Fe+Zn (F), Se+Zn (G), Fe+Se+Zn (H), morango não biofortificado (I) e medidas morfométricas realizadas (J). Scale bar: 100 μ m. CS – Camada serosa; TM – Túnica muscular; CG – Células caliciformes; LV – Largura da vilosidade; AV – Altura da vilosidade; LP – Lâmina própria.

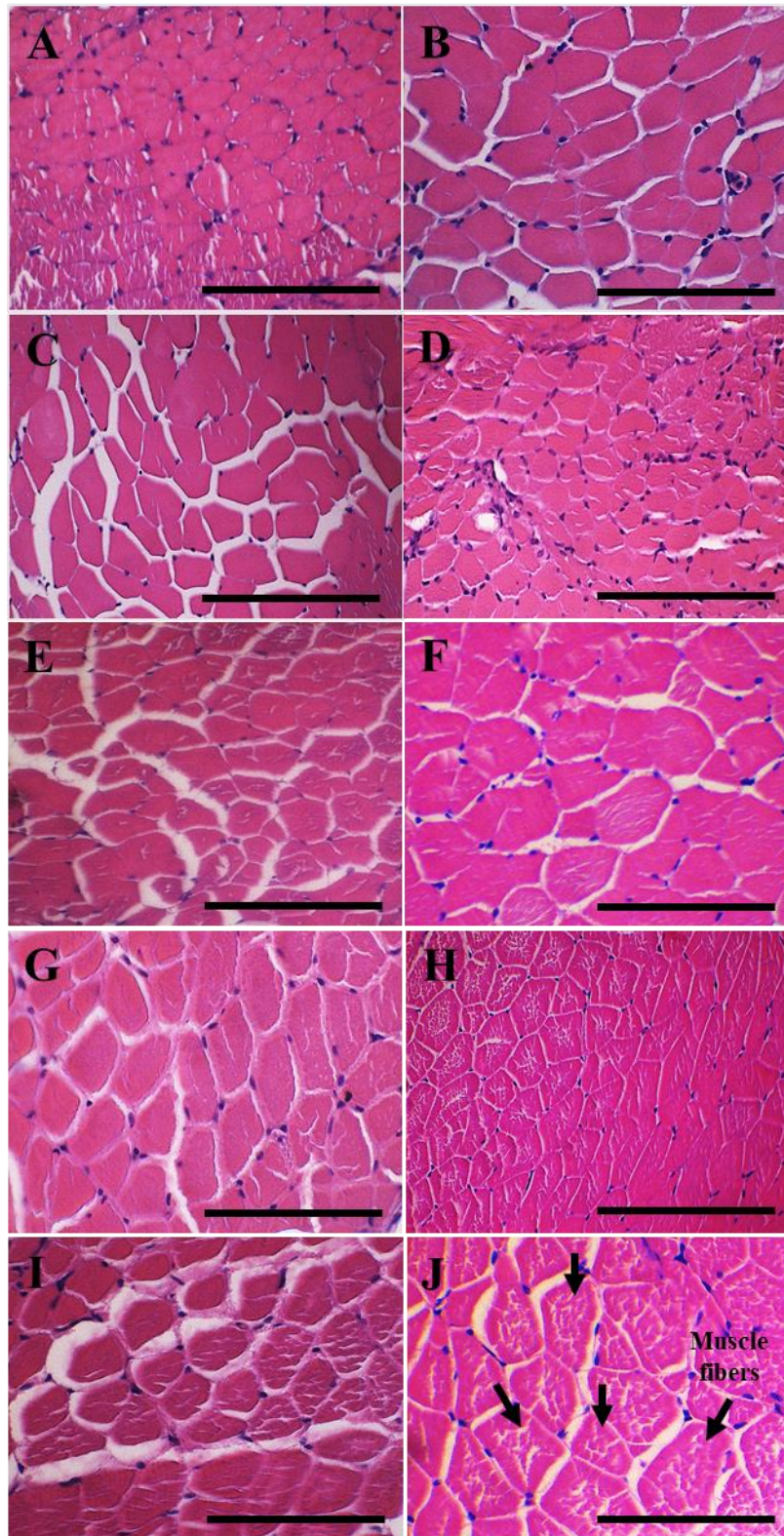


Figura 4. Fotomicrografias do músculo de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) corados com hematoxilina e eosina. Controle (A), Fe (B), Se (C), Zn (D), Fe+Se (E), Fe+Zn (F), Se+Zn (G), Fe+Se+Zn (H), morango não biofortificado (I) e medidas morfométricas realizadas (J). Setas indicam as fibras musculares. Scale bar: 100 µm.

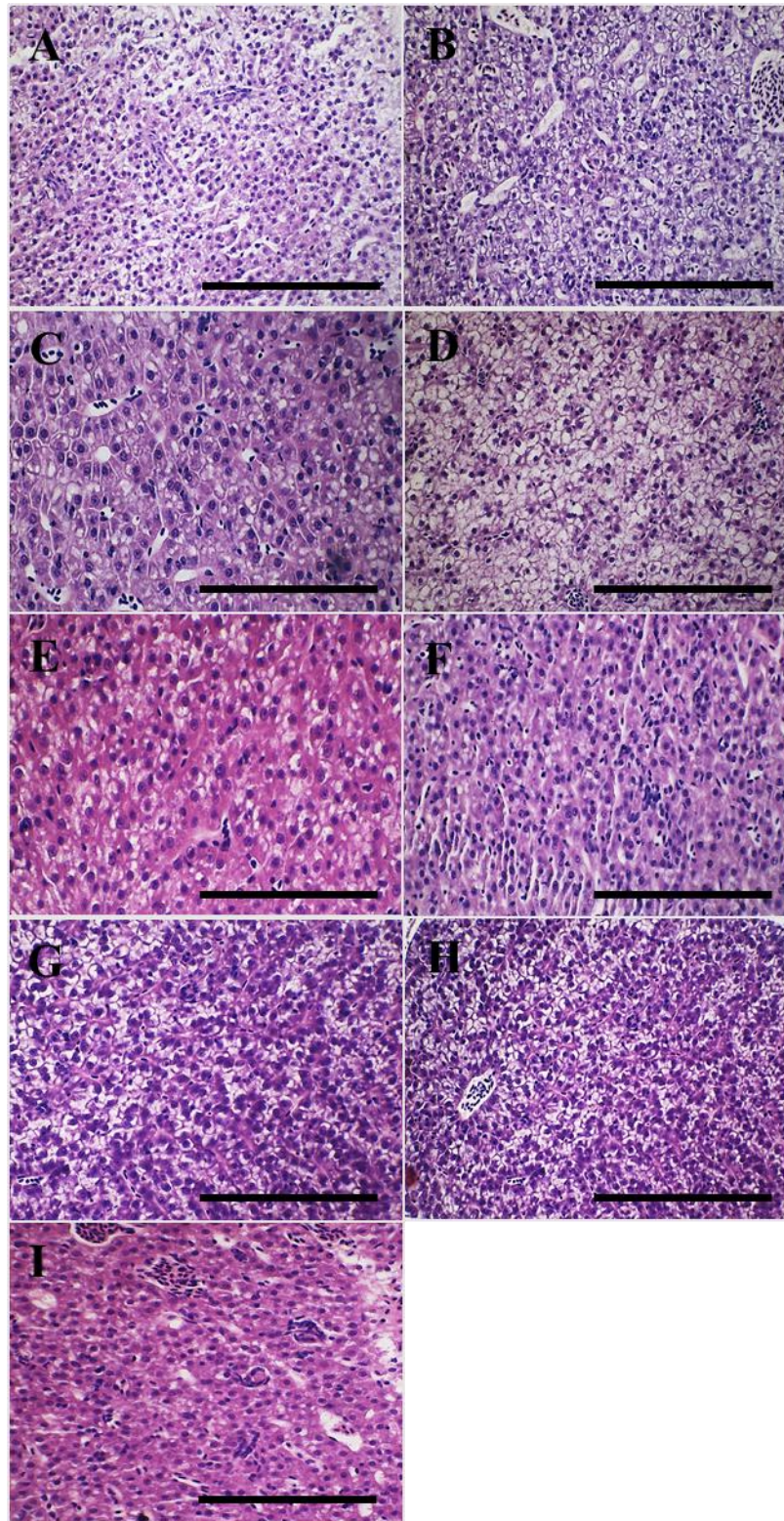


Figura 5. Fotomicrografias do fígado de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) corados com hematoxilina e eosina. Controle (A), Fe (B), Se (C), Zn (D), Fe+Se (E), Fe+Zn (F), Se+Zn (G), Fe+Se+Zn (H) e morango não biofortificado (I). Scale bar: 100 μ m.

Tabela 4 – Histomorfometria do intestino e músculo de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com ração comercial suplementada com morango biofortificado com Fe, Se e Zn.

Medidas histomorfométricas	Tratamentos									P-valor
	Controle	Fe	Se	Zn	Fe + Se	Fe + Zn	Se + Zn	Fe + Se + Zn	MNB ¹	
Altura vilosidades (µm)	281.95 ± 19.14 ^a	330.82 ± 27.98 ^a	287.17 ± 39.45 ^a	317.18 ± 60.87 ^a	447.73 ± 74.36 ^a	346.26 ± 33.78 ^a	370.70 ± 54.10 ^a	373.86 ± 29.33 ^a	315.86 ± 57.09 ^a	0.012
Largura vilosidades (µm)	152.57 ± 19.56 ^b	158.39 ± 16.06 ^b	168.80 ± 7.987 ^a	189.10 ± 4.47 ^a	191.86 ± 6.52 ^a	171.94 ± 26.07 ^a	149.80 ± 0.14 ^b	174.24 ± 10.65 ^a	148.42 ± 30.73 ^b	0.031
Células caliciformes/vilosidade	6.11 ± 1,93 ^a	8.15 ± 0,85 ^a	9.01 ± 0,92 ^a	5.70 ± 1,43 ^a	8.07 ± 1,39 ^a	8.64 ± 1,32 ^a	8.83 ± 2,67 ^a	7.84 ± 0,82 ^a	8.43 ± 1,09 ^a	0.130
Área fibras musculares (µm ²)	2017.34 ± 0.71 ^a	2205.95 ± 0.57 ^a	2197.95 ± 0.28 ^a	1870.42 ± 0.52 ^a	2036.18 ± 0.74 ^a	1416.02 ± 0.27 ^a	2040.66 ± 0.28 ^a	2443.29 ± 0.67 ^a	2171.59 ± 0.50 ^a	0.581

Os dados são expressos como as médias ± desvio padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

µm: micrometro; µm²: micrometro quadrado.

¹Morango não biofortificado.

3.5 Acúmulo de Fe, Se e Zn por EDS

A figura 6 mostra os mapas da localização dos elementos Fe, Se e Zn na região do fígado dos peixes, gerados através da combinação de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). Através da Tabela 5, é possível observar a contagem do número de pontos coloridos correspondentes aos elementos Fe, Se e Zn, presentes nas imagens apresentadas na Figura 6. Todos os tratamentos que receberam dieta suplementada com morango biofortificado com os elementos em estudo, apresentaram maior número de pontos quando comparados ao tratamento Controle. Dessa forma, foi possível observar que, somente o tratamento que recebeu a dieta com morango não biofortificado, ou seja, que não foi suplementado com os elementos Fe, Se e Zn, não apresentou quantidade de pontos superiores ao grupo Controle. Já no tratamento em que foi feita a suplementação de Fe+Zn na dieta dos peixes, foi possível observar maior número de pontos que representam Fe (5183), Se (1775) e Zn (2329), em relação ao grupo Controle (Fe (545), Se (223) e Zn (235)) e aos demais tratamentos, sendo que o Fe e o Zn se encontram em maior quantidade em relação ao Se. Em todos os tratamentos observou-se que o Fe foi o elemento que mais se destacou quando comparado aos demais elementos suplementados à dieta dos peixes, apresentando maior número de pontos que representam esse elemento dentro das regiões das imagens que foram analisadas de cada tratamento.

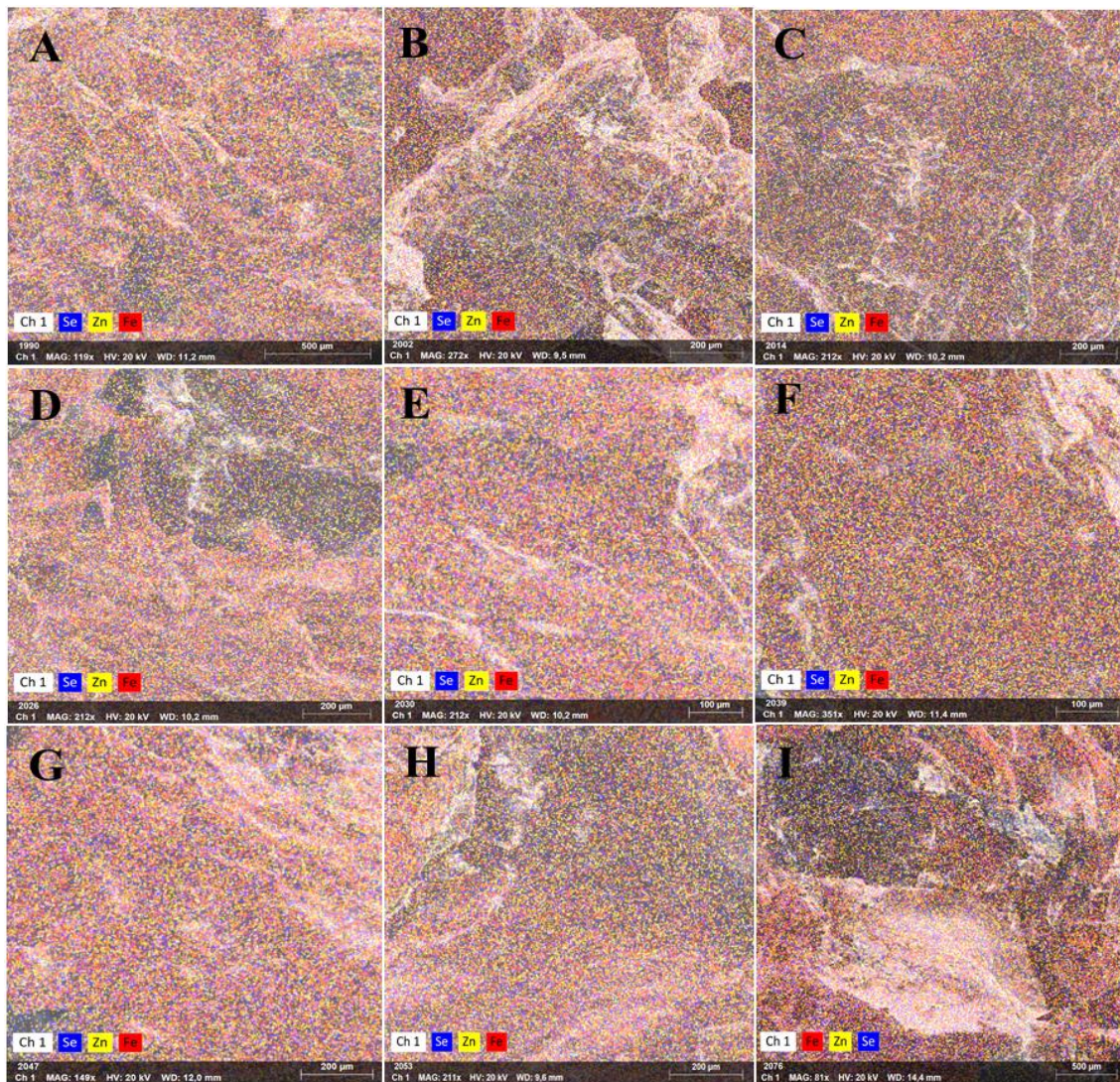


Figura 6. Mapas da localização dos elementos Fe, Se e Zn na parte interna da região do fígado de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*), gerados através da combinação de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). Controle (A), Fe (B), Se (C), Zn (D), Fe+Se (E), Fe+Zn (F), Se+Zn (G), Fe+Se+Zn (H), Morango não biofortificado (I).

Pontos azuis representam Se.

Pontos amarelos representam Zn.

Pontos vermelhos representam Fe.

Tabela 5 – Contagem de pontos correspondentes aos elementos Fe, Se e Zn nas imagens geradas por EDS, da região do fígado de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com ração comercial suplementada com morango biofortificado com Fe, Se e Zn.

Tratamentos	Contagem de pontos		
	Fe	Se	Zn
Controle	545	223	235
Fe	2162	998	1201
Se	1250	560	731
Zn	1353	515	583
Fe + Se	3341	992	1130
Fe + Zn	5183	1775	2329
Se + Zn	1449	335	354
Fe + Se + Zn	1846	781	919
MNB ¹	282	102	108

¹Morango não biofortificado.
Zn: zinco; Se: selênio; Fe: ferro.
Controle: ração Alcon Basic[®].

4 DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros de desempenho e bioquímicos

Os macro e microminerais são necessários para garantir o crescimento e a manutenção da saúde normal dos peixes, sendo que os microminerais possuem quatro funções bioquímicas amplamente reconhecidas: catalítica, estrutural, fisiológica e regulatória (Mertz, 1998). Dito isso, o fato dos parâmetros de desempenho e bioquímicos não terem sido afetados pelas dietas pode ser considerado um ponto positivo, já que demonstra que a suplementação da dieta com morango biofortificado com os micronutrientes Fe, Se e Zn isolados e em associação não comprometeram a saúde dos animais e não levaram à taxas de mortalidade que fossem significativas, mantendo seu

crescimento e desenvolvimento normais. Zheng et al. (2016) observaram que a exposição crônica ao Zn na água não afetou significativamente o crescimento e a taxa de sobrevivência em zebrafish. Também foi relatado em outras espécies de peixes como achigã (*Micropterus salmoides*), que a suplementação da dieta com Zn não alterou as taxas de sobrevivência e os níveis de colesterol total, sendo que os autores assumiram que o Zn ajudou a manter o metabolismo e o transporte normais do colesterol, regulando as formas existentes em vez da quantidade de colesterol (He et al., 2023).

4.2 Estresse oxidativo

A suplementação da dieta com morango biofortificado com Zn levou ao aumento da produção de EROs nos peixes desse grupo. Os radicais livres ou EROs são produzidos pelas células como resultado de várias atividades metabólicas (Kurutas, 2016). Para restaurar o equilíbrio redox, neutralizar os efeitos nocivos das EROs e prevenir o estresse oxidativo, os peixes utilizam enzimas que atuam no sistema de defesa antioxidante do organismo, sendo que a SOD, CAT e GPx estão envolvidas na primeira linha de proteção do organismo (Jiang et al., 2016; Shanmugam et al., 2018; Lucio et al., 2018). Sendo assim, a presença acima do nível normal de Zn no organismo pode levar a produção excessiva de EROS nas células e a atividade da SOD pode ser estimulada para regular efetivamente o equilíbrio dessas espécies reativas (Sharma et al., 2022). Quando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado no organismo pelos processos de oxidação do oxigênio, a SOD é a primeira enzima a atacá-lo através da dismutação, catalisando sua conversão em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é decomposto em água e oxigênio pela CAT (Halliwell e Gutteridge, 2015; Taheri Mirghaed et al., 2020; Yilmaz, 2019). Sendo assim, a SOD pode ter sido ativada como enzima primária de defesa para neutralizar o excesso de EROs, o que explicaria sua elevada atividade com a suplementação da dieta com morango biofortificado com Zn. Como SOD e CAT atuam em conjunto, a atividade da CAT também foi elevada.

Para evitar a produção excessiva do radical hidroxila (OH^{\cdot}), as enzimas CAT e GPx atuam evitando o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 no organismo, já que para esse radical livre, o sistema de defesa antioxidante enzimático é inválido (Yu, 1994). Com isso, além da CAT e SOD, a atividade da GPx também foi superior nos peixes que receberam dieta suplementada com morango biofortificado com Zn, o que sugere a ativação do sistema antioxidante para proteger o organismo do dano oxidativo que pode ser gerado pela

produção excessiva de EROs (Teimouri et al., 2019; Yousefi et al., 2020; Zhang et al., 2018). Na atividade de GST e nos níveis de GSH também foi possível observar aumento com a suplementação da dieta dos peixes com Zn, o que também implicaria no esforço em reduzir as EROs presentes no organismo desses animais. Para ajudar as células a se recuperarem do estresse oxidativo, a GST, associada à GSH, é considerada a enzima desintoxicante mais comum (Domingues et al., 2010), sendo que a GSH, que participa das defesas antioxidantes não enzimáticas, pode se ligar rapidamente às EROs produzidas, desintoxicando-as (Massarsky et al., 2017).

Sendo assim, apesar do esforço do sistema de defesa antioxidante enzimático em reduzir as EROs produzidas em resposta à dieta suplementada com Zn, de acordo com os resultados, esse não foi eficiente em evitar a peroxidação lipídica. Diversos autores avaliaram os efeitos do Zn em zebrafish e em outras espécies de peixes (Roberto et al., 2018; Zheng et al., 2010; Zheng et al., 2016). Wang et al. (2020) relataram que a alimentação de Tilápia do Nilo com lentilha-d'água (*Lemna minor*) enriquecida com Zn por 21 dias resultou no aumento do conteúdo de MDA, implicando na peroxidação lipídica. Já Shukry et al. (2022) ao adicionarem nanopartículas de Zn na dieta de tainha-fataça (*Liza ramada*), observaram aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, além de redução na concentração de MDA. Yu et al. (2021), relataram que níveis adequados de Zn na dieta de salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) contribuíram para a redução dos produtos da peroxidação, em grande parte devido às ações das enzimas antioxidantes, o que sugere que no presente estudo a quantidade suplementada do mesmo na dieta do zebrafish pode não ter sido em níveis suficientes, aumentando a peroxidação lipídica. Apesar do observado em relação aos níveis de EROs e MDA nos animais que receberam a dieta com Zn, de modo geral, os demais parâmetros analisados neste estudo não demonstraram que pudesse haver um indicativo, de fato, de estresse oxidativo, não causando danos celulares que comprometessem o desenvolvimento normal dos animais. Além disso, a presença desse mineral no organismo dos animais elevou a atividade enzimática, o que pode ser considerado um resultado positivo.

Embora tenha ocorrido aumento significativo da produção de EROs nos animais do modelo zebrafish alimentados com morango não biofortificado, o sistema de defesa antioxidante foi capaz de neutralizar seus efeitos, garantindo sua proteção, já que não houve aumento significativo dos níveis de MDA, não ocorrendo peroxidação lipídica. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que o morango possui diversos compostos bioativos que funcionam como antioxidantes e atuam no sistema de defesa

antioxidante, e que são capazes de gerar efeitos positivos no combate ao estresse oxidativo, o que pode ter auxiliado no combate às EROs. Sendo assim, a capacidade antioxidante do morango tem sido atribuída a compostos como vitaminas A, C e E, e polifenóis, especialmente flavonóides e ácidos fenólicos (Afrin et al., 2016). Segundo da Silva Pierri et al. (2021), sob condições metabólicas normais, as enzimas de proteção celular são mantidas em níveis basais baixos. Isso demonstra que, mesmo que não tenha sido capaz de elevar a atividade enzimática, a dieta suplementada com morango pode auxiliar no combate aos radicais livres formados pelo organismo, evitando o estresse oxidativo em zebrafish. Entretanto, novos estudos com diferentes concentrações de morango adicionadas à dieta de zebrafish são necessários para avaliar a atividade enzimática. Dito isso, não foi observado aumento na formação de EROs nos demais tratamentos.

A suplementação da dieta de zebrafish com morango biofortificado com Fe+Zn também foi capaz de elevar a atividade das enzimas SOD, GST e GPx. Já a dieta com morango biofortificado com os três micronutrientes Fe+Se+Zn, levou ao aumento significativo da atividade da GPx. Segundo da Silva Pierri et al. (2021), a alta atividade enzimática pode ser um indicador de uma resposta protetora contra possíveis estressores. Observou-se um ligeiro aumento dos níveis de peroxidação lipídica com essas dietas, no entanto, não houve aumento na formação de EROs. Além disso, o aumento da largura das vilosidades intestinais dos animais que receberam essas dietas, demonstra que os micronutrientes quando combinados na dieta na forma de Fe+Zn e Fe+Se+Zn, podem ser melhores absorvidos, melhorando a saúde intestinal e o status antioxidante em zebrafish.

4.3 Histomorfologia

Nesse estudo, a dieta de zebrafish suplementada com morango biofortificado com os microminerais Fe, Se e Zn não causou danos hepáticos aos animais, o que indica que as dietas avaliadas não foram capazes de comprometer o fígado. O músculo também não sofreu alterações morfológicas e não foi afetado significativamente pelas dietas, o que corrobora com o fato de não ter ocorrido variações entre os tratamentos na avaliação dos parâmetros de desempenho de crescimento dos animais.

A medida das características histológicas intestinais é uma ferramenta confiável para avaliar o impacto dos micronutrientes na saúde intestinal e, portanto, na capacidade de digestão intestinal (Hu et al., 2013; Richardson et al., 1985). A histomorfologia do intestino revelou uma melhora significativa na largura das vilosidades intestinais com as

dietas suplementadas com morango biofortificado com Se, Zn, Fe+Se, Fe+Zn e Fe+Se+Zn, o que sugere que a dieta com esses micronutrientes pode ter o potencial de ampliar a área de superfície necessária para a digestão, através do aumento da largura das vilosidades intestinais, podendo, assim, contribuir para a melhor absorção dos nutrientes no intestino. Isto pode estar relacionado ao fato de que em todos os grupos de animais que receberam essas dietas citadas, os elementos Fe e Zn se encontram em maior quantidade, assim como foi demonstrado através da análise dos pontos que representam os elementos Fe, Se e Zn (Tabela 5) nas imagens geradas por EDS (Figura 6), sugerindo que a maior presença de Fe e Zn no organismo, possa contribuir para a melhor absorção de nutrientes no intestino. Estudos anteriores demonstraram que estruturas intestinais bem desenvolvidas são caracterizadas por maior altura e largura das vilosidades intestinais (Wu et al., 2023), o que indica melhor saúde desse órgão no modelo zebrafish suplementado com microminerais, corroborando com os resultados em relação à largura das vilosidades intestinais encontrados nesse estudo. Shukry et al. (2022) também observaram aumento da largura das vilosidades intestinais em tainha-fataça (*Liza ramada*) alimentada com nanopartículas de Zn na dieta.

Os parâmetros intestinais como número de células caliciformes, largura e comprimento das vilosidades são considerados indicadores importantes da morfologia intestinal que melhoram a assimilação de nutrientes através da extensão e influência da área de absorção do intestino do peixe, o que, conseqüentemente, melhora o desempenho (Wang et al., 2017). Apesar dos resultados da histomorfologia do intestino serem positivos, estes não se correlacionam com os resultados dos parâmetros de desempenho nesse estudo. Embora o aumento da largura das vilosidades intestinais com as dietas suplementadas com morango biofortificado com Se, Zn, Fe+Se, Fe+Zn e Fe+Se+Zn possa indicar melhora na digestão e, conseqüentemente, na absorção desses nutrientes, os parâmetros de desempenho não foram afetados.

4.4 Acúmulo de Fe, Se e Zn por EDS

A técnica analítica EDS foi útil no fornecimento de uma avaliação qualitativa do fígado dos peixes que receberam os tratamentos, mostrando a concentração através da contagem de pontos dos elementos Fe, Se e Zn nas imagens geradas de cada tratamento, e comparando proporcionalmente o acúmulo desses elementos químicos suplementados na dieta através do morango biofortificado. Em relação à dieta suplementada com Fe+Zn e com Fe+Se+Zn, o Fe foi o componente majoritário, ocorrendo também acúmulo de Zn

nos peixes desse grupo, como demonstrado na Tabela 5. Segundo Cruz (2015) e Oteiza (2012), o Fe pode competir com o Zn nos sítios de ligação semelhantes no trato digestivo durante a absorção. Sendo assim, o Fe pode ter diminuído a disponibilidade do Zn para a absorção dos peixes, ficando mais biodisponível e acumulando no organismo, o que pode ter levado ao ligeiro aumento dos níveis de peroxidação lipídica (Marreiro et al., 2017), que foi evidenciado anteriormente. Além disso, o fato do número de pontos que representam a presença de Fe, Se e Zn no organismo dos animais, ter sido superior nos grupos que receberam dieta suplementada com morango biofortificado com esses elementos, isolados e em associação, quando comparados ao grupo Controle, pode ser um indicativo de que houve biofortificação do morango. Também mostra que os animais conseguiram absorver maior quantidade desses nutrientes a partir dessas dietas, demonstrando que a suplementação da dieta com morango biofortificado com Fe, Se e Zn, pode beneficiar a saúde dos animais, como visto através dos resultados dos demais parâmetros analisados neste estudo.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que todas as enzimas avaliadas tiveram sua atividade aumentada com a dieta suplementada com Zn, mas não foram capazes de evitar a elevação dos níveis de peroxidação lipídica. No entanto, através dos demais parâmetros analisados neste estudo, foi possível observar que, de fato, não houve evidências de estresse oxidativo, ou seja, não ocorreram danos celulares no organismo dos animais que receberam essa dieta. Sendo assim, o morango biofortificado com Fe+Zn e Fe+Se+Zn nos níveis estudados, pode ser recomendado para a suplementação da alimentação, uma vez que exerce efeitos positivos no sistema antioxidante, através do aumento da atividade enzimática. Ainda, com a análise das imagens a partir da EDS, há um indicativo de que o morango foi biofortificado, além de demonstrar que a suplementação da dieta com morango biofortificado com Fe, Se e Zn, isolados e/ou em associação, pode beneficiar a saúde dos animais, ser comprometer o desenvolvimento normal do organismo, como visto através dos resultados dos demais parâmetros analisados neste estudo.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

DECLARAÇÃO DE FINANCIAMENTO

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (pp. 121–126). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aescht, E., Büchl-Zimmermann, S., Burmester, A., Dänhardt-Pfeiffer, S., Desel, C., Hamers, C., Jach, G., Kässens, M., Makovitzky, J., Mulisch, M., Nixdorf-Bergweiler, B., Pütz, D., Riedelsheimer, B., van den Boom, F., Wegerhoff, R., & Welsch, U. (2010). *Romeis Mikroskopische Technik* (M. Mulisch & U. Welsch (Eds.)). Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2254-5>
- Afrin, S., Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Reboredo-Rodriguez, P., Mezzetti, B., Varela-López, A., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(22), 4435–4449. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00857>
- Akindoyeni, I. A., Oyeleye, I. S., Ogunruku, O. O., & Oboh, G. (2024). Biofortification of scent leaf (*Ocimum gratissimum* L.) with selenium enhances antiinflammatory cytokines and humoral response in Wistar rats. *Journal of Trace Elements and Minerals*, *8*, 100128. <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2024.100128>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Broadley, M. R., Alcock, J., Alford, J., Cartwright, P., Foot, I., Fairweather-Tait, S. J., Hart, D. J., Hurst, R., Knott, P., McGrath, S. P., Meacham, M. C., Norman, K., Mowat, H., Scott, P., Stroud, J. L., Tovey, M., Tucker, M., White, P. J., Young, S. D., & Zhao, F.-J. (2010). Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. *Plant and Soil*, *332*(1–2), 5–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0234-4>
- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., Hawkesford, M. J., McGrath, S. P., Zhao, F.-J., Breward, N., Harriman, M., & Tucker, M. (2006). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*, *65*(2), 169–181. <https://doi.org/10.1079/PNS2006490>
- Broome, C. S., McArdle, F., Kyle, J. A., Andrews, F., Lowe, N. M., Hart, C. A., Arthur, J. R., & Jackson, M. J. (2004). An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(1), 154–162. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.154>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology* (pp. 302–310). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Carr, A., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, *9*(11), 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>
- Carvalho, A. M. X. de, Mendes, F. Q., Mendes, F. Q., & Tavares, L. de F. (2020). SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical

- analyses of experiments. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20(3), e327420312. <https://doi.org/10.1590/1984-70332020v20n3s46>
- Casaril AM, Ignasiak MT, Chuang CY, Vieira B, Padilha NB, Carroll L, Lenardao EJ, Savegnago L, D. M. (2017). Selenium-containing indolyl compounds: Kinetics of reaction with inflammation-associated oxidants and protective effect against oxidation of extracellular matrix proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, 113, 395–405.
- Chasapis, C. T., Ntoupa, P.-S. A., Spiliopoulou, C. A., & Stefanidou, M. E. (2020). Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Archives of Toxicology*, 94(5), 1443–1460. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02702-9>
- Cruz, K. J. C. (2015). Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(2), 333. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i2.333>
- da Silva Pierri, B., Dafré, A. L., Silva, A. D., Cadorin, D. I., Mattos, J. J., Bascunã, V. L. A. F., Pettigrew, J. E., & Fracalossi, D. M. (2021). Dietary supplementation with increasing doses of an organic micromineral complex on juvenile Nile tilapia: Effects on the antioxidant defense system and tissue deposition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 260, 111039. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111039>
- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Grisolia, C. K., Mendo, S., & Soares, A. M. V. M. (2010). Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.010>
- Driver, A. S., Kodavanti, P. R. S., & Mundy, W. R. (2000). Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicology and Teratology*, 22(2), 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00069-0)
- Espinosa, M. B. (2016). The Zebrafish: A Tool in Education Resumen Introducción. *Revista de Educación En Biología.*, 19, 11–8.
- Gao, S., Jin, Y., Hall, K. S., Liang, C., Unverzagt, F. W., Ji, R., Murrell, J. R., Cao, J., Shen, J., Ma, F., Matesan, J., Ying, B., Cheng, Y., Bian, J., Li, P., & Hendrie, H. C. (2007). Selenium Level and Cognitive Function in Rural Elderly Chinese. *American Journal of Epidemiology*, 165(8), 955–965. <https://doi.org/10.1093/aje/kwk073>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hacisalihoglu, G. (2020). Zinc (Zn): The Last Nutrient in the Alphabet and Shedding Light on Zn Efficiency for the Future of Crop Production under Suboptimal Zn. *Plants*, 9(11), 1471. <https://doi.org/10.3390/plants9111471>
- He, X., Chen, A., Liao, Z., Zhang, Y., Lin, G., Zhuang, Z., Liu, Y., Wei, H., Wang, Z., Wang, Y., & Niu, J. (2023). Diet supplementation of organic zinc positively affects

- growth, antioxidant capacity, immune response and lipid metabolism in juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *British Journal of Nutrition*, 130(10), 1689–1703. <https://doi.org/10.1017/S0007114523000909>
- Hu, C. H., Xiao, K., Song, J., & Luan, Z. S. (2013). Effects of zinc oxide supported on zeolite on growth performance, intestinal microflora and permeability, and cytokines expression of weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 181(1–4), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.02.003>
- Jiang, T., Sun, Q., & Chen, S. (2016). Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 147, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.005>
- Karimi, K., & Zhandi, M. (2015). The effect of β -mannanase and β -glucanase on small intestine morphology in male broilers fed diets containing various levels of metabolizable energy. *Journal of Applied Animal Research*, 43(3), 324–329. <https://doi.org/10.1080/09712119.2014.978770>
- Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Lucio, L. M. C., Braz, M. G., do Nascimento Junior, P., Braz, J. R. C., & Braz, L. G. (2018). Occupational hazards, DNA damage, and oxidative stress on exposure to waste anesthetic gases. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 68(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.bjan.2017.05.001>
- Luzeena Raja, G., Divya Subhashree, K., Lite, C., Santosh, W., & Barathi, S. (2019). Transient exposure of methylparaben to zebrafish (*Danio rerio*) embryos altered cortisol level, acetylcholinesterase activity and induced anxiety-like behaviour. *General and Comparative Endocrinology*, 279, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2018.11.001>
- Gomathi, M, P. I. V. and P. G. (2017). Biofortification in Vegetable Crops – A Review. *Chemical Science Review and Letters*, 6(22), 1227–1237.
- Magee, P. J., & McCann, M. T. (2019). Micronutrient deficiencies: current issues. *Proceedings of the Nutrition Society*, 78(02), 147–149. <https://doi.org/10.1017/S0029665118002677>
- Marreiro, D., Cruz, K., Morais, J., Beserra, J., Severo, J., & de Oliveira, A. (2017). Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants*, 6(2), 24. <https://doi.org/10.3390/antiox6020024>
- Massarsky, A., Kozal, J. S., & Di Giulio, R. T. (2017). Glutathione and zebrafish: Old assays to address a current issue. *Chemosphere*, 168, 707–715. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.004>

Mertz, W. (1998). Review of the scientific basis for establishing the essentiality of trace elements. *Biological Trace Element Research*, 66(1–3), 185–191. <https://doi.org/10.1007/BF02783137>

Mistry, H. D., Broughton Pipkin, F., Redman, C. W. G., & Poston, L. (2012b). Selenium in reproductive health. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.07.034>

Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, 49(2), 474–478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4)

Oteiza, P. I. (2012). Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(9), 1748–1759. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.568>

Padayatty, S., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*, 22(6), 463–493. <https://doi.org/10.1111/odi.12446>

Richardson, N. L., Higgs, D. A., Beames, R. M., & McBride, J. R. (1985). Influence of Dietary Calcium, Phosphorus, Zinc and Sodium Phytate Level on Cataract Incidence, Growth and Histopathology in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *The Journal of Nutrition*, 115(5), 553–567. <https://doi.org/10.1093/jn/115.5.553>

Roberto, V. P., Martins, G., Pereira, A., Rodrigues, S., Grenha, A., Pinto, W., Cancela, M. L., Dias, J., & Gavaia, P. J. (2018). Insights from dietary supplementation with zinc and strontium on the skeleton of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) larvae: From morphological analysis to osteogenic markers. *Journal of Applied Ichthyology*, 34(2), 512–523. <https://doi.org/10.1111/jai.13664>

Sachett, A., Gallas-Lopes, M., G. M. M. C., & Herrmann, A. P. (2021). Glutathione peroxidase (GPx) activity assessment for zebrafish brain tissue. *Protocols.io*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bsujneun>

Santos, E. F., Figueiredo, C. O., Rocha, M. A. P., Lanza, M. G. D. B., Silva, V. M., & Reis, A. R. (2023). Phosphorus and Selenium Interaction Effects on Agronomic Biofortification of Cowpea Plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23(3), 4385–4395. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01357-6>

Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

Shanmugam, T., Abdulla, S., Yakulasamy, V., Selvaraj, M., & Mathan, R. (2018). A mechanism underlying the neurotoxicity induced by sodium fluoride and its reversal by epigallocatechin gallate in the rat hippocampus: involvement of Nrf2/Keap-1 signaling pathway. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s41936-018-0020-z>

- Sharma, K., Sharma, P., Dhiman, S. K., Chadha, P., & Saini, H. S. (2022). Biochemical, genotoxic, histological and ultrastructural effects on liver and gills of fresh water fish *Channa punctatus* exposed to textile industry intermediate 2 ABS. *Chemosphere*, 287, 132103. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132103>
- Shukry, M., Albogami, S., Gewaily, M., Amer, A. A., Soliman, A. A., Alsaïad, S. M., El-Shehawi, A. M., & Dawood, M. A. O. (2022). Growth Performance, Antioxidative Capacity, and Intestinal Histomorphology of Grey Mullet (*Liza ramada*) – Fed Dietary Zinc Nanoparticles. *Biological Trace Element Research*, 200(5), 2406–2415. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02844-6>
- Skröder, H., Kippler, M., Tofail, F., & Vahter, M. (2017). Early-Life Selenium Status and Cognitive Function at 5 and 10 Years of Age in Bangladeshi Children. *Environmental Health Perspectives*, 125(11), 117003. <https://doi.org/10.1289/EHP1691>
- Straeten, VD, Bhullar, D, De Steur, NK, et al. (2020). Multiplying the efficiency and impact of biofortification through metabolic engineering. *Nature Communications*, 11(1), 5203. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19020-4>
- Taheri Mirghaed, A., Paknejad, H., & Mirzargar, S. S. (2020). Hepatoprotective effects of dietary *Artemisia* (*Artemisia annua*) leaf extract on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 527, 735443. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735443>
- Teimouri, M., Yeganeh, S., Mianji, G. R., Najafi, M., & Mahjoub, S. (2019). The effect of *Spirulina platensis* meal on antioxidant gene expression, total antioxidant capacity, and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(3), 977–986. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-0608-3>
- Tulipani, S., Mezzetti, B., & Battino, M. (2009). Impact of strawberries on human health: insight into marginally discussed bioactive compounds for the Mediterranean diet. *Public Health Nutrition*, 12(9A), 1656–1662. <https://doi.org/10.1017/S1368980009990516>
- Wang, J., Wang, A., & Wang, W.-X. (2017). Evaluation of nano-ZnOs as a novel Zn source for marine fish: importance of digestive physiology. *Nanotoxicology*, 11(8), 1026–1039. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1388865>
- Wang, J., Xiao, J., Zhang, J., Chen, H., Li, D., Li, L., Cao, J., Xie, L., & Luo, Y. (2020). Effects of dietary Cu and Zn on the accumulation, oxidative stress and the expressions of immune-related genes in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 100, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.012>
- White, P., & Broadley, M. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science*, 10(12), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.001>
- White, P. J. (2015). Selenium accumulation by plants. *Annals of Botany*, mcv180. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv180>

White, R. M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C. E., & Zon, L. I. (2008). Transparent Adult Zebrafish as a Tool for *In Vivo* Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, *2*(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>

Wu, F., Cao, W., Xu, H., Zhu, M., Wang, J., & Ke, X. (2017). Treatment with a selenium-platinum compound induced T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma cells apoptosis through the mitochondrial signaling pathway. *Oncology Letters*, *13*(3), 1702–1710. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5666>

Wu, Q., Rayman, M. P., Lv, H., Schomburg, L., Cui, B., Gao, C., Chen, P., Zhuang, G., Zhang, Z., Peng, X., Li, H., Zhao, Y., He, X., Zeng, G., Qin, F., Hou, P., & Shi, B. (2015). Low Population Selenium Status Is Associated With Increased Prevalence of Thyroid Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *100*(11), 4037–4047. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2222>

Yiannikourides, A., & Latunde-Dada, G. (2019). A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. *Medicines*, *6*(3), 85. <https://doi.org/10.3390/medicines6030085>

Yilmaz, S. (2019). Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Plesiomonas shigelloides*. *Fish & Shellfish Immunology*, *84*, 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.012>

Yousefi, M., Vatnikov, Y. A., Kulikov, E. V., Plushikov, V. G., Drukovsky, S. G., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2020). The protective effects of dietary garlic on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia toxicity. *Aquaculture*, *526*, 735400. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735400>

Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, *74*(1), 139–162. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>

Yu, H.-R., Li, L.-Y., Shan, L.-L., Gao, J., Ma, C.-Y., & Li, X. (2021). Effect of supplemental dietary zinc on the growth, body composition and anti-oxidant enzymes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) alevins. *Aquaculture Reports*, *20*, 100744. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100744>

Zhang, J., Saad, R., Taylor, E. W., & Rayman, M. P. (2020). Selenium and selenoproteins in viral infection with potential relevance to COVID-19. *Redox Biology*, *37*, 101715. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101715>

Zhang, M., Li, M., Wang, R., & Qian, Y. (2018). Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine. *Fish & Shellfish Immunology*, *79*, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.036>

Zheng, D., Kille, P., Feeney, G. P., Cunningham, P., Handy, R. D., & Hogstrand, C. (2010). Dynamic transcriptomic profiles of zebrafish gills in response to zinc supplementation. *BMC Genomics*, *11*(1), 553. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11->

553

Zheng, J.-L., Yuan, S.-S., Wu, C.-W., & Li, W.-Y. (2016). Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, *177*, 261–268.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.001>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biofortificação é uma estratégia eficiente no combate à deficiência de microminerais, já que possui vantagens que sobressaem às outras soluções, como a fortificação, diversificação alimentar e suplementação, podendo atingir e possibilitando o acesso às populações, principalmente de países em desenvolvimento. Recentemente, vários estudos têm sido conduzidos e têm evidenciado a eficácia da biofortificação com ferro, selênio e zinco para aumentar a concentração desses elementos em diversas culturas alimentares, como o morangueiro que, devido ao seu elevado consumo em várias regiões do mundo, além dos benefícios conjuntos que podem advir ao aliar o valor nutricional do mesmo à adição de microminerais, constitui uma cultura de bastante sucesso nessa prática. Apesar do seu impacto e importância para as populações à nível de saúde global, ainda são escassos os estudos que avaliem os efeitos da biofortificação na saúde humana. Nesse sentido, o uso de modelos animais, como o modelo zebrafish, podem ser bons indicadores e trazer resultados preditivos à respeito desses efeitos à saúde. Uma vez que possui similaridade genética com o organismo humano, além de diversos benefícios em relação ao uso de mamíferos, o zebrafish tem sido utilizado como alternativa à esses últimos. Sendo assim, são necessários estudos que demonstrem a segurança dessa estratégia alimentar para a saúde das populações, trazendo maiores informações a respeito dos efeitos dessa. Além disso, estudos a respeito da biodisponibilidade desses microminerais no modelo zebrafish também seriam interessantes.