UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – PPGCB

KÍVIA VANESSA GOMES FALCÃO

ADITIVOS ALIMENTARES COM POTENCIAL TERATOGÊNICO E POSSÍVEL INDUTOR DE ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL EM EMBRIÕES DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Recife
2019

KÍVIA VANESSA GOMES FALCÃO

ADITIVOS ALIMENTARES COM POTENCIAL TERATOGÊNICO E POSSÍVEL INDUTOR DE ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL EM EMBRIÕES DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Profº. Dr. Ranilson de Sousa Bezerra
Coorientador: Profº. Dr. Rafael David Souto de Azevedo

Recife
2019

Catalogação na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Falcão, Kívia Vanessa Gomes
Aditivos alimentares com potencial teratogênico e possível indutor de estresse oxidativo mitocondrial em embriões do zebrafish (*Danio rerio*) / Kívia Vanessa Gomes Falcão - 2019.
79 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra
Coorientador: Rafael David Souto de Azevedo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Peixes– Alimentos 2. Citologia 3. Mitocôndria I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Azevedo, Rafael David Souto de (coorient.) III. Título

639.3 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2019-335

KÍVIA VANESSA GOMES FALCÃO

ADITIVOS ALIMENTARES COM POTENCIAL TERATOGÊNICO E POSSÍVEL INDUTOR DE ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL EM EMBRIÕES DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 15 / 02 / 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (UFPE – DBioq) – Orientador

_____

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE – DBIOq) – Membro Interno

_____

Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite (UFAL – DQB) – Membro Externo

Dedico esse trabalho aos meus pais amados Miriam Falcão e Ambrosio Falcão.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar perante as dificuldades. Por colocar em meu caminho as pedras que precisei sentir em meus pés para ver que nem tudo são flores, e ter colocado pessoas especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria chegado até aqui.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento que obtive durante o mestrado.

Ao meu orientador, professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra, agradeço pela oportunidade de poder fazer parte do Laboratório de Enzimologia (LABENZ) e por ter mostrado um caminho quando eu mais precisei.

Ao meu coorientador Dr. Rafael David Souto de Azevedo, meu infinito agradecimento por sempre acreditar em minha capacidade e estar ao meu lado em todas as horas, mesmo sem tempo e muito ocupado, você fez o possível e o impossível para sentar comigo e me explicar tudo. Tantas vezes que nos reunimos e, embora em algumas eu estivesse triste quando os experimentos davam errado, só bastavam algumas palavras suas para eu recuperar o mesmo ânimo do primeiro dia de trabalho. Com os seus conselhos, companheirismo, amizade, paciência, compreensão e apoio este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho. Rafa, na vida existem anjos disfarçados de pessoas que Deus envia a nós em momentos mais difíceis e nos fazem enxergar a vida com as mais belas cores, pode ter certeza que você é o meu.

Agradeço aos meus pais por sempre primarem pela minha educação e fazerem de mim a pessoa que sou hoje. Obrigada Miriam Gomes da Costa Falcão e Ambrosio Marinho Falcão Neto simplesmente por terem me feito existir, por tanto amor, por cada oração, por sempre me estimularem a continuar, por ter enxugado todas as minhas lágrimas e pelas palavras de apoio ditas me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Não tenho como agradecer a companhia de vocês durante esses dois anos, principalmente por abrirem mão dos finais de semana e dos feriados para irem comigo alimentar meus peixes, sem vocês eu não teria conseguido.

A minha avó querida Maria do Nascimento da Costa, agradeço por você ter me criado e dado tanto amor. Obrigada por todas as orações, por torcer sempre por mim e estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Mesmo não entendendo o assunto do meu projeto, você sempre me perguntava pelo mestrado e pelos meus peixes.

A minha amada irmã Amanda Renata Gomes Falcão e ao meu cunhado Alysson Magno Bezerra Soares, obrigada pela compreensão e apoio.

Ao professor Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral, obrigada por ter ensinado as técnicas de reprodução do Zebrafish, se não fosse você, este projeto não teria sido realizado.

A Professora. Dra. Maria Bernadete de Souza Maia, obrigada por abrir as portas do Laboratório de Farmacologia e Produtos Bioativos- LABFBio e ceder os equipamentos essenciais para execução do projeto.

Agradeço a todos os colegas do LABENZ por todas as horas compartilhadas na bancada e pelos momentos de descontração. Em especial, a Janilson Felix da Silva por tirar todas as minhas dúvidas e me ajudar a cuidar dos meus peixinhos. Janis, você foi um grande amigo pra mim.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui, o meu muito obrigada!

Não importa o que aconteça, continue a nadar

(Walters Graham; procurando nemo, 2003)

RESUMO

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucariontes, e nelas são produzidas a maior parte da energia celular. Defeitos no funcionamento mitocondrial podem repercutir gravemente na produção de energia e comprometer o funcionamento do organismo. Um dos responsáveis por interferir no funcionamento mitocondrial são os aditivos alimentares, os conservantes em particular, uma das classes dos aditivos que sofrem transformações químicas pós ingestão e geram compostos que são potencialmente tóxicos. Neste trabalho, os embriões do zebrafish foram expostos a concentrações de 50 mM e 100 mM dos aditivos Nitrato de sódio, Nitrito de sódio e Sulfito de sódio para avaliação de possíveis efeitos teratogênicos e de desbalanços na bioenergética mitocondrial. Para os estudos de bioenergética mitocondrial, foram analisados o consumo de oxigênio nos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons através da permeabilização dos embriões com digitonina. A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO´s) e biossíntese do óxido nítrico foram monitoradas utilizando H2DCF-DA (2´,7´-Diclorofluoresceína) e DAF-FM-DA (Diaminofluoresceína-FM diacetato) respectivamente. Como resultados, foi observado que o sulfito de sódio nas primeiras 24 h de exposição causou retardo no desenvolvimento embrionário, e posteriormente também provocou aumento de 79% na área cardíaca, diminuição de 65% na área ocular e aumento na área do rombencéfalo 88% de aumento a 50mM e superior a 100% a 100 mM. O nitrato de sódio ocasionou aumento superior a 100% na área cardíaca (50 mM e 100 mM). O nitrito de sódio causou edema pericárdio, aumento na área cardíaca e redução na frequência cardíaca (32% a 50 mM, 51% a 100mM). Os três aditivos testados causaram efeitos adversos no consumo de oxigênio, pois provocaram diminuição do controle respiratório (CR) quando utilizados substratos para os complexos I e II. O sulfito e o nitrato foram responsáveis por aumentar a produção de ERO´s em 90% a 50 mM. O nitrito de sódio aumentou a biossíntese do NO• em mais de 100% (50 mM e 10mM), já o sulfito foi responsável por diminuir a produção de NO• (61% a 50mM e 87% a 100mM) nos embriões. Em síntese, é possível afirmar que as mitocôndrias do zebrafish são uma ferramenta útil para testes de teratogenicidade e toxicidade alimentar.

Palavras-chave: Aditivos alimentares. *Danio rerio*. Teratogenicidade. Mitocôndria.

ABSTRACT

Mitochondria are present in almost all eukaryotic cells, and most of their cellular energy is produced in them. Defects in mitochondrial functioning can severely impact energy production and compromise the body's functioning. One of those responsible for interfering with mitochondrial functioning is food additives, preservatives in particular, one of the classes of additives that undergo chemical transformations after ingestion and generate compounds that are potentially toxic. In this work, zebrafish embryos were exposed to 50 mM and 100 mM concentrations of sodium nitrate, sodium nitrite and sodium sulfite additives to evaluate possible teratogenic effects and imbalances in mitochondrial bioenergetics. For mitochondrial bioenergetic studies, oxygen consumption in the respiratory complexes of the electron transport chain was analyzed through the permeabilization of embryos with digitonin. Reactive oxygen species (ROS) generation and nitric oxide biosynthesis were monitored using H2DCF-DA (2´, 7´-Dichlorofluorescein) and DAF-FM-DA (Diaminofluorescein-FM diacetate) respectively. As a result, it was observed that sodium sulphite in the first 24 h of exposure caused embryonic development retardation, and later also caused 79% increase in the cardiac area, 65% decrease in the ocular area and 88% increase in the rhombencephalon area. increase at 50mM and greater than 100% at 100mM. Sodium nitrate caused greater than 100% increase in cardiac area (50 mM and 100 mM). Sodium nitrite caused pericardial edema, increased heart area and decreased heart rate (32% to 50 mM, 51% to 100mM). The three additives tested caused adverse effects on oxygen consumption, as they caused decreased respiratory control (CR) when substrates for complexes I and II were used. Sulphite and nitrate were responsible for increasing ROS production by 90% to 50 mM. Sodium nitrite increased NO • biosynthesis by more than 100% (50 mM and 10mM), while sulfite was responsible for decreasing NO • production (61% at 50mM and 87% at 100mM) in embryos. In summary, it can be stated that zebrafish mitochondria are a useful tool for testing teratogenicity and food toxicity.

Key-words: Food additives. *Danio rerio*. Teratogenicity. Mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Categoria dos alimentos quanto ao nível de processamento 18

Figura 2 – Esquema de conversão de nitratos e nitritos no organismo 23

Figura 3 – Estrutura de uma mitocôndria 26

Figura 4 – Resumo do fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória..... 28

Figura 5 – Foto do *Danio rerio*..... 33

Figura 6 – Embriões do zebrafish com 24h após a fertilização 36

ARTIGO

Figura 1 – Efeitos teratogênicos do nitrato de sódio em embriões do zebrafish.. 51

Figura 2 – Efeitos teratogênicos do nitrito de sódio em embriões do zebrafish... 52

Figura 3 – Efeitos teratogênicos do sulfito de sódio em embriões do zebrafish.. 53

Figura 4 – Produção de ERO´s por DCF-FM-DA 58

Figura 5 – Produção de óxido nítrico por DAF-FM 59

GRÁFICO ABSTRATO.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema internacional de numeração de aditivos alimentares FAO/OMS 19

ARTIGO

Tabela 1 – Efeitos teratogênicos e frequência cardiaca no embrião do zebrafish .54

Tabela 2 – Consumo de oxigênio pela NADH desidrogenase (complexo I) dos embriões do zebrafish.....55

Tabela 3 – Consumo de oxigênio pela Succinato desidrogenase (comeplexo II) dos embriões do zebrafish.....56

Tabela 4 – Consumo de oxigênio nos complexos III e IV dos embriões do zebrafish 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosinatrifosfato
CTE	Cadeia Transportadora de Eletróns
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
DCF	Diaminofluoresceína- FM diacetato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAmt	Ácido Desoxirribonucléico mitocondrial
DNP	2,4 Dinitrofenol
ERN´s	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
$FADH_2$	Flavina-Adenina Dinucleotídeo
Fe^{2+}	Íon Ferroso
Fe^{3+}	Íon Férrico
F.U	Unidades de Fluorescência
Hb	Hemoblogina
H_2DCFH-DA	2´,7´-Diclorofluoresceína
HNO_2.	Ácido Nitroso
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
hpf	Horas Após a Fertilização
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INS	International Nubering System
JECFA.	The Joint Expert Committee on Food Additives
KCL	Cloreto de Potássio
KCN	Cianeto de Potássio
K_2HPO_4	Fosfato de Potássio
MeHb	Metahemoglobina
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
$NaNO_2$	Nitrito de Sódio
Na_2NO_3	Nitrato de Sódio
Na_2SO_3	Sulfito de Sódio
O_2^-	Ânion Radical Superóxido

$OH^{-}.$	Radical Hidroxila
$NO^{\bullet}$	Óxido Nítrico
Pi	Fosfato Inorgânico
Q	Ubiquinona
QH2	Ubiquinol
RNA	Ácido Ribonucléico
SDH	Succinato-Desidrogenase
SO	Sulfito Oxidase
SO_2	Dióxido de Enxofre
SOD	Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REFERENCIAL TEÓRICO 16

2.1 ADITIVOS ALIMENTARES..... 16

2.2 CONSERVANTES..... 21

2.2.1 Nitrato de sódio e Nitrito de sódio 22

2.2.2 Sulfito de sódio 24

2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL 25

2.3.1 Disfunção mitocondrial e produção de ERO´S E ERN´S 29

2.4 ZEBRAFISH COMO MODELO BIOLÓGICO 33

2.4.1 Desenvolvimento embrionário 35

3 ADITIVOS ALIMENTARES COM POTENCIAL TERATOGÊNICO E POSSÍVEL INDUTOR DE ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL...37

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 61

REFERÊNCIAS..... 62

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA..... 79

1 INTRODUÇÃO

O ritmo de trabalho acelerado, o tempo reduzido para refeições e a praticidade de comidas prontas têm levado as pessoas a consumirem mais produtos industrializados no dia a dia. Esse efeito vem contribuindo para o empobrecimento da dieta devido à substituição de alimentos *in natura* por alimentos processados. As tecnologias aplicadas pelas indústrias têm contribuido para utilização de substâncias químicas durante a fabricação dos alimentos, denominadas de aditivos alimentares. Os aditivos são empregados com intuito de melhorar o produto final, entretanto, a utilização dessas substâncias tem gerado questionamentos quanto aos riscos que elas trazem à saúde devido a sua presença nos alimentos (Sandhi *et al.*, 2005).

Recentemente, foram atribuídos vários efeitos adversos causados pelo consumo de aditivos, são exemplo: alterações histopatológicas como fibrose renal, atrofia glomerular e hipertrofia hepática em ratos *Wister* pela ação de corantes do tipo azo (Elbanna *et al.*, 2017); alterações citológicas como vacuolização hepática em fígados de ratos *Wister* pela ação do conservante sulfito de sódio (Mahmoud *et al.*, 2015); alterações no desenvolvimento do zebrafish causados pela exposição ao benzoato de sódio que induziu ao retardo na eclosão, alterações morfológicas como edema pericárdico, edema do saco vitelino, flexão da cauda e mudança no comportamento equivalendo a ansiedade (Gaur *et al.*, 2018); e também alterações genotóxicas como aberração cromossômica em células da medula óssea de ratos provocadas pelo benzoato de sódio (Ali *et al.*, 2018). Dentre os principais aditivos consumidos diariamente, os que contêm nitratos e nitritos em sua composição são terminantemente prejudiciais a saúde devido à ação tóxica causada pela formação endógena de compostos n-nitrosos que apresentam efeitos carcinógenos e teratogênicos (Lamariano, 2015), além de também ter sido relatado a indução de estresse oxidativo pela produção espécies reativas de oxigênio (ERO's) (Ansari e Mahmood, 2016).

O *Danio rerio* tem sido uma das espécies de animais mais utilizadas como organismos-teste em ensaios de toxicidade internacionalmente (Ton *et al.*, 2007). Os ensaios podem ser realizados em sua fase juvenil, adulta e também na fase embrionária (Chakraborty *et al*., 2016). Popularmente conhecido como zebrafish, este vertebrado tem adquirido bastante destaque em diversas pesquisas biomédicas, principalmente em estudos sobre estresse e seus efeitos no sistema nervoso central

e comportamental, assim como nas investigações sobre a formação ERO's, espécies reativas de nitrogênio (ERN's) e sobre a biossíntese do óxido nítrico (NO•) (Rosa *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2012; Nik *et al.*, 2014). Outra área bastante explorada são os estudos de teratogenicidade utilizando seus os embriões. Por possuir fecundação externa, alta taxa reprodutiva e transparência optica a identificação de deformidades embrionárias é imediata, visto que já se conhece a elucidação dos seus estágios de desenvolvimento embrionário (Kimmel *et al.*, 1995). Uma das vantagens em sua utilização é que seu genoma de referência apresenta mais de 70% de similaridade com o genoma de referência humano (Howe *et al.*, 2013). Por ser um animal de pequeno porte, o zebrafish possui fácil manutenção e baixo custo de aquisição quando comparados aos roedores, tornando-o um excelente modelo experimental para estudos toxicológicos e fisiológicos (Amaral e Johnston, 2011; Kinth *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2014; Steele *et al.*, 2014). Neste sentido, o presente trabalho possui como objetivo geral estimar a toxicidade dos aditivos Nitrato de sódio, Nitrito de sódio e Sulfito de sódio utilizando o zebrafish como modelo para estudos teratogênicos e de desordens mitocondriais. Buscando mensurar os efeitos teratogênicos à integridade embrionária do zebrafish induzidos por aditivos alimentares; analisar a ação dos aditivos no consumo de oxigênio mitocondrial nos embriões e identificar condições de estresse oxidativo induzido pelos diferentes aditivos estudados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ADITIVOS ALIMENTARES

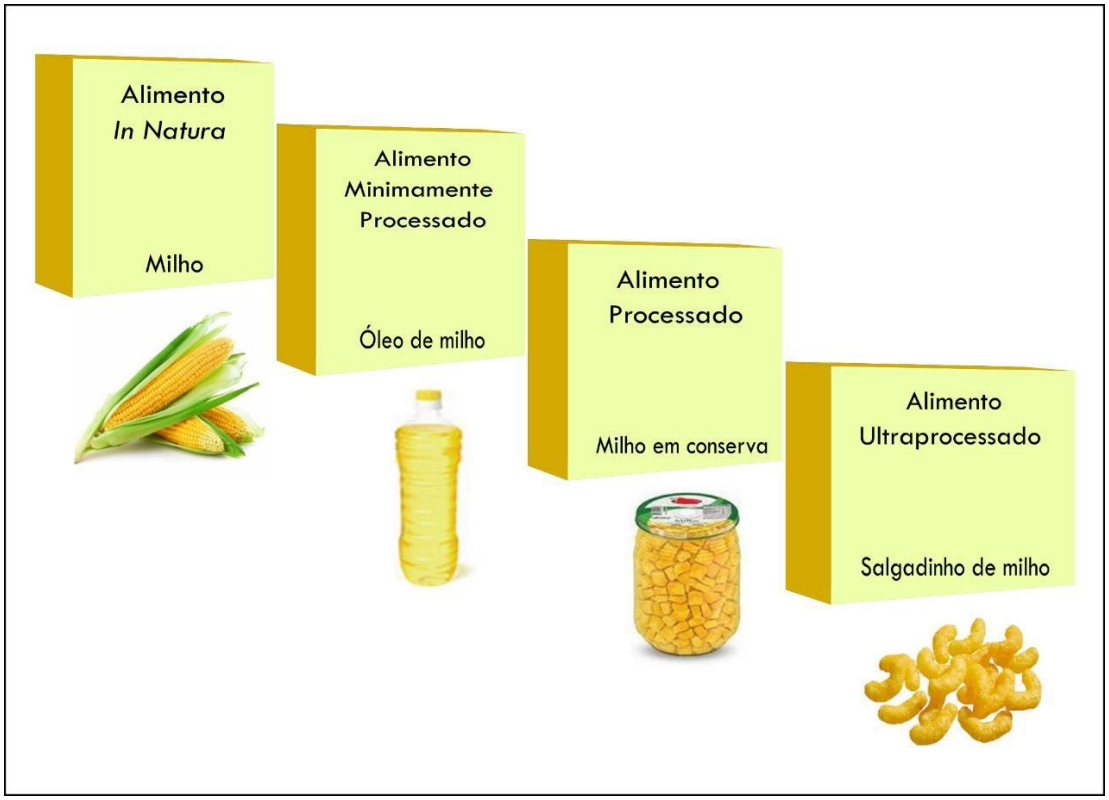
A alimentação é uma necessidade fisiológica que garante a obtenção de nutrientes cruciais para o desempenho das funções vitais, desenvolvimento e crescimento do organismo. Além de ser uma necessidade biológica, envolve aspectos econômicos, sociais, científicos, psicológicos e culturais imprescindíveis durante a evolução da sociedade (Proença, 2010). Para o alimento chegar até a mesa pronto para o consumo, há vários processos que se iniciam no campo passando por etapas de plantio, colheita e fabricação que vêm sendo cada vez mais cercados por tecnologias.

Os alimentos são classificados em quatro categorias, conforme seu grau de processamento. Este sistema de classificação já é adotado em diretrizes sobre dieta

e saúde em organizações internacionais (Pan American Health Organization; 2015) e nacionais dentro de suas diretrizes alimentares (Oliveira e Silva-Amparo, 2018). A primeira delas representa os alimentos *in natura* em que são necessariamente de origem vegetal ou animal, e são consumidos em seu estado natural sem que haja nenhum processo de transformação, são exemplos: as frutas, verduras, cereais, raízes, grãos, ovos, leite, vísceras e músculos de animais. A segunda categoria pode classificada como uma subcategoria da primeira e refere-se aos alimentos minimamente processados que são os produtos retirados a partir dos alimentos *in natura* através de técnicas como prensagem, moagem, trituração, pulverização e refino; são exemplos o óleo de soja, óleo de milho e açúcar mascavo. A terceira corresponde aos alimentos processados que são produtos fabricados a partir dos alimentos *in natura* em que se utilizam métodos de preservação como a salga, salmoura, cura e defumação, exemplos disso são os legumes em conserva, frutas em calda, sardinha e atum enlatados. A quarta e última categoria representam os ultraprocessados que são produtos industrializados que são feitos de substâncias extraídas de alimentos naturais (óleo, açúcar, proteínas) e durante sua fabricação passam por vários processos e envolve vários reagentes químicos (**Figura 1**), são eles refrigerante, biscoitos, confeitos, bombons recheados (Ministério da Saúde, 2014).

A mudança na alimentação da população ocorreu devido à substituição de alimentos naturais por alimentos processados (Polônio e Peres, 2009). Essas modificações iniciaram na década de 50 com as revoluções verdes, que trouxeram mudanças para o processo de produção dos alimentos e para a agricultura a partir da engenharia genética e tecnologia; garantindo aumento da disponibilidade de alimentos, baixando seu custo (Cavalli, 2001; Ribeiro *et al*., 2017). Junto a isso também veio o processo de globalização que permitiu a aproximação dos países no âmbito econômico, social, cultural e político (Banerjee e Linstead, 2001; Zadja, 2005; Spivac, 2012). A principal herança do processo de globalização é a chamada 'cultura global', ou seja, a transformação social voltada para a cultura de consumo gerou modificações no estilo de vida, principalmente na alimentação. Isso garantiu a inserção de costumes alimentares estrangeiros na rotina do dia-a-dia da população (Mondini e Monteiro, 1994; Oliveira, 1997; Abreu, 2001; Santos, 2005).

Figura 1 – Categoria dos alimentos quanto ao nível de processamento.



Fonte: Autora (2019).

Neste sentido, uma das desvantagens do modo de vida contemporâneo é escassez de tempo, principalmente no que diz respeito ao preparo da comida. Tal aspecto conduz a uma maior ingestão de alimentos industrializados devido a sua praticidade, economia de tempo, baixo custo e também pela grande quantidade das propagandas vinculadas nas mídias. Para facilitar o trabalho na cozinha, os alimentos são fabricados quase prontos para o consumo, e são comercializados como alimentos congelados, pré-cozidos, pré-temperado, temperados e enlatados (Bleil,1998). Com isso, os alimentos naturais que eram pra ser consumido em maior quantidade como os vegetais, frutas e cereais são substituídos por alimentos industrializados e bebidas artificiais (Tardido e Falcão, 2006). Grande parte dos comerciais sobre alimento anunciados na televisão se refere a produtos comercializados em fast food, biscoitos, cereais matinais, refrigerantes, sucos de caixa e sucos em pó (BRASIL, 2014).

Os alimentos ultraprocessados apresentam substâncias químicas em sua composição, que ajudam a aumentar o tempo de vida útil desde sua fabricação até o consumo, a fim de conservar e tornar os alimentos mais atrativos sensorialmente. Essas substâncias químicas adicionadas durante o processo de produção são denominadas de aditivos alimentares. Por definição, os aditivos alimentares são:

> [...] quaisquer ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 1997).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em conjunto com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) criou em 1963 o comitê da *Codex Alimentarius* com o objetivo de estabelecer normas internacionais no ramo alimentício, como códigos de conduta, orientações e outras recomendações relativas à produção de alimentos e a segurança alimentar. As normas do Codex abrangem as quatro categorias de alimentos e as substâncias e produtos que são usados para sua elaboração, propriedades nutricionais dos alimentos e diretrizes para o uso de aditivos alimentares (Anvisa, 2016). O Codex também elaborou um sistema numérico internacional para determinação de aditivos alimentares, o *International Numbering System* (INS). Segundo o Codex, obrigatoriamente todos os aditivos devem estar identificados pelo seu nome ou INS no rótulo dos produtos, a fim de diferencia-lós dos ingredientes utilizados durante o processo de fabricação (FAO).

Os aditivos são classificados de acordo com a função que desempenham no alimento (Aun *et al*., 2001). Alguns exemplos estão sumarizados na **Tabela 1.**

Tabela 1 - Sistema internacional de numeração de aditivos alimentares: FAO/OMS

Aditivo	Exemplo	INS	Definição
Agente de massa	Polidextrose	1200	Substância que proporciona o aumento de volume e/ou da massa dos alimentos, sem contribuir significamente para o valor energético do alimento
Antiespumante	Alginato de cálcio	404	Substância que previne ou reduz a formação de espuma
Antiumectante	Carbonato de cálcio	170i	Substância capaz de reduzir as características higroscópicas dos alimentos e diminuir a tendência de adesão, umas às outras, das partículas individuais
Antioxidante	Ácido ascórbico	300	Substância que retarda o aparecimento e alteração oxidativa no alimento
Corante	Tartrazina	102	Substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento
Conservante	Nitrato de sódio	250	Substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas
Edulcorante	Aspartame	951	Substância diferente dos açúcares que confere sabor doce ao alimento

Espessante	Goma arábica	414	Substância que aumenta a viscosidade de um alimento
Geleificante	Alginato de cálcio	404	Substância que confere textura através da formação de um gel
Estabilizante	Citrato dissódico	331(ii)	Substância que torna possível a manutenção de uma dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento
Aromatizante	Aromatizado artificialmente#		Substância ou mistura de substâncias com propriedades aromáticas e/ou sápidas, capazes de conferir ou reforçar o aroma e/ou sabor dos alimentos
Umectante	Glicerina	422	Substância que protege os alimentos da perda de umidade em ambiente de baixa umidade relativa ou que facilita a dissolução de uma substância seca em meio aquoso
Regulador de acidez	Bicarbonato de sódio	500(ii)	Substância que altera ou controla a acidez ou alcalinidade dos alimentos
Acidulante	Ácido cítrico	330	Substância que aumenta a acidez ou confere um sabor ácido aos alimentos
Emulsificante	Sorbitol	420	Substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento
Melhorador de farinha	Lactato de cálcio	327	Substância que, agregada à farinha, melhora sua qualidade tecnológica para os fins a que se destina
Flavorizantes	Glutamato monossódico	621	Substância que ressalta ou realça o sabor/aroma de um alimento
Fermento químico	Ácido glucônico	574	Substância ou mistura de substâncias que liberam gás e, desta maneira, aumentam o volume da massa
Glaceante	Ácido esteárico	570(i)	Substância que, quando aplicada na superfície externa de um alimento, confere uma aparência brilhante ou um revestimento protetor
Agente de firmeza	Gluconato de cálcio	578	Substância que torna ou mantém os tecidos de frutas ou hortaliças firmes ou crocantes, ou interage com agentes geleificantes para produzir ou fortalecer um gel
Sequestrante	Ácido cítrico	330	Substância que forma complexos químicos com íons metálicos
Espumante	Metiletilcelulose	465	Substância que possibilita a formação ou a manutenção de uma dispersão uniforme de uma fase gasosa em um alimento líquido ou sólido
Estabilizante de cor	Hidróxido de magnésio	528	Substância que estabiliza, mantém ou intensifica a cor de um alimento

#Não é obrigatório informar a substância utilizada*

Fonte: Aun *et al.*, (2011) Adaptado.

Os aditivos utilizados nos alimentos são submetidos a avaliações toxicológicas. Nelas são verificadas sua segurança, seu efeito acumulativo no organismo e também são estabelecidos limites máximos e mínimos da ingestão dos aditivos dentro do alimento. No Brasil, a regulamentação do uso de aditivos na alimentação é

determinada pela Portaria Nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 do Ministério da Saúde e fiscalizada pela ANVISA (ANVISA, 1997).

Mesmo que o emprego de aditivos alimentares proporcione vantagens tecnológicas para indústrias e para o consumidor, estudos sugerem que sua presença pode provocar efeitos maléficos à saúde como aumento da pressão arterial, aborto, alergias (Konrad *et al.*, 2012; Azevedo e Ribas, 2016) e neoplasias como câncer de ovário, intestino e colo-retal (Garófolo, 2004;Resende *et al*., 2006; Aschebrook-kilfoy *et al*., 2012).

Como todos os produtos químicos são potencialmente tóxicos, são estabelecidos valores para a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que determina a quantidade de substância química que cada pessoa pode consumir diariamente sem que cause nenhum possível dano à saúde. A IDA de cada aditivo alimentar é estabelecida a partir de avaliações da substância pelo The Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) da FAO/OMS (Martyn *et al*., 2013).

2.2 CONSERVANTES

Para manter o alimento conservado por um longo período de tempo as indústrias empregam substâncias químicas ou naturais que inibem reações enzimáticas, de oxidação, escurecimento, adiam ou reduzem o crescimento de microorganismos e inibem reações de deterioração do sabor, cor, textura e aparência no alimento, que se ocorressem naturalmente diminuiriam a qualidade nutricional dos alimentos e o seu valor (Angiolillo *et al*., 2014). O uso determinante dos conservantes pelas indústrias representa uma estratégia para aumentar a durabilidade dos produtos e facilitar o transporte e seu comércio no mercado.

Na categoria dos conservantes enquandram-se o Benzoato de sódio por possuir propriedades antifúngicas, também realça o sabor dos alimentos e pode ser encontrado em refrigerantes, margarinas e manteigas. O Sorbato de potássio possui propriedades antifúngicas além de propriedades antibacterianas e pode ser encontrado em produtos de panificação e vinhos (Gören *et al*., 2015). Os derivados do fenol, o BHA (butil-hidroxianisol) e BHT (butil-hidroxitolueno) possuem abcapicidade de inibir o crescimento de microorganismos e estão presentes em cereais e alimentos ricos em ácidos graxos (Aun *et al.,* 2001). Outros exemplos de conservantes são o nitrito, nitrato e sulfito de sódio.

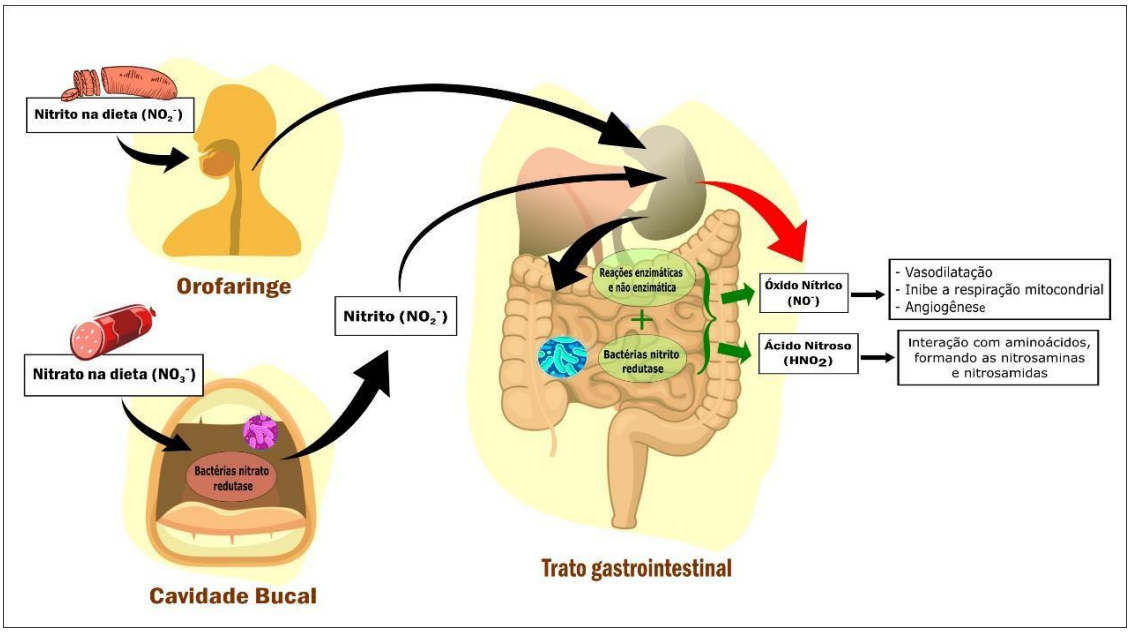
2.2.1 Nitrato de Sódio (*Na_2NO_3*) e Nitrito de Sódio (*$NaNO_2$*)

O Na_2NO_3 e o $NaNO_2$ são sais de cura utilizados como aditivos alimentares (Sindelar *et al*., 2012) principalmente pelas indústrias de pescados e de carne (Norat *et al*., 2005) e seus produtos derivados como patês, presunto, apresuntado, salames, salsichas e mortadela (Hord *et al.,* 2009). Também podem estar presentes em outros alimentos como: chocolate, sopas, cereais e óleos vegetais (Dutra *et al.*, 2007). Esses sais são classificados como conservantes de alimentos pois são potentes agentes antimicrobianos impedindo ou retardando a ação de microorganismos (Gassara *et al.,* 2016), principalmente o *Clostridium botulinum* (Herrmann *et al*., 2015; Bedale *et al*., 2016).

A conservação de um produto por adição de sal pode ser chamada de cura, além de conservar o produto o sal também melhora algumas propriedades sensoriais como na intensificação da pigmentação avermelhada garantindo a sensação de que o produto está fresco, no sabor salgado característico e aroma típico de produtos curados (Warris, 2003; Ichimura *et al*., 2017). Os compostos nitratos e nitritos são fixadores de cor, depois de adicionados as carnes eles sofrem reação de redução gerando como produto o $NO^{\bullet}$ que interage com metamioglobina originando a nitrosometamioglobina que pode reduzir-se a nitrosomioglobina formando o pigmento rosado típico dos produtos curados (Govari e Pexara, 2015).

Os compostos nitrosos não estão presentes nos alimentos apenas como aditivos alimentares, eles também podem ser ingeridos na dieta através dos legumes e vegetais (Lourero e Santos, 2017). No organismo, o nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-) por bactérias comensais presentes na cavidade oral por reação catalizada pela enzima nitrato redutase (Lundberg *et al.,* 2004; Doel *et al.*, 2005; Vanhatalo *et al*., 2018). No estômago, parte do NO_2^- é espontaneamente convertido em $NO^{\bullet}$, sem nenhum auxílio enzimático, neste caso a concentração elevada de hidrogênio (H^+) do suco gástrico favorece a formação de ácido nitroso (HNO_2) e subsequentemente $NO^{\bullet}$ (Bryan e Loscalzo, 2017). Ao serem absorvidos no intestino, vários sistemas enzimáticos e não enzimáticos dos tecidos ou por ação de bactérias nitrito redutases presentes no intestino (Sobko *et al*., 2005) ocorre a metabolização do NO_3^- e NO_2^- remanescentes em compostos N-nitrosos como o $NO^{\bullet}$ e o HNO_2 (Engemann *et al.*, 2013), conforme observado na **Figura 2**.

Figura 2: Esquema de conversão de nitratos e nitritos no organismo.



Fonte: Autora (2019).

O $NO^{\bullet}$ assim que formado reage rapidamente com várias biomoléculas e possui efeitos importantes no organismo, atuando como mediador da inflamação, participa da homeostase mitocondrial através da inibação da respiração mitocondrial pela interação direta com o complexo I, na ligação ao citocromo c oxidase (Lundberg *et al*., 2018), além do seu efeito na dilatação dos vasos sanguíneos, diminuindo a pressão arterial (Lundberg *et al.*, 2011; Kapil *et al*., 2014; Carlstrom *et al*., 2018).

Mesmo antes de se converterem, os nitritos podem interagir com a hemoglobina (Hb) e formar a metahemoglobina (MeHb). Isso acontece porque o nitrito chega até a corrente sanguínea e oxida o ferro presente na hemoglobina do seu estado ferroso (Fe^{2+}) para o férrico (Fe^{3+}), dando origem a MeHb (Cockburn *et al.*, 2010). Assim que formada a MeHb se liga de forma irreversível ao oxigênio e prejudica a liberação do mesmo aos tecidos (Basulto *et al*., 2014). Em gestantes, uma dieta rica em carnes curadas pode gerar doses altas de NO_2^-, sendo responsável por causar anoxia fetal através da MeHb no sangue e alterações em células embrionárias (Bahadoran *et al.*, 2018).

Os valores permitidos para a IDA em alimentos é 0,06 mg/kg/dia de nitrito (como íon) e de 3,7 mg/kg/dia para nitrato (BRASIL, 2014). Entretanto, independente da quantidade ingerida de nitratos e nitritos na dieta, sempre irá formar composto N-nitrosos. Esses agentes nitrosantes reagem com aminas, amidas secundárias oriundas da dieta, formando as nitrosaminas e nitrosamidas, que já tem seu efeito

bastante conhecido por serem potentes agentes carcinogênicos (Fairweather *et al*., 1981; WHO, 2000; Demeyer *et al.,* 2016; De Mey *et al*., 2017; Shpaizer *et al*., 2018) causando câncer gástrico, esofágico, nasofaríngeo, na bexiga e no intestino (cólon e reto) (Jakszyn e Gonzalez, 2006; INCA; Hebels *et al.,* 2010; Song *et al*., 2015; Kim *et al.,* 2018). Além disso, as nitrosaminas apresentam ação teratogênica e mutagênica (Dutra *et al*., 2007) e causam danos ao ácido desoxiribonucléioco (DNA) (Barnes *et al.*, 2018). O consumo exagerado de carne curada durante a gravidez provoca excesso da produção de nitrosamidas, estando associada ao tumor cerebral em crianças (Preston-Martin *et al*., 1996; Pogoda *et al*., 2011).

2.2.2 Sulfito de Sódio (*Na_2SO_3*)

O Na_2SO_3 é um sal que libera após reações químicas o composto dióxido de enxofre (SO_2), e pode ser obtido a partir da reação do dióxido de enxofre com o carbonato de sódio ou hidróxido de sódio. Ele é conhecido por possuir funções de inibir a deterioração do alimento provocada por bactérias, fungos e leveduras além de impedir o escurecimento de alimentos e bebidas, sendo dessa forma aplicado nas indústrias alimentícias como conservante alimentar (Aun *et al*., 2001; Machado e Toledo, 2006). O sulfito de sódio pode ser encontrado em produtos como geléias, frutas desidratadas, refrigerantes, vinhos e sucos de garrafas, produtos enlatados, temperos e molhos, condimentos e vinagres (Mani-López *et al*., 2016).

A IDA do Na_2SO_3 no Brasil é de 0,7 mg/Kg por dia (WHO, 2000; Favero *et al*., 2011). Entretanto, tal informação ainda é desconhecida pelas pessoas, visto que um estudo realizado em 2004 no Brasil identificou que a IDA do sulfito de sódio mostrou-se exceder o limite atinguindo o valor de 3,8 mg por dia (Popolim, 2004), também foi comprovado aumento do IDA em outros países europeus através do consumo de frutas desidratadas e bebidas alcoólicas (Leclercq *et al*., 2000; Basanranlar *et al*., 2018). Isso adquire elevada importância uma vez que o sulfito de sódio possui efeitos tóxicos no sistema nervoso (Ozturk *et al*., 2011; Kencebay *et al*., 2013; Noorafshan *et al*., 2013; Grings *et al*., 2014), principalmente no cérebro onde sua ação promove acúmulo de líquidos dentro da mitocôndria, redução do potencial de membrana mitocondrial e propicia maior capacidade de retenção de Ca^{2+}, promovendo assim dano neural (Grings *et al*., 2014).

Em humanos, o sulfito é oxidado no fígado e no pulmão em sulfato pela enzima mitocondrial sulfito oxidase (SO) (Yoshida *et al*., 2015). A SO é uma hemoproteína localizada no espaço intermembranar mitocondrial que possui a função de oxidar moléculas de sulfito oriundas da alimentação ou dos aminoácidos como a cisteína e metionina (Niknahad e O'Brien, 2008) que contém o radical enxofre em sua composição. Da mesma forma, a SO também oxida o dióxido de enxofre inalado pela queima de combustíveis de veículos e indústrias juntamente com óxidos de carbono e de nitrogênio (Schlesinger, 2018). A SO é dependente do molibdênio, que age como um cofator para degradação do sulfito. Na reação, dois elétrons do sulfito reduzem o molibdênio, e produz como resultado final a deposição de elétrons no cofator heme SO que é transferido para o citocromo c, na cadeia transportadora de elétrons (Johnson-Winters *et al.,* 2010; Klein e Schwarz, 2012).

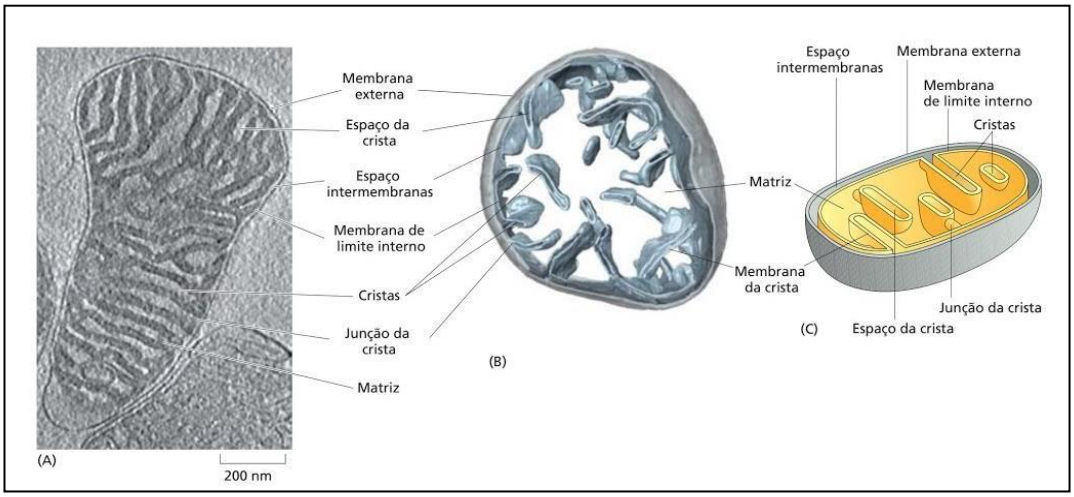
A ingestão do sulfito pode acarretar em efeitos adversos graves para a saúde como reações alérgicas, asma, doenças crônicas das vias aéreas, dermatite, choque anafilático e bronconstrição (Vally *et al*., 2009; Komarnisky *et al*., 2003). Pesquisas anteriores mostraram que estes compostos induzem a disfunção mitocondrial, geram radicais enxofre e superóxido na presença de oxigênio que induz ao dano no DNA (Ozturk *et al.*, 2011) e lesão na membrana plasmática através da peroxidação lipídica (Chiarani *et al.*, 2008).

2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

A mitocôndria é uma organela intracelular com comprimento que pode variar de 6 a 10 μm dependendo da função e da sua localização nos tecidos. Estruturalmente esta organela é composta por duas membranas, uma interna altamente especializada e outra externa separadas pelo espaço intermembranar (McBride *et al*., 2006). Semelhante a composição do citosol, o espaço intermembranas contém proteínas importantes, que se forem liberadas ativam um das vias da apoptose celular, como por exemplo o citocromo *c*. Após a membrana interna, está a matriz que contem o DNA mitocondrial, ribossomos, ácido ribonucléico (RNA), enzimas responsáveis pela síntese de proteínas e enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via de β-oxidação de ácidos graxos e as vias de oxidação de aminoácidos (Alberts *et al*., 2004).

A membrana externa envolve toda a organela e é constituída por uma bicamada lipídica permeável a prótons, íons e pequenas moléculas com até 5.000 D. Dentre ou associadas a elas estão situadas proteína e canal de íons dependentes de voltagem. A membrana interna é impermeável a íons e a maioria de pequenas moléculas carregadas. Ela possui invaginações em sua estrutura dando origem as cristas mitocondriais, que fornecem a organela uma grande área de superfície, como observado na **Figura 3** . A membrana interna contém vários complexos enzimáticos e sistemas de transporte transmembranar. Esses complexos formam a cadeia de transporte de elétrons (CTE), composta por quatro complexos enzimáticos, em geral (Mårtensson *et al.*, 2017.

Figura 3. Estrutura de uma mitocôndria. (A) Fatia tomográfica de um mapa tridmensionalde uma mitocôdria cardíaca de camundongo determinada por tomografia por microscopia eletrônica. A membrana externa cincunda a membrana de limite interno. A membrana interna é altamente enovelada em cristas lamelares e tubulares, que se entrecruzam na matriz. A matriz densa, que contém a marioria das proteínas mitocôndrias, aparece escura na microscopia eletrônica, enquanto o espaço intermembranas e o espaço da crista aparece claro devido ao baixo conteúdo de proteínas. A membrana de limite interno acompanha a membrana externa a uma distância de cerca de 20 nm. A membrana interna curva-se bruscamente nas junções das cristas, onde as cristas se unem à membrana de limite interno. (B) Tomografia de porção de uma mitocôndria de levedura reconstruída por superfície, mostrando como as cristas achatadas se projetam para dentro da matriz a partir da membrana interna. (C) Representação esquemática de uma mitocôndria mostrando a membrana externa (cinza) e a membrana interna (amarela).



Fonte: Alberts, 2017.

As mitocôndrias são organelas essenciais e desempenham diversas funções no organismo. Elas são responsáveis pela mediação de morte celular pelas vias da apoptose e necrose (Yee *et al*., 2014), participam da homeostase e sinalização de cálcio (Ca^{++}) (Sarasija e Norman, 2015; Oxenoid et al., 2016), regulação da termogênese, são de extrema importância para contribuição genética humana através

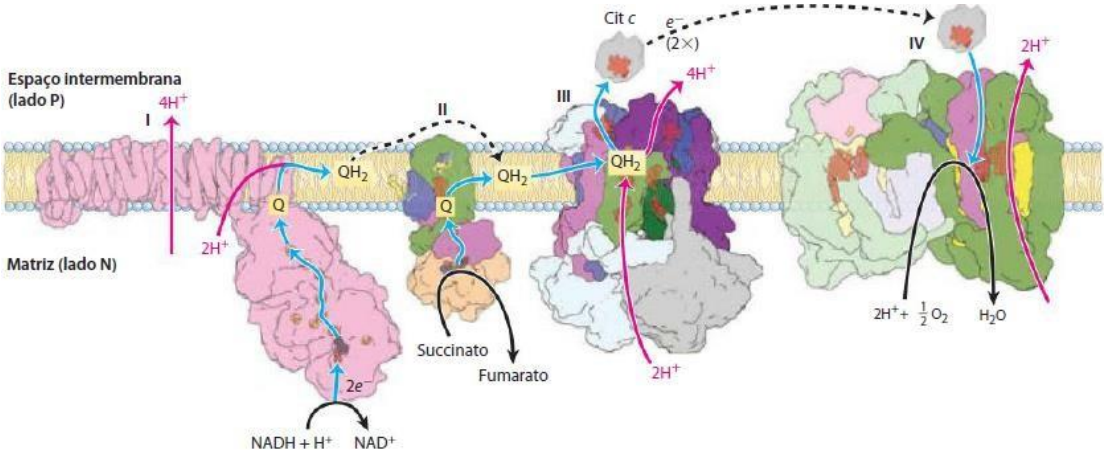
da herança materna do DNAmt (DNA mitocondrial), síntese de algumas proteínas mitocondriais, geração de espécies reativas de oxidação (ROS) (Hekimi *et al*., 2016). A mais conhecida de suas funções é a respiração celular através da sintese de adenosina trifosfato (ATP) onde é fornecida a energia para a célula (van der Bliek *et al*., 2017).

A respiração celular ocorre em três etapas: a glicólise, o Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Cítrico e a Cadeia Respiratória. O maior percentual de ATP na célula é produzido pela mitocôndria, porem também são produzidos em menor percentual pela glicólise anaeróbia. A síntese de ATP na mitocôndria é dependente de oxigênio (O_2) e substratos derivados das reações da glicólise e da oxição de aminoácidos e ácidos graxos pelo ciclo de Krebs (Berdanier, 2005).

A glicólise ocorre no citoplams e se inicia com a conversão da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico liberando energia na forma de ATP e energia livre que é captado pela nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD+) reduzindo-se a NADH. Na matriz mitocondrial o ácido pirúvico reage com a coenzima A, dando origem ao gás carbônico (CO_2) e duas moléculas de acetilcoenzima A (acetil-CoA). A acetil-CoA é degradada através de várias reações químicas que geram como produtos íons que são usados reduzir o FAD (dinucleótido de flavina) em flavina-adenina dinucleótido ($FADH_2$) e gerar moléculas de NADH (Alberts *et al*., 2004)

A fosforilação oxidativa se inicia com a transferência de elétrons e íons H^+ do NADH e $FADH_2$ e dos elétrons provenientes da glicólise para as proteínas citocromo c e a ubiquinona (Q), responsáveis por carregar elétrons entre os complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) através da bicamada liídica (Cooper, 2002). Os elétrons são rapidamente passados ao longo da CTE, e ao final da cadeia os elétrons ligam-se ao O_2 formando a molécula de água (H2O). Através do fluxo de elétrons pelos complexos, prótons H^+ são bombeados da matriz para o espaço intermembranar, o acúmulo de prótons no espaço gera elevado gradiente H^+ criando uma diferença de potencial eletroquímico em relação a matriz. Assim, os H^+ presentes no espaço intermembranar retornam para a matriz mitocondrial através da enzima ATP sintase, conforme observado na **Figura 4**. Durante o transporte, a energia liberada é utilizada para síntese de ATP, ou seja, a energia química é convertida em energia biológica necessária para a execução das ações vitais no organismo (Rotig, 2010; Pereira, 2015).

Figura 4: Resumo do fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória. Os elétrons chegam à Q por meio dos complexos I e II. A Q reduzida (QH2) serve como carregador móvel de elétrons e prótons. Ela passa elétrons ao complexo III, que os passa a outro elemento móvel de ligação, o citocromo *c*. O complexo IV então transfere elétrons do citocromo *c* reduzido ao O2. O fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV é acompanhado pelo fluxo de prótons da matriz ao espaço intermembrana. Os elétrons da β -oxidação de ácidos graxos também podem entrar na cadeia respiratória por meio de Q.



Fonte: Nelson, 2014.

O complexo I também chamado de NADH ubiquinina-oxiredutase ou NADH-desidrogenase é responsável pela transferência de elétrons da coenzima NADH para a Q. Como resultado, também ocorre o bombeamento de 4 prótons da matriz até o espaço intermembranar (DiMauro e Schon, 2003), sendo o complexo I um dos principais responsáveis pela geração de ERO´s. Diversas substâncias químicas podem interferir na transferência de elétrons dentro dos complexos, um bom exemplo de inibidor do Complexo I é a Rotenona, que quando adicionada impede a transferência de elétrons para a Q (Benedetti *et al*., 2016).

O complexo II ou Succinato-desidrogenase (SDH) é uma proteína que está ancorada à membrana mitocondrial interna, ou seja, não é transmembranar e não transfere prótons para o espaço intermembranar. É constituída por quatro subunidades: A, B, C e D, e é uma das enzimas que compõem o ciclo de Krebs, responsável pela oxidação do succinato à fumarato. Através da ligação do substrato ao sítio FAD, dois elétrons são gerados e transferidos do substrato ao FAD que ficará reduzido a $FADH_2$, logo após os elétrons são transferidos diretamente para a Q, reduzindo a ubiquinol (QH_2). Em seguida QH_2 se acopla e transfere os elétrons para o citocromo c no complexo III. Durante a oxidação do succinato, os elétrons podem escapar para fora da enzima em direção ao O_2 na porção D da proteína, com isso

ocorre a produção de ERO´s, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) (Quinlan *et al*., 2012).

O próximo complexo respiratório é o III ou também chamado de ubiquinona citocromo *c*-oxiredutase, esse complexo é responsável pela transferência de elétrons da QH_2 para o citocromo c, que por sua vez move-se para o complexo IV. No complexo III parte dos elétrons recirculam dentro dele e podem escapar para o espaço intermembranar antes de serem transferidos para o citocromo c, sendo ele assim como o complexo I responsavel por grande parte da produção de ERO´s (Bell *et al*., 2007). Uma substância química conhecida pelo nome de Antimicina A, um antibiótico produzido pelo fungo *Streptomyces griseus*, bloqueia o transporte de elétrons no Complexo lll entre a subunidade b no complexo e a coenzima Q (Ferreira *et al*., 2008). O complexo IV é o último complexo eo responsável pela conversão de O_2 em H_2O. O Complexo IV pode ser bloqueado pelo Cianeto de Potássio (KCN) que impede a oxidação do citocromo C e a redução do O_2 (Donnelly *et al*., 2014)

Para a produção de ATP, a ATP-sintase utiliza a energia acumulada através do gradiente de prótons (ΔpH) da CTE junto ao potencial de membrana mitocondrial (ΨΨm) gerado pelas bombas de prótons para realizar a síntese de ATP a partir ADP e do fosfato inorgânico (Pi). O ΨΨm fornece a força motriz para direcionar os prótons contra seu gradiente de concentração através da membrana mitocondrial interna, resultando em um acúmulo de H^+ fora da membrana, que então retorna para a mitocôndria através da porção F^1/ F^0 da ATP-sintase, gerando ATP (Zorova *et al*., 2018). A força total da condução de prótons para a mitocôndria (Ap), é uma combinação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) e o gradiente de pH mitocondrial (ΔpH m) de acordo como o modelo quimiosmótico proposto por Mitchell (Nelson e Michael, 2014).

2.3.1 Disfunção mitocondrial e produção de ERO´s e ERN´s

As mitocôndrias são extremamente importante para o desempenho de funções vitais no organismo, como na produção de energia e ativações de vias críticas nas células que podem levar a lesão ou a morte celular. Dentre os principais fatores que podem interferir no seu funcionamento, estão o: aumento do Ca^{2+} citosólico, geração excessiva de ERO´s, escassez de oxigênio, substâncias químicas ou mutações em

genes mitocondriais. Nos últimos anos, vários distúrbios têm sido associados a anormalidades mitocondriais, como por exemplo, as doenças neurodegenerativas progressivas como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer (Schapira, 2012), doença Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (Dhillon e Fenech, 2014). Também são reconhecidas outras patologias como a dislipidemia, desordens nutricionais e doenças do sistema cardiovascular (Hiramitsu *et al.,* 2014; Pinho et al., 2016; Walters *et al*., 2016). Notadamente, todas estas fisiopatologias são positivamente correlacionadas com um aumento na geração de ERO´s (Azevedo, 2018).

Os radicais livres são produzidos fisiologicamente em pequenas quantidades pelo corpo por meio do metabolismo oxidativo, bioenergética mitocondrial através dos complexos respiratórios que geram ERO´s, ativação de leucócitos pelo sistema imunológico no processo inflamatório e pelo NO•. Entretanto, são degradados e removidos pelo poderoso sistema de defesa formado pelas enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase, Glutationa peroxidase, Glutationa S. transferase. Os radicais livres atuam como mediadores em diversas reações, e a sua produção fisiológica possibilita a formação de ATP pela CTE, fertilização do óvulo durante a fecundação, ativação de genes e a participação de mecanismos de defesa durante processos inflamatórios (Ferreira e Matsubara, 1997; Shami e Moreira, 2004). Todavia, quando presentes em excesso no organismo induzem a danos oxidativos, devido a sua natureza química possuir um único elétron desemparelhado em sua última camada; e para ganhar estabilidade tendem a doar o elétron a moléculas adjacentes como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucléicos; causando assim dano oxidativo em células e tecidos. A condição patológica quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e a sua remoção pelo sistema antioxidante é chamada de estresse oxidativo (Zorov *et al.*, 2014).

Durante a produção de radicais livres nas células, o O_2 é reduzido nas mitocôndrias para gerar duas moléculas de H_2O, e durante esse processo, são geradas espécies intermediárias ou também conhecidas como ERO´s. São elas: O_2•, H_2O_2 e íons hidroxila (OH•) (Zorov *et al.*, 2014).

As ERO´s podem reagir com os lipídeos presentes nas membranas celulares causando a peroxidação lipídica (LPO). Os radicais livres iniciam o processo de LPO pela formação do radical OH• a partir do H_2O_2 através da reação de Fenton (dependente de Fe^{2+}) (Jaeschke *et al.*, 2018). O radical OH• formado retira um elétron de ácidos graxos insaturados presente na membrana, gerando um radical lipídico

instável, que reagem com o oxigênio para gerar radicais peróxidos lipídicos. Esses radicais peróxidos podem reagir com outro ácido graxo para formar hidroperóxidos que iniciam a reação em cadeia, formando mais radical lipídico e hidroperóxidos, propagando a lesão (Jaeschke *et al.*, 2018). A LPO em membranas pode resultar em perda na fluidez, causar alteração no potencial de membrana e gradientes iônicos levando à necrose celular. A LPO também possui envolvimento em várias condições patológicas, incluindo aterosclerose e artrite (Ramana *et al*., 2016).

O dano ao DNA das células é uma das principais consequências da superprodução de ERO´s, sendo responsável por causar instabilidades genômicas e mutações (Cadet e Davies, 2017). Nas proteínas, causam modificações em sua estrutura e induzem apoptose celular ou necrose (Finkel e Holbrook, 2000; Martindale e Holbrook, 2002). Também podem atuar em vias de sinalizações que levam à progressão do câncer, através da ativação das proteínas quinases, fosfatidilinositol-3-Quinase, fosfolipase C-g1, proteína Quinase C, fator nuclear κB e Jak / Stat (Leonard *et al*., 2004).

Um dos produtos gerados durante a condição de estresse oxidativo o ânio O_2• pode reagir com NO• quando estão em excesso no organismo, gerando as Especies Reativas de Nitrogênio (ERN´s). O radical NO• é produzido no organismo através da enzima óxido nítrico sintase, a partir de L-arginina na presença de O_2 e NADPH. Outra fonte de geração no organismo é através da alimentação, em que o nitrito presente na dieta é convertido espontaneamente no estômago, pela ação do pH ácido, em óxido nítrico. Também podem ser produzidos através da metabolização do nitrito no sangue e nos tecidos que geram como produtos o NO• e o HNO_2 (Engemann *et al*., 2013).

O NO• é um importante sinalizador celular, e atua em diversos sistemas no organismo. Sua principal função é como vasodilatador, atuando no relaxamento no endotélio e na regulação da pressão sanguínea basal. Também promove a agregação plaquetária durante a coagulação sanguínea, é responsável pela angiogênese fisiológica ou patológica. No trato gastrointestinal, medeia o relaxamento da musculatura dos esfíncteres esofagiano, do estômago, do duodeno, intestino delgado e esfíncter anal. E ainda, é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano e dos seus vasos sanguíneos aferentes, necessários para a ocorrência da ereção (Adams, 1996). Também assume um papel importante na respiração, através da inibição da enzima citocromo c oxidase (Lundberg *et al*., 2018).

Em concentrações fisiológicas o NO• não é prejudicial ao organismo, mas altas concentrações de NO•˙ e seus derivados (peroxinitrito, dióxido de nitrogênio e nitrotirosinas) causam inibição irreversível da CTE, desacoplamento mitocondrial, transição de permeabilidade e morte celular (Brown, 2001).

O desacoplamento mitocondrial consiste na dissipação do gradiente de prótons formado na membrana intermembrana, fazendo com que os prótons retornem a matriz. Como consequência disso ocorre menor produção de ATP, visto que quantidade de prótons que retornam pela ATP sintase está dissipada. Uma alternativa encontrada pela CTE para compensar a perda e retomar o gradiente normal é a aceleração da sua atividade, resultando no aumento na oxidação de substratos pelo ciclo de Krebs e maior consumo de O_2. (Clapham *et al.*, 2000; Erlanson-Albertsson, 2003). O desacoplamento pode ser ocasionado por substâncias químicas como Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), 2,4 dinitrofenol (DNP) e pelo aumento da transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM é caracterizada pela perda do potencial de membrana da mitocôndria gerando assim uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial externa, fazendo com que a mesma se torne permeável a prótons, íons e até mesmo a pequenas proteínas devido à formação de poros. Como resultado ocorre interferência na fosforilação oxidativa e redução da geração de ATP, além disso o aumento da TPM favorece ao extravasamento de proteínas pró-apoptóticas presentes no espaço intermenbranas, como citocromo C e caspases que culminam na ativação da apoptose e necrose celular (Kroemer *et al*., 2009; Fuchs e Steller, 2011; Rongvaux *et al*., 2014).

Um excelente modelo biológico para estudar as disfunções mitocondriais e testar tratamentos direcionados a doenças mitocondriais é o zebrafish, pois suas mitocôndrias e a dos mamíferos exibem elevada homologia genética e funcional (Pinho *et al.,* 2013). A ordem dos genes e dos códons nos nucleotídios é conservada entre todo o genoma mitocondrial dos vertebrados e no zebrafish (Steele *et al.*, 2014). Este vertebrado possui maior vantagem em pesquisas sobre a cultura de células, pois é possível monitorar a atividade mitocondrial com marcadores específicos em todo corpo do animal, sendo capaz a realização de estudos tanto in vitro como in vivo. Nos estudos in vivo, ocorre comunicação e interação entre os diferentes sistemas e órgãos, e essa interação é essencial para a compreensão de toxicidade, sobretudo para toxicidade mitocondrial (Wallace, 2010).

2.4 ZEBRAFISH COMO MODELO BIOLÓGICO

O uso de animais em pesquisas iniciou-se por volta do século V a.C, porém, seu emprego só foi crescente a partir do século XIX (Raimyndo e Goldim, 2002). Por volta de 1865 a partir de estudos realizados na área da fisiologia foram estabelecidos princípios do uso de animais como modelo de estudo para a fisiologia humana (Bernad, 1865). Desde então, os animais são largamente utilizados em pesquisas e muitos progressos na área da saúde foram obtidos a partir de seu advento; sendo exemplo disso os 94 dos 106 prêmios Nobel concedidos para as áreas de fisiologia e medicina foram para pesquisas em que se utilizaram animais como modelo experimental (Pasquali, 2018). Os roedores são os animais usados com mais frequência nas pesquisas, todavia, recentemente um novo vertebrado vem sendo muito utilizado no âmbito científico: o zebrafish.

Conhecido popularmente como paulistinha, de espécie *Danio rerio* pertencente à família Cyprinidae, o zebrafish é um pequeno peixe teleósteo (de 3 – 5 cm) tropical de água doce original do sul da Ásia que vem sendo utilizado como novo modelo animal de experimentação para o estudo de numerosas doenças humanas. Este vertebrado possui dismorfismo sexual, os machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas. Quando adultos, possuem uma única nadadeira dorsal e um par de nadadeiras pélvicas, conferindo rapidez durante o nado. A característica mais marcante na espécie é a presença de listras pretas e brancas/prateadas ao longo do corpo e nas nadadeiras, que por causa delas foram apelidados de zebrafish ou “peixe zebra” (Engeszer *et al*., 2007; Lawrence, 2007), **Figura 5**.

Figura 5: Foto do *Danio rerio.*

Fonte: Ferreira, A. C. M.

O marco inicial da introdução do zebrafish como modelo animal em pesquisas ocorreu em 1981, com base em um estudo em genética utilizando este animal publicado na Nature (Streisinger *et al.,*1981). A partir disto, este modelo está se tornando popular nas pesquisas biomédicas, tanto os animais adultos como os seus embriões (Chakraborty *et al*., 2016). Além de ter fácil e baixo custo de manutenção, este peixe vem adquirido notabilidade em pesquisas por possuir todo seu DNA sequenciado e apresentar mais de 70% de similaridade com o genoma de referência humano (Howe *et al*., 2013). Assim, o zebrafish possui homologia genômica e fisiológica com os seres humanos, os seus sistemas cardiovascular, nervoso e digestivo são semelhantes aos humanos, bem como suas vias de sinalização (Beliaeva *et al*., 2010).

Outra área bastante estudada utilizando o zebrafish é sobre o estresse e seus efeitos no sistema nervoso central e no comportamento. Em condições de estresse, no peixe assim como no homem o hormônio liberado é o cortisol. Nos roedores, o hormônio produzido sob essas condições é a corticosterona, que é liberado em concentrações muito baixas no homem. Esse é um dos casos em que zebrafish oferece maior vantagem sobre os roedores da sua utilização em pesquisas (Zorzetto e Guimarães, 2013).

Por ser um peixe ovíparo, sua fertilização e desenvolvimento são externos e seus ovos são transparentes, além de dispor da elucidação completa dos estágios de desenvolvimento embrionário (Kimmel *et al*., 1995). Devido à sua clareza óptica e a capacidade reprodutível, o zebrafish tornou-se um dos modelos de doenças genéticas humanas (Sarasamma *et al*., 2017).

Dentre as principais vantagens para utilização deste modelo animal, uma delas é em relação ao tempo de vida. O zebrafish possui o ciclo de vida curto quando comparados com os roedores, ou seja, atingem a idade reprodutiva em torno de 60 á 90 dias e vivem cerca de três anos. Com isso, este animal torna-se um meio barato para testar os efeitos de drogas ou produtos químicos sem a nessecidade de utilização de vários animais para execução dos testes (Chan e Williamson, 2018). Também é possível obter resultados rápidos sobre o efeito de drogas no organismo, já que são administradas poucas quantidades e as respostas são imediatas se comparadas com outros modelos animais de maior porte.Todas essas vantagens o tornaram um importante modelo vertebrado em inúmeras áreas de investigação tais como

comportamental, genética, toxicologia e fisiologia (Amaral e Johnston, 2011; Kinth *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2014; Steele *et al.*, 2014).

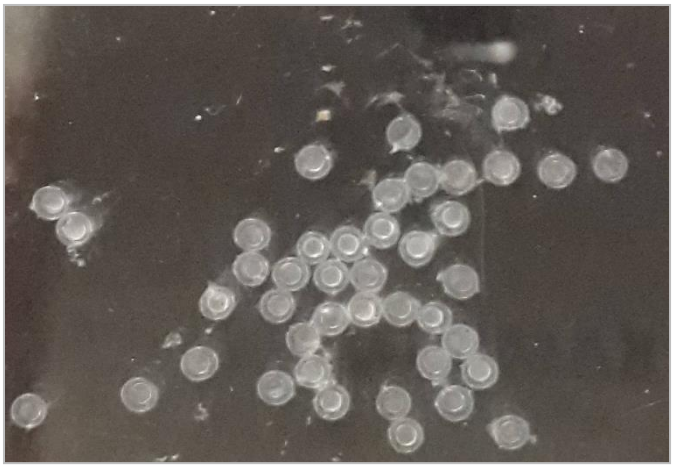
2.4.1 Desenvolvimento Embrionário

O animal adulto e o seu embrião são muito usados para determinação de toxicidade aguda de vários compostos incluindo metais pesados, pesticidas, contaminantes ambientais e para avaliação de qualidade da água (Busquet *et al*., 2014; Kyeongnam *et al.*, 2014). Em muitos países, inclusive na Europa, o zebrafish é um modelo amplamente aceito para estudos de ecotoxicidade (Ton *et al.*, 2007). Como modelo para pesquisas na área biomédica, o zebrafish está ganhando popularidade dentre a comunidade científica (Tavares e Santos Lopes, 2013). Os seus embriões têm provado serem uma ferramenta altamente valiosa, diversos estudos realizados durante o seu desenvolvimento têm avançado a respeito da compreensão dos efeitos tóxicos sobre seu organismo causados por inúmeros compostos químicos (Busch *et al*., 2011).

A reprodução do zebrafish é externa, ocorre através da deposição na água de espermatozoides e ovócitos maduros liberados pelos exemplares adultos. A atividade reprodutiva inicia-se nas primeiras horas da manhã em que ocorre a luminosidade, após exposição ao escuro. Os ovócitos são então fertilizados pelos espermatozóides gerando assim o embrião. Esta espécie apresenta uma fecundidade elevada, uma fêmea na idade adulta produz grandes quantidades de ovócitos maduros em cada postura, entre 50 a 200 podendo libertar até 1000 (Reed e Jennings, 2011), isso torna este modelo animal muito vantajoso para ser utilizado em ensaios teratogênicos de grande escala.

Um dos principais motivos pela escolha dos embriões em pesquisas ocorre porque a indução de processos malformativos pode ser alcançada sem sacrificar nenhum animal, já que os embriões são transparentes e o seu desenvolvimento é externo ao corpo materno (Eimon, 2014). Isso facilita a visualização de sua anatomia interna, com auxílio de uma lupa ou microscópio óptico permite-se observar diretamente os seus estágios de desenvolvimento (Doke e Dhawale, 2013). Os embriões podem ser vistos até mesmo a olho nu, como observado na **Figura 6**.

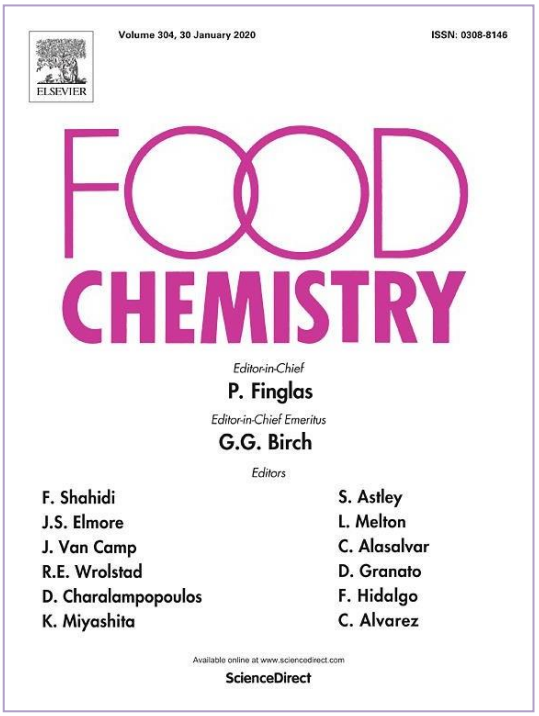
Figura 6 – Embriões do Zebrafish com 24 horas após a fertilização.



Fonte: Autora (2018).

Os embriões do zebrafish desenvolvem-se rapidamente, a primeira clivagem inicia-se aos 45 minutos, posteriormente a fertilização e a embriogênese se completa com 96 horas após a fertilização (hpf) já com a maioria dos órgãos formados e funcionando (Kimmel *et al*., 1995). As larvas eclodem com cerca de 48 a 72 hpf, gradualmente após a eclosão, vão consumindo a vesícula vitelina até o momento em que seu tubo digestivo e a boca completam seu desenvolvimento, por volta de 15 dias após a fecundação.

3 Aditivos alimentares com potencial teratogênico e possível indutor de estresse oxidativo mitocondrial.



A ser submetido a Food Chemistry – FI 4.946
ISSN:0308-8146•
https://www.journals.elsevier.com/food-chemistry

Acesso: https://www.journals.elsevier.com/food-chemistry Online.

3.1 INTRODUÇÃO

As tecnologias modernas empregadas pelas indústrias alimentícias para a conservação, estocagem, e distribuição dos alimentos exigiram o uso de produtos químicos durante sua fabricação denominados de aditivos alimentares. Os aditivos são substâncias químicas intencionalmente adicionadas aos alimentos com intuito de melhorar a qualidade do produto final. No alimento, os aditivos desempenham diversas funções como aumentar o tempo de conservação, melhorar o desempenho físico e químico, realçar ou modificar o sabor, e impedir as ações microbiológicas (Tomaska e Brooke-Taylor, 2014; Ferreira e Carocho, 2017).

O emprego dos aditivos pode trazer benefícios aos alimentos, entretanto o seu uso indiscriminado também pode ser prejudicial à saúde do consumidor, visto que reações adversas podem ser causadas por excesso da sua ingestão, tais como efeitos tóxicos no sistema nervoso (Ozturk *et al.*, 2011; Kencebay *et al.,* 2013; Grings *et al.*, 2014), alterações citológicas, histopatológicas e genotóxicas (Hobbs *et al.*, 2012; Mahmoud *et al.*, 2015, Sahin *et al.*, 2015), alterações mutagênicas e carcinogênicas (Lamariano *et al*., 2015), também foi descoberto sua associação com a produção de ERO´s (Ansari e Mahmood, 2016). Os conservantes em particular, são uma das classes dos aditivos que ao sofrerem transformações químicas no organismo pós-ingestão geram compostos potencialmente tóxicos, exemplos disso se dão pelo consumo de nitratos e nitritos que formam endogenamente composto n-nitrosos que apresentam efeitos carcinógenos e teratogênicos (Lamariano, 2015), e os sulfitos que ao serem metabolizados geram radicais enxofre e superóxido que na presença de oxigênio induzem a disfunções mitocondriais e dano no ácido desoxirribonucléico (DNA) (Ozturk *et al*., 2011).

O estresse oxidativo é uma condição patológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e sua remoção pelo sistema antioxidante, favorecendo assim, a geração de radicais livres em excesso como ERO´s e ERN´s (Sinha e Dabla, 2015). Estas espécies reativas são bastante conhecidas por causarem danos a diversos componentes celulares como o DNA, as membranas celulares e a mitocôndria (McGarry *et al*., 2018). Os danos causados às proteínas, em especial as que participam dos complexos da cadeia respiratória é significativo, pois compromete a produção de energia na célula. Sendo assim, a dieta é um dos fatores que podem

levar a lesão celular, pois é uma das principais vias de exposição a diferentes compostos, visto que uma mistura complexa de agentes químicos são encontrados nos alimentos processados (Monteiro, 2009; Monteiro *et al*., 2013; Moubarac *et al*., 2014).

Um novo modelo de vertebrado tem adquirido notabilidade para estudos de bioenergética mitocondrial, o Zebrafish. Este modelo ganhou destaque nos últimos anos após pesquisas conseguirem sequenciar o seu genoma e o mesmo apresentar mais de 70% de similaridade com o genoma de referência humano (Howe *et al.*, 2013), seus sistemas cardiovascular, nervoso e digestivo são similares aos dos humanos, assim como suas vias de sinalização (Beliaeva *et al.*, 2010). Umas das suas principais características são alta taxa reprodutiva, reprodução externa e embriões fecundados transparentes, o que permite o acompanhado direto de todos os seus estágios de desenvolvimento (Doke e Dhawale, 2013). O emprego dos embriões em pesquisas que necessitem avaliações ou indução de processos malformativos é muito vantajoso, uma vez que os processos podem ser aplicados sem sacrifício de nenhum animal, além de já dispor o conhecimento de todos os seus estágios de desenvolvimento embrionário (Kimmel *et al.*, 1995).

Atualmente muitos processos mitocondriais cruciais vêm sendo estudados utilizando o zebrafish como modelo animal (Azzolin *et al.*, 2010; Steele *et al.* 2014), principalmente os que avaliam a integridade mitocondrial: potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi m$), transporte de Ca^{+2}, acoplamento respiratório, respiração desacoplada mitocondrial ou vazamento de prótons, geração de ERO´s pela cadeia respiratória (Pinho *et al*., 2013; Gibert *et al.*, 2013; Steele *et al*,. 2014; Noble *et al*., 2015; Zhao *et al*., 2016). Neste sentido, o presente estudo adotou como hipótese central que os aditivos alimentares Sulfito de sódio, Nitrato de sódio e Nitrito de sódio possuem potencial para interferir na organogênese e na bioenergética mitocondrial. O primeiro objetivo do trabalho foi investigar se baixas concentrações de sulfito, Nitrato e Nitrito levam a malformações embrionárias. Subsequentemente, a bioenergética mitocondrial e ageração de ERO´s e ERN´s foram avaliadas. Foram considerados o consumo de oxigênio e a geração de espécies reativas, uma vez que estes parâmetros desempenham um papel crucial para modulação da função mitocondrial.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Manejo dos Animais

O peixe-zebra adulto *D. rerio* (228 ± 0,25 mg) foram adquiridos da Recife Aquários-PE e aclimatados na Universidade Federal de Pernambuco antes das técnicas experimentais por quatro semanas em aquários com 2 L e 2 x 2 m, cerca de 10 animais por aquário. Os mesmos foram mantidos a 26 ºC sob o ciclo 14 h de luz e 10 h escuro, também foi monitorado o pH da água (7,0). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração D-50 plus por Tropical® até a saciedade. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo 23076.011093/2018-57).

3.2.2 Reprodução

Os exemplares adultos (na proporção de 1 macho para 2 fêmeas) foram coletados dos aquários no fim da tarde por volta das 16 h e foram colocados juntos por 12 h em um aquário com fundo gradeado, para impedir que os mesmos se alimentem dos ovos fecundados. As 8 h da manhã seguinte, os peixes foram recolhidos e devolvidos aos antigos aquários e ovos fecundados foram coletados em até 2 horas após a fecundação (hpf).

3.2.3 Exposição aos aditivos

Após serem fecundados, os embriões foram lavados com solução tamponada de água filtrada e avaliados no microscópio óptico Zeiss Primo Star (ZEISS-Brazil), descartando os que apresentavam alguma má formação durante o período de clivagem e blástula cerca de 2 a 7 hpf. Posteriormente, os embriões foram incubados em placas de cultura com seis poços numa densidade de 10 embriões/dose/poço. Os embriões foram expostos a 5 ml dos aditivos sulfito de sódio, nitrato de sódio e nitrito de sódio nas concentrações de 50 mM (I) e 100 mM (II), menores concentrações dos aditivos que apresentaram efeitos negativos durante o desenvolvimento dos embriões. Paralelamente, foi realizada a exposição dos embriões a solução tamponada de água

filtrada, para posterior comparação. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de 24°C.

3.2.4 Avaliação do Potencial teratogênico

O desenvolvimento embrionário foi acompanhado utilizando o microscópio óptico Zeiss Primo Star (ZEISS-Brazil), foram feitas fotografias seriadas de todos os embriões incubados a 24 hpf, 48 hpf e 72 hpf. Para avaliar o potencial de toxicidade dos aditivos no desenvolvimento embrionário, foi analisado a morfogênese dos embriões e calculado a área ocular, do pericárdio e ventrículo do rombencéfalo utilizando o software ImageJ®, além dos batimentos cardíacos que foram contabilizados através da observação do embrião ao microscópio óptico, no tempo de 1 minuto. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de 24 °C.

3.2.5 Respiração

Os experimentos foram realizados a 24 ºC sob agitação magnética contínua no eletrodo do tipo Clark oxygraph (Hansatech - United Kingdom). Foram permeabilizados 20 embriões com digitonina a 50 µM juntos com meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 10 mM de HEPES, 2 mM de fosfato de potássio (K2HPO4), 65 mM de cloreto de potássio (KCl) e 1 mM de cloreto de magnésio (MgCl2), pH 7,2 (Leite *et al*., 2010). A atividade da NADH desidrogenase (Complexo I) foi avaliada utilizando um mix de substrato contendo 5 mM de piruvato, 5 mM malato, 5 mM glutamato e 5 mM α-cetoglurato, ADP, oligomissina e CCCP. A atividade da Succinato desidrogenase (Complexo II) foi avaliada com o mix de substrato para o Complexo I, 5 mM de succinato + 1 mM de rotenona como substrato, ADP, oligomissina e CCCP. A rotenona foi necessária para bloquear o complexo I e impedir o fluxo reverso de elétrons. A atividade do Citocromo c oxidorredutase (Complexo III) e do Citocromo c redutase (Complexo IV) foi avalida com o mix de substrato, succinato + rotenona, Antimicina A e TMPD + Ascorbato como substrato do complexo III e IV respectivamente, e KCN.

3.2.6 Produção de ERO´s

A produção geral de ERO´s foi monitorada utilizando diacetato de 2',7'-diclorodiidrofluoresceína (H_2DCFH-DA) no espectrofluorímetro FP-6300 (Jasco Corporation-Brasil). Foram incubados 20 embriões a 24 ºC juntos ao meio de reação descrito anteriormente por Leite *et al.*(Leite *et al*., 2010), por 20 min sob agitação magnética contínua, na presença de 10 µM de succinato, 0.5 µM de rotenona e 1 µM de H_2DCFH-DA. A fluorescência foi observada sob comprimentos de onda de 488 nm de excitação e 525 nm de emissão, e largura de fenda de 2.5 nm. Uma curva de calibração foi obtida com diclorofluoresceína (DCF). Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência (FU).

3.2.7 Produção de óxido nítrico

A geração de óxido nítrico (NO•) foi estimada usando 2 µM de Diaminofluoresceína-FM diacetato (DAF-FM-DA) com comprimentos de ondas de 495 nm de excitação e 515 nm emissão por 20 min sob agitação magnética contínua no espectrofluorímetro FP-6300 (Jasco Corporation - Brasil). Para o experimento, 20 embriões foram incubados a 24 ºC com meio de reação descrito por Leite *et al.* (Leite *et al*., 2010) junto com 10 µM de succinato, 0.5 µM de rotenona, 1 µM de SOD e 1 µM de catalase.

3.2.8 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram analisados com ANOVA one-way e teste pos-hoc de Tukey após verificação normal de Kolmorov-Smirnov. O teste de Student foi usado para apenas duas comparações de médias. Os resultados foram considerados significativos a partir de $p < 0.05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Avaliação do Potencial teratogênico

Em ensaios preliminares, foi observado que concentrações iguais ou acima de 1 M dos aditivos testados afetaram diretamente a sobrevida dos embriões, pois todos os embriões expostos morreram a essas concentrações (dados não publicados). Apartir desssas análises, foram testadas diversas concentrações e a concentração de 50 mM foi a menor concentração dos aditivos estudados que causou teratogenicidade nos embriões expostos. A fim de comparar as principais diferenças encontradas no desenvolvimento embrionário após a exposição de uma concentração maior a que apresentou efeitos, foi testado a concentração de 100 mM dos aditivos.

A exposição dos embriões ao nitrato de sódio está representada na **Figura 1**. Durante as primeiras 24 h após a exposição o desenvolvimento embrionário apresenta-se semelhante ao controle, porém, após 48 h de exposição houve uma redução na área do ventrículo rombencefálico de 5,338 ± 0,009 para 3,996 ± 0,30 mm^2 na concentração I e 4,124 ± 0,42 mm^2 na concentração II. Após 72 h de exposição foi observado redução da área ocular de 60% na concentração I e de 25% na em concentração II ($p<0.0001$). Entretanto, houve aumento de 2x a área do coração nas concentrações (I e II), consequentemente também ocorreu aumento da frequência cardíaca (**Tabela 1A**). Ao final das 72 h foi observado atraso na eclosão dos embriões expostos ao nitrato de sódio, visto que os mesmos ainda se encontravam dentro do córion (**Figura 1**). Também ficou evidente aumento no saco vitelínico.

Durante a exposição dos embriões ao nitrito de sódio (**Figura 2**), nas primeiras 24 h de exposição não foi verificado nenhuma anormalidade no desenvolvimento. Após 48 h, foi observado redução de 16% e 12% da área do rombencéfalo nas concentrações I e II, respectivamente. Após 72 h, ocorreu redução da área ocular e aumento na área cardíaca em 10x, entretanto ocorreu diminuição da frequência cardíaca nas concentrações I e II, de 107± 9.41 bpm no contole chegando até 53 ± 8.28 bpm na concentração II (**Tabela 1B**). Semelhante ao que ocorreu com o conservante nitrato de sódio, ao final de 72 h de exposição também foi observado atraso na eclosão dos embriões expostos, pois os mesmos ainda estavam dentro do córion (**Figura 2**) e também foi visualizado aumento do saco vitelínico e edema pericárdio.

O sulfito de sódio diferentemente dos outros conservantes, apresentou alterações já nas primeiras 24 h de exposição. Foi observado retardo no desenvolvimento embrionário nas concentrações (I e II) (**Figura 3**). Após 48 h de exposição foi observado aumento na área do rombencéfalo de 88% na concentração

I e de 143% na concentração II (p<0,0001) (**Tabela 1C**). Contudo, os embriões expostos ao sulfito na concentaçaõ II apesar de apresentarem aumento da área rombencefálica ainda sim apresentavam retardo em seu desenvolvimento, pois os mesmos ainda encontravam-se na fase de segmentação, diferentemente do controle que se apresentavam na fase faríngea. Após 72 h de exposição houve redução da área ocular (**Figura 3**) nas concentrações (I e II). Na concentração I também ocorreu aumento de 79% da área cardíaca acompanhado de edema no precário, já na concentração II houve uma redução de 33% da área cardíaca (**Tabela 1C**). No que diz respeito à frenquência cardíaca, houve uma pequena variação no sulfito a concentração I (de 108 ± 9.74 bpm no controle para 111 ± 0.95 bpm) e não foi possível contabilizar os batimentos cardíacos na concentração II.

3.3.2 Respiração mitocondrial

O três conservantes testados alteraram a velocidade de consumo do oxigênio no complexo I (**Tabela 2**) já no instante em que as mitocôndrias foram energizadas com o mix de substratos (estado 2), o nitrato de sódio na concentração I (2.234 ± 0.30 nmol/O_2/min), nitrito de sódio na concentração II (0.957 ± 0.14 nmol/O_2/min) e o sulfito de sódio na concentração I (2.444 ± 0.29 nmol/O_2/min). Em relação ao consumo de oxigênio durante a fosforilação oxidativa (estado 3), somente o nitrito II apresentou diferença em comparação ao controle (p=0.003). O estado de inibição da fosforilação oxidativa (estado 4) somente nitrato de sódio I e II e o sulfito na concentração I apresentaram-se diferente estatisticamente do controle, (p=0,02, p=0,006 e p=0,003 respectivamente). No que diz respeito ao estado respiração máxima (CCCP) o nitrato de sódio I e II, sulfito I, e o nitrito II apresentaram diferençtes em relação ao controle. A razão entre a velocidade da respiração após a adição de ADP (estado 3) e a velocidade do estado basal (estado 4) obtida após consumo de ADP, corresponde ao Controle Respiratório (CR). No CR do complexo I foi observado que todos os aditivos em suas concentrações (I e II) apresentaram-se diferentes do controle (p < 0.007).

No complexo II (**Tabela 3**), após o fornecimento de succinato+rotenona (estado 2) e energia (estado 3) os aditivos nitrito de sódio na concentração II e sulfito de sódio II apresentaram-se diferentes do controle (p<0,005, p<0,03, respectivamente). O consumo basal de oxigênio (estado 4), os aditivos nitrito I (1.403 ± 0.24 nmol/O_2/min) e nitrato II (1.481 ± 0.22 nmol/O_2/min) aumentaram a velocidade de consumo de

oxigênio, quando comparados ao controle (0.913 ± 0.12 nmol/O_2/min). A respiração máxima na cadeia respiratória dos embriões (CCCP) foi prejudicada pelo sulfito de sódio na concentração II, assim como no CR em que o mesmo apresentou menor valor entre os demais aditivos (1.414 ± 0.05 nmol/ O_2/min). Do mesmo modo como ocorreu no complexo I, todos os aditivos interferiram no controle respiratório do complexo II. Nos complexos III e IV (**Tabela 4**), o nitrito de sódio e o nitrato de sódio nas concentrações I e II e o sulfito na concentração I apresentaram-se estatisticamentes diferentes do controle em relação à inibição do complexo III por Antimicina A (AA) ($p<0,04$, $p<0,02$). Em relação ao complexo IV, todos os aditivos mostraram-se diferentes após exposição em comparação ao grupo controle.

3.3.3 Produção de ERO´s

A produção geral de ERO´s foi semelhante entre o sulfito de sódio e o nitrato de sódio nas duas concentrações (I e II) (**Figura 4**). Entre os três aditivos testados, o sulfito foi o que apresentou maior produção inespecífica de ERO´s. O nitrito de sódio no tempo de 1200 s na concentração I apresentou 1,0 F.U similar ao controle (**Figura 4A**), e na concentração II apresentou 0,8 F.U (**Figura 4B**); demonstrando que a geração de EROS é estatisticamente semelhante ao controle e que o mesmo apresenta menor probabilidade de dano por ERO´s. Nos primeiros 200 s o sulfito na concentração I apresentou produção elevada de ERO´s em comparação ao nitrato também na concentração I, obtendo valores de 0,8 F.U e 0.2 F.U respectivamente (**Figura 4A**), e seus traçados só se encontram no tempo final de 1200 s. Resultados diferentes ocorreram na concentração II, com maior produção de ERO´s nos primeiros 200 s para o nitrato e os seus traçados só chegam a se igualar em 600 s com a produção de 0,8 F.U. O sulfito apresentou aumento na produção de ERO´s em relação ao nitrato até os 1200 s.

3.3.4 Produção de NO•

O nitrito de sódio mostrou alta suscetibilidade à biossíntese de NO•, enquanto o nitrato de sódio apresentou-se equivalente ao controle nas duas concentrações (I e II) (**Figura 5A e B**). O traçado do sulfito de sódio apresentou-se contínuo nas duas

concentrações (I e II) com valores muito baixos na concentração I de 0,1 F.U, e 0 na concentração II ao final de 1200 s.

3.4 DISCUSSÃO

Todos os aditivos testados causaram defeitos significativos durante o desenvolvimento embrionário. O nitrato de sódio e o nitrito de sódio agiram de forma semelhante no embrião, ambos foram capazes retardar o desenvolvimento normal do rombencéfalo e do olho. O rombencéfalo é a parte do tronco encefálico embrionário composto pelo metencéfalo e pelo mielencéfalo. Depois que completar seu desenvolvimento, o metencéfalo dará origem ao cerebelo e a ponte, e o mielencéfalo originará o bulbo raquidiano e a medula (Rea *et al.,* 2015). Diversas funções são desempenhadas por essas estruturas tais como: funções autônomas de respiração, controle da frequência cardíaca e pressão arterial; manutenção do equilíbrio através do controle muscular e dos movimentos voluntários e condução de impulsos nervosos. Malformações relacionadas ao desenvolvimento cerebral podem ser associadas aos nitratos e nitritos, visto que já foi reportado que as nitrosaminas são responsáveis por causarem defeitos no tubo neural em bebês (Coren *et al*., 2001). Com relação ao coração, o nitrato e o nitrito causaram cardiomegalia, uma patologia caracterizada pelo aumento do volume cardíaco devido a defeitos congênitos no coração ou de vasos sanguíneos que transportam sangue para o coração (Mehta e Chidambaram, 1992). Neste sentido, já foi demonstrado que a exposição de embriões do zebrafish ao nitrito causou defeitos em válvulas cardíacas (Li *et al*., 2014). Isso explicaria a redução observada na frequência cardíaca neste estudo. Resultados semelhantes foram relatados sobre a exposição do nitrito de sódio em larvas do zebrafish, nelas as alterações teratogênicas mencionadas foram de edema no saco vitelínio, edema no pericárdio, malformações craniofaciais e redução do tamanho dos olhos (Simmons *et al*., 2012).

Dentre os aditivos, o sulfito de sódio foi o único capaz de provocar retardo no desenvolvimento embrionário já nas primeiras 24 h de exposição. Os embriões do zebrafish com 24 h encontram-se na fase de segmentação segundo Kimmel *et al.,* (Kimmel *et al.*, 1995), entretanto os embriões expostos as concentrações (I e II) do sulfito com 24 h ainda permaneceram na fase de gastrulação. O sulfito de sódio

também foi responsável por causar hipertrofia cardíaca acompanhada de edema no pericárdio (**Figura 3**), caracterizado pelo acúmulo anormal de líquido na cavidade pericárdica, causando aumento da pressão intrapericárdica e consequente interferência negativa na frequencia cardíaca (Spodick, 2003). A possível explicação da ausência de batimentos cardíacos e a redução significativa da área cardíaca após a exposição do sulfito a concentração II é que os compostos derivados de SO_2 podem modular os canais de sódio (Na) dependentes de voltagem em miócitos cardíacos. Esta modulação envolve aumento do pico de Na com mudanças na inativação e ativação dos canais de Na, que por consequência acarretam em várias cardiopatias e a morte súbita cardíaca (Nie e Meng, 2005). Assim como os outros conservantes testados o sulfito também causou diminuição do tamanho ocular, e foi responsável pelo aumento na área do rombencéfalo. Um estudo recente realizado em humanos aponta que o aumento do rombencéfalo é considerado um dos principais problemas causados no feto, provocando atraso em seu desenvolvimento, incapacidade intelectual e convulsões (Parrini *et al*., 2016).

O consumo de oxigênio pelo complexo I foi parcialmente afetado por todos os aditivos, esse resultado é de extrema relevância visto que a função desempenhada por este complexo é muito importante para o adequado funcionamento da cadeia transportadora de elétrons. Neste sentido, já foi observado que os compostos nitrogenados reativos derivados dos nitratos, possuem interação com o complexo I da cadeia respiratória, produzindo redução da sua atividade catalítica (Burwell *et al.*, 2006; Chouchani *et a*l, 2013). Além de reduzir a ubiquinona, o complexo I também é responsável por bombear prótons para o espaço intermembranar contribuindo para gerar a força motriz utilizada durante a síntese de ATP (Hirst e Roessler, 2016). A NADH ubiquinona oxidoredutase também pode contribuir significativamente para o estabelecimento de estresse oxidativo mitocondrial e produção de ERO´s (Murphy, 2009).

Os aditivos nitrito de sódio e sulfito de sódio na concentração II foram capazes de interferir na energização do complexo II (estado 2), fosforilação do ADP (estado 3) e na taxa de respiração máxima. Esse dado é muito importante, já que a SDH é um possível local para geração de ERO´s na cadeia respiratória (Quinlan *et al*., 2012; Grivennikova *et al.*, 2017), e a sua deficiência está correlacionada com encefalopatia grave (Rustin, 2002). Sobre as consequências causadas pela sua inibição, já foi observado que uma inibição da SDH com 3NP induziu mais anormalidades no

desenvolvimento em embriões de peixe-zebra do que a inibição do complexo I ou III (Pinho *et al*., 2013). A SDH também possui genes responsáveis pela supressão de tumores (Kluckova *et al*., 2013), e também foi descoberto que o complexo II contribui para a apoptose celular (Finsterer, 2008).

Os resultados demonstraram que na concentração I do sulfito de sódio e nas concentrações I e II do nitrito de sódio e nitrato de sódio foram estatísticamente diferentes do controle no estado de inibição do complexo III (AA), em especial o sulfito II que teve o consumo de oxigênio mais prejudicado entre os demais aditivos. Neste sentido já foi identificado que um desbalanço no funcionamento do complexo III acarretou na morte de embriões do peixe-zebra (Chen *et al*., 2003; Figueira *et al*., 2013; Pinho *et al*., 2013; Tahara *et al*., 2009). Foram relatadas que mutações no complexo III são responsáveis por causarem encefalopatias, perda auditiva (Morán *et al*., 2010), atraso no crescimento fetal intrauterino e nascimento prematuro de bebês (Feichtinger *et al*., 2017). Essa mutações também são responsáveis por afetarem diretamente o complexos I e interferir na formação do complexo IV (Feichtinger *et al*., 2017). As deficiências no complexo III são responsáveis por causarem redução moderada da atividade do complexo I (Haut *et al*., 2003), além da redução de subunidades nos complexos I e IV (Gaignard *et al*., 2013).

Todos os aditivos interferiaram no consumo de oxigênio pelo complexo IV, entretando o sulfito de sódio foi o aditivo em que o consumo de oxigênio foi mais prejudicado. O sulfito de sódio também foi capaz de inibir a atividade do complexo IV da cadeia transportadora no córtex cerebral de ratos (Grings *et al.*, 2013). Esta inibição causada pelo sulfito pode contribuir para a diminuição da síntese de ATP, como demonstrado em estudos anteriores (Vincent *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2004). No organismo o sulfito é oxidado pela enzima mitocondrial sulfito oxidase (SO), que mantem os níveis intracelulares em quantidades aceitáveis. A SO também é responsável por reduzir o citocromo c (utilizado como substrato para reação) durante a metabolizaçãos dos sulfitos (Velayutham *et al*., 2016). O citocromo c medeia o transporte de elétrons entre a citocromo c-redutase (complexo III) e a citocromo c oxidase (complexo IV) durante a respiração mitocondrial e também assume um papel importante como antioxidante por medear a remoção do radical superóxido e impede a condição de estress oxidativo (Semak *et al*., 2005). Sendo assim, deficiências que possam afetar o funcionamento da SO possuem interferência direta na atividade da cadeia transportadora de elétrons gerando maior produção de ERO´s (Velayutham *et*

al., 2011), além disso também são responsáveis por causar anormalidades neurológicas como retardo mental, convulsões e microcefalia (Carmi-Nawi *et al*., 2011; Wyse *et al*., 2019).

O CR avalia o acoplamento entre a transferência de elétrons pela cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa (Miranda *et al*., 2005). No presente estudo foi possível identificar que todos os aditivos nas concentrações testadas (I e II) tiveram capacidade de interferir no contole respiratórios dos complexos I e II das mitocondrias dos embriões.

Os ingredientes que compões a dieta ao serem degradados no organismo, levam a restrição de nutrientes, afetam os níveis de vitaminas e minerais importantes e também podem interferir na função da cadeia transportadora de elétrons (Kowaltowski, 2018), gerando assim compostos oxidantes. Sobre isso, foi observado neste estudo que o sulfitto de sódio e o nitrato de sódio foram responsáveis por produzir elevadas quantidades de ERO´s. O aumento na produção de ERO´s está associado a disfunção dos complexos na cadeia respiratória e tem sido implicado em várias doenças degenerativas e no envelhecimento biológico (Dröse e Brandt, 2012). Neste estudo foi obeservado que apenas o nitrito de sódio foi capaz de aumentar a geração de NO•, diferentemente do sulfito de sódio que inibiu a sua sintese. O NO• é um importante sinalizador celular, e atua em diversos sistemas no organismo. Sua principal função é como vasodilatador, atuando no relaxamento do endotélio e na regulação da pressão sanguínea basal. O NO• ainda assume um papel importante na respiração, através da inibição da enzima citocromo c oxidase (Lundberg *et al*., 2018). Em concentrações fisiológicas o NO• não é prejudicial ao organismo, mas quando em excesso pode reagir com o radical ânion O_2^- gerando $DNOO^-$. Altas concentrações de NO• e seus derivados (peroxinitrito, dióxido de nitrogênio e nitrotirosinas) causam inibição irreversível da CTE, desacoplamento mitocondrial, transição de permeabilidade na membrana mitocondrial e morte celular (Brown, 2001).

Diante das evidências observadas pelo presente estudo é possível aceitar a hipótese central deste trabalho, onde que os aditivos alimentares sulfito de sódio, nitrato de sódio e nitrito de sódio interferem na organogênese e na bioenergética mitocondrial, além de comprovar o uso do zebrafish na avaliação teratogênica de conservantes alimentares ou até mesmo de outras substâncias químicas.

3.5 CONCLUSÃO

O acompanhamento do desenvolvimento embrionário demonstraram que os aditivos testados provocaram alterações fisiológicas nos embriões do zebrafish. Em especial as alterações provocadas pelo sulfito de sódio, causaram retardo no desenvolvimento embrionário. Isso pode trazer consequências severas, visto que as primeiras horas após a fertilização são essênciais para que as divisões celulares ocorram de forma correta e possam gerar todos os órgãos do feto.

Os aditivos estudados reduziram o controle respiratório nos complexos I e II e interferiram negativamente na atividade do complexo IV. E o nitrato de sódio e o sulfito de sódio ainda provocam aumento na sintese de ERO´s na mitocôndria., demostrando seu efeito prejudicial a bionergética celular. Sobre isso, prejuízos que venham a afetar o controle respiratório, ou comprometer a atividade da cadeia transportadora de elétrons, é muito significativo, pois podem provocar redução na síntese de ATP na célula.

Portanto a identificação de pequenas doses de aditivos diariamente consumidos que comprometam a função mitocondrial é extremamente importante e reafirmam a necessidade de controles mais precisos sobre a utilização destes compostos químicos, visto que o comprometimento da fisiologia mitocondrial desencadeia uma série de processos que levam a condição de estresse oxidativo e morte celular.

Figura 1: Efeitos teratogênicos do nitrato de sódio em embriões do zebrafish. Efeitos teratogênicos das concentrações de 50 mM e 100 mM do nitrato de sódio nos embriões entre 24 e 72 horas pós-fertilização. Os embriões contole não foram expostos às concentrações. O rombencéfalo, coração e olho foram destacados com traçados e setas coloridas em amarelo, vermelho e azul respectivamente.

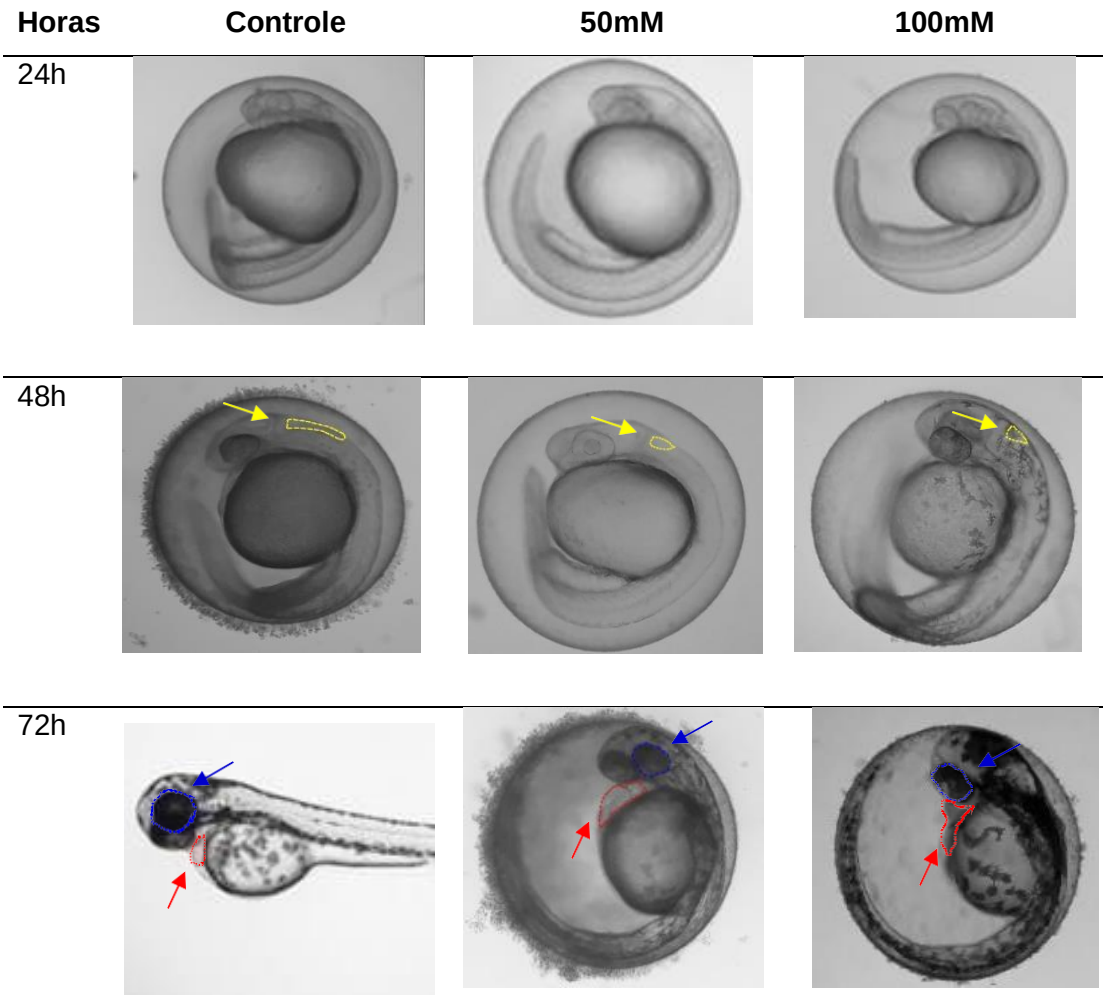


Figura 2: Efeitos teratogênicos do nitrito de sódio em embriões do zebrafish. Efeitos teratogênicos das concentrações de 50 mM e 100 mM do nitrito de sódio nos embriões entre 24 e 72 horas pós-fertilização. Os embriões contole não foram expostos às concentrações. O rombencéfalo, coração e olho foram destacados com traçados e setas coloridas em amarelo, vermelho e azul respectivamente. O edema no pericárdio é indicado pela seta verde.

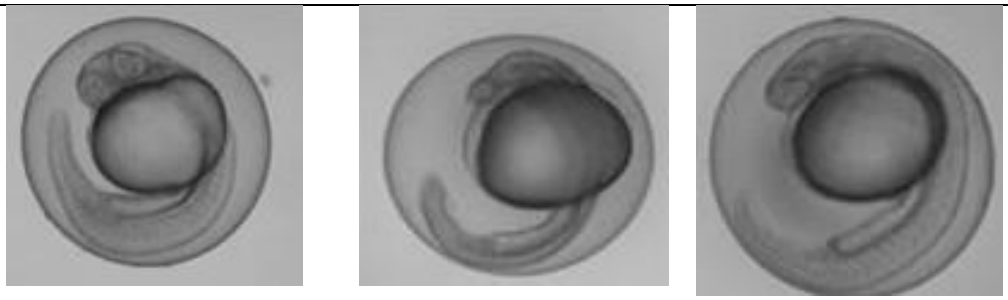
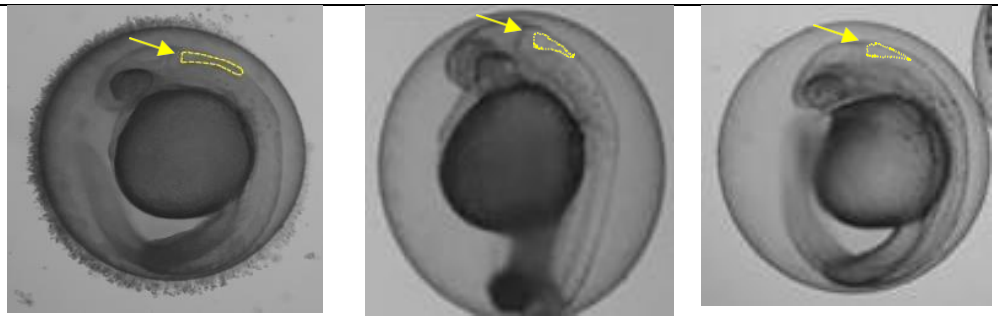
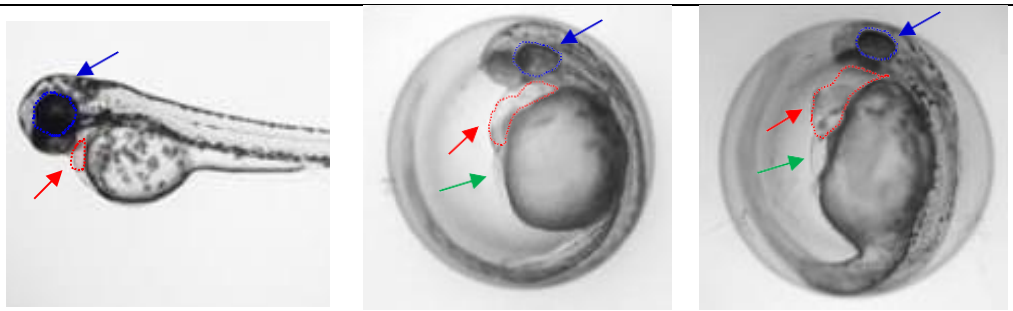
Horas	Controle	50mM	100mM
24h			
48h			
72h			

Figura 3: Efeitos teratogênicos do sulfito de sódio em embriões do zebrafish. Efeitos teratogênicos das concentrações de 50 mM e 100 mM do sulfito de sódio nos embriões entre 24 e 72 horas pós-fertilização. Os embriões contole não foram expostos às concentrações. O rombencéfalo, coração e olho foram destacados com traçados e setas coloridas em amarelo, vermelho e azul respectivamente. O edema no pericárdio é indicado pela seta verde.

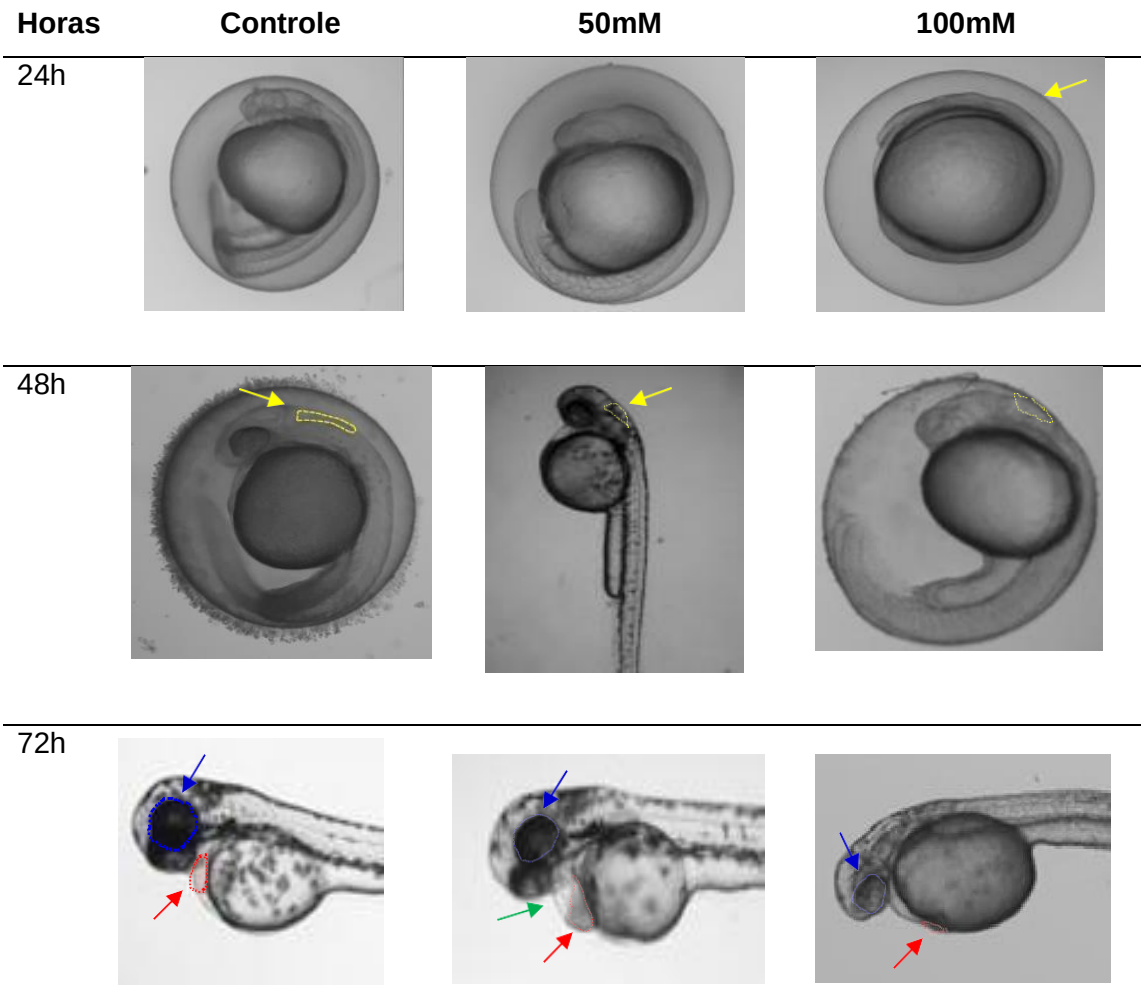


Tabela 1. Efeitos teratogênicos e frequencia cardíaca dos embriões do zebrafish. Áreas e frequencia cardíaca dos embriões do zebrafish expostos às concentrações de 50 mM e 100 mM do nitrato de sódio, nitrito de sódio e sulfito de sódio entre 24 e 72 horas hpf. A área do rombencéfalo foi calculada em 48 hpf, a área ocular e cardíaca foi calculada em 72 hpf, valores expressos em mm^2. A freqüência cardíaca foi contabilizada com 72 hpf expressa em bpm / min- batimentos por minuto/minuto (n = 4). * p <0,01; ** p <0,0001; *** p = 0,03.

	Efeitos	**Controle**	**50 mM**	**100 mM**
A– Nitrato Sodio	Rombencéfalo	5.338 ± 0.009	3.996 ± 0.30*	4.124 ± 0.42*
	Desenvolvimento ocular	34.7 ± 0.68	13.9 ± 1.05**	26 ± 0.64**
	Coração	5.625 ± 0.71	11.589 ± 0.74**	12.424 ± 0.49**
	Frequência Cardíaca	111 ± 13.1	136.5 ± 1.73*	144 ± 7.4*
B– Nitrito Sodio	Rombencéfalo	5.361 ±0.10	4.567 ± 0.39*	4.781 ± 0.59
	Desenvolvimento ocular	34.785 ± 0.68	14.614 ± 0.91**	10.892 ± 0.76**
	Coração	6.705 ± 0.25	17.114 ± 1.03**	17.578 ± 1.05**
	Frequência Cardíaca	107 ± 9.41	73 ± 8.99*	53 ± 8.28**
C– Sulfito Sodio	Rombencéfalo	5.351 ± 0.09	10.329 ± 1.04**	12.976 ± 1.09**
	Desenvolvimento ocular	34.778 ± 0.68	11.761 ± 0.29**	12.067 ± 0.17**
	Coração	6.707 ± 0.25	12.196 ± 0.72**	4.586 ± 0.57*
	Frequência Cardíaca	108 ± 9.74	111 ± 0.95	-

Tabela 2. Consumo de Oxigênio pela NADH-Desidrogenase (Complexo I) dos embriões do zebrafish.

Letras maiúsculas representam diferenças entre 50 mM dos aditivos alimentares A p<0.001; B p=0.02; C p=0.003; D p=0.0001; E p< 0.007quando comparados ao controle. Letras minúsculas representam diferenças entre 100 mM dos aditivos alimentares a p<0.05; b p=0.003; c p=0.006; d p<0.01; e p<0.002 quando comparados ao controle. Valores expressos em nmol/O_2/min, n=4 experimentos independentes.

Complexo I – NADH Desidrogenase

		Estado 2	Estado 3	Estado 4	CCCP	RC
Controle		1.386 ± 0.02	1.831 ± 0.37	0.839 ± 0.20	1.368 ± 0.13	2.204 ± 0.21
Nitrato	**50 mM**	2.234 ± 0.30 ^{A}	2.420 ± 0.33	1.466 ± 0.39 ^{B}	1.993 ± 0.18 $_{D}$	2.021 ± 0.24 ^{E}
	100 mM	1.962 ± 0.24	1.930 ± 0.24	1.499 ± 0.10 ^{c}	1.781 ± 0.10 ^{d}	1.288 ± 0.15 ^{e}
Nitrito	**50 mM**	1.534 ± 0.14	1.573 ± 0.23	1.252 ± 0.07	1.263 ± 0.09	1.253 ± 0.12 ^{E}
	100 mM	0.957 ± 0.14 ^{a}	0.861 ± 0.23 ^{b}	0.781 ± 0.15	0.901 ± 0.18 ^{d}	1.110 ± 0.27 ^{e}
Sulfito	**50 mM**	2.444 ± 0.29 ^{A}	2.387 ± 0.30	1.990 ± 0.57 $_{C}$	2.117 ± 0.20 $_{D}$	1.260 ± 0.37 ^{E}
	100 mM	1.581 ± 0.51	1.561 ± 0.34	1.300 ± 0.35	1.271 ± 0.23	1.258 ±.0.34 ^{e}

Tabela 3. Consumo de Oxigênio pela Succinato Desidrogenase (Complexo II) dos embriões do zebrafish.

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os aditivos a 50 mM quando comparados ao controle A $p<0.006$. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os aditivos a 100 mM quando comparados ao controle a $p<0.005$; b $p<0.03$. Valores expressos em nmol/O_2/min, n=4 experimentos independentes.

Complexo II – Succinato Desidrogenase

		Estado 2	Estado 3	Estado 4	CCCP	RC
Controle		1.873 ± 0.13	2.391 ± 0.09	0.913 ± 0.12	2.115 ± 0.10	2.647 ± 0.29
Nitrate	**50 mM**	1.190 ± 0.22	2.018 ± 0.22	1.209 ± 0.13	1.771 ± 0.57	1.689 ± 0.31 [A]
	100 mM	2.023 ± 0.10	2.140 ± 0.24	1.481 ± 0.22 [b]	1.978 ± 0.13	1.461 ± 0.20 [a]
Nitrito	**50 mM**	1.790 ± 0.12	1.983 ± 0.22	1.403 ± 0.24 [A]	1.895 ± 0.21	1.427 ± 0.15 [A]
	100 mM	1.193 ± 0.08 [a]	1.914 ± 0.18 [b]	1.221 ± 0.08	1.803 ± 0.23	1.568 ± 0.10 [a]
Sulfito	**50 mM**	1.978 ± 0.27	2.284 ± 0.37	1.253 ± 0.12	2.027 ± 0.31	1.822 ± 0.23 [A]
	100 mM	1.336 ± 0.30 [a]	1.617 ± 0.29 [b]	1.140 ± 0.17	1.393 ± 0.27 [d]	1.414 ± 0.05 [a]

Tabela 4. Consumo de Oxigênio no Complexo III e IV dos embriões do zebrafish. Letras maiúsculas indicam diferença estatística a 50 mM entre os aditivos quando comparado ao controle A $p<0.04$; B $p=0.0001$. Letras minúsculas indicam diferença estatística a 100 mM entre os aditivos quando comparado ao controle a $p<0.02$; b $p<0.0001$. Valores expressos em nmol/O_2/min, n=4 experimentos independentes.

		AA	TMPD+Asc	KCN
Controle		0.640 ± 0.19	13.92 ± 1.53	9.881 ± 1.68
Nitrato	**50 mM**	1.011 ± 0.15 ^{A}	2.319 ± 0.54 ^{B}	0.985 ± 0.45 ^{B}
	100 mM	1.165 ± 0.22 ^{a}	1.298 ± 0.10 ^{b}	0.700 ± 0.16 ^{b}
Nitrito	**50 mM**	1.237 ± 0.14 ^{A}	1.712 ± 0.30 ^{B}	1.224 ± 0.22 ^{B}
	100 mM	1.162 ± 0.29 ^{a}	1.686 ± 0.25 ^{b}	1.444 ± 0.47 ^{b}
Sulfito	**50 mM**	1.235 ± 0.18 ^{A}	2.521 ± 0.25 ^{B}	1.599 ± 0.41 ^{B}
	100 mM	0.978 ± 0.04	1.235 ± 0.08 ^{b}	1.184 ± 0.03 ^{b}

Figura 4 - Produção de ERO´s por DCF-FM-DA.

Produção de ERO´s monitorizada pelo DCF+ succinato e rotenona como substrato. A figura “A” representa o ensaio comparativo entre o controle e os aditivos a 50 mM, a figura “B” representa o ensaio comparativo entre o controle e os aditivos a 100 mM. * Indica diferenças estatísticas * p <0,03; ** p <0,02. n=3 experimentos independentes.

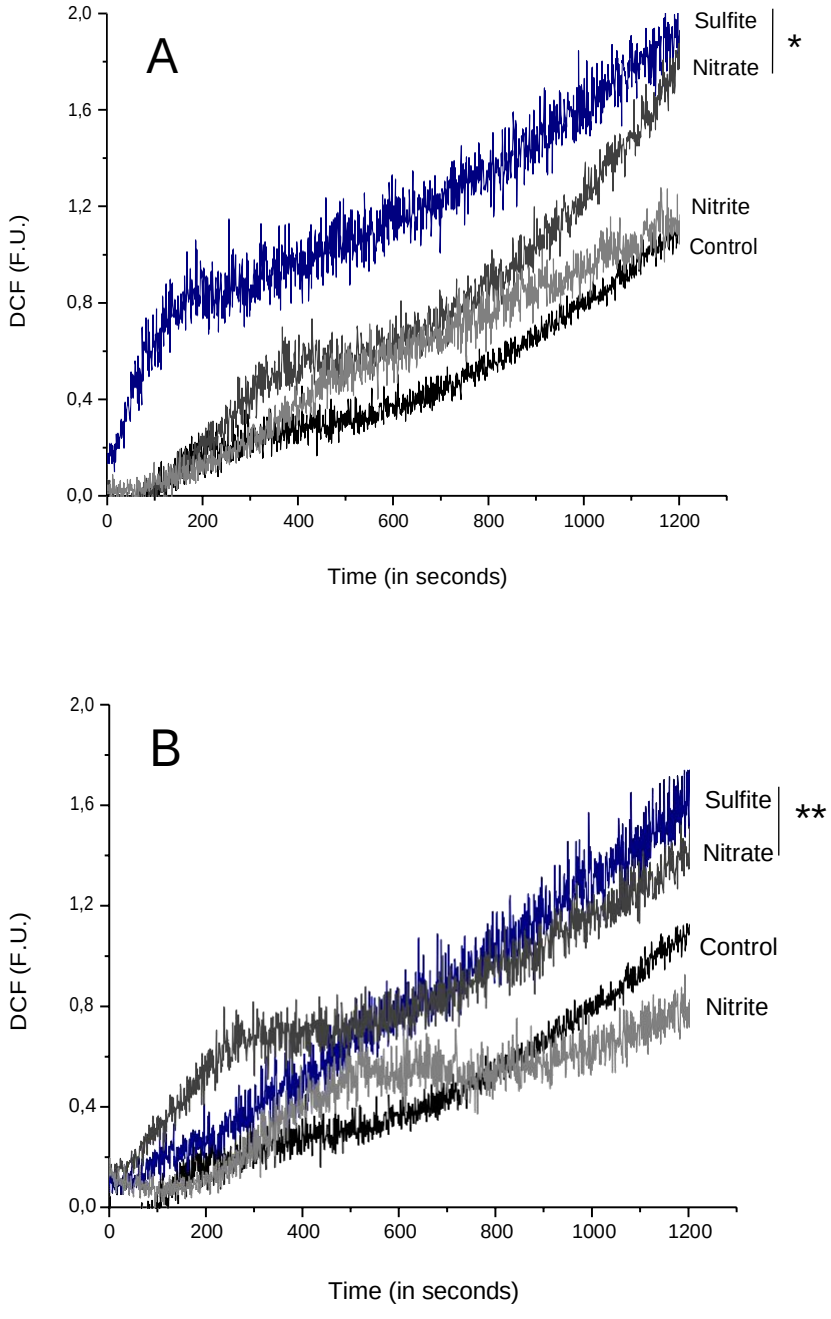
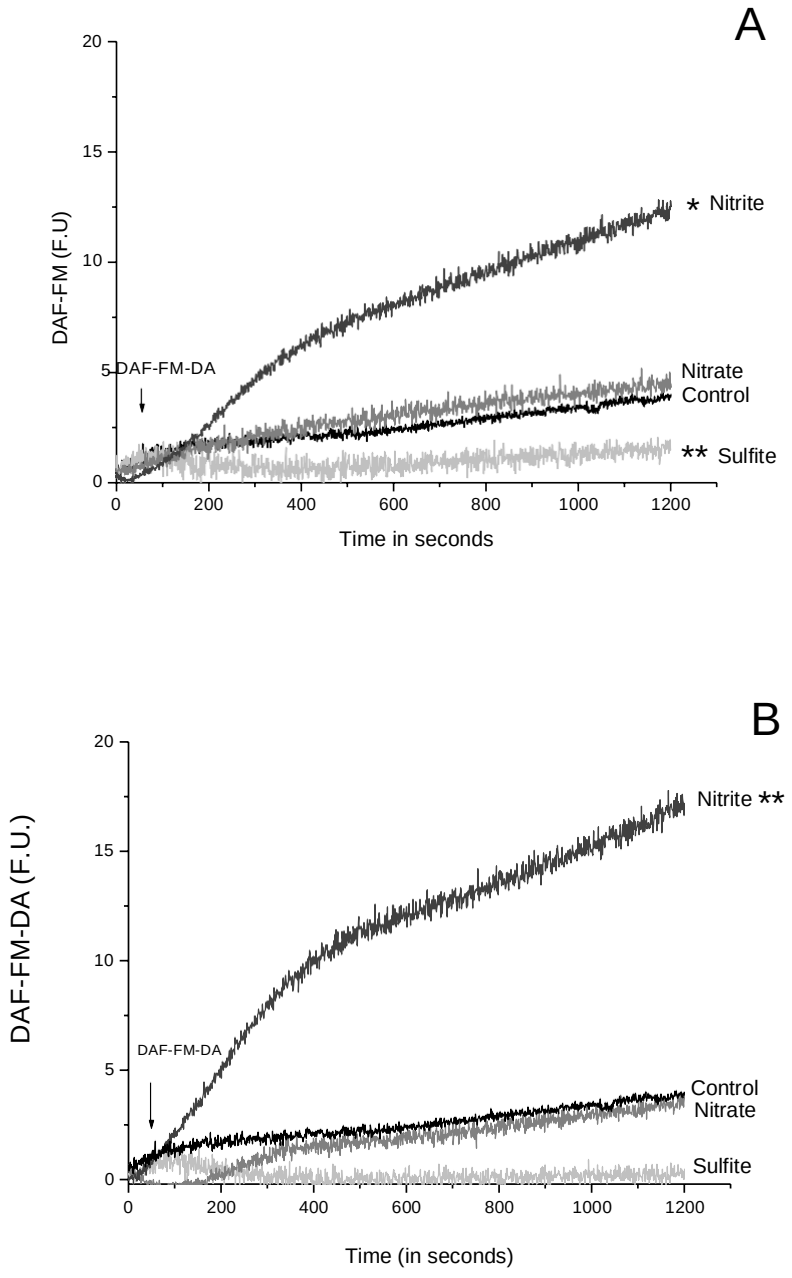
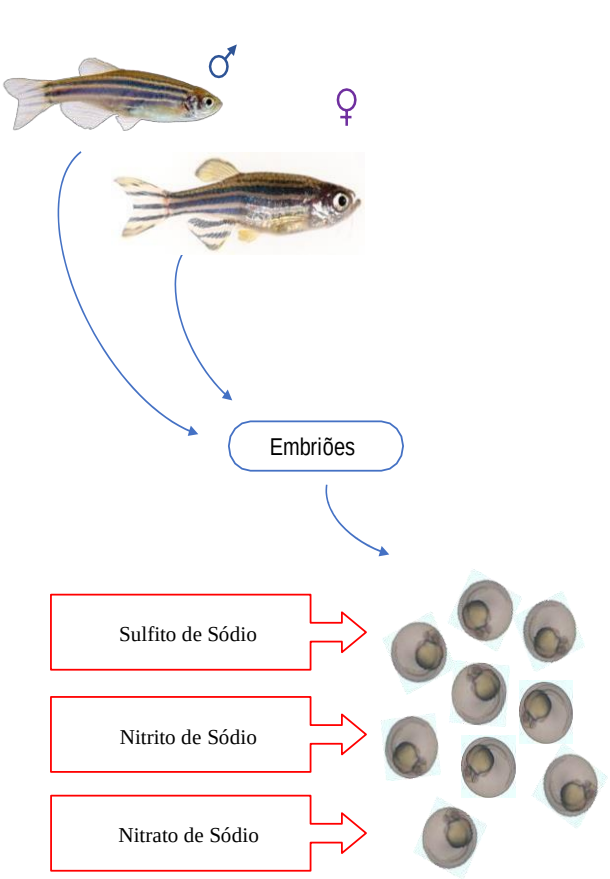


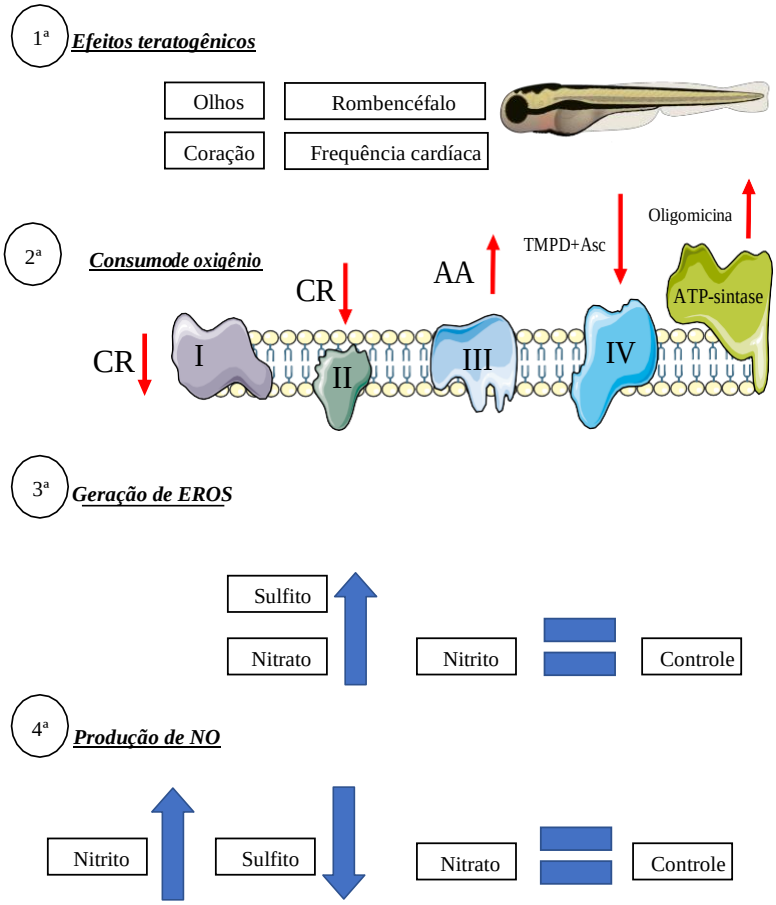
Figura 5. Produção de óxido nítrico por DAF-FM.

A produção de NO • foi continuamente monitorizada com DAF-FM suspenso em tampão respiratório + 1 µM de catalase e 1 µM de SOD. O experimento foi realizado com uma mistura de piruvato, malato, glutamato e ácido α-cetoglutarato como substrato. A figura “A” representa o ensaio comparativo entre o controle e os aditivos a 50 mM, a figura “B” representa o ensaio comparativo entre o controle e os aditivos a 100 mM. * Indica diferenças estatísticas p <0,001 e ** p <0,0001. n=3 experimentos independentes.



Gárafico Abstrato.





4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo comprova a utilidade do zebrafish na avaliação do potencial teratogênico de conservantes alimentares, bem como para estimar o status bioenergético mitocondrial. Considerando que o genoma do peixe-zebra possui alta similaridade com o genoma de referência humano, as informações obtidas em estudos utilizando o zebrafish podem levar a resultados aplicáveis à humanos. Neste sentido é possível assumir que os aditivos Nitrito de sódio, Nitrato de sódio e Sulfito possuem efeitos tóxicos. Notadamente para (1) Integridade embrionária, (2) consumo de oxigênio por tecidos permeabilizados, (3) geração de ERRO´s e (4) biossíntese de óxido nítrico. Neste sentido, considerando a inclusão planejada de Nitrito de sódio, Nitrato de sódio e Sulfito em uma elevada gama de alimentos processados, obter informações sobre efeitos subletais destes compostos químicos adquire relevância tendo em vista padrões de qualidade e segurança alimentar. Especialmente quando se tem especulado sobre como a alimentação está envolvida em algumas morbidades e em condições patológicas de etilogia desconhecida.

REFERÊNCIAS

Abreu, E. S.; VianaII, I.C.; Moreno, R.B.; Torres, E.A.F.S. Alimentação mundial: uma reflexão sobre a história. Saude soc., v. 10, n. 2, p. 3-14, 2001.

Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. J Am Med Assoc; v. 209, p. 1297-1302, 1996.

Akbar, S.M., Sharma, H.C., Jayalakshmi, S.K., and Sreeramulu, K.,Methylparathion- and carbofuran-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Helicoverpa armigera (Noctuidae: Lepidoptera): Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 103, p. 31-37, 2012.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Biologia Molecular da Célula, 4ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2004.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Biologia Molecular da Célula. Conversão de energia: mitocôndrias e cloroplastos. 6ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2017. 757p.

Ali, M.Y.; Hassan, G.M.; Hassan, A.M.S.; Mohamed, Z.A.; Ramadan, M.F. In vivo genotoxicity assessment of sunset yellow and sodium benzoate in female rats. Drug Chem Toxicol, 2018.

Amaral, I. P.; Johnston, I. A. Insulin-like growth factor (IGF) signalling and genome-wide transcriptional regulation in fast muscle of zebrafish following a single-satiating meal. J Exp Biol, v. 214, n. Pt 13, p. 2125-39, 2011.

Angiolillo, L.; Conte, A.; Del Nobile, M.A. Food Additives: Natural Preservatives. Encyclopedia of Food Safety, v. 2, p. 474-476, 2014.

Ansari, F. A. e MAhmood, R. Sodium nitrite enhances generation of reactive oxygen species that decrease antioxidant power and inhibit plasma membrane redox system of human erythrocytes. Cell Biology International, v. 40, n. 8, p. 887-894, 2016.

ANVISA. Ministério da Sáude. Agência Nacional de Vigilância Sanitária -. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares definições, classificação e emprego. Diário Oficial da República Federativa do Brasil,Brasília, DF, 28 out. 1997.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa, trecho 5, área especial 57, 2016. www.anvisa.gov.br. Acesso em: 06.07.2017.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria 540. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/ . Acesso em: 22.07.2017.

Aschebrook-Kilfoy, B.; Ward, M.H.; Gierach, G.L.; Schatzkin, A.; Hollenbeck, A.R.; Sinha, R.; Cruz, A.J. Epithelial ovarian cancer and exposure to dietary nitrate and nitrite in the NIH-AARP Diet and Health Study. Eur J Cancer Prev., v. 21, n. 1, p. 65-72, 2012.

Aun, M. V.; Mafra, C.; Philippi, J.C.; Kalil, J.; Agondi, R.C.; Motta, A.A. Aditivos em alimentos. Rev. bras. alerg. imunopatol., v. 34, n. 5, 2001.

Azevedo, E.; Ribas, M.T.G.O. Estamos seguros? Reflexões sobre indicadores de avaliação da segurança alimentar e nutricional. Revista Nutrição. v. 29, n. 2, p. 241-251, 2016.

Azevedo, R.D.S. Avaliações bioenergéticas mitocondriais em tecidos permeabilizados do zebrafish (Danio rerio). 2018.176f. Tese de Doutorado-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

Azzolin, L., Basso, E., Argenton, F., Bernardi, P. Mitochondrial Ca2+ transport and permeability transition in zebrafish (Danio rerio): Biochim Biophys Acta, v. 1797, n. 11, p. 1775-1779, 2010.

Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Azizi, F.; Ghasemi, A. Nitrate-rich dietary supplementation during pregnancy: The pros and cons. Pregnancy Hypertens, v. 11, p. 44-46, 2018.

Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T.Mitochondria, oxidants, and aging: Cell, v. 120, p. 483–495, 2005.

Banerjee, S.B.; Linstead, S. Globalization, Multiculturalism and Other Fictions: Colonialism for the New Millennium? Organization, v. 8, n. 4, p. 683–722, 2001.

Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H , Ofir, R., Narkis, G , Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., Birk, O.S. Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRQ : American Journal of Human Genetics, v.82, n. 5, p.1211–1216, 2008.

Barnes, J.L.; Zubair, M.; John, K.; Poirier, M.C.; Martin, F.L. Carcinogens and DNA damage. Biochem Soc., v 46, n.5, p.1213-1224, 2018.

Basaranlar, G.; Derin, N.; Kencebay Manas, C.; Tanriover, G.; Aslan, M. The effects of sulfite on cPLA2, caspase-3, oxidative stress and locomotor activity in rats. Food Chem Toxicol., v. 123, p. 453-458, 2018.

Basulto, J.; Manera, M.; Baladia, E. Ingesta dietética de nitratos en bebés y niños españoles y riesgo de metahemoglobinemia. Rev Pediatr Aten Primaria, v. 16, n. 61, p. 65-69, 2014.

Bedale, W.; Sindelar, J.J.; Milkowski, A.L. Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. Meat Sci., n.120, p. 85-92, 2016.

Beliaeva, N.F.; Kashirtseva, V.N.; Medvedeva, N.V.; Khudoklinova. I.; Ipatova, O.M.; Archakov, A.I. Zebrafish as a model organism for biomedical studies. Biomed Khim., v. 56, p. 120–123, 2010.

Bell, E.L.; Klimova, T.A.; Eisenbart, J.; Moraes, C.T.; Murphy, M.P.; Budinger, G.R.S., et al. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the

transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. The Journal of Cell Biology, v.177, p. 1029–1036, 2007.

Benedetti, M.; Lanzoni, I.; Nardi, A.; d'Errico, G.; Di Carlo, M.; Fattorini, D.; Nigro, M.; Regoli, F. Oxidative responsiveness to multiple stressors in the key Antarctic species, Adamussium colbecki: interactions between temperature, acidification and cadmium exposure. Mar. Environ. Res., v. 121, p. 20–30, 2016.

Berdanier, C.D. Mitochondria in Health and Disease. Cap. 1 Introduction to mitochondria. Taylor & Francis Group, 2005.

Bernard C. An introduction to the study of experimental medicine In: Images from the history of medicine division. National Library of Medicine, 1865.

Bleil, S.I. O Padrão Alimentar Ocidental: considerações sobre a mudança de hábitos no Brasil. Revistas de Cadernos de Debate, v. 6, p. 1-25, 1998.

Brown, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1504, p. 46-57, 2001.

Bryan, N.S. e Loscalzo, J. Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease, Springer, 2017.

Burwell, L.S., Nadtochiy, S.M., Tompkins, A.J., Young, S., and Brookes, P.S. Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I: Biochem. J., v. 394, p. 627–634, 2006.

Busquet, F.; Strecker, R.; Rawlings, J.M.; Belanger, S.E.; Braunbeck,T.; Carr, G.J.; Cenijn, P.; Fochtman, P.; et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. Regul Toxicol Pharmacol., v. 69, n. 3, p. 496-511, 2014.

Cadet, J.; Davies, K.J.A. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. Free Radic Biol Med., v. 107, p. 2-12, 2017.

Carlström, M.; Lundberg, J.O.; Weitzberg, E.. Mechanisms underlying blood pressure reduction by dietary inorganic nitrate. Acta. Physiol. (Oxf), v. 224, n. 1, 2018.

Carmi-Nawi, N., Malinger, G., Mandel, H., Ichida, K., Lerman-Sagie, T., Lev, D. Prenatal brain disruption in molybdenum cofactor deficiency: J. Child. Neurol., v.26, p.460–464, 2016.

Cavalli, S. B. Segurança Alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. Rev. Nutr. v.14, 2001.

Chakraborty, C.; Sharma, A..R.; Sharma, G.; Lee, S.S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. J. Nanobiotechnology, v. 14, 2016.

Chan, S.; Williamson, T. Detection of Mitochondrial Toxicity Using Zebrafish. Mitochondrial Dysfunction Caused by Drugs and Environmental Toxicants, p. 323-346.

Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., and Lesnefsky, E. J. 2003, Production of reactive oxygen species by mitochondria Central role of complex III: Journal of Biological Chemistry, v. 278, p. 36027-36031.

Chiarani, F., Bavaresco, CS, Dutra-Filho, CS et al. Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. Metab Brain Dis , v. 23, 123-132, 2008.

Chouchani, E.T., Methner, C., Nadtochiy, S.M., Logan, A., Pell, V.R., Ding, S., James, A.M., Cocheme´, H.M., Reinhold, J., Lilley, K.S., et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I:at. Med.,v. 19, p. 753–759.

Clapham, JC., et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. Nature, v. 406, n. 6794, p.415-418, 2000.

Cockburn, A.; Brambilla, G.; Fernández, M.L.; Arcella, D.; Bordajandi, L.R.; Cottrill, B.; van Peteghem, C.; Dorne, J.L. Nitrite in feed: from animal health to human health. Toxicol Appl Pharmacol., v. 270, n. 3, p. 209-217, 2010.

Cooper, G.M. A célula: uma abordagem molecular. Cap. 10: Bioenergética e metabolismo: mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. 2ª ed. Artmed, 2002.

Croen, L.A., Todoroff, K., Shaw, G.M., 2001, Maternal exposure to nitrate from drinking water and diet and risk for neural tube defects: Am J Epidemiol., v. 153, n. 4, p. 325–331.

De Mey, E.; De Maere, H.; Paelinck, H.; Fraeye, I. Volatile N-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr., v. 57, p. 2909-2923, 2017.

Demeyer, D.; Mertens, B.; De Smet, S.; Ulens, M., Mechanisms Linking Colorectal Cancer to the Consumption of (Processed) Red Meat: A Review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v. 56, 2016.

Dhillon, V. S., and M. Fenech, 2014, Mutations that affect mitochondrial functions and their association with neurodegenerative diseases: Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 759, p. 1-13.

DiMauro, S.; Schon, E.A. Mitochondrial respiratory-chain diseases. N Engl J Med., v. 348, n. 26, p. 2656-68, 2003.

Doel, J.J.; Benjamin, N.; Hector, M.P.; Rogers, M.; Allaker, R.P. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. Eur J Oral Sci., v. 113, n.1, p. 14-19, 2005.

Doke, S.K.; Dhawale, S.C. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharm J., v. 23, n.3, p. 223-229, 2013.

Donnelly, D.F.; Kim, I.; Mulligan, E.M.; Carroll, J.L. Non-additive interactions between mitochondrial complex IV blockers and hypoxia in rat carotid body responses. Respir Physiol Neurobiol., v. 190, p. 62-9, 2014.

Dröse, S., and Brandt, U, 2012, Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain: Adv. Exp. Med. Biol., v. 748, p. 145–169.

Dutra, C.B.; Rath, S.; Reyes, F.G.R. Nitrosaminas voláteis em alimentos. Alim. Nutr., v. 18, n. 1, p. 11-129, 2007.

Eimon, P.M. Studying apoptosis in the Zebrafish. Methods Enzymol., v. 544, p. 395-431, 2014.

Elbanna, K.; Sarhan, O.M.; Khider, M.; Elmogy, M.; Abulreesh, H.H.; Shaaban, M.R. Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. J Food Drug Anal., v. 24, n. 3, p. 667-680, 2017.

Engemannet, A.; Focke, C.; Humpf, H.U. Intestinal formation of N-nitroso compounds in the pig cecum model. J Agric Food Chem., v. 61, n. 4, p.998-1005, 2013.

Engeszer, R. E. et al. Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field. Zebrafish . v. 4, n 1, 2007.

Erlanson-Albertsson, C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. Acta Physiol Scand., v. 178, n. 4, p. 405-412, 2003.

Fairweather, F.A.; Swann, C.A. Food Additives and Cancer. Proc. Nutr. Soe., v. 40, p. 21-30, 1981.

Fang, L., Liu, C., Miller, Y.I., 2014, Zebrafish models of dyslipidemia: Relevance to atherosclerosis and angiogenesis. Translational research: The journal of laboratory and clinical medicine, v. 163, n. 2, p. 99-108.

Fang, L.; Liu, C.; Miller, Y. I. Zebrafish models of dyslipidemia: Relevance to atherosclerosis and angiogenesis. Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine, v. 163, n. 2, p. 99-108, 10/02 2014

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex imentarius: como tudo começou. www.fao.org/tempref/GI/.../FTP_FaoRlc/.../María%20Aparecida%20Martinelli.pdf. Acesso em: 06.07.2017.

Favero, D. M.; Ribeiro, C.D.A.S.G.; Aquino, A.D.D.E. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 18, n. 1, p. 11-20, 2011.

Feichtinger, R.G. et al, 2017, Combined Respiratory Chain Deficiency and UQCC2 Mutations in Neonatal Encephalomyopathy: Defective Supercomplex Assembly in Complex III Deficiencies: Oxid Med Cell Longev., v. 2017.

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. RAMB.; v. 43, n.1, p.61-8, 1997.

Ferreira, I., and Carocho, M.Food Additives: Classification, Regulation and Analysis: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2017.

Ferreira, M.; Aguiar, T.; Vilarinho, L. Cadeia Respiratória Mitocondrial Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. Arq Med, Porto , v. 22, n. 2-3, p. 49-56, 2008.

Figueira, T.R., Barros, M.H., Camargo, A.A., Castilho, R.F., Ferreira, J.C., Kowaltowski, A.J., Sluse, F.E., Souza-Pinto, N.C., Vercesi, A.E., 2013, Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health: Antioxid. Redox Signal, v. 18, p. 2029–2074.

Finkel, T.; Holbrook, N.J. “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing,” Nature, vol. 408, n. 6809, p. 239– 247, 2000.

Finsterer, J., 2008, Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults: Pediatr. Neurol., v.39, p. 223-235.

Fuchs,Y. e Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. Cell, v. 147, p. 742-758, 2011.

Gaignard, P., et al., 2013, Mutations in CYC1, encoding cytochrome c1 subunit of respiratory chain complex III, cause insulin-responsive hyperglycemia: American Journal of Human Genetics, v. 93, n. 2, p. 384–389.

GarófoloI, A.; Avesani; C.M.; Camargo; K.G.; Barros; M.E.; Silva; S.R.J.; Taddei, J.A.A.C.; Sigulem, D.M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. Rev. Nutr., v. 17, n. 4, p. 491-505, 2004.

Gassara, F.; Kouassi, A.P,; Brar, S.K.; Belkacemi, K. Green Alternatives to Nitrates and Nitrites in Meat-based Products-A Review. Crit Rev Food Sci Nutr., v. 56, n. 13, p. 2133-48, 2016.

Gaur, H.; Purushothaman, S.; Pullaguri, N.; Bhargava, Y.; Bhargava, A. Sodium benzoate induced developmental defects, oxidative stress and anxiety-like behaviour in zebrafish larva. Biochem Biophys Res Commun, v. 502, n.3, p. 264-369, 2018.

Gören, A.C.; Bilsel, G.; Şimşek, A.; Bilsel, M.; Akçadağ, F.; Topal, K.; Ozgen, H. HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. Food Chem., v. 175, p. 273-279, 2015.

Govari, M.; Pexara, A. Nitrates and nitrites in meat products. J. Hellenic Vet. Med. Soc., v. 66, p. 127–140, 2015.

Grings, M., Moura, A. P., Amaral, A. U., Parmeggiani, B., Gasparotto, J., Moreira, J. C. F., Leipnitz, G. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease, v. 1842, n. 9, p. 1413–1422, 2014.

Grings, M., Moura, A. P., Amaral, A. U. et al. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification: Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease, v. 1842, n. 9, p. 1413–1422, 2014.

Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Marcowich, G.F., Amaral, A.U., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., Leipnitz, G. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency : Gene, v. 531, n. 2, p. 191-8, 2013.

Grivennikova, V.G., Kozlovsky, V.S., and Vinogradov A.D., 2017, Respiratory complex II: ROS production and the kinetics of ubiquinone reduction: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1858, p. 109-117.

Haut, S., Brivet M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J.M., Boutron, A., Legrand, A., Slama, A., 2003, A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis: Human Genetics, v. 113, n. 2, p.118–122.

Hebels, D.G.; Briedé, J.J.; Khampang, R.; Kleinjans, J.C., Kok, T.M. Radical mechanisms in nitrosamine- and nitrosamide-induced whole-genome gene expression modulations in Caco-2 cells. Toxicol Sci., v.116, n.1, p.194-205, 2010.

Hekimi, S.; Wang, Y.; Noe, A. Mitochondrial ROS and the effectors of the intrinsic apoptotic pathway in aging cells: the discerning killers. Front. Genet., v. 7, p. 161, 2016.

Herrmann, S.S.; Granby, K.; Duedahl-Olesen, L. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. Food Chem., v. 174, p. 516-526, 2015.

Hiramitsu, M.; Shimada,Y.; Kuroyanagi, J.; Inoue, T.; Katagiri, T.; Zang, L.Q.; Nishimura, Y.; Nishimura, N.; Tanaka, T. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. Scientific Reports, v. 4, p. 11, 2014.

Hirst J., and Roessler, M.M., 2016, Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I: Biochim Biophys Acta,. v. 1857, n. 7, p. 872-83.

Hobbs, C. A., Swartz, C., Maronpot, R., Davis, J., Recio, L., Hayashi, S.M., 2012,. Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti: Food and Chemical Toxicology, v. 50, n. 3-4, p. 854-860.

Hord, N.G.; Tang, Y.; Bryan, N.S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. Am J Clin Nutr., v. 90, n.1, p.1-10, 2009.

Howe, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

Ichimura, S.; Nakamura, Y.; Yoshida, Y.; Hattori, A. Hypoxanthine enhances the cured meat taste. Anim Sci J., v. 88, n. 2, p. 379-385, 2016. doi: 10.1111/asj.12625.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Câncer no estomago. Disponível em:https://www.inca.gov.br/alimentacao/carnes-processadas Acesso em: 15/10/2018.

Jaeschke, H.; Ramachandran, A. Oxidant Stress and Lipid Peroxidation in Acetaminophen Hepatotoxicity. React Oxyg Species (Apex), v. 5, n. 15, p. 145–158, 2018.

Jakszyn, P.; Gonzalez, C.A.Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence.World J Gastroenterol.; v. 12, n. 27, p. 4296-303, 2006.

Johnson-Winters, K; Tollin, G; Enemark, J.H. Elucidating the catalytic mechanism of sulfite oxidizing enzymes using structural, spectroscopic, and kinetic analyses. Biochemistry, v. 49, p. 7242-7254, 2010.

Kapil, V., Weitzberg, E., Lundberg, J.O., and Ahluwalia, A. Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health. Nitric Oxide, v.38, p.45–57, 2014.

Kencebay, C.; Derin, N.; Ozsoy, O.; Kipmen-korgun, D.; TanrioveR, G.; Ozturk, N.; Basaranlar, G.; Yargicoglu-akkiraz, P.; Sozen, B.; Agar, A. Merit of quinacrine in the decrease of ingested sulfite-induced toxic action in rat brain. Food Chem. Toxicol., v. 52, p. 129-136, 2013.

Kim, N.H.; Seol, J.E.; Kim, J.; Lee, B.H.; Hwang, D.Y.; Jeong, J.; Lee, H.J.; Ahn, Y.O.; Kim, D.H.; Lee, J.E. Red meat intake, CYP2E1 and PPARγ polymorphisms, and colorectal cancer risk. Eur J Cancer Prev., v. 26, 2018.

Kimmel, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

Kinth, P.; Mahesh, G.; Panwar, Y. Mapping of zebrafish research: a global outlook. Zebrafish, v. 10, n. 4, p. 510-7, Dec 2013. ISSN 1545-8547.

Klein, J.M; Schwarz, G. Cofactor-dependent maturation of mammalian sulfite oxidase links two mitochondrial import pathways. J. Cell Sci., v.125 , p. 4876-4885, 2012.

Kluckova, K., Bezawork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., Neuzil, J., 2012, Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents: Biochim Biophys Acta, v. 1827, n. 5, p. 552-64.

Konrad, S.P.; Farah, V.; Rodrigues, B.; Wichi, R.B.; Machado, U.F.; Lopes, H.F.; D'Agord Schaan, B.; De Angelis, K.; Irigoyen, M.C. Monosodium glutamate neonatal treatment induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. In: Clinics v. 67, n. 10, p. 1209-1214, 2012.

Kowaltowski, AJ., 2018, Strategies to detect mitochondrial oxidants: Redox Biol., v. 21.

Kremer, L.S., L'Hermitte-Stead, C., Lesimple, P., et al., 2016, Severe respiratory complex III defect prevents liver adaptation to prolonged fasting: Journal of Hepatology, v. 65, n. 2, p. 377–385.

Kroemer, L. et al. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.Cell Death Differ, v. 16, p. 3-11, 2009.

Kyeongnam, K.; Chi-Hwa, W.; Yong, S.O.; Sung-Eun, L. Heart developmental toxicity by carbon black waste generated from oil refinery on zebrafish embryos (Danio rerio): Combined toxicity on heart function by nickel and vanadium. Journal of Hazardous Materials, v. 363, p. 127-1375, 2019.

Lamarino, L. Z.; Oliveira, M.C.; Antunes, M.M.; Oliveira, M.; Rodrigues, R.O.; Zanin, C.I.C.B. et al. Nitritos e nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. Gestão Foco, v. 7, p. 246-251, 2015.

Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture., v 269, p. 1–20, 2007.

Leclercq, C.; et al. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. Food Additives and Contaminants, v. 17, n. 12, p. 979-989, 2000.

Leite, A.C.R., Oliveira, H.C.F., Utino, F.L., Garcia, R., Alberici, L.C., Fernandes, M.P., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2010, Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1797, p. 1210-1216.

Leite, C. E. et al. Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larvae: toxicological and pharmacological applications. Anal Biochem, v. 421, n. 2, p. 534-40, 2012.

Letts, J. A., Fiedorczuk, K., Sazanov, L. A, 2016, The architecture of respiratory supercomplexes: Nature, v. 537, n. 7622, p. 644–648.

Leonard, S.S.; Harris,G.K.; Shi, X. “Metal-induced oxidative stress and signal transduction,” Free Radical Biology and Medicine, vol. 37, no. 12, pp. 1921–1942, 2004.

Li, J., Jia, W., Zhao, Q., 2014, Excessive nitrite affects zebrafish valvulogenesis through yielding too much NO signaling: PLoS One.; v. 9, n. 3, p. 92728.

Loureiro, L.L.; Santos, G.B. Nitrato: suplementação, fontes dietéticas e efeitos na performance. Revis. Bras. Nutri. Func., v. 71, p.7-16, 2017.

Lundberg, J.O.; Govoni, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. Free Radic. Biol. Med., v.37, p.395–400, 2004.

Lundberg, J.O., Carlström, M., Larsen, F.J., and Weitzberg, E. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. Cardiovasc. Res, v.89, p. 525–532, 2011.

Lundberg, J.O.; Carlström, M.; Weitzberg, E. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. Cell Metab., v.28, p.9-22, 2018.

Mahmoud, A. A. T. et al. Demonstrating adverse effects of a common food additive (sodium sulfite) on biochemical, cytological and histopathological parameters in tissues of albino Wister rats. European Journal of Integrative Medicine, v. 7, n. 3, p. 234-242, 2015.

Mani-López, E.; Palou, E.; López-malo, A. Preservatives: Classifications and Analysis. Encyclopedia of Food and Health, p.497–504, 2016.

Mårtensson, C.U.; Doan, K.N.; Becker, T. Effects of lipids on mitochondrial functions. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, v. 1862, n. 1, p.102-113, 2017.

Martindale, J.L.; Holbrook, N.J. “Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival,” Journal of Cellular Physiology, vol. 192, no. 1, pp. 1–15, 2002.

Martyn, D.M.; McNulty, B.A.; Nugent, A.P.; Gibney, M.J. Food additives and preschool children. Proc Nutr Soc., v. 72, n. 1, p. 109-116, 2013.

McBride, H.M.; Neuspiel, M.; Wasiak, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. Curr Biol., v. 16, n. 14, p. 551–560, 2006.

McGarry, T., Biniecka, M., Veale, D.J., Fearon, U., 2018, Hypoxia, oxidative stress and inflammation: Free Radic Biol Med., v. 125, p.15-24.

Mehta, A.V., Chidambaram, B., 1992, Ventricular septal defect in the first year of life. Am J Cardiol, v. 70, p. 364-366.

Meyer, J.N., Leung, M.C., Rooney, J.P., Sendoel, A., Hengartner, M.O., Kisby, G.E., Bess, A.S., 2013, Mitochondria as a target of environmental toxicants: Toxicol. Sci, v.134, n. 1, p. 1-17.

Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira.2a. Brasília (DF): 2014.

Miranda, L.E.C. et al., 2005, A atividade respiratória mitocondrial é um bom parâmetro para a lesão por isquemia e reperfusão hepática. Arq. Gastroenterol., v. 42, n. 2, p. 89-94.

Mondini, L.; Monteiro, C.A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira. Rev. Saúde Pública, v. 28, n. 6, p. 433-439, 1994.

Monteiro, C.A., 2009, Nutrition and health. The issue is not food, nor nutrients, so much as processing: Public Health Nutr., v. 12, n. 5, p. 729–731.

Monteiro, C.A., Moubarac, J.C. Cannon, G.; Ng, S.W.; Popkin, B., 2013, Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system: Obes Rev., v. 14, p. 21–28.

Morán, M., Marín-Buera, L., Gil-Borlado, M. C., Rivera, H., Blázquez, A., Seneca, S., Vázquez-López, M., Arenas, J., Martín, M.A., Ugalde, C., 2010, Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency:Human Mutation, v.31, n. 8, p.930–941.

Moubarac, J.C., Parra, D.C., Cannon, G., Monteiro, C.A., 2014, Food classification systems based on food processing: significance and implications for policies and actions: a systematic literature review and assessment: Curr Obes Rep., v. 3, n. 2, p. 256–272.

Murphy, M.P., 2009, How mitochondria produce reactive oxygen species: Biochem. J., v. 417, p. 1–13.

Nelson, D.L.; Michael M.COX. Princípios de bioquímica de Lehninger. David L. Nelson, Michael M. Cox. Porto Alegre: Artmed, 6º ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Nie, A., and Meng, Z, 2005, Study of the interaction of sulfur dioxide derivative with cardiac sodium channel : Biochim Biophys Acta, v. 1718, n. 1-2, p. 67-73.

Nik, S. H. M.; et al. The Comparison of Methods for Measuring Oxidative Stress in Zebrafish Brains. Zebrafish, v. 11, n. 3, p. 248-254, 2014.

Niknahad H; O'Brien, P.J. Mechanism of sulfite cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. Chem. Biol. Interact., v.174, p. 147-154, 2008.

Noble, S., Godoy, R., Affaticati, P., Ekker, M., 2015, Transgenic Zebrafish Expressing mCherry in the Mitochondria of Dopaminergic Neurons: Zebrafish., v. 12, n. 5, p. 349-56.

Noorafshan, A.; Asadi-golshan, R.; Karbalay-doust, S.; Abdollahifar, M.A.; Rashidiani-rashidabadi, A. Curcumin, the main part of turmeric, prevents learning and memory changes induced by sodium metabisulfite, a preservative agent, in rats. Exp. Neurobiol., v. 22, p. 23-30, 2013.

Norat, T.; Bingham, S.; Ferrari, P. et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. J Natl Cancer Inst., v. 97, n. 12, p. 906-916, 2005.

Oliveira M.S.; Silva-Amparo, L. Food-based dietary guidelines: a comparative analysis between the Dietary Guidelines for the Brazilian Population 2006 and 2014. Public Health Nutr., v. 21, n. 1, p. 210-217, 2018.

Oliveira, S.P. Changes in food consuption in Brazil. Arch. Latinoamer. Nutr., v. 47, n. 2 supl.1, p. 22-44, 1997.

Oxenoid, K.; Dong, Y.; Cao, C.; Cui, T.; Sancak, Y.; et al. Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. Nature, v. 533, p. 269–273, 2016.

Ozturk, N.; Yargicoglu, P.; Derin, N.; Akpinar, D.; Agar, A.; Aslan, M. Dose-dependent effect of nutritional sulfite intake on visual evoked potentials and lipid peroxidation. Neurotoxicol. Teratol., v. 33, p. 244-254, 2011.

Pan American Health Organization Ultra-processed food and drink products in Latin America: trends, impact on obesity, policy implications. Washington (DC): Pan American Health Organization; 2015.

Parrini, E., Conti, V., Dobyns, W.B., Guerrini, R., 2016, Genetic Basis of Brain Malformations: Mol Syndromol., v. 7, n. 4, p. 220-233.

Pasquali, P. The importance of animal models in research. Research in Veterinary Science, v.118, p 144-145, 2018.

Pereira, Benedito. Biogenêse mitocondrial e exercício físico: hipótese do acoplamento elétrico-transcripcional. Rev. bras. educ. fís. esporte, v. 29, n. 4, p. 687-703, 2015.

Pereira, S.P., Fernandes, M.A.S, Martins , J.D., Santos, M.S., Moreno, A.J.M., Vicente, J.A.F., Videira, R.A., and Jurado, A.S., 2009, Toxicity assessment of the herbicide metolachlor comparative effects on bacterial and mitochondrial model systems: Toxicology in Vitro, v. 23, p. 1585-1590.

Pinho, B.R.; Santos, M.M.; Fonseca-Silva, A.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Oliveira, J.M. How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development and cardiovascular function: an in vivo model for testing mitochondria-targeted drugs. Br J Pharmacol., v. 169, n. 5, p.1072-90, 2013.

Pinho, B.R.S.D.; Reis, P.; Guedes-Dias, A.; Leitao-Rocha, C.; Quintas, P.; Valentao, P.B.; Andrade, M.; Santos, M.; Oliveira, J.M.A. Pharmacological modulation of HDAC1 and HDAC6 in vivo in a zebrafish model: Therapeutic implications for Parkinson's disease: Pharmacological Research, v. 103, p. 328-339, 2016.

Pogoda, J. M.; Preston-martin, S. Maternalbcured meat consumption during pregnancy and risk ofbpediatric brain tumor in offspring: potentially harmful levels of intake. Public Health Nutr., v.4, n.2, p.183-189, 2001.

Polônio, M.L.T; Peres, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. Cad. Saúde Pública. v.25, n.8, p. 1653-1666, 2009.

Popolim, WD. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta. (Tese de mestrado). São Paulo (São Paulo): Universidade de São Paulo; 2004.

Preston-martin, S. et al Maternal consumption of cured meats and vitamins in relation to pediatric brain tumors. Cancer Epidemiol., Biomakers Prev., v.5, p.599-605, 1996.

Proenca, R.P.C. Alimentação e globalização: algumas reflexões. Cienc. Cult., v. 62, n. 4, p. 43-47, 2010.

Quinlan, C.L.; Orr, A.L.; Perevoshchikova, I.V.; Treberg, J.R.; Ackrell, B.A.; Brand, M.D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. The Journal of Biological Chemistry, v. 287, p. 27255–27264, 2012.

Ramana, K.V.; Srivastava, S.; Singhal, S.S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease. Oxid Med Cell Longev., 2014, 2163285, 2014.

Raymundo, M.M.; Goldim, J.R. Ética em pesquisa em modelos animais. Bioética, v.10, n.1, p. 31-44, 2002.

Rea, P., 2015 Hindbrain (Rhombencephalon). Essential Clinical Anatomy of the Nervous System.

Reed, B. e Jennings, M. Guidance on the housing and care of Zebrafish Danio rerio. Res Anim Dep Sci Group RSPCA, p. 1–27, 2011.

Resende, A.L.S; Mattos, I. E; Koifman, S. Dieta e câncer gástrico: aspectos históricos associados ao padrão de consumo alimentar no estado do Pará. Rev. Nutr., v.19, 4, p. 511- 519, 2006.

Ribeiro, H.; Jaime, P.C.; Ventura, D. Alimentação e sustentabilidade. Estud. av., v. 31, n. 89, p. 185-198, 2017.

Rongvaux, A. et al. Apoptotic Caspases Suppress mtDNA-Induced STING-Mediated Type I IFN Production on mitochondrial DNA. Cell, v.159, p. 1549-1562, 2014.

Rosa, C.E.; et al. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, v. 149, n. 1, p. 209-214, 2008.

Rotig, A. Genetic bases of mitochondrial respiratory chain disorders. Diabetes Metab., v. 36, p. 97- 107, 2010.

Rustin, P., 2002, Mitochondria, from cell death to proliferation: Nat. Genet., v. 30, p. 352–353.

Sahin, N., Pirinc, B., Turkoglu, S., 2015, In vivo Genotoxicity assessment of some food preservatives in Drosophila melanogaster with the comet assay: Fresenius Environmental Bulletin, v. 24, n. 6A, p. 2138-2145.

Sandhi, M.B.; Pinheiro, A.R.O.; Sichieri, R.; Monteiro, C.A.; Filho, M.B.; Schimidt, M.I. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. Epidemiol Serv Saúde, v. 14, p. 41-68, 2005.

Santos, C.R.A. A alimentação e seu lugar na história: Os tempos da memória gustativa. História: Questões & Debates, v. 42, 2005.

Sarasamma, S.; Varikkodan, M.M.; Liang, S.T.; Lin, Y.C.; Wang, W.P.; Hsiao, C.D. Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario. Zebrafish, v. 4, n. 6, p. 589-605, 2017.

Sarasija, S.; Norman, K.R. A gamma-secretase independent role for presenilin in calcium homeostasis impacts mitochondrial function and morphology in Caenorhabditis elegans. Genetics., v. 201, 2015.

Schlesinger, R.B. Sulfur Oxides. Comprehensive Toxicology , v. 15, p. 403-415, 2018.
Shami, N.J.I.E.; Moreira, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. Rev Nutr., v. 17, n.2, p. 227-36, 2004.

Semak, I., Naumova, M., Korik, E., Terekhovich, V., Wortsman, J., Slominski, A, 2005, A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome C: Biochemistry, v. 44, p. 9300–9307.

Sena, L.A.; and Chandel, N.S., 2012, Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species: Mol Cell, v. 48, n. 2, p.158-67.

Shpaizer, A.; Nussinovich, A.; Kanner, J.; Tirosh, O. S-Nitroso-N-acetylcysteine Generates Less Carcinogenic N-Nitrosamines in Meat Products than Nitrite. J. Agric. Food Chem., v. 66, n. 43, p. 11459-11467, 2018.

Sindelar, J.J.; Milkowski, A.L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. Nitric Oxide., v. 26, n. 4, p.:259-266, 2012.

Simmons, A.E., Karimi, I., Talwar, M., Simmons, T.W., 2012, Effects of nitrite on development of embryos and early larval stages of the zebrafish (Danio rerio): Zebrafish, v.9, n. 4, p. 200-206.

Sinha, N., Dabla, P.K., 2015, Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review: Curr Hypertens Rev., v. 11, n. 2, p.132-42.

Sobko, T.; Reinders, C.I.; Jansson, E. A.; Norin, E.; Midtvedt, T.; Lundberg, J.O. Gastrointestinal bacteria generate nitric oxide from nitrate and nitrite. Nitric Oxide, v. 13, n. 4, p. 275-278, 2005.

Song, P.; Wu, L.; Guan, W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. Nutrients., v.7, n. 12, p. 9872-95, 2015.
Spivak, G.C. An aesthetic education in the era of globalization. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 2012.

Somero, G.N., Lockwood, B.L., Tomanek, L., 2017, Biochemical Adaptation: Response to Environmental Challenges from Life's Origins to the Anthropocene, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.

Spodick, D.H., 2003, Acute cardiac tamponade: The New England Journal of Medicine, v. 349, n. 7, p. 684–690.

Steele, S. L.; Prykhozhij, S. V.; Berman, J. N. Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases. Transl Res, v. 163, n. 2, p. 79-98,2014.

Streisinger, G.; et al. "Production of clones of homozygous diploid zebrafish (Brachydanio rerio). Nature, v. 291, n 5813, 1981.

Tahara, E.B., Navarete, F.D.T., and Kowaltowski, A. J., 2009, Tissue substrate and site specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation: Free Radical Biology and Medicine, v. 46, p. 1283-1297.

Tavares, B.; Santos Lopes, S. The importance of Zebrafish in biomedical research. Acta Med Port., v.26, n. 5, p. 583-92, 2013.

Tardido, A.P; Falcão, M.C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. Rev Bras Nutr Clin. v.21, n.2, p.117- 24, 2006.

Tomaska, L.D., and Brooke-Taylor, S., 2014, Food Additives: Food Additives – General. v. 2, p. 449-454.

Ton, C; Lin, Y.; Willett, C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol., v.76, n. 7, p. 553-67, 2007.

van der Bliek, A.M.; Sedensky, M.M.; Morgan, P.G. Cell Biology of the Mitochondrion. Genetics, v. 207, n. 3, p. 843-871, 2017.

Vanhatalo, A.; Blackwell, J. R.; L'Heureux, J. E.; Williams, D. W.; Smith, A.; van der Giezen, M.; Jones, A.M. Nitrate-responsive oral microbiome modulates nitric oxide homeostasis and blood pressure in humans. Free Radic. Biol. Med., n. 124, p. 21–30, 2018.

Velayutham, M., Hemann, C., Zweier, J.L., 2011 ,Removal of H(2)O(2) and generation of superoxide radical: role of cytochrome c and NADH: Free. Radic. Biol. Med., v. 51, p.160–170.

Velayutham, M., Hemann, C.F., Cardounel, A.J., Zweier, J.L., 2016, Sulfite Oxidase Activity of Cytochrome c: Role of Hydrogen Peroxide: Biochem Biophys Rep., v.5, p. 96-104.

Vincent, A.S., Lim, B.G., Tan, J., Whiteman, M., Cheung, N.S., Halliwell, B., Wong, K.P., 2004, Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells: Kidney Int., v. 65, p. 393–402.

Wallace, D.C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. Environ Mol Mutagen, v. 51, n. 5, p. 440-50, 2010.

Walters, J. W., D. Amos, K. Ray, and N. Santanam. Mitochondrial redox status as a target for cardiovascular disease. Curr Opin Pharmacol, v. 27, p. 50-5, 2016.

Warris, P. D. Ciência de la carne. Saragoza: Acribia, 2003.

WHO. Q&A on the carcinogenicity of the consumption of red meat and processed meat. WHO. http://www.who.int/features/qa/cancer-red-meat/en/ Acesso em: 13.05.2018.

WHO. World Health Organisation. Evaluation of certain food additives (Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, n. 891, 2000.

Wyse, A.T.S., Grings, M.; Wajner ,M.; Leipnitz, G, 2019, The Role of Oxidative Stress and Bioenergetic Dysfunction in Sulfite Oxidase Deficiency: Insights from Animal Models. Neurotox Res., v.35, n. 2, p. 484-494.

Yee, C.; Yang, W.; Hekimi, S. The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in C. elegans. Cell, v. 157, p. 897–909, 2014.

Yoshida, M. Nakagawa, R. Hosomi, T. Nishiyama, K. Fukunaga. Low molybdenum state induced by tungsten as a model of molybdenum deficiency in rats, Biol. Trace Elem. Res., v.165, n.1, p. 75-80, 2015.

Zadja, J. International handbook on globalisation, education and policy research. In: White, W. (Ed.). International handbook on globalisation, education and policy research: global pedagogies and policies. Dordrecht, Netherlands, 2005.

Zhang, X., Vincent , A.S., Halliwell, B., Wong, K.P, 2004, A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase: J. Biol. Chem., v.279,p. 43035–43045.

Zhao, X., Ren, X., Zhu, R., Luo, Z., Ren, B., 2016, Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos: Aquat Toxicol., v. 180, p. 56-70.

Zorov, D.M.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. Physiol Rev., v. 94, n. 3, p. 909–950, 2014.

Zorova, L.D.; Popkov, V.A.; Plotnikov, E.Y.; Silachev, D.N.; Pevzner, I.B.; Jankauskas, S.S.; Babenko, V.A.; Zorov, S.A.; Balakireva, A.V.; Juhaszova, M.; Sollott, S.T.; Zorova, D.B. Mitochondrial membrane potential. Anal Biochem., v. 552, p. 50–59, 2018.

Zorzetto, R.; Guimarães, M. Um peixe modelo. Pesqui. Fapesp, 2013.

ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMEITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 17 de julho de 2018

Ofício nº 68/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Ranilson de Souza Bezerra**
Centro de Biociencias
Departamento de Bioquimica
Universidade Federal de Pernambuco
Processo **nº 23076.011093/2018-57**

Certificamos que a proposta intitulada "**Potencial teratogênico e indutor de estresse oxidativo mitocondrial de aditivos alimentares contra embriões do zebrafish (Danio rerio).**", Registrada com o **nº 23076.011093/2018-57** sob a responsabilidade de **Prof. Ranilson de Souza Bezerra** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 04/07/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2017 - dezembro de 2018
Espécie/linhagem/raça	Peixe - embriões
Nº de animais	----------
Peso/Idade	2.5 hpf até 7.hpf
Sexo	----------
Origem	Recife Aquários

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691
UFPE