

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUN TAE LANGUINOTTI DOS SANTOS VIANA

METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS E DE PROTEÍNAS EM
Astyanax lacustris SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

CURITIBA

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUN TAE LANGUINOTTI DOS SANTOS VIANA

METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS E DE PROTEÍNAS EM
Astyanax lacustris SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profª Drª Lucélia Donatti

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Languinotti dos Santos Viana, Sun Tae.

Metabolismo energético de carboidratos e de proteínas em *Astyanax lacustris* submetidos a estresse térmico agudo. / Sun Tae Languinotti dos Santos Viana. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Lucélia Donatti.

1. Resposta ao Choque Térmico. 2. Carboidratos. 3. Análise multivariada. 4. Otimização. 5. Espectrofotometria. I. Donatti, Lucélia, 1964-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **SUN TAE LANGUINOTTI DOS SANTOS VIANA**, intitulada: **Metabolismo energético de carboidratos e de proteínas em *Astyanax lacustris* submetidos a estresse térmico agudo**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Julho de 2025.

Assinatura Eletrônica

02/07/2025 15:36:45.0

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/07/2025 17:42:43.0

KATYA NALIWAICO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/07/2025 11:55:39.0

ANSELMO CHAVES NETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Neste momento de conclusão de uma etapa em minha trajetória acadêmica, percebo o quanto fui agraciado e ajudado neste percurso, bem como em toda a minha vida. Se hoje estou vivo e bem, tenho que agradecer aos Pais Celestiais. Se cresci e tive acesso a educação, devo isso aos meus pais e principalmente a minha mãe que fez de tudo para que eu chegasse até aqui e ser quem eu sou. Se tenho algum conhecimento, devo aos meus professores e a todas as pessoas que compartilharam seus saberes comigo. Se estou concluindo meu mestrado, devo agradecer a minha orientadora que me deu suporte e me ensinou, e aos meus colegas de laboratório que me ajudaram e aos amigos da pós graduação, bem como todos os professores que me ensinaram o que eu sei hoje. Faltariam páginas para citar a todos que me ajudaram a estar concluindo este mestrado, pois eu só estou aqui pela ajuda de cada pessoa ao longo de minha vida. Como bem disse Isaac Newton: *“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes”*, todo conhecimento que desenvolvemos só é possível porque estamos sobre o fundamento de nossos predecessores. Da mesma forma, se estou aqui hoje, foi por estar sobre o fundamento de meus antepassados e contemporâneos. Por isso sou profundamente grato a todos, e aos muitos que não cito, mas que carrego em meu coração o respeito e gratidão. Obrigado.

RESUMO

Organismos aquáticos, em especial que habitam rios e pequenos afluentes de águas, estão mais expostos a variações térmicas se comparados a grandes porções hidrográficas, afetando mais facilmente a ictinofauna presente. Como organismos ectotérmicos, a temperatura é o principal fator abiótico que interfere no desenvolvimento de peixes, e mudanças que extrapolam a faixa de temperatura adequada à espécie levam a uma condição de estresse térmico implicando mudanças no equilíbrio de suas atividades bioquímicas, moleculares e fisiológicas. Neste contexto, o estresse térmico sofrido por peixes e sua consequente perda da homeostase, tem repercussão desde a capacidade de ingestão de alimentos até os processos digestivos, a eficiência na absorção de nutrientes e ao estoque do excedente de energia. Com o objetivo de avaliar como uma condição de choque térmico agudo em alta temperatura afeta o metabolismo de carboidratos e proteínas em *Astyanax lacustris*, o presente trabalho fez uso de método espectrofotométrico para inferir a atividade enzimática de 8 biomarcadores (hexoquinase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, citrato sintase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, glutamato desidrogenase) do metabolismo energético, amostrados no encéfalo, fígado, músculo e brânquias desse peixe, em 5 tempos de exposição ao estresse térmico (2, 6, 12, 24 e 48 horas). O Encéfalo apresentou um aumento da atividade enzimática em todos os biomarcadores analisados, com exceção de alanina aminotransferase, em um primeiro momento. O órgão que teve maior prejuízo em sua atividade metabólica em relação aos respectivos controles foram as brânquias, possivelmente por estar mais exposta ao meio externo e a desnaturalização proteica. Enzimas como lactato desidrogenase e glutamato desidrogenase apresentaram aumento em sua atividade em todos os tempos analisados no fígado quando comparadas aos seus controles em temperatura de aclimação. Dentre as inúmeras metodologias de inferência da atividade enzimática as baseadas em espectrofotometria são amplamente utilizadas. Baseado nisso este trabalho propôs uma metodologia de otimização do cálculo da atividade enzimática de dados provenientes da leitura de microplacas pelo espectrofotômetro, baseado na seleção do grupo ótimo de leituras respeitando as restrições metodológicas da literatura através do use de sliding window. Foi encontrado diferenças significativas entre o algoritmo proposto e os cálculos manuais para determinação da porção linear da curva de absorbância, no slope resultante e consequentemente na atividade enzimática para as amostras analisadas.

Palavras-chave: Choque térmico; Carboidratos; Análise Multivariada; Otimização; Espectrofotômetro; Sliding window.

ABSTRACT

Aquatic organisms, particularly those inhabiting rivers and small water tributaries, are more exposed to thermal fluctuations compared to those in larger hydrographic systems, which more readily affects the local ichthyofauna. As ectothermic organisms, temperature is the main abiotic factor influencing fish development, and deviations beyond the optimal thermal range for a given species result in thermal stress, leading to disturbances in the balance of their biochemical, molecular, and physiological processes. In this context, thermal stress experienced by fish and the consequent loss of homeostasis can impact a wide range of biological functions, from food intake and digestion to nutrient absorption efficiency and energy storage. With the aim of evaluating how acute high-temperature thermal shock affects carbohydrate and protein metabolism in *Astyanax lacustris*, this study employed a spectrophotometric method to infer the enzymatic activity of eight biomarkers (hexokinase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, citrate synthase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and glutamate dehydrogenase) related to energy metabolism. These were assessed in the brain, liver, muscle, and gills of the fish at five different thermal stress exposure durations (2, 6, 12, 24, and 48 hours). The brain exhibited increased enzymatic activity across all analyzed biomarkers, except for alanine aminotransferase, at the initial stages. The gills showed the most significant impairment in metabolic activity compared to the respective control groups, likely due to their greater exposure to the external environment and consequent protein denaturation. Enzymes such as lactate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase exhibited increased activity at all time points in the liver when compared to the control groups maintained at acclimation temperature. Among the various methods for inferring enzymatic activity, spectrophotometric approaches are widely used. Based on this, the present study proposed an optimization methodology for calculating enzymatic activity from microplate readings obtained via spectrophotometry. This method was based on the selection of the optimal set of readings, adhering to methodological constraints reported in the literature, through the use of a sliding window approach. Significant differences were observed between the proposed algorithm and manual calculations in determining the linear portion of the absorbance curve, the resulting slope, and consequently the enzymatic activity of the analyzed samples.

Keywords: Thermal shock; Carbohydrates; Multivariate analysis; Optimization; Spectrophotometry; Sliding window.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1 –	DESENHO ESQUEMÁTICO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
FIGURA 2 –	FLUXO DE TRABALHO PARA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
FIGURA 3 –	FLUXO DE TRABALHO PARA ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	31
FIGURA 4 –	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE <i>Astyanax lacustris</i> EXPOSTOS A UM CHOQUE TÉRMICO....	36
FIGURA 5 –	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE <i>Astyanax lacustris</i> EXPOSTOS A UM CHOQUE TÉRMICO ...	37
FIGURA 6 –	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE <i>Astyanax lacustris</i> EXPOSTOS A UM CHOQUE TÉRMICO ...	38
FIGURA 7 –	HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NO ENCÉFALO	40
FIGURA 8 –	HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NO FÍGADO	41
FIGURA 9 –	HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NA BRÂNQUIA	42
FIGURA 10 –	HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NO MÚSCULO	43

CAPÍTULO II

FIGURA 1 –	LEITURA DE MICROPLACAS NO ESPECTROFOTÔMETRO.....	62
FIGURA 2 –	NÚMERO DE CONJUNTOS VÁLIDOS POSSÍVEIS EM FUNÇÃO DO INTERVALO ENTRE LEITURAS E O TEMPO TOTAL NO ESPECTROFOTÔMETRO	66
FIGURA 3 –	SELEÇÃO DOS SUBCONJUNTOS PELO SLIDING WINDOWS	70
FIGURA 4 –	JANELA COM SUBCONJUNTO ÓTIMO EM CURVA DE ABSORBÂNCIA EM AMOSTRA DE ENCÉFALO DE <i>Astyanax lacustris</i> PARA ENZIMA CS.....	73
FIGURA 5 –	JANELA COM SUBCONJUNTO ÓTIMO EM CURVA DE ABSORBÂNCIA EM AMOSTRA DE ENCÉFALO DE <i>Astyanax lacustris</i> PARA ENZIMA G6PDH	74
FIGURA 6 –	JANELA COM SUBCONJUNTO ÓTIMO EM CURVA DE ABSORBÂNCIA EM AMOSTRA DE BRÂNQUIA DE <i>Astyanax lacustris</i> PARA ENZIMA CS.....	75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Níveis de significância entre os animais expostos a choque térmico em relação aos grupos controles nas brânquias.....	44
Tabela 2 – Níveis de significância entre os animais expostos a choque térmico em relação aos grupos controles no encéfalo.....	45
Tabela 3 – Níveis de significância entre os animais expostos a choque térmico em relação aos grupos controles no fígado.....	46
Tabela 4 – Níveis de significância entre os animais expostos a choque térmico em relação aos grupos controles no músculo.....	47

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Pseudocódigo do algoritmo de seleção de subconjunto para inferência da atividade enzimática.....	71
---	----

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina de soro bovina

CS – Citrato Sintase

DTNB – 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

g – Gramas (unidade de massa)

G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GLDH – Glutamato Desidrogenase

h – Horas

H₂O – Água

HK – Hexoquinase

L – Litro

LDH – Lactato Desidrogenase

MDH – Malato Desidrogenase

mg – Miligrama

mM – Milimolar

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

nm – Nanômetro

pH – Potencial Hidrogeniônico

TGO – Transaminase Glutâmico-Oxalacética (Aspartato Aminotransferase)

TGP – Transaminase Glutâmico-Pirúvica (Alanina Aminotransferase)

U – Unidade internacional

UFPR – Universidade Federal do Paraná

µg – Microgramas

µL – Microlitro

µmol – Micromol

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius (unidade de temperatura)

Δ – Variação (diferença entre dois valores)

λ – Comprimento de onda (usado em espectrofotometria)

μ – Micro (prefixo para 10^{-6} , como em μL ou μg)

μM – Micromolar (concentração de 10^{-6} mol/L)

ρ – Densidade (massa por unidade de volume)

σ – Desvio padrão (estatística)

ϵ – Coeficiente de extinção molar (usado em espectrofotometria)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. O aumento da temperatura e a taxa de reações metabólicas.....	15
2.2. Metabolismo energético de carboidratos.....	16
2.3. Ciclo de Krebs.....	17
2.4. Metabolismo de proteínas.....	18
2.5. Estatística Multivariada.....	18
2.6. Método espectrofotométrico e cálculo da atividade enzimática.....	19
3. REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO I -	
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Coleta e aclimatação dos animais.....	27
3.2. Delineamento/arranjo experimental.....	28
3.3. Procedimentos analíticos.....	29
3.3.1 Determinação das enzimas do metabolismo energético de carboidratos.....	31
3.3.2. Determinação das enzimas do metabolismo energético de proteínas.....	32
3.4. Análises Estatísticas.....	32
3.4.1. PERMANOVA	32
3.4.2. Heatmap	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Atividade Enzimática Dos Biomarcadores	34
4.1.1. Encéfalo	34
4.1.1. Fígado	34
4.1.1. Brânquia	35
4.1.1. Músculo	35
4.2. Dinâmica Temporal Da Atividade Enzimática Dos Biomarcadores.....	38
4.2.1. Heatmap	38

4.2.1.1. Encéfalo	38
4.2.1.2. Fígado	40
4.2.1.3. Brânquia	41
4.2.1.4. Músculo	42
4.1. Validação da PERMANOVA	43
5. DISCUSSÃO.....	48
5.1. Comportamento Dos Órgãos Analisados	48
5.1.1. Encéfalo	48
5.1.2. Brânquias	49
5.1.3. Fígado	50
5.1.4. Músculo	51
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO II -	
1. INTRODUÇÃO	59
1.1 OBJETIVO GERAL	59
1.2 Objetivos específicos	59
1.3 Estrutura do trabalho	60
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	60
2.1. Método Espectrofotométrico de inferência da Atividade Enzimática.....	60
2.2. Espectrofotometria de microplacas.....	61
2.2. Otimização.....	62
2.2. Janelas Deslizantes (Sliding Windows).....	63
3. APLICAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO NA INFERÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	64
3.1. Número de soluções possíveis.....	64
3.2. Otimização da Inferência da atividade enzimática baseada no método espectrofotométrico	66
4. ALGORITMO.....	68
4.1. Seleção Dos Subconjuntos Usando Sliding Windows.....	68
4.2. Solução computacional.....	71
5. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS.....	72
5.1. Comparação Dos Resultados Do Algoritmo Com A Leitura Do Espectrofotômetro.....	72

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
7. REFERÊNCIAS.....	77
REFERÊNCIAS GERAIS.....	80

1. INTRODUÇÃO GERAL

A metabolização de compostos para obtenção de energia é um processo fundamental para a sobrevivência e adaptação dos organismos vivos, sendo regulado por uma complexa rede de vias bioquímicas que envolvem carboidratos, lipídios e proteínas. Para os peixes, que estão imersos em um ambiente aquoso com características próprias de condução de energia, esse processo é particularmente sensível a variações ambientais, como mudanças de temperatura, que podem alterar a homeostase e induzir respostas fisiológicas e bioquímicas significativas (ALBERTS et al., 2017; RØNNESTAD & VOLKOFF, 2020). A compreensão dessas respostas metabólicas é essencial para elucidar como os organismos aquáticos se adaptam a condições adversas, como o estresse térmico, que pode acelerar o catabolismo de carboidratos e proteínas, alterando a atividade enzimática e a disponibilidade de energia (SOMERO, 2010; IBARZ et al., 2010; HUANG et al., 2018).

O estudo de biomarcadores que possam nos indicar a dinâmica das alterações metabólicas nos possibilita ter uma ferramenta para entender como as alterações ambientais, em especial as alterações térmicas, tem influência na fisiologia e bioquímica destes organismos. Dentre os biomarcadores conhecidos, a inferência da atividade enzimática surge como uma ferramenta interessante para avaliar as alterações metabólicas em diferentes tecidos e órgãos, visto que fazem parte direta das reações metabólicas envolvidas. Métodos espectrofotométricos têm sido amplamente utilizados para medir a atividade enzimática devido à sua simplicidade, sensibilidade e capacidade de fornecer dados quantitativos precisos (BERGMEYER, 1974; WHITAKER, 1994). Estes métodos baseiam-se na Lei de Beer-Lambert, que estabelece uma relação linear entre a absorbância de uma solução e a concentração do analito, permitindo a determinação indireta da atividade enzimática por meio da taxa de formação do produto ou consumo do substrato (WARBURG & CHRISTIAN, 1942).

No entanto, a precisão dos resultados espectrofotométricos depende da seleção adequada de pontos consecutivos que representem a porção linear da curva de absorbância, garantindo que a velocidade inicial da reação seja calculada com exatidão. Tradicionalmente, essa seleção é feita manualmente, mas o avanço de técnicas automatizadas, como o uso de algoritmos para análise de dados, tem

otimizado esse processo, especialmente em ensaios de alta produtividade realizados em microplacas (DUGGLEBY, 1995). A otimização do cálculo da atividade enzimática é, portanto, essencial para aumentar a confiabilidade e a eficiência dos ensaios bioquímicos.

Neste trabalho, buscamos explorar duas vertentes complementares: (1) a avaliação das alterações no metabolismo de carboidratos e proteínas, do peixe dulcícola *Astyanax lacustris* em resposta ao estresse térmico, utilizando a inferência da atividade enzimática de biomarcadores do metabolismo energético por espectrofotometria; e (2) a otimização do cálculo da atividade enzimática por meio da seleção do melhor subconjunto de pontos consecutivos que atendam aos critérios de linearidade e intervalo de tempo adequado utilizando sliding window. Ao integrar essas abordagens, esperamos contribuir para o avanço do conhecimento sobre as respostas metabólicas de peixes a mudanças ambientais e para o refinamento de metodologias bioquímicas aplicadas à pesquisa em biologia molecular e ecologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O AUMENTO DA TEMPERATURA E A TAXA DE REAÇÕES METABÓLICAS

A temperatura pode ser descrita como a medida da energia cinética média das partículas de um corpo ou sistema, indicando seu estado térmico. Quando dois corpos com diferentes temperaturas entram em contato, o calor flui do corpo mais quente para o corpo mais frio até que ambos atinjam o equilíbrio térmico (BEJAN, 2019; SULLIVAN & SPENCER, 2022; TASAKI, 2024).

Neste contexto, quando ocorre o aumento da temperatura do ambiente em relação a um organismo, significa que a energia térmica média das partículas no ambiente está mais alta do que a desse corpo, e essa energia térmica é transferida a ele buscando um equilíbrio do sistema (TASAKI, 2024).

Em organismos endotérmicos, como nós humanos, existem mecanismos adaptativos para manter uma temperatura corporal constante mesmo com as transferências de calor, envolvendo vários processos fisiológicos e comportamentais que visam regular o balanço de calor no organismo. Para os peixes, em especial os ectotérmicos, sua temperatura corporal varia de acordo com o ambiente externo, não conseguindo regular de forma eficiente a temperatura interna através de

processos fisiológicos de forma independente do meio externo. (SÁEZ-ARTEAGA et al., 2024).

O calor recebido pelo organismo proveniente do meio externo não representa diretamente uma energia livre, isto é, não está disponível para realizar trabalho. Entretanto, o acréscimo da temperatura aumenta a energia cinética das moléculas, o que, por sua vez, aumenta a frequência e a energia das colisões entre as moléculas reagentes podendo acelerar as taxas de reações metabólicas, fazendo com que aumente a probabilidade de as moléculas atingirem a energia de ativação necessária para que a reação ocorra. Dessa forma, o aumento de colisões efetivas facilita a ocorrência de reações, inclusive aquelas catalisadas por enzimas (ALBERTS et al., 2017).

Por outro lado, como enzimas são proteínas elas possuem uma estrutura tridimensional que permite a elas catalisarem reações específicas, e o aumento excessivo da temperatura pode as desestabilizar levando a desnaturação, isto é, a perda de sua estrutura tridimensional. Assim durante a exposição a uma alta temperatura existe uma relação entre o aumento da taxa de reação e o risco de desnaturação que se comportam de maneira diferente entre as espécies (DELONG et al., 2017; EĞILMEZ & HASPOLAT, 2024).

2.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS

A hexoquinase (HK) é a primeira enzima da via glicolítica, e fosforila a glicose transformando-a em glicose 6-fosfato (BOITEUX et al., 1981), o que impede a saída da glicose da célula, sendo uma molécula importante por ser um intermediário usado em várias vias metabólicas. Além disso, a atividade da HK é regulada por feedback negativo via glicose-6-fosfato (LOGATO et al. 2009; Fields & Somero, 1998). A HK é uma das 3 enzimas que fazem a regulação alostérica da glicólise, junto com a fosfofrutoquinase-I (PFK) e a piruvato quinase (PK) (NELSON & COX, 2018) sendo estas, enzimas de reações irreversíveis. A PFK converte a frutose 6-fosfato em frutose 1,6-difosfato em velocidade que refletirá na velocidade total da glicólise. A PK é a última reação da via glicolítica transformando a molécula de fosfoenol piruvato em piruvato. Em situações em que as células musculares não são supridas suficientemente de oxigênio ocorre o processo de fermentação láctica que então converte o piruvato a lactato através da enzima lactato-desidrogenase (LDH) que

reduz o carbono 2 do piruvato passando de cetona para álcool com o auxílio de NADH (BARREIROS et al. 2012). Essa reação é vital para regenerar NAD⁺ e manter o fluxo glicolítico, especialmente em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio. A isoforma predominante da LDH pode influenciar o comportamento metabólico celular, sendo frequentemente regulada em processos adaptativos (Fields & Somero, 1998).

Os peixes armazenam o excedente de glicose ingerido na forma de glicogênio, polimerizando a glicose, sendo encontrado principalmente no fígado e músculos, como uma forma de guardar parte da energia consumida (CYRINO et al., 2000; LOGATO et al. 2009). Estes estoques podem ser mobilizados pela enzima glicogênio fosforilase (GP) para uso na célula, produzindo glicose 1-fosfato (NELSON & COX, 2018). Em condições de jejum prolongado em que o glicogênio reservado no fígado e músculos não são suficientes para manter o nível de concentração de glicose no sangue e em tecidos que tem a glicose como única fonte de energia, ao invés de aminoácidos ou lipídios, o organismo recorre a utilização de compostos não glicídicos, ou seja, de precursores não provenientes de carboidratos, para realizar a síntese de glicose em um processo de anabolismo chamado gliconeogênese. A enzima glucose 6-phosphatase (G6Pase) converte a glucose 6-phosphate em glicose na presença de água liberando um grupo fosfato (BARREIROS et al. 2012; LOGATO et al. 2009).

Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é uma enzima presente na fase oxidativa da via das pentoses que converte a glicose 6-fosfato em 6-fosfogluconolactona na presença do íon magnésio com o auxílio de NADP (BARREIROS et al. 2012).

2.3. CICLO DE KREBS

O ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), é um conjunto central de reações metabólicas na mitocôndria que desempenha um papel essencial no metabolismo energético das células aeróbicas. Ele converte acetil-CoA, ponto inicial do ciclo, em energia química na forma de NADH e FADH₂, convergindo o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Esses cofatores reduzem e fornecem elétrons para a cadeia

transportadora de elétrons, onde ocorre a síntese de ATP, a principal moeda energética celular.

O ciclo é fundamental não apenas para a produção de energia, mas também para funções anabólicas, como a biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e outras moléculas precursoras essenciais. Além disso, o ciclo de Krebs é regulado por condições celulares, incluindo disponibilidade de substratos e feedback de produtos intermediários, garantindo a adaptação às demandas metabólicas variáveis.

A citrato sintase (CS), enzima inicial do ciclo, atua como um ponto de controle regulatório, sensível à disponibilidade de substratos e inibição por feedback do citrato acumulado (NELSON & COX, 2018). A enzima malato desidrogenase (MDH) é responsável pela conversão reversível de malato em oxaloacetato, utilizando NAD^+ como cofator. Sua atividade é essencial para a regeneração do oxaloacetato, o que permite a continuidade do ciclo e a manutenção de fluxos metabólicos. A MDH também está envolvida em reações anapleróticas, contribuindo para a flexibilidade metabólica em estados de alta demanda energética (NELSON & COX, 2018).

2.4. METABOLISMO DE PROTEÍNAS

O catabolismo de proteínas em peixes, do metabolismo de aminoácidos, começa com a secreção de ácido clorídrico (HCL), pepsinogênio, que posteriormente é convertido em pepsina, e gastrina no estômago. Até o intestino todas as proteínas já foram quebradas em aminoácidos que são absorvidos e chegam ao fígado através da circulação sanguínea. (BARREIROS et al. 2012).

A enzima alanina-aminotransferase (ALT) cataliza o processo de conversão da alanina mais α -Cetoglutamato em piruvato mais glutamato. A aspartato-aminotransferase (AST) transfere para o oxaloacetato um grupamento amina, provenientes do glutamato, formando a molécula de aspartato. A enzima glutamato-desidrogenase (GLDH) catalisa a oxidação de glutamato pelo NAD^+ ou NADP^+ resultando na molécula de Imina (BARREIROS et al. 2012).

2.5. ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

A análise multivariada é uma técnica estatística que possibilita examinar múltiplas variáveis simultaneamente e que é frequentemente utilizada em estudos

ecológicos, biológicos e sociais (DRAY & JOMBART, 2011; PALIY & SHANKAR, 2016). Diferentemente da análise univariada, que avalia apenas uma variável por vez, esta técnica considera o possível relacionamento entre as variáveis e fornece uma visão mais abrangente dos padrões nos dados. Essa metodologia é particularmente útil quando há alta interdependência entre as variáveis, ou melhor, quando se busca explorar relações complexas em grandes conjuntos de dados (EDWARDS et al., 2011).

Na análise univariada, o foco está na descrição ou na inferência baseada em uma única variável, como na ANOVA, onde se testa a diferença de médias entre grupos considerando a única variável observada. Já a análise multivariada, como MANOVA ou análises baseadas em distâncias, examina simultaneamente múltiplas respostas, proporcionando conhecimento sobre correlações, dependências e padrões multidimensionais. Além disso, enquanto métodos univariados frequentemente assumem distribuições normais, análises multivariadas como PERMANOVA são mais robustas e podem lidar com dados não paramétricos (DRAY & JOMBART, 2011; EDWARDS et al., 2011).

A PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) é uma técnica baseada em permutações que utiliza matrizes de distâncias para comparar diferenças entre grupos. A principal vantagem da PERMANOVA é a flexibilidade, pois não assume distribuições normais e pode lidar com estruturas complexas de amostragem.

Outra técnica importante são as matrizes de correlação, pois resumem a relação entre variáveis. Em muitos casos, como na análise de componentes principais (PCA), essas matrizes são usadas para identificar variáveis redundantes e reduzir a dimensionalidade dos dados. Quando combinadas com métodos como PERMANOVA, permitem explorar como variáveis ambientais influenciam padrões biológicos, sendo amplamente aplicadas em ecologia e biologia molecular.

2.6. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO E CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Existem diversas maneiras de inferir a atividade enzimática em modelos biológicos, dentre às quais os baseados no uso de dados espectrofotométricos são amplamente utilizados. Sua determinação, por tais métodos, geralmente consiste em

mensurar a alteração na absorbância de um componente específico a determinada substância em função do tempo, utilizando-se a porção linear da curva que descreve a taxa de alteração em função do tempo (BOECKX et al., 2017), sendo está diretamente relacionada à atividade da enzima estudada.

Lei de Beer-Lambert é a base fundamental para a quantificação espectrofotométrica, estabelecendo uma relação linear entre a absorbância de uma solução e a concentração da substância que absorve luz. Essa lei, expressa pela equação $A = \epsilon * c * l$, onde A é a absorbância, ϵ é o coeficiente de extinção molar, c é a concentração e l é o caminho óptico, permite a determinação precisa de concentrações de analitos em soluções. Na prática, a espectrofotometria é amplamente utilizada em ensaios bioquímicos, como a inferência da atividade enzimática, onde mudanças na absorbância são monitoradas ao longo do tempo para avaliar a conversão de substrato em produto. Por exemplo, em reações que envolvem NADH, que absorve fortemente a 340 nm, a diminuição ou aumento da absorbância nesse comprimento de onda reflete diretamente a atividade da enzima (BERGMEYER, 1974).

No monitoramento espectrofotométrico de reações enzimáticas, a curva gerada pelo equipamento geralmente apresenta três fases distintas: a fase lag, a fase linear e a fase de platô. A fase lag corresponde ao período inicial em que a reação está se estabelecendo, com pouca ou nenhuma mudança na absorbância. Em seguida, a fase linear, que é a mais crítica para a determinação da atividade enzimática, reflete uma taxa constante de conversão do substrato, permitindo o cálculo da velocidade da reação ($\Delta A / \Delta t$). Finalmente, a fase de platô ocorre quando o substrato se esgota ou a enzima satura, resultando em uma estabilização da absorbância. Essas fases são claramente observadas em leituras de microplacas, onde a espectrofotometria de alta throughput é empregada para análises enzimáticas em larga escala (JOHNSON, 2016). A capacidade de identificar e analisar essas fases é essencial para a caracterização cinética de enzimas e para o desenvolvimento de ensaios enzimáticos robustos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 6. ed. New York: Garland Science, 2017.
- BARREIROS, A. L. S.; BARREIROS, M. L. **Química de biomoléculas**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe/CESAD, 2012.
- BEJAN, A. Thermodynamics of heating. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 475, n. 2223, p. 20180820, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspa.2018.0820>. Acesso em: 9 fev. 2025.
- BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1974.
- BOITEUX, A.; HESS, B. Design of glycolysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, v. 293, p. 5–22, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.1981.0056>. Acesso em: 15 fev. 2025.
- CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; MARTINO, R.C. Retenção de proteína e energia em juvenis de "black bass" *Micropterus salmoides* **Scientia Agricola**, v.57, p.609–616, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162000000400003>. Acesso em: 25 de mar. 2025.
- DELONG, J. P. et al. The combined effects of reactant kinetics and enzyme stability explain the temperature dependence of metabolic rates. *Ecology and Evolution*, v. 7, n. 11, p. 3940–3950, 23 abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ece3.2955>. Acesso em: 06 fev. 2025.
- DRAY, S.; JOMBART, T. Revisiting Guerry's data: introducing spatial constraints in multivariate analysis. **The Annals of Applied Statistics**, v. 5, n. 4, p. 2278–2299, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1202.6485>. Acesso em: 10 abr. 2025.
- DUGGLEBY, R. G. Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. **Methods in Enzymology**, 1995. 249, 61–90. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)49031-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)49031-0). Acesso em: 28 fev. 2025.
- EDWARDS, K. R. et al. A comparison of univariate and multivariate methods for analyzing clinal variation in an invasive species. **Hydrobiologia**, v. 674, n. 1, p. 119–131, 24 maio 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0732-2>. Acesso em: 03 abr. 2025.
- EĞİLMEZ, H. I.; HASPOLAT, E. Temperature-Dependent Parameters in Enzyme Kinetics: Impacts on Enzyme Denaturation. **Fundamental Journal of Mathematics and Applications**, v. 7, n. 4, p. 226–235, 31 dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.33401/fujma.1517334>. Acesso em: 10 mar. 2025.

HUANG, J.; KANG, Y.; LI, Y.; LIU, Z.; WANG, J. Transcriptomic responses to heat stress in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 82, p. 32–40, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.002>. Acesso em: 10 mar. 2025.

IBARZ, A. et al. Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 155, n. 3, p. 319–326, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.012>. Acesso em: 3 jan. 2025.

LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C.; SILVEIRA, U. S. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, p. 817–836, 2009.

FIELDS, P. A.; SOMERO, G. N. Hot spots in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A 4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 19, p. 11476–11481, 15 set. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11476>. Acesso em: 12 fev. 2025.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**. 7ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2018.

PALIY, O.; SHANKAR, V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1032–1057, 26 fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mec.13536>. Acesso em: 23 mar. 2025.

RØNNESTAD, I.; VOLKOFF, H. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. **Temperature**, v. 7, p. 307–320, 2020. DOI: 10.1080/23328940.2020.1765950. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23328940.2020.1765950>. Acesso em: 12 abr. 2025.

SÁEZ-ARTEAGA, A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; SANZ, A.; DELGADO, M. J. Thermal adaptation in ectotherms: physiological and biochemical responses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 287, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.111352>. Acesso em: 10 dez. 2025.

SOMERO, G. N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 912–920, 26 fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>. Acesso em: 02 fev. 2025.

SULLIVAN, G.; SPENCER, M. Heat and temperature. **BJA Education**, v. 22, n. 9, p. 350–356, set. 2022.

TASAKI, H. Heat flows from hot to cold: A simple rigorous example of thermalization in an isolated macroscopic quantum system. **arXiv:cond-mat/0009206**, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2404.04533>. Acesso em: 23 jan. 2025.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, p. 384–421, 1942.

WHITAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food sciences*. New York: Marcel Dekker, 1994.

CAPÍTULO I – METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS E DE PROTEÍNAS EM *Astyanax lacustris* SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

RESUMO

Astyanax lacustris são peixes de pequeno porte com ampla distribuição geográfica na América do Sul que habitam rios e pequenos afluentes de águas que estão mais expostos a variações térmicas se comparados a grandes porções hidrográficas, afetando mais facilmente a ictiofauna presente. Para manter a vida, a obtenção de energia é uma atividade essencial, e assim como todo organismo heterótrofo a alimentação para os peixes é fundamental como o início dos processos de catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios visando a obtenção de energia para todas suas atividades fisiológicas. Assim, para compreender aspectos sobre os ajustes do metabolismo de carboidratos e de proteínas de *Astyanax lacustris* quando expostos a uma condição de mudança abrupta e extrema da temperatura do meio em diferentes períodos de exposição, este trabalho se faz uso de biomarcadores enzimáticos do metabolismo de carboidratos e de proteínas através da inferência de sua atividade enzimática por método espectrofotométrico nos órgãos do encéfalo, fígado, brânquias e músculos visando elucidar aspectos ainda não esclarecidos na literatura. Para isso, experimentou-se cinco tempos de exposição (2h, 6h, 12h, 24h e 48 horas) a uma condição de choque térmico a alta temperatura (31°C) em comparação a uma condição de controle a temperatura padrão (21°C), com 12 réplicas para cada tratamento. Ajustes metabólicos foram observados nos quatro órgãos analisados e ocorreram em taxas de variações diferentes em relação aos seus respectivos controles. O encéfalo demonstrou um aumento da atividade glicolítica e da via das pentoses fosfato, sugerindo uma resposta rápida para suprir a demanda energética e lidar com o estresse oxidativo, priorizando as vias rápidas de geração de ATP. As flutuações nas principais enzimas energéticas nas brânquias sugerem ajuste fino e transitório da glicólise, fermentação e resposta antioxidante, com ativação pontual do metabolismo de aminoácidos, possivelmente como via energética secundária. No fígado, observou-se uma estratégia distinta, com predomínio do catabolismo de aminoácidos e estabilidade da via oxidativa mitocondrial, apontando para um papel regulador e conservador desse órgão na redistribuição de recursos energéticos. Por fim, o músculo esquelético apresentou um perfil adaptativo evidente, com aumento da LDH e CS, indicando tanto o uso de vias anaeróbicas quanto uma adaptação mitocondrial para suportar o aumento da demanda energética.

Palavras-chave: Peixes de água doce, Choque térmico; Temperatura; Carboidratos; PERMANOVA

1. INTRODUÇÃO

A obtenção e utilização de energia são processos essenciais para a sobrevivência e o funcionamento eficiente dos organismos vivos. Nos peixes, o metabolismo energético é sustentado principalmente pela degradação de carboidratos, lipídios e proteínas, que fornecem as bases energéticas para processos vitais, como crescimento, reprodução e adaptação ao ambiente (ALBERTS et al. 2017; PALMA 2023).

Com ampla distribuição na América do Sul, *Astyanax lacustris* (LÜTKEN 1875) (Família: Characidae) é um peixe dulcícola e de pequeno porte que possui um hábito onívoro e oportunista, conhecido vulgarmente como Lambari do Rabo Amarelo (ANDRADE et al. 2016), que hoje engloba também as antigas espécies *Astyanax altiparanae*, *Astyanax jacuhiensis*, e *Astyanax asuncionensis* como sinônimos após a revisão feita por LUCENA e SOARES (2016).

Organismos aquáticos estão submetidos a diferentes fatores ambientais, dentre eles a temperatura. Grandes massas de água caracterizadas, por exemplo, pelos ambientes marinhos, geralmente são mais estáveis em relação a mudanças de temperatura do que tributários de água doce, nos quais a ictiofauna é mais afetada, pois experimenta variações de temperatura em maiores níveis do que os animais marinhos (DIJIK et al., 2004). O rompimento da condição de homeostase em que os peixes estão submetidos pode ser chamada de estresse, e esta alteração induz um conjunto de mudanças no organismo e na sua regulação fisiológica (BALDISSEROTTO et al. 2014).

Devido a serem ectotérmicos e de não alterarem a temperatura corporal por processos fisiológicos, fazendo com que a temperatura de seu habitat seja igual ou muito próxima a sua, a temperatura constitui o principal fator abiótico capaz de afetar o desenvolvimento dos peixes (GUDERLEY 2003; ISLAM et al. 2021; RØNNESTAD & VOLKOFF, 2020). Desta forma alterações na temperatura além da faixa adequada para a espécie podem afetar a capacidade dos peixes de equilibrar suas atividades bioquímicas, moleculares e fisiológicas resultando em mudanças no organismo em decorrência do estresse térmico que variam conforme o tempo de exposição a ela submetida, a intensidade da mudança térmica e se esta variação ocorreu de forma abrupta ou gradual (HUANG et al., 2018; LU et al., 2016; RØNNESTAD & VOLKOFF, 2020).

A elevação da temperatura pode acelerar o catabolismo de carboidratos, aumentando a taxa de glicólise e a entrada de piruvato no ciclo do ácido cítrico. Entretanto, sob estresse térmico prolongado, proteínas podem ser mobilizadas para suprir a demanda energética crescente, em um processo que envolve o aumento da atividade proteolítica e a consequente liberação de aminoácidos para a gliconeogênese ou oxidação direta no ciclo de Krebs (SOMERO, 2010; IBARZ et al., 2010).

A demanda energética em situações de estresse térmico varia significativamente entre diferentes tecidos e órgãos devido às suas funções específicas e necessidades metabólicas. Estudos em crustáceos, como o camarão *Mantis oratosquilla oratória* (DE HAAN, 1844), mostram que o músculo foca na degradação proteica e no metabolismo energético para lidar com estresse térmico, podendo refletir a necessidade de energia desse tecido para ter uma resposta rápida de fuga a uma situação de estresse térmico. As brânquias de peixes ajustam rapidamente os transportes de íons e proteínas relacionadas ao estresse para manter o equilíbrio osmótico e respiratório sob altas temperaturas, com impacto direto no consumo de energia.

Biomarcadores são uma importante ferramenta para compreender os ajustes que ocorrem no metabolismo energético, visto que ele é um processo complexo e sistêmico, mostrando alterações em pontos cruciais das vias metabólicas relacionadas a metabolização de carboidratos e de proteínas. Isto nos permite visualizar mudanças em resposta ao estresse térmico quando comparadas a uma situação controle em cada tecido trabalhado (SHARMA; CHADHA; SHARMA, 2021).

Contudo, os órgãos e tecidos não atuam de forma isolada durante situações de estresse térmico. Existe uma relação complexa e coordenada entre os sistemas corporais para lidar com a demanda energética e os desafios impostos. Essa interação é mediada por sinais metabólicos, hormonais e neuronais, que integram as respostas de diferentes órgãos (DELGADO et al. 2017; WILSON & METZLER-WILSON, 2018).

2. OBJETIVOS

Compreender os ajustes fisiológicos no metabolismo energético de carboidratos e proteínas observados em *Astyanax lacustris* decorrentes de uma

condição de aumento abrupto e extremo da temperatura do meio (31° C) em diferentes períodos de exposição (2h, 6h, 12h, 24h e 48 horas) avaliados através da inferência da atividade enzimática por método espectrofotométrico a partir de tecidos do encéfalo, fígado, brânquias e músculo em relação a uma condição de temperatura adequada para espécie (21°C) tida como controle.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se os ajustes do metabolismo de carboidratos e de proteínas diferem significativamente entre os peixes em condição de estresse térmico (choque térmico a 31°C) com os do grupo controle (21°C) nos diversos tempos de exposição testados através dos biomarcadores;
2. Compreender se os ajustes do metabolismo de carboidratos e de proteínas ocorrem em taxas proporcionais de alterações em relação ao controle em cada órgão estudado neste trabalho (encéfalo, fígado, brânquias e músculos) e se apresentam diferenças significativas em relação aos biomarcadores avaliados;
3. Identificar qual foi o tempo de exposição ao choque térmico com maior mudança na atividade enzimática;
4. Compreender do ponto de vista energético como o metabolismo de *Astyanax lacustris* lida com uma situação de estresse térmico de forma abrupta;
5. Avaliar a aplicabilidade da análise multivariada para estudos similares, e sua validação por meio de testes paramétricos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram adquiridos 120 espécimes (comprimento total (CT) médio: 8,54 cm; comprimento padrão (CP) médio: 6,99 cm; peso médio: 10,404 g) de *Astyanax lacustris* provenientes de cultivo aquícola no município de União da Vitória – PR, mais especificamente no Centro de Pesquisa e Extensão em Aquicultura Ildo Zago. A coleta foi feita com redes e os peixes transferidos para tanque com temperatura constante de 21° C e com aeração constante, mantidos por 72 horas para

aclimação sob regime nutricional de 1% da média da massa corporal de ração comercial por peixe ao dia.

3.2. DELINEAMENTO/ARRANJO EXPERIMENTAL

Este projeto estudou o metabolismo de *Astyanax lacustris* submetidos a cinco tempos de exposição a duas temperaturas.

O experimento foi conduzido com um delineamento com dois fatores. O primeiro fator é a temperatura com $c = 2$ níveis: 31°C e 21°C. Já o segundo fator é o tempo de exposição com $r = 5$ níveis: 2h, 6h, 12h, 24h e 48h. A unidade experimental é o peixe *Astyanax lacustris*. O tamanho da amostra foi de $n = 120$ unidades experimentais alocadas de forma aleatória na matriz de ordem 5×2 contendo réplicas de tamanho $m = 12$ em cada casela. E, foram observadas cinco respostas no experimento, ou seja, taxas proporcionais de alterações em relação ao controle em cada órgão estudado neste trabalho (encéfalo, fígado, brânquias e músculos). Considerando-se os quatro órgãos estudados registrou-se 480 valores como resposta, $i = 1, \dots, c$, $j = 1, \dots, r$, e $k = 1, \dots, m$, resultando em $2 \times 5 \times 12 \times 4 = 480$. O fator principal considerado é o tempo de exposição e fator da temperatura é composto pela temperatura de exposição (31°C) e a temperatura de controle (21°C) (FIGURA 1).

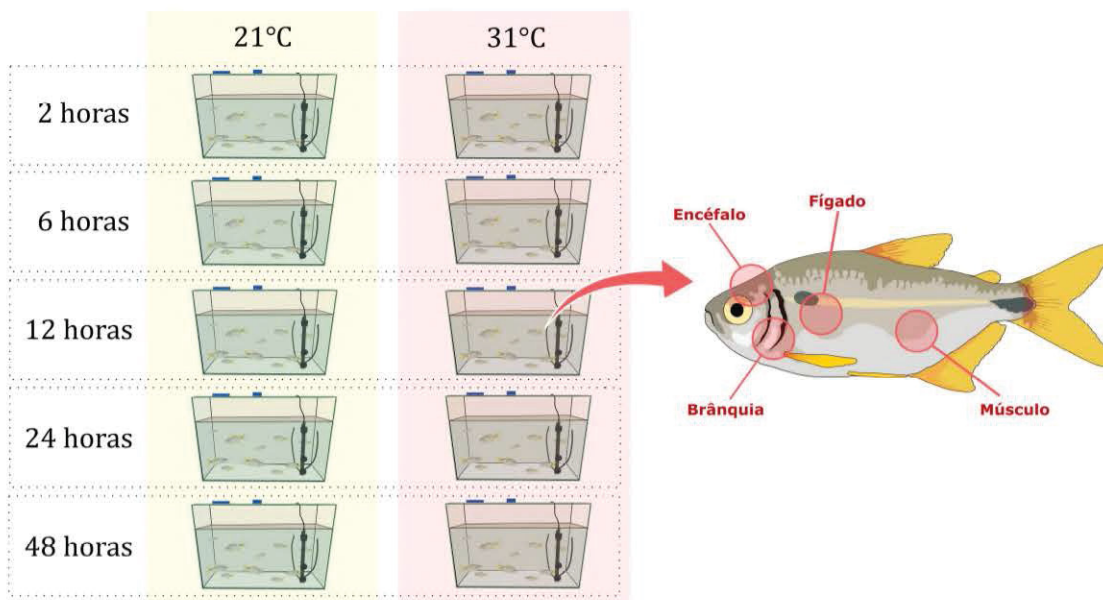
Ao final, para cada amostra, foi feito triplicadas em microplacas para análise na leitura do espectrofotômetro, onde posteriormente é feito sua média para o cálculo da atividade enzimática.

Para garantir o princípio da casualidade os animais de cada tratamento foram selecionados de forma aleatória, provenientes do mesmo tanque de aclimação. Utilizou-se 10 aquários de 50 litros cada qual com um tratamento e, portanto, 12 peixes por aquário, mantendo sua respectiva temperatura específica e aeração constantes analisando os parâmetros de: temperatura (21 ± 0.05), pH (7.4 ± 0.05), oxigênio dissolvido (7.5 ± 0.5 mg/L), amônia (0.08 mg/L), nitrato (0.00 mg/L), nitrito (0.00 mg/L).

Após receber os tratamentos experimentais os animais foram conduzidos para receberem um anestésico em solução de 1% de benzocaína (p v – 1), onde foi realizado a eutanásia pela secção medular e dissecados imediatamente e os órgãos

do encéfalo, coração e fígado retirados e conservados em nitrogênio líquido. Nas 24 horas prévias a isto foi administrado a última alimentação dos peixes.

FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



FONTE: O Autor (2025)

LEGENDA: Após 3 dias de aclimação dos peixes em temperatura de 21°C, eles foram transferidos de forma randomizada para 10 aquários de 50 litros com aeração constante, contendo 12 animais por aquário, sendo 5 aquários com temperatura constante de 21°C e 5 aquários com temperatura constante de 31°C.

A licença ambiental para a coleta de animais foi obtida via Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio), sob número 63551-1. Já a licença de experimentação animal foi obtida através da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO/UFPR), sob números 1228 e 1228C.

3.3. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

As amostras de tecido dos órgãos coletados (encéfalo, fígado, músculo e brânquias) foram cortadas em fragmentos menores e pesadas em uma balança de precisão, obtendo uma massa aproximada de 0,1 g. O peso exato de cada amostra foi anotado para normalização dos dados posteriores. Cada amostra foi transferida para um tubo tipo eppendorf de 2 mL, e adicionou-se um volume de tampão Tris 50 mM (pH 7,4) correspondente a 5 vezes a massa do tecido (ou seja, 500 µL para 0,1 g de tecido). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de

microesferas (beads) em um homogeneizador, sendo uma esfera por tubo, sendo os tubos vedados com parafilme para impedir o extravasamento do líquido (FIGURA 2).

FIGURA 2– FLUXO DE TRABALHO PARA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS



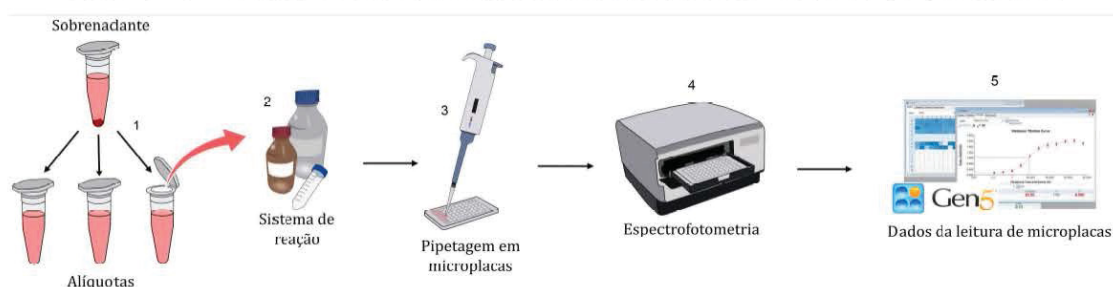
FONTE: O autor (2025)

LEGENDA: Representação esquemática do trabalho para preparação das amostras para as análises do metabolismo energético. 1 – Corte e pesagem das amostras para cada órgão; 2 – Adição de tampão Tris-HCl pH 7,4 (50 mM) em tubos tipo eppendorf de 2 mL e das microesferas beads; 3 – Homogeneização das amostras com o tampão e os beads; 4 – Sonicação até atingir 18 J; 5 – Centrifugação para separar o sobrenadante dos pellets.

Após a homogeneização, o parafilme e os beads foram retirados dos tubos, e as amostras foram sonicadas utilizando um sonicador de ponta (Sonicador Sonics Vibra-Cell VCX130 PB) com pulsos intermitentes até atingir uma energia total de aproximadamente 18 J. Durante a sonicação, manteve-se as amostras em banho de gelo para evitar degradação térmica. As amostras foram então centrifugadas a 10.260 rpm por 10 minutos a 4°C em uma centrífuga refrigerada, como mostrado na FIGURA 2.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para tubos do tipo eppendorfs de 1,5 mL separando-o em alíquotas, evitando a transferência de qualquer pellet ou debris (FIGURA 3). Os tubos foram identificados e congelados verticalmente a -20°C e, posteriormente, armazenados a -80°C para preservação a longo prazo. Cada tubo foi identificado com informações como tipo de tecido, tipo de tratamento e data de coleta.

FIGURA 3 – FLUXO DE TRABALHO PARA ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA



FONTE: O autor (2025)

LEGENDA: Representação esquemática para as análises do metabolismo energético por método espectrofotométrico a partir do sobrenadante das amostras de tecido. 1 – O sobrenadante de cada tubo é dividido em alíquotas; 2 – Para análise de cada enzima é preparado o sistema de reação adequado conforme metodologia específica; 3 – Pipetagem nas microplacas de 96 ou 384 poços, a depender da metodologia, do sistema de reação e amostra; 4 – leitura espectrofotométrica das microplacas em comprimento de onda conforme metodologia específica; 5 – leitura dos dados pelo software Gen5.

As metodologias para inferência da atividade enzimática de cada biomarcador foram padronizadas com espectrofotometria na leitora de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT, USA). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão, com leitura em microplaca. Os resultados foram utilizados para normalizar os dados da atividade enzimática (FIGURA 3).

3.3.1 Determinação das enzimas do metabolismo energético de carboidratos

A atividade da hexoquinase (HK, E.C. 2.7.1.1) foi determinada pelo método descrito por BALDWIN et al. (2007) que quantifica a redução de NADP⁺ a 340nm. A atividade da citrato sintase (CS, E.C. 4.2.3.7) foi determinada pelo método descrito por SABOROWSKI e BUCHHOLZ (2002), com base na quantificação, a 410 nm, do complexo formado pela Coenzima A (CoA) e 5,5'ditiobis (ácido-2- nitrobenzóico) (DTNB). A atividade da malato desidrogenase (MDH, E.C. 1.1.1) será determinada pelo método descrito por CHILDRESS e SOMERO (1979), onde a oxidação do NADH presente no meio de reação é quantificado a 340nm. A atividade da lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27) foi dosada pelo método proposto por THUESEN et al. (2005), e o decréscimo de absorbância foi observado a 340nm em decorrência da oxidação do NADH. A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase a 600nm (G6PDH, E.C. 1.1.1.49) foi determinada a 340nm em decorrência da redução de NADP⁺ a NADPH pela G6PDH (CIARDELLO et al., 1995).

3.2.1. Determinação das enzimas do metabolismo energético de proteínas

A alanina aminotransferase (ALT, E.C. 2.6.1.2) e aspartato aminotransferase (AST, E.C. 2.6.1.1) foram determinadas segundo REITMAN-FRANKEL (1957). A glutamato desidrogenase (GLDH, E.C. 1.4.1.3) foi determinada segundo CIARDIELLO et al. (2000) e SYED et al. (1990).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi delineado para comparar dois grupos principais: (1) o grupo exposto a uma condição de choque térmico agudo a 31°C e (2) o grupo controle, mantido na temperatura de aclimação prévia de 21°C. Dentro de cada grupo, foram avaliados cinco tempos de exposição: 2, 6, 12, 24 e 48 horas. Para cada combinação de temperatura e tempo de exposição, foram utilizadas 12 réplicas biológicas ($n = 12$ peixes), totalizando 120 peixes. Em cada peixe, foram analisados quatro órgãos (encéfalo, fígado, brânquias e músculo), resultando em 480 amostras. Para cada amostra, a absorbância foi medida em triplicatas utilizando um espectrofotômetro, e a média das triplicatas foi utilizada para a inferência da atividade enzimática. Foram avaliados oito biomarcadores (enzimas diferentes) em cada amostra.

3.4.1. PERMANOVA

Para verificar diferenças significativas na atividade enzimática entre os peixes expostos ao choque térmico e seus respectivos controles, foi realizada uma análise de PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance). Essa análise comparou os tratamentos (choque térmico vs. controle) considerando os fatores temperatura, tempo de exposição, órgão e biomarcador. A PERMANOVA foi executada no software R (versão 4.4.2), utilizando uma matriz de distâncias baseada na atividade enzimática dos oito biomarcadores.

Para visualizar os resultados, foram gerados 64 gráficos de boxplot (8 biomarcadores $\times$ 4 órgãos $\times$ 2 temperaturas) através do software Python (versão 3.13), organizados em três figuras. Esses gráficos ilustram a distribuição da atividade enzimática em função do tempo de exposição e da temperatura para cada

combinação de biomarcador e órgão, bem como a significância estatística obtida pela análise de PERMANOVA.

Para sua validação foi também verificado as diferenças estatísticas entre os peixes expostos ao choque térmico e seus respectivos controles, através da análise da ANOVA two-way (Analysis of Variance bidirecional). Os resultados da PERMANOVA e ANOVA foram organizados em tabelas para sua comparação.

Para garantir os pressupostos de normalidade dos dados e homocedasticidade das variâncias foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Levene respectivamente, através do software R.

3.4.2. Heatmap

Para analisar a dinâmica temporal da atividade enzimática, foram construídos heatmaps. Para isso, calculou-se a média da atividade enzimática para cada grupo (temperatura × tempo × enzima × órgão). Visando a normalização dos dados, permitindo sua comparação, foi determinada sua diferença percentual entre o grupo exposto ao choque térmico e seu respectivo controle, para cada combinação de tempo, enzima e órgão. Essas diferenças percentuais foram organizadas em oito matrizes (uma para cada biomarcador), com cinco colunas representando os tempos de exposição e quatro linhas representando os órgãos. Cada matriz foi utilizada para gerar um heatmap no software R, com uma escala de cores que indica a magnitude da diferença percentual.

O agrupamento dos heatmaps foi feito aplicando-se a técnica de Aglomeração Hierárquica com distância Euclidiana, conforme expressão adiante, com base na taxa de alteração dos biomarcadores em relação aos seus respectivos controles. A função pheatmap do software R calculou a matriz de distâncias entre cada combinação de linhas (órgãos) com base na distância euclidiana ^d. Onde A e B representam linhas distintas, n o número de linhas, e i a i-ésima linha.

$$d(A,B) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (A_i - B_i)^2}$$

A construção do Heatmap se baseou na metodologia utilizada por FANG, L. et al. (2017) e YANG, C. -X. et al. (2017), com adaptações substituindo a correlação de pearson pela taxa de variação.

4. RESULTADOS

Dos 120 peixes do experimento houve 2 mortes (1,67%).

O Resultado da PERMANOVA entre a atividade enzimática dos biomarcadores dos peixes expostos ao choque térmico em relação aos seus respectivos controles e sua significância estatística está organizado nas FIGURAS 4, 5 e 6.

4.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES

4.1.1 Encéfalo

Todos os biomarcadores analisados apresentaram diferença estatística em ao menos um tempo de exposição ao choque térmico, exceto TGP (FIGURA 6E). Com relação aos biomarcadores do metabolismo energético de carboidratos, houve significância na atividade da HK em 12 e 24 horas de exposição (FIGURA 4A), na G6PDH em 24 horas (FIGURA 4E), e na LDH em 6 e 12 horas (FIGURA 4I). Para os biomarcadores do ciclo de Krebs houve diferença significativa em 12 horas para CS (FIGURA 5A), e em 48 horas MDH (FIGURA 5E). Para os biomarcadores do metabolismo energético de proteínas houve diferença nos tempos de 12 horas para TGO (FIGURA 6A), e 6 horas para GLDH (FIGURA 6I). Destas, para MDH, TGO e GLDH a diferença representou uma diminuição da atividade enzimática em seus respectivos tempos.

4.1.2 Fígado

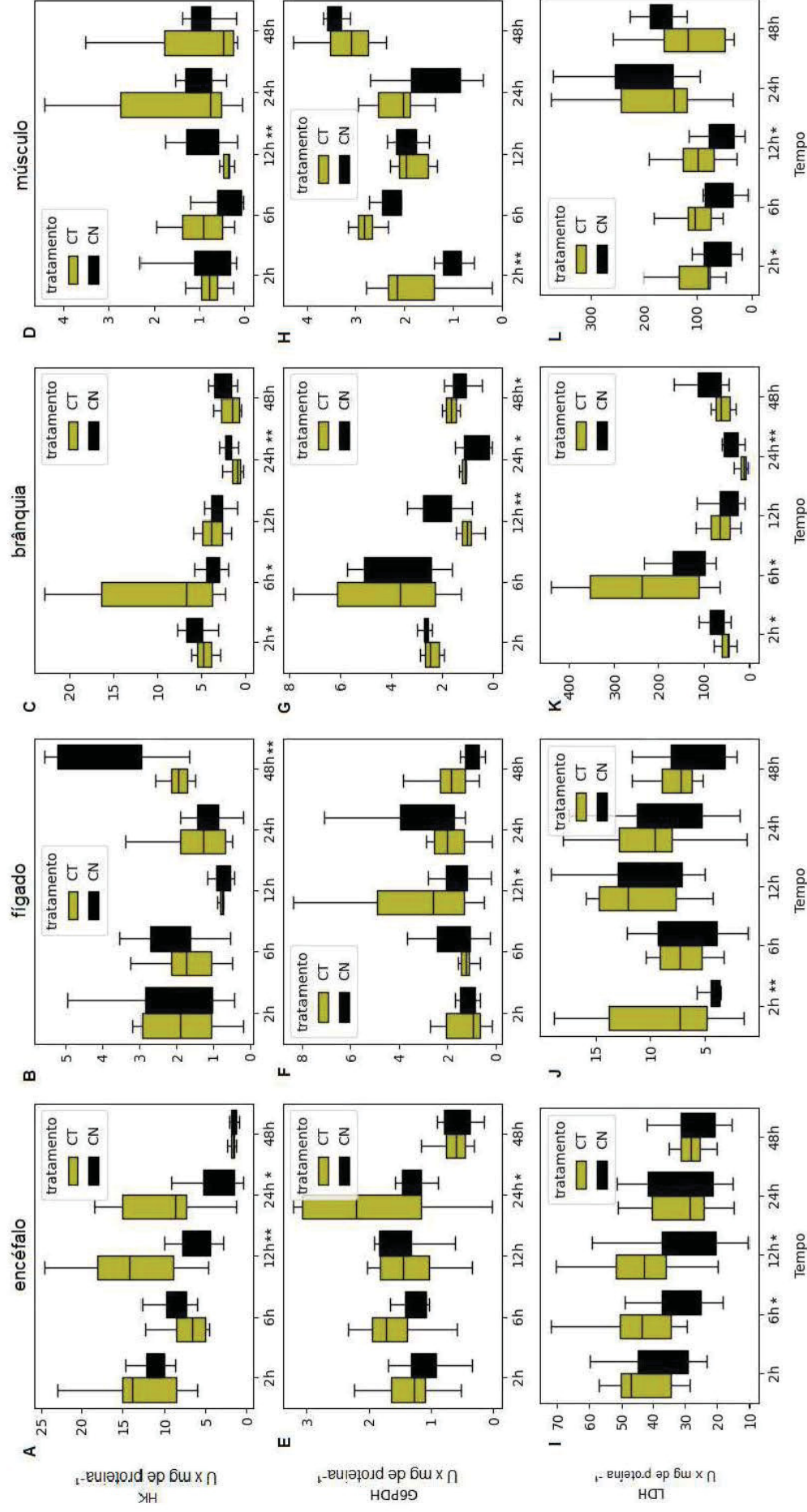
A enzima CS foi o único biomarcador analisado que não apresentou diferença estatística em ao menos um tempo de exposição ao choque térmico (FIGURA 5B). Dentre os biomarcadores do metabolismo energético de carboidratos a HK apresentou diferença estatística no tempo de exposição ao choque térmico de 48 horas com diminuição da atividade enzimática (FIGURA 4B), a G6PDH no tempo de 12 horas (FIGURA 4F), e a LDH em 2 horas (FIGURA 4J). Para os biomarcadores do ciclo de Krebs MDH teve diferença em 2 horas (FIGURA 5F). Relacionado ao metabolismo de proteínas, a TGO apresentou diferença em 12, 24 e 48 horas de exposição (FIGURA 6B). TGP teve diferença em 2 e 12 horas, sendo esta segunda diminuição na atividade (FIGURA 6F), e GLDH nos tempos de 6, 24 e 48 horas (FIGURA 6J).

4.1.3 Brânquia

A enzima CS foi o único biomarcador analisado que não apresentou diferença estatística em ao menos um tempo de exposição ao choque térmico (FIGURA 5C). Os biomarcadores do metabolismo energético de carboidratos apresentaram diferença em 2, 6 e 24 horas de exposição ao choque térmico para a enzima HK (FIGURA 4C), em 12 e 24 horas para G6PDH (FIGURA 4G), e em 2, 6 e 24 horas para LDH (FIGURA 4K). Sendo que nos tempos de exposição de 24 horas para HK, 12 horas para G6PDH, e 2 e 24 horas para LDH a diferença representa uma diminuição na atividade enzimática em relação aos seus respectivos controles. Para os biomarcadores do ciclo de Krebs houve diferença em 2, 6 e 24 horas para MDH (FIGURA 5G), sendo que apenas o tempo de 6 horas houve aumento de atividade. Dentre os biomarcadores do metabolismo de proteínas houve diferença em 24 horas para TGO (FIGURA 6C), 6 e 48 horas para TGP (FIGURA 6G) e 6 e 24 horas para GLDH (FIGURA 6K). Todos estes apresentaram diminuição da atividade enzimática, exceto no tempo de 6 horas para GLDH.

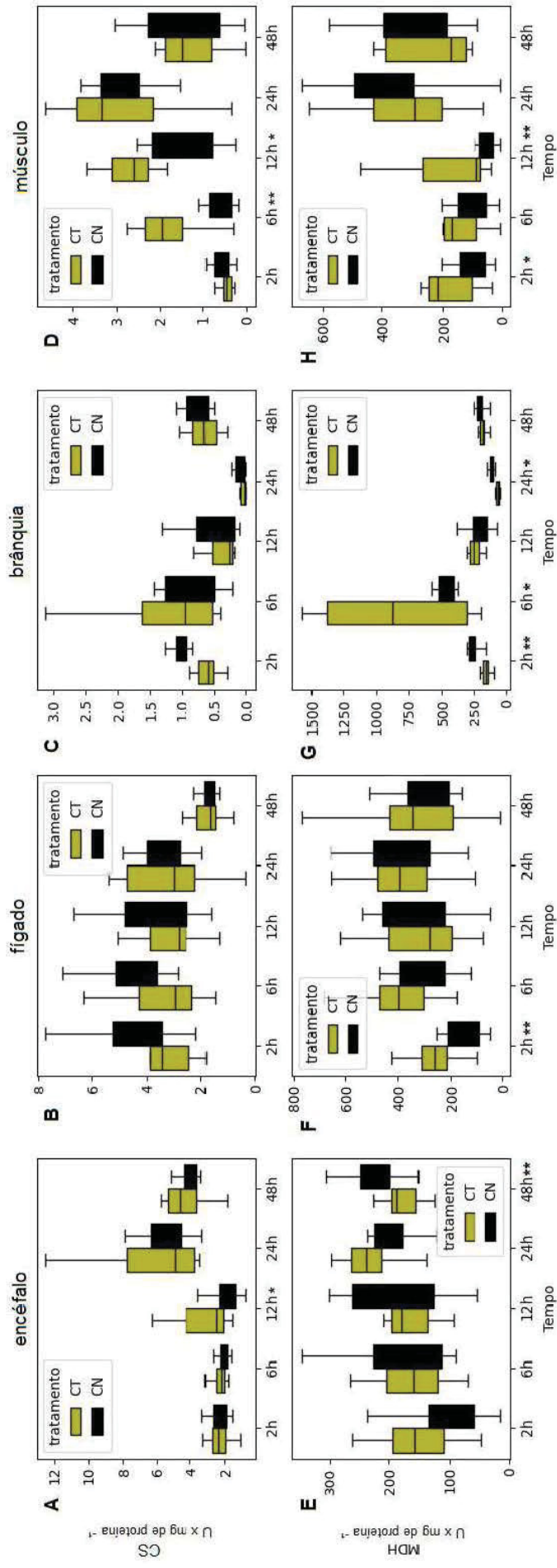
4.1.4 Músculo

As enzimas TGO e TGP não apresentaram diferença estatística em nenhum dos tempos de exposição ao choque térmico analisados (FIGURAS 6D e 6H). Os biomarcadores do metabolismo energético de carboidratos apresentaram diferença nos tempos de exposição de 12 horas para HK (FIGURA 4D), 2 horas para G6PDH (FIGURA 4H) e 2 e 12 horas para LDH (FIGURA 4L), sendo que apenas em 12 horas da HK houve diminuição da atividade. Com relação aos biomarcadores do ciclo de Krebs houve diferença nos tempos de 6 e 12 horas para CS (FIGURA 5D), e 2 e 12 horas para MDH (FIGURA 5H), todos representando aumento da atividade. A enzima GLDH foi o único biomarcador do metabolismo energético de proteínas que apresentou diferença estatística, em 6 horas de exposição com aumento de atividade (FIGURA 6L).

FIGURA 4 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE *Asyanax lacustris* EXPOSTOS A UM CHOQUE TÉRMICO

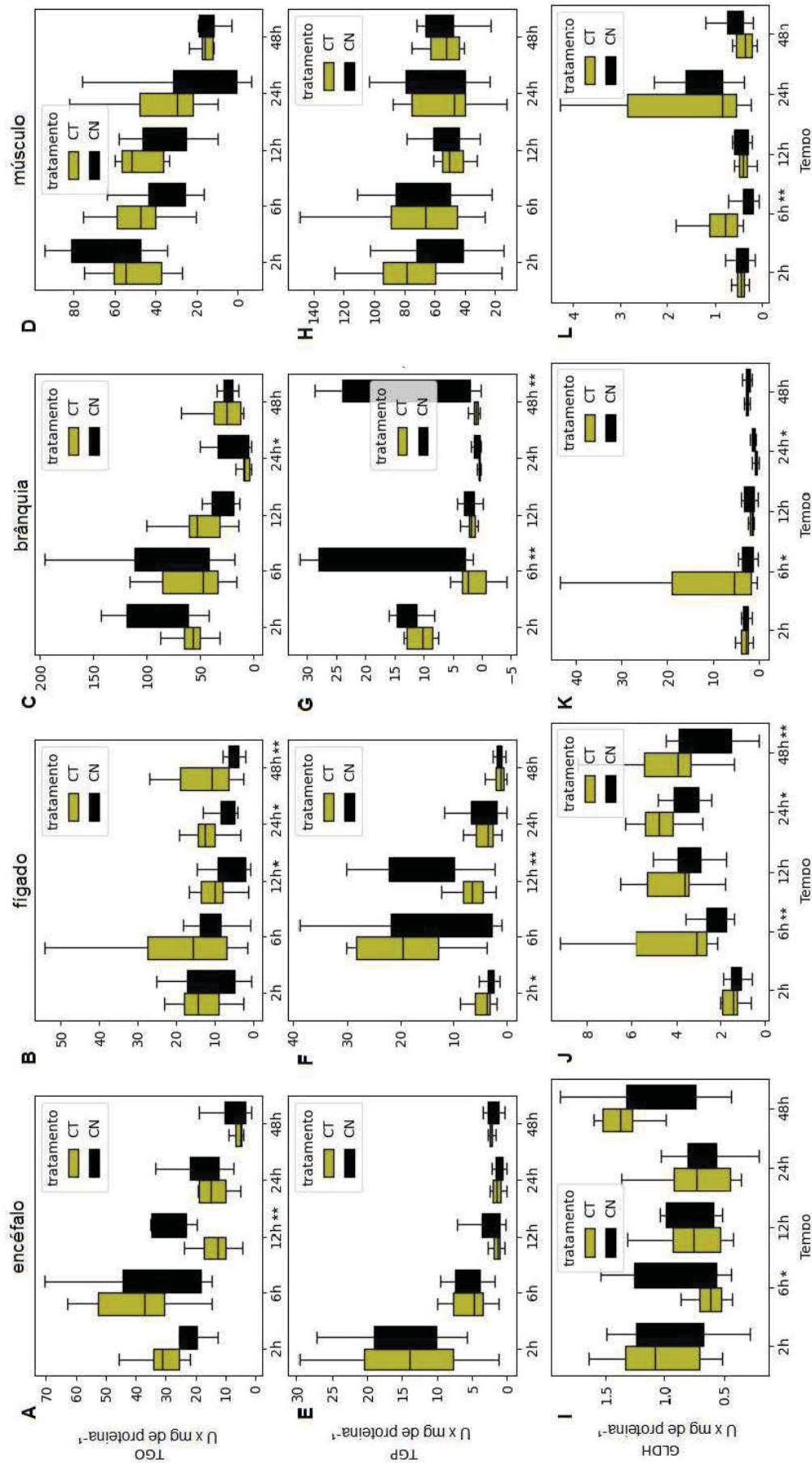
CT - Condição de exposição a choque térmico a 31°C; CN - Condição de controle a 21°C; HK - Hexoquinase; G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase; LDH - Lactato desidrogenase; Tempo em horas (h); A significância estatística foi obtida através da análise de PERMANOVA; Os níveis de significância são indicados por: *** ($p < 0,001$), ** ($p \leq 0,01$), * ($p \leq 0,05$); O tamanho da amostra foi de 12 peixes por tratamento. (A) Atividade enzimática da HK no encéfalo; (B) Atividade enzimática da HK no fígado; (C) Atividade enzimática da HK na brânquia; (D) Atividade enzimática da HK no músculo; (E) Atividade enzimática da G6PDH no encéfalo; (F) Atividade enzimática da G6PDH no fígado; (G) Atividade enzimática da G6PDH na brânquia; (H) Atividade enzimática da G6PDH no músculo; (I) Atividade enzimática da LDH no encéfalo; (J) Atividade enzimática da LDH no fígado; (K) Atividade enzimática da LDH na brânquia; (L) Atividade enzimática da LDH no músculo.

FIGURA 5 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE *Astyanax lacustris* EXPOSTOS A UM CHOQUE TÉRMICO



CT - Condição de exposição a choque térmico a 31°C; CN - Condição de controle a 21°C; CS - Citrato sintase; MDH - Malato desidrogenase; Tempo em horas (h); A) Atividade enzimática da CS no cérebro; B) Atividade enzimática da CS no fígado; C) Atividade enzimática da CS na brânquia; D) Atividade enzimática da CS no músculo; E) Atividade enzimática da MDH no cérebro; F) Atividade enzimática da MDH no fígado; G) Atividade enzimática da MDH na brânquia; H) Atividade enzimática da MDH no músculo.

FIGURA 6 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE *Asyanax lacustris* EXPOSTOS A UM CHOQUE TÉRMICO



CT - Condição de exposição a choque térmico a 31°C; CN - Condição de controle a 21°C; TGP - Alanina aminotransferase; TGO - Aspartato aminotransferase; GLDH - Glutamato desidrogenase; Tempo em horas (h); A significância estatística foi obtida através da análise de PERMANOVA; Os níveis de significância são indicados por: *** (p < 0,001), ** (p < 0,01), * (p < 0,05); O tamanho da amostra foi de 12 peixes por tratamento. (A) Atividade enzimática da TGP no encéfalo; (B) Atividade enzimática da TGP no fígado; (C) Atividade enzimática da TGP na brânquia; (D) Atividade enzimática da TGP no músculo; (E) Atividade enzimática da TGO no encéfalo; (F) Atividade enzimática da TGO no fígado; (G) Atividade enzimática da TGO na brânquia; (H) Atividade enzimática da TGO no músculo; (I) Atividade enzimática da GLDH no encéfalo; (J) Atividade enzimática da GLDH no fígado; (K) Atividade enzimática da GLDH na brânquia; (L) Atividade enzimática da GLDH no músculo.

4.2. DINÂMICA TEMPORAL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES

Com a inferência da atividade enzimática para todas as séries temporais dos biomarcadores foi calculado a diferença percentual entre a média do tratamento com exposição ao choque térmico em 31°C para cada tempo e enzima em relação ao seu respectivo grupo controle expostos a temperatura de aclimação para a espécie de *Astyanax lacustris* de 21°C. Com o resultado foi construído a sequência de Heatmaps mostrados da FIGURA 7 a 10.

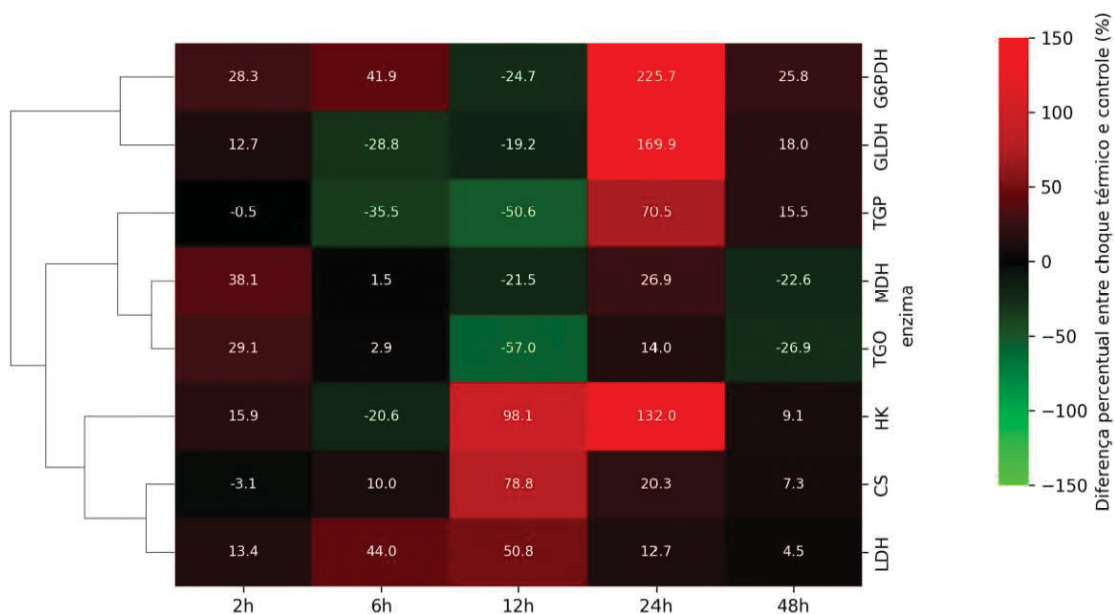
4.2.1. Heatmap

Integrado ao heatmap foi realizado a clusterização entre os órgãos através de um dendrograma baseado na distância euclidiana.

4.2.1.1. Encéfalo

A clusterização mostrou 3 grandes agrupamentos da atividade enzimática dos biomarcadores no encéfalo. A maior similaridade foi constituída pela atividade de MDH e TGO, que iniciaram com o pico de atividade em 2 horas, com diminuição da atividade em 6 horas, e por fim, um pico de redução na atividade em 12 horas antes de um aumento. G6PDH e GLDH formaram outro agrupamento, que também apresentou um pico negativo em 12 horas, seguido pelo pico com maior atividade em 24 horas de exposição, e ainda uma atividade superior ao controle em 48 horas de exposição (FIGURA 7). O agrupamento formado por CS, LDH, e HK teve pico da atividade entre 12 e 24 horas, e tiveram sua atividade superior ao controle em quase todos os tempos. CS e LDH tiveram a segunda maior similaridade entre os grupos.

FIGURA 7 – HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NO ENCÉFALO



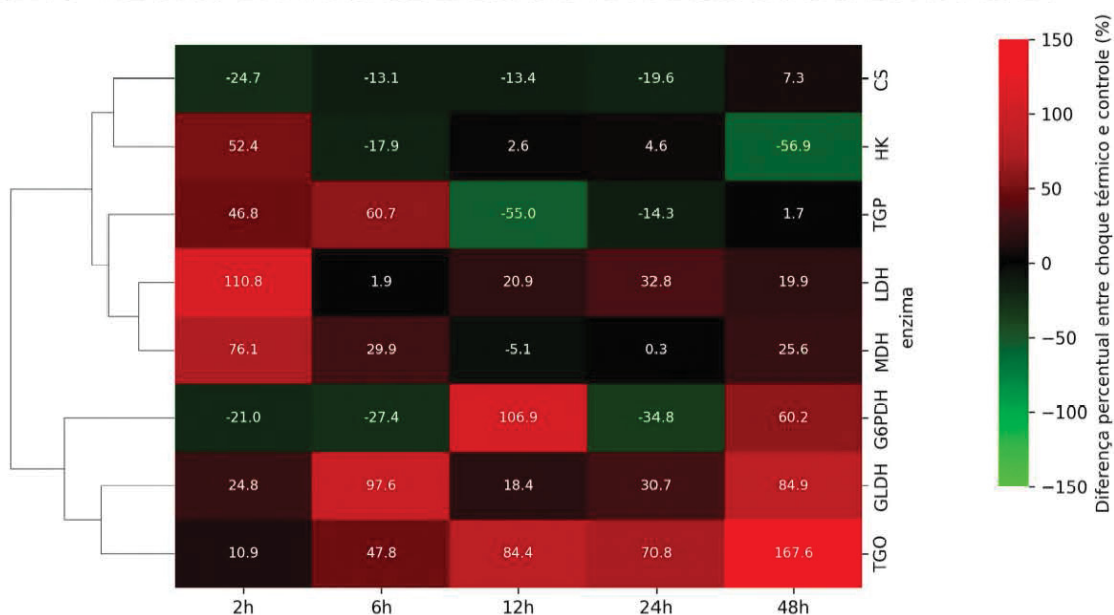
LEGENDA: Heatmap clusterizado da diferença entre a atividade enzimática dos biomarcadores analisados em *Astyanax lacustris* no encéfalo em resposta a uma condição de estresse térmico agudo em série temporal. Os valores reais da diferença entre a atividade enzimática são convertidos em porcentagem da diferença percentual entre o tratamento com a exposição ao choque térmico de 31°C em relação ao seu respectivo controle em 21°C. O sistema de cores verde-vermelho foi utilizado para representar variações negativas e positivas na atividade enzimática.

4.2.1.2. Fígado

O dendrograma associado ao heatmap mostrou 2 grandes agrupamentos da atividade enzimática dos biomarcadores no fígado, sendo um deles subdividido. MDH e LDH tiveram a maior similaridade, com o pico de atividade em 2h, seguido de uma diminuição e posterior pequeno aumento da atividade enzimática. O agrupamento de HK e CS teve o maior número de queda na atividade enzimática. Em contraste a isso o agrupamento de TGO e GLDH tiveram aumento gradual em todos os tempos com pico em 48 horas de exposição (FIGURA 8).

A atividade de TGP foi mais similar ao agrupamento formado por MDH e LDH em relação ao agrupamento de HK e CS, e G6PDH foi mais similar ao agrupamento de TGO e GLDH.

FIGURA 8 – HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NO FÍGADO



LEGENDA: Heatmap clusterizado da diferença entre a atividade enzimática dos biomarcadores analisados em *Astyanax lacustris* no fígado em resposta a uma condição de estresse térmico agudo em série temporal. Os valores reais da diferença entre a atividade enzimática são convertidos em porcentagem da diferença percentual entre o tratamento com a exposição ao choque térmico de 31°C em relação ao seu respectivo controle em 21°C. O sistema de cores verde-vermelho foi utilizado para representar variações negativas e positivas na atividade enzimática.

4.2.1.3. Brânquia

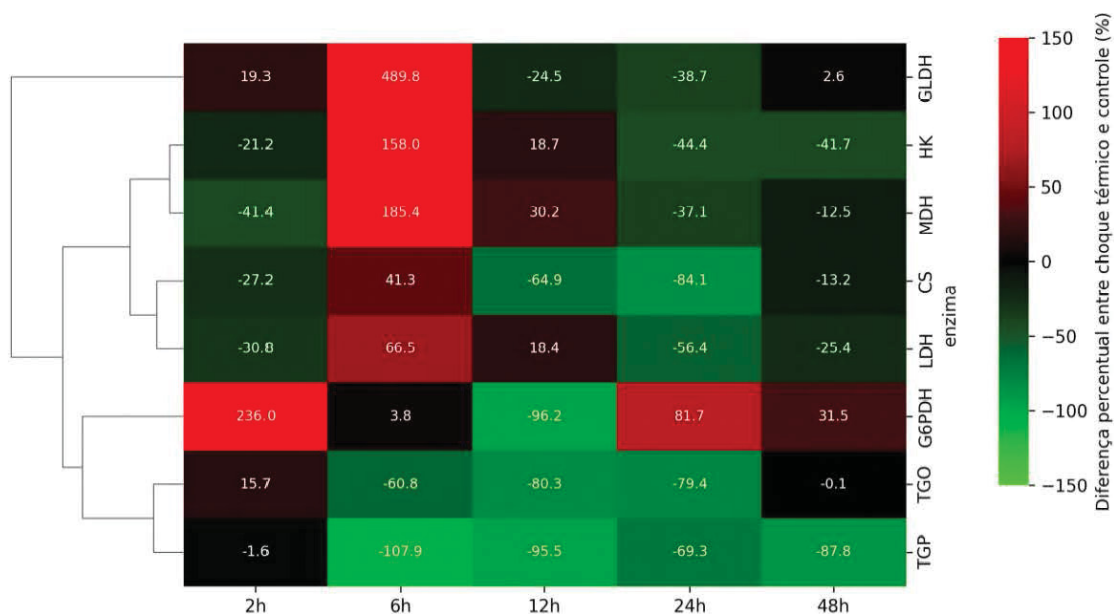
Nas brânquias, a atividade de GLDH teve a menor similaridade com os outros biomarcadores, e se separou dos demais agrupamentos encontrados nas brânquias. HK e MDH tiveram a maior similaridade, iniciando com uma queda da atividade enzimática em 2 horas seguida do pico de atividade em 6 horas que se manteve até 12 horas superior ao controle, finalmente tendo o pico negativo de atividade entre 24 e 48 horas, conforme a FIGURA 9.

O agrupamento de TGO, TGP e G6PDH foi o único que não teve pico de atividade em 6 horas de exposição. TGO e TGP apresentaram forte pico de atividade negativa se estendendo desde 6 horas até 24 horas. Com exceção de G6PDH, entre 24 e 48 horas houve redução de atividade em todos os biomarcadores analisados.

HK, MDH, CS e LDH formaram um agrupamento com grande similaridade, que iniciou com queda da atividade, seguido de pico de atividade entre 6 e 12 horas e queda brusca na atividade entre 24 e 48 horas.

A brânquia foi ao órgão com mais picos negativos de atividade dos biomarcadores encontrados nos heatmaps.

FIGURA 9 – HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NA BRÂNQUIA



LEGENDA: Heatmap clusterizado da diferença entre a atividade enzimática dos biomarcadores analisados em *Astyanax lacustris* na brânquia em resposta a uma condição de estresse térmico agudo em série temporal. Os valores reais da diferença entre a atividade enzimática são convertidos em porcentagem da diferença percentual entre o tratamento com a exposição ao choque térmico de 31°C em relação ao seu respectivo controle em 21°C. O sistema de cores verde-vermelho foi utilizado para representar variações negativas e positivas na atividade enzimática.

4.2.1.4. Músculo

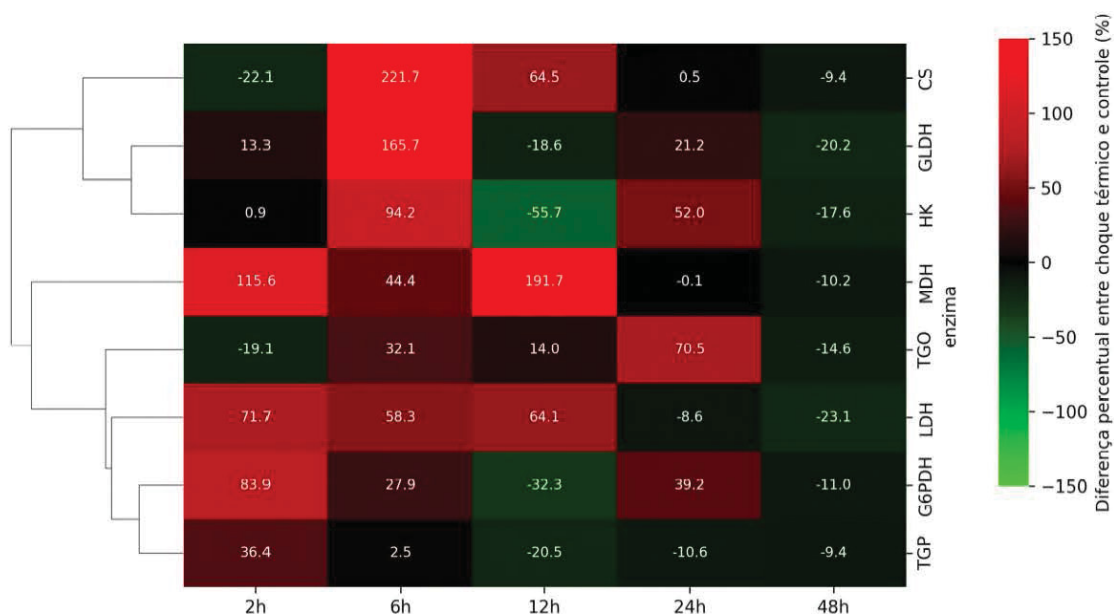
O pico da atividade enzimática para os biomarcadores foi entre 2 e 6 horas, com exceção de MDH que teve dois picos que se estenderam de 2 até 12 horas, e TGO que teve o pico em 24 horas de exposição. A variação da atividade foi negativa para todos os biomarcadores em 48 horas.

Os maiores picos de atividades foram da CS e MDH, em 6 e 12 horas respectivamente. As maiores similaridades encontradas foram entre G6PDH e TGP, e entre HK e GLDH.

HK, GLDH e CS formaram um agrupamento distinto dos demais biomarcadores iniciando com baixa atividade seguida do pico em 6 horas, enquanto os demais apresentaram o pico de atividade logo em 2 horas de exposição, com exceção de TGO.

Conforme a FIGURA 10 houve poucos picos negativos de atividade.

FIGURA 10 – HEATMAP DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS BIOMARCADORES NO MÚSCULO



LEGENDA: Heatmap clusterizado da diferença entre a atividade enzimática dos biomarcadores analisados em *Astyanax lacustris* no músculo em resposta a uma condição de estresse térmico agudo em série temporal. Os valores reais da diferença entre a atividade enzimática são convertidos em porcentagem da diferença percentual entre o tratamento com a exposição ao choque térmico de 31°C em relação ao seu respectivo controle em 21°C. O sistema de cores verde-vermelho foi utilizado para representar variações negativas e positivas na atividade enzimática.

4.3. VALIDAÇÃO DA PERMANOVA

Com o intuito de avaliar a robustez dos resultados obtidos pela PERMANOVA, foi feita uma comparação com os resultados de uma ANOVA Two-Way aplicada aos mesmos dados experimentais (Exposição ao choque térmico em 5 tempos de duração em relação aos seus respectivos controles mantendo em temperatura de aclimação).

Os dados atenderam aos pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias (Levene, $p > 0,05$), permitindo a aplicação de testes paramétricos.

Os resultados da comparação para encéfalo, fígado, brânquia e músculo são apresentados nas TABELAS 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Observou-se que, na maioria dos casos, os dois testes apresentaram resultados concordantes quanto à significância estatística.

TABELA 1 – NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE OS ANIMAIS EXPOSTOS A CHOQUE TÉRMICO EM RELAÇÃO AOS GRUPOS CONTROLES NO ENCÉFALO

Enzima	Tempo	PERMANOVA		ANOVA two-way	
		P	Significância	P	Significância
CS	2h	0,797	ns	0,79118	ns
	6h	0,176	ns	0,18100	ns
	12h	0,022	*	0,02909	*
	24h	0,393	ns	0,37568	ns
	48h	0,493	ns	0,49328	ns
G6PDH	2h	0,159	ns	0,16657	ns
	6h	0,066	ns	0,06849	ns
	12h	0,572	ns	0,39298	ns
	24h	0,033	*	0,17855	ns
	48h	0,252	ns	0,27074	ns
HK	2h	0,444	ns	0,45620	ns
	6h	0,037	*	0,04282	*
	12h	0,494	ns	0,39176	ns
	24h	0,386	ns	0,31998	ns
	48h	0,367	ns	0,33286	ns
GLDH	2h	0,246	ns	0,25415	ns
	6h	0,098	ns	0,09578	ns
	12h	0,007	**	0,00666	**
	24h	0,028	*	0,03236	*
	48h	0,464	ns	0,46921	ns
MDH	2h	0,209	ns	0,22399	ns
	6h	0,008	**	0,00968	**
	12h	0,012	*	0,01696	*
	24h	0,763	ns	0,68778	ns
	48h	0,642	ns	0,65077	ns
LDH	2h	0,179	ns	0,18726	ns
	6h	0,946	ns	0,94368	ns
	12h	0,552	ns	0,46673	ns
	24h	0,456	ns	0,35240	ns
	48h	0,004	**	0,00363	**
TGO	2h	0,104	ns	0,11247	ns
	6h	0,917	ns	0,91323	ns
	12h	0,001	**	0,01198	*
	24h	0,925	ns	0,73975	ns
	48h	0,221	ns	0,21793	ns
TGP	2h	0,981	ns	0,98136	ns
	6h	0,36	ns	0,28033	ns
	12h	0,138	ns	0,14747	ns
	24h	0,235	ns	0,23470	ns
	48h	0,61	ns	0,69111	ns

FONTE: O autor (2025)

LEGENDA: Resultados da análise de PERMANOVA e ANOVA two-way para as enzimas CS (Citrato sintase), G6PDH (Glicose-6-fosfato desidrogenase), HK (Hexoquinase), GLDH (Glutamato desidrogenase), MDH (Malato desidrogenase), LDH (Lactato desidrogenase), TGO (Transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (Transaminase glutâmico-pirúvica) no órgão encéfalo, em diferentes tempos de exposição (2h, 6h, 12h, 24h e 48h). Os valores de P representam os valores de p obtidos para a PERMANOVA e ANOVA two-way. A significância é indicada por: *** (p<0.001, altamente significativo), ** (p<0.01, muito significativo), * (p<0.05, significativo) e ns (p≥0.05, não significativo).

TABELA 2 – NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE OS ANIMAIS EXPOSTOS A CHOQUE TÉRMICO EM RELAÇÃO AOS GRUPOS CONTROLES NO FÍGADO

Enzima	Tempo	PERMANOVA		ANOVA two-way	
		P	Significância	P	Significância
CS	2h	0,211	ns	0,21953	ns
	6h	0,464	ns	0,47252	ns
	12h	0,384	ns	0,37577	ns
	24h	0,299	ns	0,30251	ns
	48h	0,561	ns	0,55271	ns
G6PDH	2h	0,487	ns	0,45230	ns
	6h	0,174	ns	0,16107	ns
	12h	0,019	*	0,03496	*
	24h	0,126	ns	0,13127	ns
	48h	0,075	ns	0,07473	ns
HK	2h	0,193	ns	0,18689	ns
	6h	0,002	**	0,00713	**
	12h	0,191	ns	0,21378	ns
	24h	0,013	*	0,00761	**
	48h	0,013	*	0,01067	*
GLDH	2h	0,454	ns	0,37833	ns
	6h	0,289	ns	0,32419	ns
	12h	0,825	ns	0,82274	ns
	24h	0,847	ns	0,86264	ns
	48h	0,001	**	0,00404	**
MDH	2h	0,008	**	0,00939	**
	6h	0,925	ns	0,92239	ns
	12h	0,352	ns	0,34810	ns
	24h	0,388	ns	0,33186	ns
	48h	0,368	ns	0,38011	ns
LDH	2h	0,005	**	0,00195	**
	6h	0,093	ns	0,08124	ns
	12h	0,808	ns	0,79968	ns
	24h	0,986	ns	0,98787	ns
	48h	0,39	ns	0,37800	ns
TGO	2h	0,684	ns	0,67619	ns
	6h	0,306	ns	0,28699	ns
	12h	0,037	*	0,03727	*
	24h	0,054	ns	0,05017	ns
	48h	0,007	**	0,00419	**
TGP	2h	0,045	*	0,04307	*
	6h	0,164	ns	0,15314	ns
	12h	0,004	**	0,00587	**
	24h	0,606	ns	0,59455	ns
	48h	0,941	ns	0,95074	ns

FONTE: O autor (2025)

LEGENDA: Resultados da análise de PERMANOVA e ANOVA two-way para as enzimas CS (Citrato sintase), G6PDH (Glicose-6-fosfato desidrogenase), HK (Hexoquinase), GLDH (Glutamato desidrogenase), MDH (Malato desidrogenase), LDH (Lactato desidrogenase), TGO (Transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (Transaminase glutâmico-pirúvica) no órgão fígado, em diferentes tempos de exposição (2h, 6h, 12h, 24h e 48h). Os valores de P representam os valores de p obtidos para a PERMANOVA e ANOVA two-way. A significância é indicada por: *** (p<0.001, altamente significativo), ** (p<0.01, muito significativo), * (p<0.05, significativo) e ns (p≥0.05, não significativo)

TABELA 3 – NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE OS ANIMAIS EXPOSTOS A CHOQUE TÉRMICO EM RELAÇÃO AOS GRUPOS CONTROLES NAS BRÂNQUIAS

Enzima	Tempo	PERMANOVA		ANOVA two-way	
		P	Significância	P	Significância
CS	2h	0,406	ns	0,32035	ns
	6h	0,228	ns	0,20400	ns
	12h	0,274	ns	0,27236	ns
	24h	0,235	ns	0,28244	ns
	48h	0,305	ns	0,31161	ns
G6PDH	2h	0,886	ns	0,34315	ns
	6h	0,882	ns	0,88414	ns
	12h	0,001	**	0,30807	ns
	24h	0,012	*	0,00895	**
	48h	0,009	**	0,01083	*
HK	2h	0,05	ns	0,05674	ns
	6h	0,008	**	0,00975	**
	12h	0,322	ns	0,29989	ns
	24h	0,007	**	0,00542	**
	48h	0,074	ns	0,09346	ns
GLDH	2h	0,376	ns	0,34869	ns
	6h	0,025	*	0,05285	ns
	12h	0,187	ns	0,19753	ns
	24h	0,043	*	0,05377	ns
	48h	0,835	ns	0,84324	ns
MDH	2h	0,001	**	0,00005	***
	6h	0,035	*	0,06501	ns
	12h	0,188	ns	0,19189	ns
	24h	0,011	*	0,00881	**
	48h	0,189	ns	0,19361	ns
LDH	2h	0,008	**	0,00665	**
	6h	0,035	*	0,03592	*
	12h	0,522	ns	0,51097	ns
	24h	0,012	*	0,00590	**
	48h	0,141	ns	0,12469	ns
TGO	2h	0,997	ns	0,88188	ns
	6h	0,265	ns	0,27025	ns
	12h	0,989	ns	0,37698	ns
	24h	0,068	ns	0,17482	ns
	48h	0,996	ns	0,99552	ns
TGP	2h	0,848	ns	0,98854	ns
	6h	0,003	**	0,05934	ns
	12h	0,207	ns	0,32332	ns
	24h	0,171	ns	0,25542	ns
	48h	0,003	**	0,00379	**

FONTE: O autor (2025)

LEGENDA: Resultados da análise de PERMANOVA e ANOVA two-way para as enzimas CS (Citrato sintase), G6PDH (Glicose-6-fosfato desidrogenase), HK (Hexoquinase), GLDH (Glutamato desidrogenase), MDH (Malato desidrogenase), LDH (Lactato desidrogenase), TGO (Transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (Transaminase glutâmico-pirúvica) no órgão brânquia, em diferentes tempos de exposição (2h, 6h, 12h, 24h e 48h). Os valores de P representam os valores de p obtidos para a PERMANOVA e ANOVA two-way. A significância é indicada por: *** (p<0.001, altamente significativo), ** (p<0.01, muito significativo), * (p<0.05, significativo) e ns (p≥0.05, não significativo).

TABELA 4 – NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE OS ANIMAIS EXPOSTOS A CHOQUE TÉRMICO EM RELAÇÃO AOS GRUPOS CONTROLES NO MÚSCULO

Enzima	Tempo	PERMANOVA		ANOVA two-way	
		P	Significância	P	Significância
CS	2h	0,114	ns	0,11575	ns
	6h	0,001	**	0,00034	***
	12h	0,047	*	0,04379	*
	24h	0,977	ns	0,97579	ns
	48h	0,711	ns	0,70228	ns
G6PDH	2h	0,001	**	0,00117	**
	6h	0,08	ns	0,06665	ns
	12h	0,175	ns	0,18653	ns
	24h	0,079	ns	0,09005	ns
	48h	0,182	ns	0,18468	ns
HK	2h	0,503	ns	0,48839	ns
	6h	0,001	**	0,00053	***
	12h	0,576	ns	0,49630	ns
	24h	0,551	ns	0,56954	ns
	48h	0,511	ns	0,47224	ns
GLDH	2h	0,978	ns	0,97598	ns
	6h	0,075	ns	0,08268	ns
	12h	0,004	**	0,00197	**
	24h	0,251	ns	0,25752	ns
	48h	0,689	ns	0,65824	ns
MDH	2h	0,016	*	0,01702	*
	6h	0,072	ns	0,07586	ns
	12h	0,033	*	0,03593	*
	24h	0,734	ns	0,71311	ns
	48h	0,268	ns	0,28126	ns
LDH	2h	0,01	*	0,01519	*
	6h	0,219	ns	0,20763	ns
	12h	0,014	*	0,01415	*
	24h	0,992	ns	0,99694	ns
	48h	0,669	ns	0,68302	ns
TGO	2h	0,132	ns	0,12521	ns
	6h	0,08	ns	0,07730	ns
	12h	0,542	ns	0,48618	ns
	24h	0,158	ns	0,15374	ns
	48h	0,604	ns	0,53578	ns
TGP	2h	0,121	ns	0,12078	ns
	6h	0,891	ns	0,89087	ns
	12h	0,675	ns	0,51616	ns
	24h	0,541	ns	0,52831	ns
	48h	0,498	ns	0,51815	ns

FONTE: O autor (2025)

LEGENDA: Resultados da análise de PERMANOVA e ANOVA two-way para as enzimas CS (Citrato sintase), G6PDH (Glicose-6-fosfato desidrogenase), HK (Hexoquinase), GLDH (Glutamato desidrogenase), MDH (Malato desidrogenase), LDH (Lactato desidrogenase), TGO (Transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (Transaminase glutâmico-pirúvica) no órgão músculo, em diferentes tempos de exposição (2h, 6h, 12h, 24h e 48h). Os valores de P representam os valores de p obtidos para a PERMANOVA e ANOVA two-way. A significância é indicada por: *** (p<0.001, altamente significativo), ** (p<0.01, muito significativo), * (p<0.05, significativo) e ns (p≥0.05, não significativo).

5. DISCUSSÃO

A exposição a uma situação adversa de choque térmico agudo (31°C) desencadeou alterações significativas no metabolismo energético de *Astyanax lacustris* de forma diferente nos órgãos analisados, e ao mesmo tempo complementares, evidenciadas pela modulação de enzimas-chave das vias glicolíticas, do ciclo de Krebs, fermentativas e do metabolismo de aminoácidos em dinâmicas temporais diferentes. Essas respostas refletem uma reorganização metabólica frente a necessidade de manter a homeostase em uma condição de estresse térmico.

5.1. COMPORTAMENTO DOS ÓRGÃOS ANALISADOS

5.1.1. Encéfalo

No encéfalo de *A. lacustris* a atividade da LDH aumentou em 31°C quando comparada com 21°C, principalmente em um primeiro momento até 12 horas de exposição. Isto pode indicar que o peixe optou por fazer a transição para o metabolismo anaeróbico ocasionado provavelmente por uma condição de hipóxia ou mesmo pelo dano celular devido a temperatura elevada do ambiente. O aumento de temperatura provoca hipóxia nos ambientes aquáticos naturais, além de aumentar a demanda energética nos tecidos e a produção de EROs, resultando em estresse oxidativo (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; LUSCHAK, 2011; POL; FLIK; GORISSEN, 2017; WEN et al., 2018). Estratégias adaptativas identificadas em espécies de peixes demonstram ajustes metabólicos selecionados evolutivamente e que garantem a sobrevivência em situação de estresse ambiental, com ajustes entre anabolismo e catabolismo e na produção e demanda de energia, a partir das fontes moleculares de carboidratos, proteínas e ácidos graxos (POL; FLIK; GORISSEN, 2017). O pico da atividade de LDH foi entre 6 e 12 horas, e após este período de exposição sua atividade diminuiu continuamente. Esse aumento da LDH poderia indicar uma necessidade de complementação da produção de ATP através da via de fermentação láctica, em uma busca compensatória da limitação de distribuição de oxigênio ou um atraso na adaptação mitocondrial.

Paralelamente a isso, no encéfalo de *A. lacustris*, as enzimas biomarcadoras do metabolismo energético de carboidratos HK e G6PDH tiveram seu pico em 12 e 24 horas respectivamente, seguidas por uma forte queda na atividade em 48 horas.

Isto pode indicar uma tentativa de fortalecimento da via glicolítica e um subsequente esgotamento de substrato. O aumento da atividade de HK indica uma intensificação da glicólise para suprir a demanda energética elevada causada pelo estresse térmico. Esse padrão é comum em peixes submetidos a altas temperaturas, como observado em estudos com *Astyanax lacustris* e outras espécies (SCHLEGER et al., 2022 e 2024). Dessa forma o aumento na atividade da HK em 12 e 24 horas após a exposição ao estresse indica um aumento na captação e fosforilação da glicose, sugerindo intensificação da glicólise como via prioritária para suprimento energético rápido. Esse padrão é comum em peixes submetidos ao calor, como observado em estudos com *Oreochromis niloticus* e outras espécies, nos quais o aumento da temperatura induz maior atividade glicolítica como adaptação ao incremento da taxa metabólica (YOUNIS, E. M., 2015; LIU et al., 2023). Já para G6PDH este aumento pode estar relacionado a necessidade de combater o estresse oxidativo gerado pelo aumento da temperatura, especialmente em tecidos metabolicamente ativos como o encéfalo (LUSHCHAK, 2021).

As enzimas encefálicas CS e MDH, em *A. lacustris*, tiveram um pequeno aumento em sua atividade em 12 e 24 horas respectivamente. Esse aumento da atividade de CS pode indicar um reforço na capacidade de produção aeróbica de energia, através da via ciclo de Krebs, ou talvez uma adaptação mitocondrial posterior à glicólise e fermentação, visto o seu aumento descrito a cima em tempos similares através do aumento da atividade de HK (LIU et al., 2023).

Em relação ao metabolismo de aminoácidos não houve aumento significativo nos biomarcadores analisados no encéfalo de *A. lacustris*. Esta falta de alteração de TGP e GLDH acrescidos da redução da TGO pode sugerir que nesse órgão o metabolismo de aminoácidos não foi uma via preferencial para produção de ATP. A queda na atividade de TGO em 12 horas pode ser interpretada como uma forma de evitar o excesso de entrada de intermediários no ciclo de Krebs ou mesmo uma diminuição temporária da atividade catabólica (KEHL-FIE; SKAAR, 2010).

5.1.2. Brânquias

A oscilação apresentada pela HK nas brânquias de *A. lacustris*, pode indicar que inicialmente a via glicolítica estava suprimida em 2 horas como resposta ao estresse térmico agudo, mas que a via possivelmente foi ativada a fim de compensar

a demanda energética em 6 horas. Posteriormente, a partir de 24 horas houve novamente a queda da atividade de HK em relação ao controle, indicando a utilização de outras vias metabólicas.

O aumento inicial da atividade de G6PDH pode indicar uma ativação transitória da via das pentoses fosfato para produção de NADPH, nas brânquias de *A. lacustris*, possivelmente visando melhorar a resposta antioxidante, mas que posteriormente em 12 e 24 horas apresentou uma provável inibição possivelmente ligada à exaustão celular ou ajuste fino do metabolismo redox (LUSHCHAK, 2011).

A atividade de LDH apresentou queda inicialmente no tempo de 2 horas seguida de um aumento de atividade em 6 horas de exposição ao choque térmico. Isso pode indicar uma fase inicial de inibição da respiração anaeróbica, seguida por um breve aumento, possivelmente como forma de complementar a produção de ATP sob provável restrição de oxigênio ou por grande aumento na demanda.

A CS não apresentou diferença significativa nas brânquias de *A. lacustris*. Este comportamento pode indicar estabilidade da função mitocondrial sobre estresse nos tempos testados, considerando pelo menos a fase inicial do ciclo de Krebs. Já a MDH, apresentou respostas semelhantes à LDH, o que pode indicar uma resposta coordenada das enzimas do metabolismo energético. Ambas acompanharam de forma semelhante as flutuações na demanda energética nesse tecido.

Os biomarcadores do metabolismo de aminoácidos em brânquias de *A. lacustris*, TGO e TGP, apresentaram diminuição da atividade. Isto indica que a transaminação da alanina e a transaminação do aspartato são inibidas. Para GLDH, houve um breve aumento abrupto no tempo de 6 horas indicando a ativação do metabolismo de aminoácidos como fonte energética alternativa, mas seguido de um controle negativo para evitar degradação excessiva de proteínas estruturais. Este processo pode ocorrer em resposta a estressores agudos.

5.1.3. Fígado

O fígado é o principal órgão regulador do metabolismo energético e desempenha funções cruciais na glicólise, gliconeogênese e metabolismo de proteínas (MOURA et al. 2006). Em fígado de *A. lacustris*, a atividade da HK não apresentou aumento significativo no fígado. Esta redução pode ter ocorrido por uma redistribuição de substratos energéticos para outros tecidos mais demandantes.

Esse padrão sugere uma transição do metabolismo glicolítico para outras vias energéticas, como a oxidação de aminoácidos, em fases mais prolongadas do estresse. Partindo dessa suposição, podemos observar que as enzimas biomarcadoras do metabolismo de aminoácidos sofreram incrementos significativos, indicando o aumento do consumo de aminoácidos. A atividade de TGO apresentou aumento significativo a partir de 12 horas até 48 horas de exposição ao choque térmico. A GLDH teve aumento da atividade em todos os tempos, com significância em 6, 24 e 48 horas. Isso resultou na ideia de que o metabolismo do fígado de *Astyanax lacustris* optou pelo catabolismo de aminoácidos. A TGP teve uma queda significativa em 12 horas, que se manteve nos tempos seguintes, indicando uma possível exaustão de substrato.

Em fígado de *A. lacustris* houve um aumento significativo na atividade da G6PDH após 12 horas de exposição, e este aumento pode ser justificado por uma possível intensificação da via das pentoses fosfato para suprir a demanda de NADPH e reforçar a defesa antioxidante. A LDH teve um pico significativo em 2 horas indicando uma rápida ativação da via anaeróbica em resposta ao estresse, alguns tecidos podem ter comprometimento temporário do metabolismo aeróbico, em resposta a estresse térmico agudo, e pode ser devido a um comprometimento temporário da eficiência mitocondrial (IFTIKAR et al., 2014).

A CS se manteve sem alteração ao longo dos tempos de exposição. Provavelmente o potencial oxidativo mitocondrial hepático se manteve estável, mesmo com o estresse térmico. Isso pode indicar um papel mais conservador do fígado, priorizando funções essenciais mesmo sob estresse, diferentemente do músculo, que tende a modular fortemente essa via (THANH et al., 2014). Embora a CS não tenha apresentado alterações significativas, a MDH teve um aumento de atividade em 2 horas. Isto pode estar relacionado com a atividade da MDH do citosol, com uma tentativa de manter a oxidação de substratos e a regeneração de NAD^+ no citosol, possibilitando continuidade do metabolismo glicolítico.

5.1.4. Músculo

O tecido muscular, responsável pela locomoção, responde rapidamente a mudanças na demanda energética, que podem ser causadas por estressores (MORASH; VANDERVEKEN; MCCLELLAND, 2014). A diminuição da HK, observada

no músculo de *A. lacustris*, pode indicar um redirecionamento do metabolismo energético do músculo branco, priorizando vias alternativas à glicólise, como a fermentação láctica.

O aumento na atividade da LDH nos tempos de 2 e 12 horas, sugere uma intensificação da glicólise anaeróbia para a rápida produção de ATP.

Além disso, observou-se um aumento na atividade da CS nos tempos de 6 e 12 horas, o que indica adaptação metabólica mitocondrial para aumentar a produção de energia, através do ciclo de Krebs (EKSTRÖM et al., 2016; YAN; XIE, 2015).

Essas alterações refletem uma resposta adaptativa imediata para suprir as exigências energéticas impostas pelo choque térmico no músculo de *A. lacustris*. Resposta semelhante foi observada no trabalho de VOITURON et al. (2022), com músculo de juvenis de *Dicentrarchus labrax*. Neste trabalho observou-se que os juvenis de *D. labrax* expostos a alta temperatura (26°C) tiveram uma maior atividade mitocondrial, elevando tanto o consumo de oxigênio quanto a produção de ATP, tendo uma maior eficiência mitocôndrial. Outro trabalho relacionado foi o desenvolvido por BOUCHARD (2003) com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mostrando que a aclimação ao calor levou a ajustes na atividade de enzimas mitocondriais, entre elas a CS, no músculo, sugerindo uma compensação térmica para manter a capacidade oxidativa.

Em músculo de *A. lacustris*, o aumento da atividade de MDH, junto com CS, reforça a ativação do metabolismo aeróbico como uma resposta adaptativa secundária ao estresse térmico. Também pode estar relacionado ao suporte à regeneração de NAD^+ para manter a glicólise funcionando. Estudos em *Scophthalmus maximus* e *Perca fluviatilis* mostram aumento dessas enzimas sob estresse térmico, reforçando a ativação do metabolismo aeróbico (EKSTRÖM, et al., 2017; YANG, et al., 2020). Esse incremento, além de apoiar a função mitocondrial, também pode regenerar NAD^+ via MDH, mantendo a glicólise operante.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho identificou alterações significativas no metabolismo energético de carboidratos e proteínas de *Astyanax lacustris* expostos ao choque térmico ao longo da escala temporal. Estes ajustes metabólicos ocorreram em taxas de

variação diferentes em relação aos seus respectivos controles no encéfalo, fígado, brânquias e músculo.

O encéfalo demonstrou uma ativação inicial do metabolismo anaeróbico, com pico de LDH entre 6 e 12 horas, seguido por um aumento da atividade glicolítica e da via das pentoses fosfato, sugerindo uma resposta rápida para suprir a demanda energética e lidar com o estresse oxidativo. O envolvimento limitado do metabolismo de aminoácidos neste tecido indica a priorização de vias rápidas de geração de ATP.

As brânquias apresentaram flutuações nas principais enzimas energéticas, sugerindo um ajuste fino e transitório da glicólise, fermentação e resposta antioxidante, com ativação pontual do metabolismo de aminoácidos, possivelmente como via energética secundária.

No fígado, observou-se uma estratégia distinta, com predomínio do catabolismo de aminoácidos e estabilidade da via oxidativa mitocondrial, apontando para um papel regulador e conservador desse órgão na redistribuição de recursos energéticos. A elevação da G6PDH reforça sua importância na defesa contra o estresse oxidativo.

Por fim, o músculo esquelético apresentou um perfil adaptativo evidente, com aumento da LDH e CS, indicando tanto o uso de vias anaeróbicas quanto uma adaptação mitocondrial para suportar o aumento da demanda energética. A resposta concertada entre LDH, CS e MDH reflete uma estratégia de curto e médio prazo para manutenção da função contrátil sob estresse térmico.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. H. C., LIMA, D. M. V., LIMA, S. M., SANTANA, C. A., SÚAREZ, Y. R. Laser-induced fluorescence in fish scales to evaluate the environmental integrity of ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 165, 80 – 86. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.005>. Acesso em 21 dez. 2024.
- BALDISSEROTTO, B., CYRINO, J. E. P., & URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP 2014
- BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, n. 2, p. 213–225, 2007.
- BIRNIE-GAUVIN, K.; COSTANTINI, D.; COOKE, S. J.; WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928–942, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/faf.12215>. Acesso em 27 mai. 2025.
- BOUCHARD, P. Time course of the response of mitochondria from oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 19, p. 3455–3465, 1 out. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.00578>. Acesso em: 08 mar. 2025.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities Of protein utilizing the principle of rotein-dye binding. **Anal Biochem**. V. 72, p. 248-254, 1976.
- CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979.
- CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. I- Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000
- EKSTRÖM, A. et al. Thermal sensitivity and phenotypic plasticity of cardiac mitochondrial metabolism in European perch, *Perca fluviatilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 3, p. 386–396, 16 nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.150698>. Acesso em: 25 abr. 2025.
- EKSTRÖM, A. et al. Thermal sensitivity and phenotypic plasticity of cardiac mitochondrial metabolism in European perch, *Perca fluviatilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 3, p. 386–396, 16 nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.150698>. Acesso em 18 jan. 2025.

FANG, L.; LIU, Y.; TIAN, H.; CHEN, H.; WANG, Y.; HUANG, M., Proper land use for heavy metal-polluted soil based on enzyme activity analysis around a Pb-Zn mine in Feng County, China. **Environmental science and pollution research international**, v. 24, n. 36, p. 28152–28164, 10 out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0308-4>. Acesso em: 15 jan. 2025.

IBARZ, A. et al. Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 155, n. 3, p. 319–326, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.012>. Acesso em: 3 jan. 2025.

IFTIKAR, F. I.; MACDONALD, J. R.; BAKER, D. W.; RENSHAW, G. M. C.; HICKEY, A. J. R. Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 13, p. 2348–2357, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.098798>. Acesso em: 7 fev. 2025.

ISLAM, M. J., KUNSMANN, A., SLATER, M. J. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. **Journal of the World Aquaculture Society**. 53, 314 – 366. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jwas.12853>

KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 218–224, abr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008>. Acesso em: 14 mar. 2025.

LIU, H., YANG, R., FU, Z., YU, G., LI, M., DAI, S., Ma, Z., Zong, H., Acute thermal stress increased enzyme activity and muscle energy distribution of yellowfin tuna. **PLoS ONE** v. 18, n. 10, e0289606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289606>. Acesso em: 10 fev. 2025.

LU, Y., LIU Y., SONG, Z., WU, Z. XIAO, P., ZANG, P. Insight into the heat resistance of fish via blood: Effects of heat stress on metabolism, oxidative stress and antioxidant response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and turbot *Scophthalmus maximus*. **Fish & Shellfish Immunology**. 58, 125 - 135. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.008>. Acesso em: 21 fev. 2025.

LUCENA C. A. & SOARES H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**. Jan 28; 4072, 101 - 25. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>. Acesso em 04 fev. 2025.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 17 jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>. Acesso em 04 mar. 2025

MORASH, A. J.; VANDERVEKEN, M.; MCCLELLAND, G. B. Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. **Frontiers in**

Physiology, v. 5, 21 nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00452>. Acesso em 25 jan. 2025.

MOURA, A. S. et al. Fisiologia hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p. 92-99, 2006. Disponível em: <https://gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/305/296>. Acesso em: 20 mar. 2025.

POL, I.; FLIK, G.; GORISSEN, M. Comparative physiology of energy metabolism: fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00036>. Acesso em: 14 abr. 2025.

REITMAN, S., FRANKEL, S. A. Colorimetric method for the determination of serum Glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. A in. **J. Clin. Path**, v.28, n. 56, p. 53 - 63, 1957.

RØNNESTAD, I., VOLKOFF, H. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. **Temperatura (Austin)**. 7, 307 – 320. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23328940.2020.1765950>. Acesso em: 21 dez. 2024.

SABOROWSKI, R., BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 557–565, 2002.

SYED, S. E. H.; ENGEL, P. C. A pH-dependent activation-inactivation equilibrium in Glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*. **Biochemical Journal**, 271, 351 – 355, 1990.

THANH, N. M.; JUNG, H.; LYONS, R.; CHAND, V.; TUAN, N. V.; THU, V. T.; MATHER, P. A. transcriptomic analysis of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in response to salinity adaptation: De novo assembly, gene annotation and marker discovery. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**. v. 10, p. 52–63, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpd.2014.04.001>. Acesso em 10 mar. 2025.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 3, p. 603–611, 2005.

YAN, Y.; XIE, X. Metabolic compensations in mitochondria isolated from the heart, liver, kidney, brain and white muscle in the southern catfish (*Silurus meridionalis*) by seasonal acclimation. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 183, p. 64–71, maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.011>. Acesso em: 23 abr. 2025.

YANG, C.-X.; WANG, T.; GAO, L.-N.; YIN, H.-J.; LÜ, X., Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China. **Journal of Applied**

Microbiology, v. 123, n. 6, p. 1447–1460, 22 out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13562>. Acesso em: 15 jan. 2025.

YANG, S., ZHAO, T., MA, A., HUANG, Z., LIU, Z., CUI, W., ZHANG, J., ZHU, C., GUO, X., YUAN, C., Metabolic responses in *Scophthalmus maximus* kidney subjected to thermal stress. **Fish Shellfish Immunol**, v. 103, p. 37–46, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.003>. Acesso em: 4 fev. 2025.

YOUNIS, E.M. Variation in metabolic enzymatic activity in white muscle and liver of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, in response to long-term thermal acclimatization. **Chin. J. Ocean. Limnol.** 33, 696–704 (2015). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00343-015-4093-y>. Acesso em: 17 mar. 2025.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; GAO, J. Z. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1372–1381, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.401>. Acesso em: 24 fev. 2025.

CAPÍTULO II – ALGORÍTIMO PARA OTIMIZAÇÃO DA INFERÊNCIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDA PELA LEITURA DE MICROPLACAS PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM O USO DE SLIDING WINDOWS

RESUMO

A precisão na interpretação de dados científicos é fundamental para a confiabilidade dos resultados, uma vez que erros podem levar a conclusões equivocadas e comprometer a validade dos estudos. No contexto da bioquímica, a inferência da atividade enzimática é um dos procedimentos mais comuns, e diversos métodos têm sido desenvolvidos para essa finalidade, como titulações, ensaios fluorométricos e técnicas radioisotópicas. Existem diversas maneiras de inferir a atividade enzimática em modelos biológicos, dentre as quais os baseados no uso de dados espectrofotométricos são amplamente utilizados. Sua determinação, por tais métodos, geralmente consiste em mensurar a alteração na absorbância de um componente específico a determinada substância em função do tempo, utilizando-se a porção linear da curva que descreve a taxa de alteração em função do tempo, sendo esta diretamente relacionada à atividade da enzima estudada, conforme estabelecido pela Lei de Beer-Lambert. Tradicionalmente, a seleção da porção linear da curva é realizada manualmente, analisando-se graficamente a variação da absorbância em função do tempo. No entanto, essa abordagem está sujeita a erros de interpretação e pode ser ineficiente em ensaios de alta produtividade, como os realizados em microplacas. Neste trabalho, propõe-se uma metodologia para otimizar o cálculo da atividade enzimática proveniente de leituras de microplacas por espectrofotômetro, por meio da otimização da seleção do melhor subconjunto de pontos consecutivos que atendam a dois critérios principais: pertencerem à porção linear da curva e compreenderem um intervalo de tempo superior a 3 minutos de leitura. Para isso se faz uso de sliding windows. O algoritmo proposto foi testado em dados de amostras de peixe para atividade das enzimas citrato sintase (CS) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), através de uma solução computacional usando o software Python. Ele foi capaz de identificar todas as soluções possíveis respeitando as respectivas restrições metodológicas de linearidade dos pontos contínuos e tempo de leitura. As atividades enzimáticas resultantes foram maiores que as obtidas pelo método manual mantendo um R^2 superior.

Palavras-chave: atividade enzimática, espectrofotometria, linearidade, otimização

1. INTRODUÇÃO

A determinação da atividade enzimática é uma ferramenta fundamental em estudos bioquímicos e fisiológicos. Existem numerosas formas de inferir a atividade enzimática de um sistema biológico, dentre as quais as metodologias baseadas na leitura de dados pelo espectrofotômetro se destacam pela relativa praticidade e utilização eficaz em diversas reações enzimáticas (KEI, 2024).

Estes ensaios se baseiam em um princípio físico-químico estabelecido pela lei de Beer-Lambert, que relaciona a absorbância da luz por uma substância à sua concentração. Esta relação entre absorbância e tempo gera a curva de progresso, que em sua porção linear, sob condições saturantes de substrato, é diretamente proporcional à concentração da enzima ativa presente (BOECKX et al., 2017). Essa região linear é caracterizada por uma taxa constante de formação de produto e, por não ser afetada pela limitação de substrato ou inibição por produto, representa uma estimativa confiável da atividade catalítica máxima sob as condições experimentais aplicadas (BOECKX et al., 2017; BURSCH; OLP; SMITH, 2023).

A seleção dos pontos lineares da curva de absorbância pode ser realizada de diferentes maneiras. Tradicionalmente, essa seleção é feita manualmente, analisando-se graficamente a curva de absorbância em função do tempo e identificando a região onde a absorbância varia linearmente. A seleção manual dos pontos de leitura da porção linear da curva, além de trabalhoso está suscetível a vieses. Erros na seleção dos pontos podem comprometer a reprodutividade e a padronização das análises (HALLING et al., 2018; NARAYANAN, 2021). E embora existam diversos programas para análises cinéticas enzimáticas, ainda existe uma carência de ferramentas com foco em dados contínuos de análises enzimáticas para velocidade inicial (BURSCH; OLP; SMITH, 2023).

1.1 OBJETIVO GERAL

Melhorar a seleção de pontos provenientes da leitura de microplacas no espectrofotômetro para o cálculo da atividade enzimática.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compreender a dimensão das possibilidades de resposta para seleção de pontos de leitura respeitando a metodologia de inferência da atividade enzimática baseada em espectrofotometria;
- Analisar o cálculo da atividade enzimática como um problema de otimização;
- Propor um algoritmo para a inferência da atividade enzimática utilizando janelas deslizantes para otimizar a resposta;
- Verificar seu desempenho na inferência da atividade enzimática.

1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está organizado em 6 seções. A primeira seção apresenta o trabalho e seus objetivos. A segunda seção apresenta uma revisão da literatura dos conteúdos pertinentes ao trabalho: Método espectrofotométrico de inferência da atividade enzimática; Espectrofotometria de microplacas; Otimização; e Sliding windows.

Na seção três é apresentado a inferência da atividade enzimática como um problema de otimização proposto. Na quarta seção é proposto um algoritmo para solução desse problema de otimização. A quinta seção mostra a aplicação desse algoritmo em amostras reais.

Por fim, a sexta seção apresenta as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE INFERÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A espectrofotometria baseia-se na Lei de Beer-Lambert, que estabelece uma relação linear entre a absorbância (A) de uma solução e a concentração (c) do analito, expressa pela equação $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, onde ϵ é o coeficiente de extinção molar e l é o caminho óptico da cubeta. Para inferir a atividade enzimática, é essencial monitorar a reação na porção linear da curva de absorbância, onde a variação da

absorbância é diretamente proporcional ao tempo. Essa região é conhecida como "fase linear" ou "regime de velocidade inicial" (BERGMEYER, 1974)

Uma curva de progresso da reação enzimática não é linear o tempo todo porque a velocidade da reação varia com o tempo. Durante a fase inicial da curva (lag phase) a velocidade é baixa pois a enzima ainda está se ligando ao seu substrato, e durante a fase de saturação (declínio) a reação perde a velocidade devido a fatores como o esgotamento de substrato ou a inibição pelo produto (BROOKS et al., 2004).

Essa região linear é caracterizada por uma taxa constante de formação de produto e, por não ser afetada pela limitação de substrato ou inibição por produto, representa uma estimativa confiável da atividade catalítica máxima sob as condições experimentais aplicadas (BOECKX et al., 2017; BURSCH; OLP; SMITH, 2023). Ou seja, nessa região não ocorre variação da velocidade (BROOKS et al., 2004). Neste período da reação enzimática, a velocidade de formação do produto (ou de consumo do substrato) se mantém constante, ou seja, quantidade por tempo. Sob estas circunstâncias a inclinação da curva está refletindo sem interferências significativas de efeitos secundários (como esgotamento de substrato ou inibição por produto), a atividade enzimática sob as condições do ensaio (BROOKS et al., 2004).

Quando assumimos a linearidade de uma região da curva de progressão, podemos aplicar a regressão linear ou outro método linear padrão para obter as taxas iniciais e poder inferir a atividade enzimática (BOECKX et al., 2017).

Desta forma a fase linear onde o substrato é abundante a enzima apresenta o funcionamento em velocidade máxima, pois a enzima está saturada pelo substrato e opera em sua taxa máxima (BOECKX et al., 2017).

A taxa de variação pode ser expressa pela equação a seguir, e está diretamente relacionada a inclinação (slope) e a velocidade inicial da curva de progressão. Portanto ao encontrar a maior velocidade, encontramos o momento quando a enzima esta mais saturada pelo substrato e sua taxa máxima sob as condições do ensaio. (BOECKX et al., 2017; BROOKS et al., 2004)

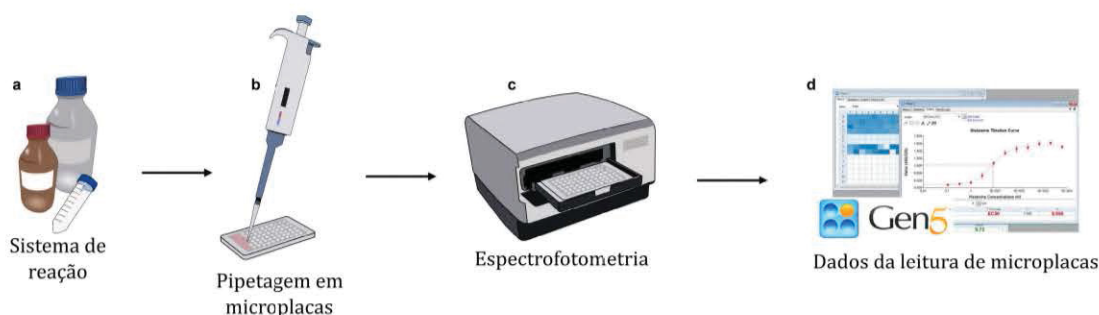
$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = slope = v_0$$

2.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE MICROPLACAS

A espectrometria de microplacas é uma técnica de alta produtividade que utiliza microplacas com diferentes quantidades de poços para medir a absorbância

em múltiplos poços simultaneamente. (ASHOUR, GEE e HAMMOCK, 1987; POWERS et al., 2007). A análise de leituras de microplacas no espectrofotômetro gera um conjunto de dados relacionando o tempo e a absorbância para cada poço da microplaca (FIGURA 1).

FIGURA 1 – LEITURA DE MICROPLACAS NO ESPECTROFOTÔMETRO



Fonte: O Autor (2025)

LEGENDA: Exemplo simplificado de uma leitura de microplacas pelo espectrofotômetro. a = É montado um sistema de reação conforme a metodologia específica da enzima que está sendo trabalhada para fornecer o substrato adequado para enzima; b = O sistema de reação junto com a amostra trabalhada é pipetado na microplaca com o auxílio de micropipetas; c = Ocorre a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda adequado a enzima trabalhada; d = os dados são interpretados pelo software associado ao espectrofotômetro para gerar a curva de progressão.

O processo de identificação da porção linear da curva de absorbância em função do tempo pode-se utilizar do coeficiente de determinação (R^2), onde quanto mais próximo de 1, mais linear é o trecho. Desta forma, para a inferência da atividade enzimática, os autores consideram trechos da curva com um R^2 igual ou superior a 0,99 para a obtenção da inclinação. Outro aspecto a ser considerado é o intervalo mínimo de leitura registrado. Períodos curtos demais podem não expressar corretamente a reação que está ocorrendo. Desta forma se estabelece um período mínimo, normalmente 3 minutos, para garantir a fidelidade dos dados. (BALDWIN et al., 2007; BIDIGARE; KING, 1981; BURTIS; ASHWOOD, 1998; CIARDELLO; CAMARDELLA; DI PRISCO, 1995; CIARDIELLO et al., 2000; CHILDRESS; SOMERO, 1979; REITMAN; FRANKEL, 1957; SABOROWSKI; BUCHHOLZ, 2002; THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS, 2005).

2.3 OTIMIZAÇÃO

Otimização pode ser definida, em termos gerais, como o processo ou método que pode tornar algo o mais eficaz a partir de um conjunto de soluções possíveis e

uma seleção de parâmetros (PAPPALARDO, PARDALOS e STRACQUADANIO, 2013; SINHA, 2019; WANG & ZHAO, 2022).

Problemas de otimização podem ser aplicados em inúmeras áreas. (PAPPALARDO, PARDALOS e STRACQUADANIO, 2013; WANG & ZHAO, 2022) Eles podem ser formalizados como:

$$\begin{aligned} & \text{Minimizar ou maximizar } f(x), \\ & \text{sujeito a } g_i(x) \leq b_i, \quad i = 1, 2, \dots, m, \end{aligned}$$

Onde $x \in \mathbb{R}^n$ é o vetor de decisão (variáveis que podemos ajustar), $f: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$ é a função objetivo, que queremos minimizar ou maximizar, $g_i(x)$ representam as restrições (igualdades ou desigualdades) que definem a região viável.

A otimização de metodologias para cálculo da atividade enzimática é um processo que visa ajustar parâmetros experimentais para obter resultados precisos e reprodutíveis. Isso inclui a seleção do comprimento de onda adequado, a determinação da faixa linear da curva de absorbância e a minimização de interferências, como turbidez ou presença de inibidores. (DARWISH & ALZOMAN, 2023; GERMAN et al., 2011; ONYEOGAZIRI & PAPANEOPHYTOU, 2019) A otimização é particularmente importante em ensaios de alta produtividade, como os realizados em microplacas, onde a precisão e a rapidez são críticas. Encontrar o melhor valor possível de atividade enzimática não apenas aumenta a confiabilidade dos dados, mas também permite comparar resultados entre diferentes estudos e laboratórios.

A otimização da metodologia, por sua vez, é essencial para obter resultados confiáveis e reprodutíveis, contribuindo para avanços na pesquisa básica e aplicada. A contínua evolução das técnicas espectrofotométricas, aliada ao desenvolvimento de métodos computacionais para análise de dados, promete ampliar ainda mais o potencial dessa metodologia no estudo das enzimas.

2.4 JANELAS DESLIZANTES (SLIDING WINDOWS)

Janelas deslizantes (Sliding window) é uma técnica computacional utilizada para analisar partes de um conjunto de dados sequenciais, que podem ser séries temporais, sinais, textos ou sequências genéticas, de forma progressiva e contínua (NURAN TUNC-SKARKA et al., 2009; WU et al., 2014).

Seja uma série temporal univariada, como em estudos como o de KULANUWAT et al. (1862) e SUN et al., (2024) definida como $X = \{x_1, x_2, x_3, \dots, x_n\}$ com N pontos, escolhe-se uma janela de tamanho w (*fixo, inteiro, $1 \leq w \leq N$*). Define-se a janela deslizante W_t como o subconjunto da série: $W_t = \{x_t, x_{t+1}, x_{t+2}, \dots, x_{t+w-1}\}$, onde $t = 1, 2, 3, \dots, N - w + 1$.

Desta forma, a janela começa na posição t e contém os próximos w valores da série, avançando 1 ponto por vez.

3 APLICAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO NA INFERÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Nesta seção é apresentado o problema do número de soluções possíveis para escolha dos pontos de leitura de microplacas pelo espectrofotômetro para inferência da atividade enzimática como um problema de otimização. Também é analisado o uso de sliding windows na solução do problema. Por último é proposto um algoritmo para a inferência da atividade enzimática utilizando sliding windows para otimizar a resposta.

3.1 NÚMERO DE SOLUÇÕES POSSÍVEIS

Do conjunto de dados fornecido pela leitura do espectrofotômetro para cada poço, existem um subconjunto de soluções que atendem ao R^2 superior a 0,99 em um intervalo de pelo menos 3 minutos. Se considerarmos o número total de dados de leitura para um mesmo poço como n , o intervalo de tempo entre as leituras consecutivas como Δt (em minutos), e o número de leituras consecutivas selecionadas para o cálculo como k , podemos definir a soma dos intervalos de tempo da leitura selecionada como:

$$\text{Soma dos intervalos} = (k-1) \times \Delta t$$

Onde para k leituras consecutivas existem $k-1$ intervalos. Para atender o mínimo de tempo para o cálculo, temos que a soma dos intervalos deve atender:

$$(k-1) \times \Delta t \geq 3$$

Logo queremos:

$$\begin{aligned}
(k-1) \times \Delta t &\geq 3 \\
k-1 &\geq \frac{3}{\Delta t} \\
k &\geq \left(\frac{3}{\Delta t}\right)+1
\end{aligned}$$

Assim, tendo o número de elementos (k) em uma solução, podemos agora saber o número de conjuntos de tamanho k possíveis em uma análise com n leituras.

$$\text{Número de conjuntos de tamanho } k = n - k + 1$$

Considerando o número mínimo de elementos da solução como k_{min} temos:

$$k_{min} = \left(\frac{3}{\Delta t}\right)+1$$

Então o número total de conjuntos válidos é:

$$\sum_{k=k_{min}}^n (n - k + 1)$$

Se simplificarmos:

$$\sum_{k=k_{min}}^n (n - k + 1) = \sum_{m=1}^{n-k_{min}+1} m = \frac{(n-k_{min}+1)(n-k_{min}+2)}{2}$$

Como um resultado de valor negativo é incoerente para o nosso problema podemos utilizar a função máximo para garantir que caso ocorra seja substituído por zero, indicando a inexistência de possibilidades para resposta. Desta forma chegamos a fórmula final para o número máximo de possibilidades para os conjuntos viáveis:

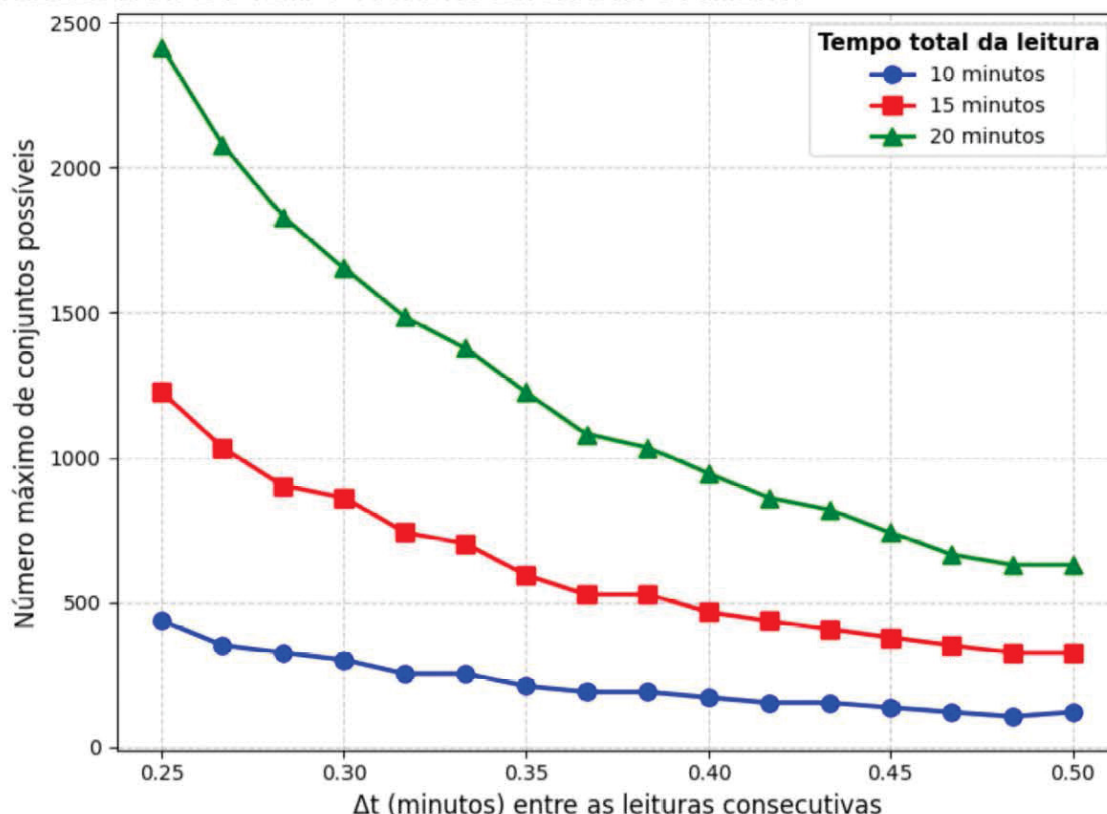
$$max = \left(0, \frac{(n-k_{min}+1)(n-k_{min}+2)}{2} \right)$$

Onde:

$$k_{min} = \left(\frac{3}{\Delta t}\right)+1$$

Utilizando esta fórmula para prever a possibilidade de grupos de leituras para diferentes combinações entre intervalos de leitura do espectrofotômetro e o tempo total de leitura obtemos o gráfico apresentado na FIGURA 1.

FIGURA 2 – NÚMERO DE CONJUNTOS VÁLIDOS POSSÍVEIS EM FUNÇÃO DO INTERVALO ENTRE LEITURAS E O TEMPO TOTAL NO ESPECTROFOTÔMETRO



FONTE: O autor (2025)

Legenda: Número de possibilidade máxima de conjuntos resposta atendendo o requisito de 3 minutos de leitura de microplacas contínua no espectrofotômetro em função do intervalo de leitura para 3 tempos totais de leitura diferentes.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA INFERÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA BASEADA NO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

A inferência da atividade enzimática está sujeita a tomada de decisão para seleção do conjunto de pontos consecutivos da leitura espectrofotométrica que se enquadrem nos requisitos metodológicos específicos. O cálculo da atividade enzimática varia conforme a metodologia utilizada e o tipo de reação pela qual será submetida no espectrofotômetro. No entanto, podemos escrever de forma genérica esse cálculo atendendo a algumas metodologias para enzimas do metabolismo energético conforme equação abaixo (BALDWIN et al., 2007; BIDIGARE; KING, 1981; BURTIS; ASHWOOD, 1998; CIARDELLO; CAMARDELLA; DI PRISCO, 1995; CIARDIELLO et al., 2000; CHILDRESS; SOMERO, 1979; REITMAN; FRANKEL, 1957; SABOROWSKI; BUCHHOLZ, 2002; THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS, 2005).

$$Atividade_{enzima} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{v_i * V_t}{\epsilon * l * V_{a,i} * P_i} \right) * D$$

Onde:

v_i : Velocidade da reação para a i -ésima repetição.

V_t : Volume total no poço da microplaca.

ϵ : Coeficiente de extinção do sistema de reação.

l : Caminho óptico.

$V_{a,i}$: Volume da amostra na i -ésima repetição.

P_i : Teor/concentração de proteína para a i -ésima repetição.

D : Este é um fator de diluição, se aplicável. Se a amostra foi diluída antes da medição, este fator ajusta a atividade enzimática para a concentração original.

A velocidade da reação para a i -ésima repetição é calculada multiplicando o "slope" (inclinação) da reta obtida a partir do gráfico de absorbância versus tempo por 60. Isso converte a velocidade para unidades de absorbância por minuto. Substituindo temos:

$$Atividade_{enzima} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{(slope * 60) * V_t}{\epsilon * l * V_{a,i} * P_i} \right) * D$$

As variáveis de decisão são:

t_i = Tempo inicial do subconjunto de pontos selecionados.

t_f = Tempo final do subconjunto de pontos selecionados.

z = Número de pontos consecutivos selecionados entre (variável dependente de t_i e t_f).

Se considerarmos a equação para inferência da atividade enzimática como função objetiva, os critérios metodológicos de coeficiente de determinação e período mínimo de leitura como restrições, e os conjuntos de pontos em sequência que atendem a estes requisitos como o conjunto viável de respostas, podemos formalizar este problema como um problema de otimização para encontrar o melhor conjunto que atenda aos requisitos metodológicos, da seguinte forma.

$$\text{Maximizar } Atividade_{enzima} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \left(\frac{(slope_j * 60) * V_t}{\epsilon * l * V_{a,j} * P_j} \right) * D$$

Restrições:

$$\left\{ \begin{array}{l} R^2(t_i, t_f) > 0,99 \\ t_f - t_i > 3 \\ z = \text{número de pontos entre } t_i \text{ e } t_f \\ t_{\min} \leq t_i < t_f \leq t_{\max} \\ a_i = \text{absorbância no tempo } t_i \\ a_f = \text{absorbância no tempo } t_f \end{array} \right\}$$

Como para cada poço os valores de volume, ϵ , l , P_i , e D são constantes, o que está variando é o slope. Dessa forma para maximizar a atividade enzimática devemos encontrar o menor slope possível. Desta forma se torna um problema de minimização do slope.

4 ALGORITMO

O problema da seleção do subconjunto de leituras espectrofotométricas é um problema classificado como otimização combinatória com dados contínuos. As variáveis que deverão ser tratadas no problema, providas dos dados gerados pelo software Gen5 associado a leitura de microplacas pelo espectrofotômetro, são pares ordenados de tempo e absorbância, sendo variáveis numéricas contínuas.

Assim o conjunto de dados da leitura do espectrofotômetro tem a seguinte forma:

$$\{(t_1, A_1), (t_2, A_2), \dots, (t_i, A_i), (t_{i+1}, A_{i+1}), \dots, (t_n, A_n)\}$$

Ou seja:

$$\{(t_i, A_i)\}_{i=1}^n, \text{ onde:}$$

$t_i \in \mathbf{R}$ é o tempo da i -ésima leitura,
 $A_i \in \mathbf{R}$ é a absorbância correspondente,
 n é o número total de leituras.

4.1 SELEÇÃO DOS SUBCONJUNTOS USANDO SLIDING WINDOWS

O algoritmo utiliza um processo de busca baseado em janelas deslizantes (sliding windows) que percorrem as colunas de dados esgotando as possibilidades de conjuntos analisando os critérios de restrições para cada janela. A cada

conclusão da sequência de passos sobre os dados, é acrescido uma unidade a mais no tamanho da janela e se reinicia o processo.

Para que uma janela de tamanho k seja válida, é necessário:

$$(k-1) \times \Delta t \geq 3 \Rightarrow k \geq \left(\frac{3}{\Delta t} \right) + 1$$

Definimos:

$$k_{min} = \left(\frac{3}{\Delta t} \right) + 1$$

Para cada tamanho de janela k , começando de k_{min} até n , percorremos os dados com janelas deslizantes:

Para cada $k \in [k_{min}, n]$, consideramos os subconjuntos:

$$S_{j,k} = \{(t_j, A_j), (t_{j+1}, A_{j+1}), \dots, (t_{j+k-1}, A_{j+k-1})\}, j = 1, \dots, n-k+1$$

Para cada subconjunto $S_{j,k}$, ajustamos uma regressão linear $A = at + \beta$ e calculamos:

Inclinação:

$$slope_{j,k} = \frac{k \sum t_i A_i - (\sum t_i)(\sum A_i)}{k \sum t_i^2 - (\sum t_i)^2}$$

Coefficiente de determinação (R^2):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (A_i - \hat{A}_i)^2}{\sum (A_i - \bar{A})^2}$$

Aceitamos (guardamos) apenas subconjuntos que satisfaçam:

$$R^2 > 0,99$$

Entre todas as janelas que passam o filtro de $R^2 > 0,99$, selecionamos a janela com menor slope positivo.

A FIGURA 2 mostra uma representação do funcionamento das janelas deslizantes para seleção dos subconjuntos viáveis dentro do algoritmo de otimização. Com base no que já foi descrito anteriormente podemos dizer que a primeira janela terá o subconjunto: $S_{1,k_{min}} = \{(t_1, A_1), (t_2, A_2), \dots, (t_{k_{min}}, A_{k_{min}})\}$ representado pela janela verde a esquerda. Ao dar um passo a janela terá o subconjunto: $S_{2,k_{min}} = \{(t_2, A_2), (t_3, A_3), \dots, (t_{k_{min}+1}, A_{k_{min}+1})\}$, e assim por diante até chegar ao final dos dados.

4.2 Solução Computacional

Para aplicar o algoritmo foi desenvolvido um código em linguagem Python (versão Python 3.13) para ler os dados obtidos da leitura de espectrofotômetro e calcular o subconjunto de leituras ótimo.

O programa inicia com a leitura do arquivo com os dados do espectrofotômetro na forma de pares com tempo e absorbância $\{(t_1, A_1), (t_2, A_2), \dots, (t_n, A_n)\}$, pelo qual percorrerá uma janela de tamanho k , variando de $k_{\min}$ até n . Para cada k , o código busca todas as janelas possíveis, ajustando um modelo para regressão linear e calculando o coeficiente de determinação (R^2) a cada passo para cada subconjunto de leitura. Se o R^2 for superior a 0,99 então calcula-se o slope, e este é atribuído a um dataframe. Para isso tem um loop externo sobre os tamanhos de janela k , e um loop interno sobre a posição inicial da janela.

O dataframe maior_slope (QUADRO 1) inicia com o valor atribuído de $-\infty$. A cada cálculo de slope se compara com o valor do dataframe maior_slope, se for maior se substitui pelo novo valor do slope, e armazena-se a janela correspondente.

Pseudocódigo – Otimização da Atividade Enzimática
<pre> 1: $R^2_{\min} \leftarrow 0.99$ 2: $t_{\min} \leftarrow 3$ 3: $\Delta t \leftarrow \text{moda}(\text{tempo}[i+1] - \text{tempo}[i])$ 4: $k_{\min} \leftarrow \lceil t_{\min} / \Delta t \rceil + 1$ 5: maior_slope $\leftarrow -\infty$ 6: melhor_janela $\leftarrow \emptyset$ 7: $n \leftarrow \text{comprimento}(\text{tempo})$ 8: For $k = k_{\min}$ até n do 9: For $i = 0$ até $(n - k)$ do 10: Subconjunto_t $\leftarrow \text{tempo}[i : i + k - 1]$ 11: Subconjunto_A $\leftarrow \text{absorbância}[i : i + k - 1]$ 12: slope, $R^2 \leftarrow \text{RegressãoLinear}(\text{Subconjunto_t}, \text{Subconjunto_A})$ 13: If $R^2 \geq R^2_{\min} \wedge (\text{Subconjunto_t}[k-1] - \text{Subconjunto_t}[0]) \geq t_{\min}$ then 14: If slope > maior_slope then 15: maior_slope $\leftarrow$ slope 16: melhor_janela $\leftarrow (i, k)$ 17: EndIf 18: EndIf 19: EndFor 20: EndFor </pre>


```

21: If melhor_janela =  $\emptyset$  then
22:   Retornar "Nenhum subconjunto válido encontrado."
23: EndIf

24:  $(i_{\text{melhor}}, k_{\text{melhor}}) \leftarrow \text{melhor\_janela}$ 
25: atividade_total  $\leftarrow 0$ 

26: For j =  $i_{\text{melhor}}$  até  $(i_{\text{melhor}} + k_{\text{melhor}} - 1)$  do
27:   Atividade_j  $\leftarrow ((\text{maior\_slope} \times 60) \times V_t) / (\epsilon \times l \times \text{Va}[j] \times P[j]) \times D$ 
28:   atividade_total  $\leftarrow \text{atividade\_total} + \text{Atividade\_j}$ 
29: EndFor

30: atividade_média  $\leftarrow \text{atividade\_total} / k_{\text{melhor}}$ 
31: Retornar atividade_média

```

TABELA 1: Pseudocódigo do algoritmo de seleção de subconjunto para inferência da atividade enzimática.

5. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS

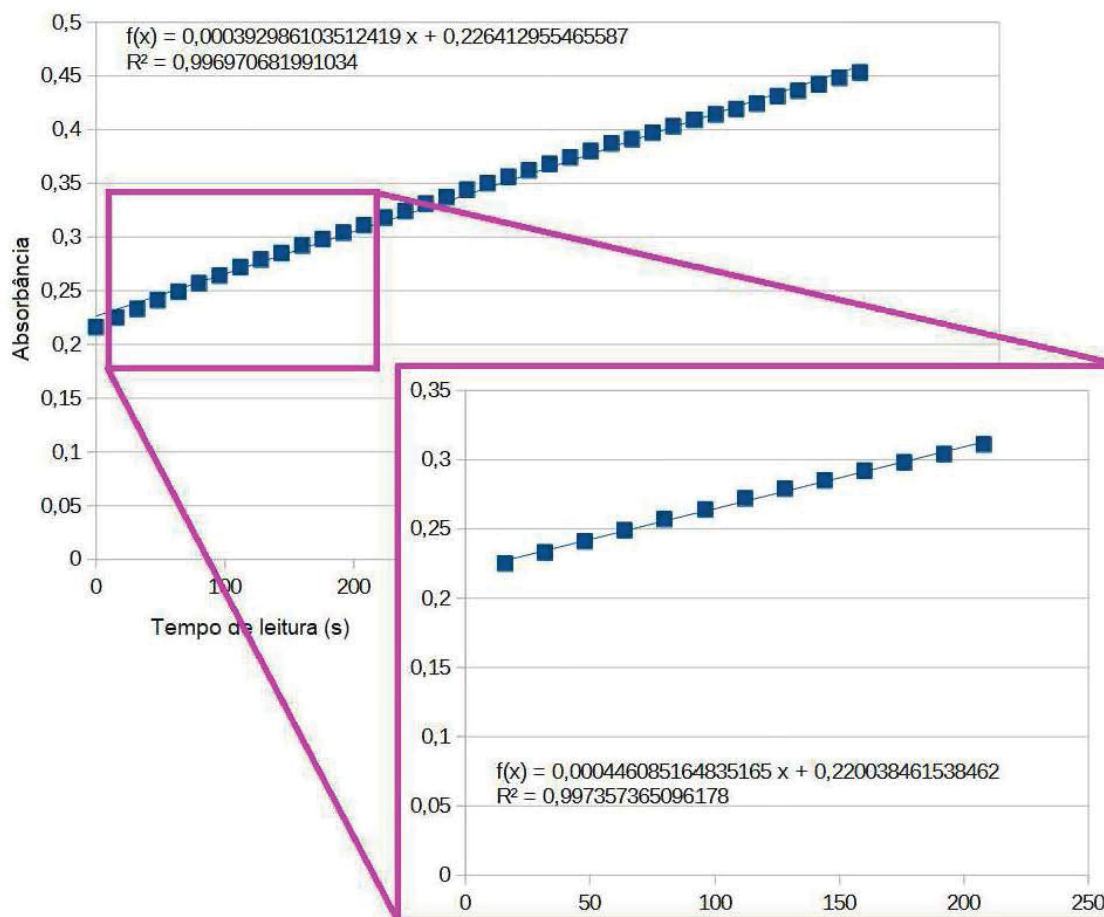
Este capítulo fala sobre a aplicação do algoritmo proposto em amostras reais para verificar seu desempenho. A abordagem proposta foi demonstrada na determinação da atividade enzimática de duas enzimas do metabolismo energético, citrato sintase (CS) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em tecidos do encéfalo e brânquia de *Astyanax lacustris*. Observou-se sua aplicação em leituras com 10, 14 e 15 minutos de duração total. Para isso foi utilizado o programa em python descrito anteriormente. O programa retornou todos os subconjuntos possíveis atendendo as restrições e o subconjunto ótimo. Com esses dados e os valores originais de leitura foi criado as curvas de absorbância.

5.1 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO ALGORITMO COM A LEITURA DO ESPECTROFOTÔMETRO

A FIGURA 3 mostra a janela do subconjunto ótimo em uma amostra de encéfalo de *Astyanax lacustris* obtida pelo algoritmo em uma leitura para inferência da atividade enzimática de citrato sintase – CS. O algoritmo encontrou 325 subconjuntos possíveis que atendiam o tempo mínimo e com um coeficiente de determinação superior a 0,99. O kmin para esta leitura foi de 13 observações. A janela ótima também teve uma duração de 13 observações totalizando 3,2 minutos de leitura contínua, com um R^2 de 0,99736.

A curva da leitura completa atende os pressupostos de tempo e linearidade, e se calcularmos a atividade enzimática da CS para o período integral obtemos 0,03384 U / mg de proteína⁻¹. Agora se usarmos a janela encontrada pelo algoritmo a atividade de CS fica em 0,03851 U / mg de proteína⁻¹.

FIGURA 4 – JANELA COM SUBCONJUNTO ÓTIMO EM CURVA DE ABSORBÂNCIA EM AMOSTRA DE ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* PARA ENZIMA CS

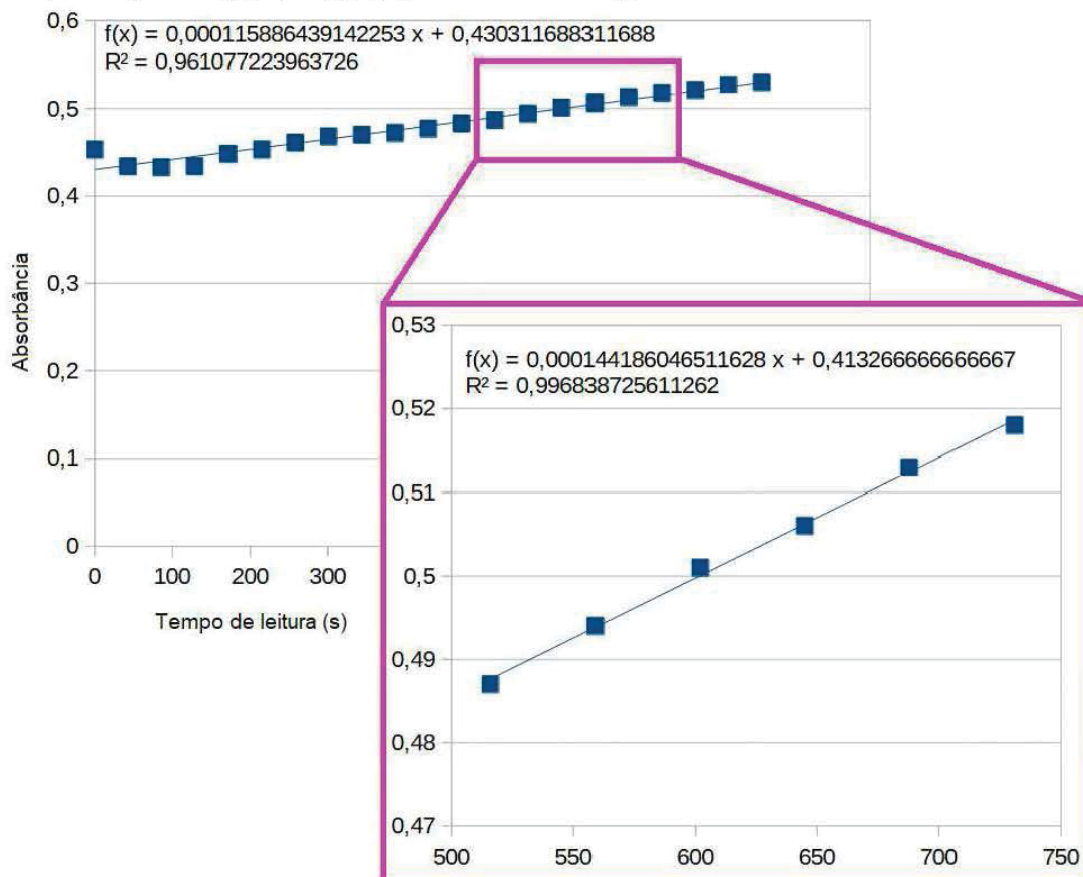


LEGENDA: Curva de absorvância a 412 nm pelo espectrofotômetro monitorando a formação de um complexo entre CoA-SH e DTNB, em amostra de tecido do encéfalo de *Astyanax lacustris* para inferir a atividade da enzima citrato cintase – CS. A janela com o subconjunto ótimo encontrada pelo algoritmo possui um k de 13. O tempo de leitura total foi de 10 minutos. O intervalo de cada leitura (Δt) foi de 16 segundos.

A segunda amostra testada foi para atividade de G6PDH em encéfalo de *Astyanax lacustris*. A leitura do espectrofotômetro teve 21 observações com um Δt de 43 segundos, totalizando 14 minutos de leitura. Se considerarmos a curva como um todo, ela tem um R^2 inferior a 0,99. Então considerando o maior subconjunto de leituras consecutivas com um R^2 adequado temos um conjunto iniciando no segundo ponto com $k = 20$ com um $R^2 = 0,9922$. Para este conjunto foi calculado a atividade enzimática de: 0,010724 U / mg de proteína⁻¹. O algoritmo encontrou o subconjunto

ótimo com $k = 6$ com R^2 de 0,9968, iniciando no 13º ponto de leitura. Para esse subconjunto a atividade foi 0,012448 U / mg de proteína⁻¹, conforme a FIGURA 4.

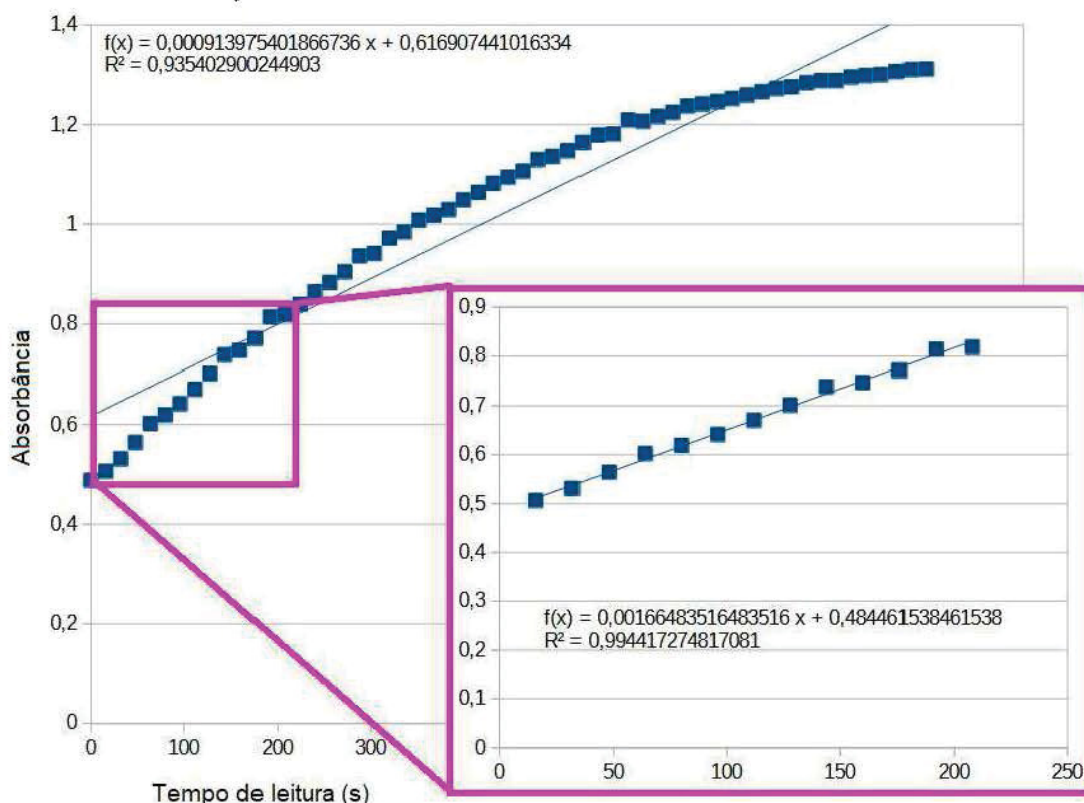
FIGURA 5 – JANELA COM SUBCONJUNTO ÓTIMO EM CURVA DE ABSORBÂNCIA EM AMOSTRA DE ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* PARA ENZIMA G6PDH



LEGENDA: Curva de absorvância a 340 nm pelo espectrofotômetro monitorando a formação de NADPH, em amostra de tecido do encéfalo de *Astyanax lacustris* para inferir a atividade da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase – G6PDH. A janela com o subconjunto ótimo encontrada pelo algoritmo possui um k de 6. O tempo de leitura total foi de 14 minutos. O intervalo de cada leitura (Δt) foi de 43 segundos.

A terceira amostra era do tecido de brânquia de *Astyanax lacustris* para atividade da CS. A leitura do espectrofotômetro teve 15 minutos com intervalo entre as observações de 16 segundos. Se considerarmos o intervalo com maior linearidade para comparação temos um conjunto com $k = 26$ e $R^2 = 0,9901$, iniciando na segunda observação, e a atividade enzimática de CS correspondente a esse intervalo é de 0,120771 U / mg de proteína⁻¹. O algoritmo encontrou para a mesma amostra o subconjunto ótimo com $k = 13$ e $R^2 = 0,9944$. Para esta janela a atividade correspondente foi de 0,143728 U / mg de proteína⁻¹.

FIGURA 6 – JANELA COM SUBCONJUNTO ÓTIMO EM CURVA DE ABSORBÂNCIA EM AMOSTRA DE BRÂNQUIA DE *Astyanax lacustris* PARA ENZIMA CS



LEGENDA: Curva de absorbância a 412 nm pelo espectrofotômetro monitorando a formação de um complexo entre CoA-SH e DTNB, em amostra de tecido da brânquia de *Astyanax lacustris* para inferir a atividade da enzima citrato cintase – CS. A janela com o subconjunto ótimo encontrada pelo algoritmo possui um k de 21. O tempo de leitura total foi de 15 minutos. O intervalo de cada leitura (Δt) foi de 16 segundos.

Para todas as amostras analisadas o algoritmo conseguiu encontrar as porções da curva de progresso com slopes superiores a seleção de pontos manuais da leitura do espectrofotômetro. Estas janelas de leituras respeitaram as restrições metodológicas de tempo mínimo de leitura contínua e de linearidade, pressupostos essenciais para poder tomar a velocidade da reação como medida da quantidade de atividade (BOECKX et al., 2017; BURSCH, OLP e SMITH, 2023). Além disso, o algoritmo conseguiu analisar todas as janelas possíveis e assim encontrando a atividade enzimática máxima.

Por final a execução do algoritmo tornou a inferência mais rápida e eficiente, visto que obteve a atividade máxima em questão de segundos tendo analisado todas as soluções possíveis.

O que o algoritmo está fazendo ao maximizar o slope é encontrar a porção da curva em que a taxa da absorbância por unidade de tempo é maior, respeitando os critérios metodológicos utilizados, de forma que a atividade enzimática subsequente é inferida na

porção onde a absorbância está mudando com a maior velocidade constante, isto é, o momento em que a reação acontece mais rapidamente.

Assim como esclarece BROOKS et al. (2004) esta região da curva de progresso não é predeterminada e varia conforme as condições do ensaio enzimático, assim como visto nas curvas analisadas pelo algoritmo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No presente trabalho foi apresentado uma interpretação da inferência da atividade enzimática como um problema de otimização e proposto um algoritmo utilizando sliding windows para encontrar todos os subconjuntos viáveis. A implementação do algoritmo foi capaz de identificar todas as soluções possíveis respeitando as restrições metodológicas para a inferência da atividade enzimática, além de proporcionar uma padronização na seleção dos pontos de leitura do espectrofotômetro.

Do ponto de vista da otimização o algoritmo foi capaz de encontrar a solução ótima por meio de busca exaustiva, conseguindo encontrar o ótimo global. Entretanto este algoritmo só se torna viável através de uma solução computacional. Isto, por outro lado, permite encontrar de forma padronizada a atividade enzimática em questão de segundos e evita erros de seleção humana e de ambiguidade na interpretação da atividade enzimática.

Foi verificado o número alto de possíveis respostas que atendem as metodologias de cálculo da atividade enzimática, o que poderia ocasionar a identificação de atividades enzimáticas diferentes para uma mesma amostra mesmo respeitando os critérios de tempo de leitura e linearidade da curva de absorbância.

Do ponto de vista biológico, embora o algoritmo respeite aos critérios metodológicos de inferência de atividade enzimática consultados, ainda existe a necessidade de verificar se a solução ótima representa fielmente a atividade enzimática para todos os casos, e de esclarecer completamente essa relação a fim de encontrar possíveis casos em que a atividade ótima possa não ser adequada, caso existam. O algoritmo foi testado em um número pequeno de amostras. As análises testadas foram com enzimas do metabolismo energético, de forma que ainda é preciso compreender para quais tipos de enzimas o algoritmo é eficiente, se de forma geral ou apenas a uma parcela.

Seria interessante criar uma interfase de fácil visualização para o usuário.

7. REFERÊNCIAS

- ASHOUR, M. B., GEE, S. J., HAMMOCK, B. D., Use of a 96-well microplate reader for measuring routine enzyme activities. **Anal Biochem**, v.166, n. 2, p. 353-60, 1 nov 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90585-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90585-9). Acesso em 27 mai. 2025.
- BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974.
- BOECKX, j., HERTOOG, m., GEERAERD, A., NICOLAI, B., Kinetic modelling: an integrated approach to analyze enzyme activity assays. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, 25 ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0218-y>. Acesso em 14 fev. 2025.
- BURSCH, K. L.; OLP, M. D.; SMITH, B. C. Analysis of continuous enzyme kinetic data using ICEKAT. **Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology**, p. 109–129, 1 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2023.06.019>. Acesso em: 28 mar. 2025.
- BROOKS, H. B., GEEGANAGE, S., KAHL, S. D., MONTROSE, C., SITTAMPALAM, C., SMITH, M. C., WEIDNER, J. R., Assay Guidance Manual . Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92007/>. Acesso em: 14 abr. 2025.
- CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979.
- CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. I- Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000
- DARWISH, I. A.; ALZOMAN, N. Z. Development of Green and High Throughput Microplate Reader-Assisted Universal Microwell Spectrophotometric Assay for Direct Determination of Tyrosine Kinase Inhibitors in Their Pharmaceutical Formulations Irrespective the Diversity of Their Chemical Structures. **Molecules**, v. 28, n. 10, p. 4049–4049, 12 maio 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28104049>. Acesso em 10 mai. 2025.
- DUGGLEBY, R. G. Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. **Methods in Enzymology**, 1995. 249, 61–90. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)49031-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)49031-0). Acesso em: 28 fev. 2025.
- HALLING, P. et al. An empirical analysis of enzyme function reporting for experimental reproducibility: missing/incomplete information in published papers.

Biophysical chemistry, v. 242, p. 22–27, 1 nov. 2018. Disponível em: [10.1016/j.bpc.2018.08.004](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.08.004). Acesso em: 21 mai. 2025.

GERMAN, D. P.; WEINTRAUB, M. N.; GRANDY, A. S.; LAUBER, C. L.; RINKES, Z. L.; ALLISON, S. D. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 1387–1397, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.017>. Acesso em 10 mai. 2025.

KEI, S. Exploring Enzyme Assays for Biochemical Insights. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 15, n. 3, p. 1–2, 11 mar. 2024.

KULANUWAT, L., CHANTRAPORNCHAI, C., MALEEWONG, M., WONGCHAI SUWAT, P., WIMALA, S., SARINNAPAKORN, K., BOONYA-ARONNET, S., Anomaly Detection Using a Sliding Window Technique and Data Imputation with Machine Learning for Hydrological Time Series. **Water**, 2021 v. 13, n. 13, 1862. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w13131862>. Acesso em 23 mai. 2025.

NARAYANAN, H. **Advancing Enzyme Analysis**. Disponível em: https://www.biopharminternational.com/view/advancing-enzyme-analysis?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 22 mai. 2025.

NURAN TUNC-SKARKA et al. MR spectroscopic evaluation of N-acetylaspartate's T2 relaxation time and concentration corroborates white matter abnormalities in schizophrenia. **NeuroImage**, v. 48, n. 3, p. 525–531, 15 nov. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.06.061>. Acesso em 23 abr. 2025.

ONYEOGAZIRI, F. C.; PAPANEOPHYTOU, C. A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach. **SLAS discovery: advancing life sciences R & D**, v. 24, n. 5, p. 587–596, 1 jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2472555219830084>. Acesso em: 10 mai. 2025.

REITMAN, S., FRANKEL, S. A. Colorimetric method for tile determination of serum Glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. A in. **J. Clin. Path**, v.28, n. 56, p. 53 - 63, 1957.

SINHA, G. R. Modern Optimization Methods for Science, Engineering and Technology. [s.l: s.n.].

SABOROWSKI, R., BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 557–565, 2002.

SUN, W.; LI, H.; LIANG, Q.; ZOU, X.; CHEN, M.; WANG, Y., On data efficiency of univariate time series anomaly detection models. **Journal Of Big Data**, v. 11, n. 1, 11 jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40537-024-00940-7>. Acesso em 25 mai. 2025.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 3, p. 603–611, 2005.

WANG, L.; ZHAO, J. Mathematical Optimization. Apress eBooks, p. 87–119, 27 dez. 2022.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. **Biochemische Zeitschrift**, Berlin, v. 310, p. 384-421, 1942.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker, 1994.

WU, K., ZHANG, K., FAN, W., EDWARDS, A., YU, P. S., RS-Forest: A Rapid Density Estimator for Streaming Anomaly Detection, IEEE International Conference on Data Mining, Shenzhen, China, 2014, pp. 600-609, Disponível em: <https://doi.org/10.1109/ICDM.2014.45>. Acesso em 4 mai. 2025.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 6. ed. New York: Garland Science, 2017.
- ANDRADE, L. H. C., LIMA, D. M. V., LIMA, S. M., SANTANA, C. A., SÚAREZ, Y. R. Laser-induced fluorescence in fish scales to evaluate the environmental integrity of ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 165, 80 – 86. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.005>. Acesso em 21 dez. 2024.
- ASHOUR, M. B., GEE, S. J., HAMMOCK, B. D., Use of a 96-well microplate reader for measuring routine enzyme activities. **Anal Biochem**, v.166, n. 2, p. 353-60, 1 nov 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90585-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90585-9). Acesso em 27 mai. 2025.
- BALDISSEROTTO, B., CYRINO, J. E. P., & URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotrópicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP 2014.
- BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, n. 2, p. 213–225, 2007.
- BARREIROS, A. L. S., BARREIROS, M. L. **Química de Biomoléculas**. São Cristóvão, Universidade Federal de Sergipe / CESAD, 2012.
- BEJAN, A. Thermodynamics of heating. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 475, n. 2223, p. 20180820, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspa.2018.0820>. Acesso em: 9 fev. 2025.
- BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1974.
- BIRNIE-GAUVIN, K.; COSTANTINI, D.; COOKE, S. J.; WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928–942, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/faf.12215>. Acesso em 27 mai. 2025.
- BOECKX, j., HERTOOG, m., GEERAERD, A., NICOLAI, B., Kinetic modelling: an integrated approach to analyze enzyme activity assays. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, 25 ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0218-y>. Acesso em 14 fev. 2025.
- BOITEUX, A.; HESS, B. Design of glycolysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences**, v. 293, p. 5–22, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.1981.0056>. Acesso em: 15 fev. 2025.

BOUCHARD, P. Time course of the response of mitochondria from oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 19, p. 3455–3465, 1 out. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.00578>. Acesso em: 08 mar. 2025.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities Of protein utilizing the principle of rotein-dye binding. **Anal Biochem**. V. 72, p. 248-254, 1976.

BROOKS, H. B., GEEGANAGE, S., KAHL, S. D., MONTROSE, C., SITTAMPALAM, C., SMITH, M. C., WEIDNER. J. R., Assay Guidance Manual . Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92007/>. Acesso em: 14 abr. 2025.

BURSCH, K. L.; OLP, M. D.; SMITH, B. C. Analysis of continuous enzyme kinetic data using ICEKAT. **Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology**, p. 109–129, 1 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2023.06.019>. Acesso em: 28 mar. 2025.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. I- Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000

CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; MARTINO, R.C. Retenção de proteína e energia em juvenis de "black bass" *Micropterus salmoides* **Scientia Agricola**, v.57, p.609-616, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162000000400003>. Acesso em: 25 de mar. 2025.

DARWISH, I. A.; ALZOMAN, N. Z. Development of Green and High Throughput Microplate Reader-Assisted Universal Microwell Spectrophotometric Assay for Direct Determination of Tyrosine Kinase Inhibitors in Their Pharmaceutical Formulations Irrespective the Diversity of Their Chemical Structures. **Molecules**, v. 28, n. 10, p. 4049–4049, 12 maio 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28104049>. Acesso em 10 mai. 2025.

DELONG, J. P. et al. The combined effects of reactant kinetics and enzyme stability explain the temperature dependence of metabolic rates. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 3940–3950, 23 abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ece3.2955>. Acesso em: 06 fev. 2025.

DRAY, S.; JOMBART, T. Revisiting Guerry's data: introducing spatial constraints in multivariate analysis. **The Annals of Applied Statistics**, v. 5, n. 4, p. 2278–2299,

2011. Disponível em: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1202.6485>. Acesso em: 10 abr. 2025.

DUGGLEBY, R. G. Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. **Methods in Enzymology**, 1995. 249, 61–90. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)49031-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)49031-0). Acesso em: 28 fev. 2025.

EDWARDS, K. R. et al. A comparison of univariate and multivariate methods for analyzing clinal variation in an invasive species. **Hydrobiologia**, v. 674, n. 1, p. 119–131, 24 maio 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0732-2>. Acesso em: 03 abr. 2025.

EĞİLMEZ, H. I.; HASPOLAT, E. Temperature-Dependent Parameters in Enzyme Kinetics: Impacts on Enzyme Denaturation. **Fundamental Journal of Mathematics and Applications**, v. 7, n. 4, p. 226–235, 31 dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.33401/fujma.1517334>. Acesso em: 10 mar. 2025.

EKSTRÖM, A. et al. Thermal sensitivity and phenotypic plasticity of cardiac mitochondrial metabolism in European perch, *Perca fluviatilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 3, p. 386–396, 16 nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.150698>. Acesso em: 25 abr. 2025.

FANG, L.; LIU, Y.; TIAN, H.; CHEN, H.; WANG, Y.; HUANG, M., Proper land use for heavy metal-polluted soil based on enzyme activity analysis around a Pb-Zn mine in Feng County, China. **Environmental science and pollution research international**, v. 24, n. 36, p. 28152–28164, 10 out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0308-4>. Acesso em: 15 jan. 2025.

FIELDS, P. A.; SOMERO, G. N. Hot spots in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A 4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 19, p. 11476–11481, 15 set. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11476>. Acesso em: 12 fev. 2025.

GERMAN, D. P.; WEINTRAUB, M. N.; GRANDY, A. S.; LAUBER, C. L.; RINKES, Z. L.; ALLISON, S. D. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 1387–1397, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.017>. Acesso em 10 mai. 2025.

HALLING, P. et al. An empirical analysis of enzyme function reporting for experimental reproducibility: missing/incomplete information in published papers. **Biophysical chemistry**, v. 242, p. 22–27, 1 nov. 2018. Disponível em: 10.1016/j.bpc.2018.08.004. Acesso em: 21 mai. 2025.

HUANG, J., KANG, Y., LI Y., LIU, Z., WANG, J. Transcriptomic responses to heat stress in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney. **Fish & Shellfish Immunology**. 82, 32 – 40. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.002>. Acesso em: 10 mar. 2025.

IBARZ, A. et al. Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 155, n. 3, p. 319–326, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.012>. Acesso em: 3 jan. 2025.

IFTIKAR, F. I.; MACDONALD, J. R.; BAKER, D. W.; RENSHAW, G. M. C.; HICKEY, A. J. R. Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 13, p. 2348–2357, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.098798>. Acesso em: 7 fev. 2025.

ISLAM, M. J., KUNSMANN, A., SLATER, M. J. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. **Journal of the World Aquaculture Society**. 53, 314 – 366. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jwas.12853>

KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 218–224, abr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008>. Acesso em: 14 mar. 2025.

KEI, S. Exploring Enzyme Assays for Biochemical Insights. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 15, n. 3, p. 1–2, 11 mar. 2024.

KULANUWAT, L., CHANTRAPORNCHAI, C., MALEEWONG, M., WONGCHAI SUWAT, P., WIMALA, S., SARINNAPAKORN, K., BOONYA-ARONNET, S., Anomaly Detection Using a Sliding Window Technique and Data Imputation with Machine Learning for Hydrological Time Series. **Water**, 2021 v. 13, n. 13, 1862. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w13131862>. Acesso em 23 mai. 2025.

LIU, H., YANG, R., FU, Z., YU, G., LI, M., DAI, S., Ma, Z., Zong, H., Acute thermal stress increased enzyme activity and muscle energy distribution of yellowfin tuna. **PLoS ONE** v. 18, n. 10, 5 out, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289606>. Acesso em: 10 fev. 2025.

LOGATO, P. V. R., PONTES, E. C., SILVEIRA, U. S. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, 6, 817 - 836. 2009.

LU, Y., LIU Y., SONG, Z., WU, Z. XIAO, P., ZANG, P. Insight into the heat resistance of fish via blood: Effects of heat stress on metabolism, oxidative stress and antioxidant response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and turbot *Scophthalmus maximus*. **Fish & Shellfish Immunology**. 58, 125 - 135. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.008>. Acesso em: 21 fev. 2025.

LUCENA C. A. & SOARES H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**. Jan 28; 4072, 101 - 25. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>. Acesso em 04 fev. 2025.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 17 jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>. Acesso em 04 mar. 2025

MORASH, A. J.; VANDERVEKEN, M.; MCCLELLAND, G. B. Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 21 nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00452>. Acesso em 25 jan. 2025.

MOURA, A. S. et al. Fisiologia hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p. 92-99, 2006. Disponível em: <https://gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/305/296>. Acesso em: 20 mar. 2025.

NARAYANAN, H. **Advancing Enzyme Analysis**. 2021. Disponível em: https://www.biopharminternational.com/view/advancing-enzyme-analysis?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 22 mai. 2025.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**. 7ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2018.

NURAN TUNC-SKARKA et al. MR spectroscopic evaluation of N-acetylaspartate's T2 relaxation time and concentration corroborates white matter abnormalities in schizophrenia. **NeuroImage**, v. 48, n. 3, p. 525–531, 15 nov. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.06.061>. Acesso em 23 abr. 2025.

ONYEOGAZIRI, F. C.; PAPANEOPHYTOU, C. A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach. **SLAS discovery: advancing life sciences R & D**, v. 24, n. 5, p. 587–596, 1 jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2472555219830084>. Acesso em: 10 mai. 2025.

PALIY, O.; SHANKAR, V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1032–1057, 26 fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mec.13536>. Acesso em: 23 mar. 2025.

POL, I.; FLIK, G.; GORISSEN, M. Comparative physiology of energy metabolism: fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00036>. Acesso em: 14 abr. 2025.

REITMAN, S., FRANKEL, S. A. Colorimetric method for tile determination of serum Glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. A in. **J. Clin. Path**, v.28, n. 56, p. 53 - 63, 1957.

RØNNESTAD, I.; VOLKOFF, H. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. **Temperature**, v. 7, p. 307–320, 2020. DOI: 10.1080/23328940.2020.1765950. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23328940.2020.1765950>. Acesso em: 12 abr. 2025.

SABOROWSKI, R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 557–565, 2002.

SÁEZ-ARTEAGA, A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; SANZ, A.; DELGADO, M. J. Thermal adaptation in ectotherms: physiological and biochemical responses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 287, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.111352>. Acesso em: 10 dez. 2025.

SINHA, G. R. Modern Optimization Methods for Science, Engineering and Technology. [s.l: s.n.].

SYED, S. E. H.; ENGEL, P. C. A pH-dependent activation-inactivation equilibrium in Glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*. **Biochemical Journal**, 271, 351 – 355, 1990.

SOMERO, G. N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 912–920, 26 fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>. Acesso em: 02 fev. 2025.

SULLIVAN, G.; SPENCER, M. Heat and temperature. **BJA Education**, v. 22, n. 9, p. 350–356, set. 2022.

SUN, W.; LI, H.; LIANG, Q.; ZOU, X.; CHEN, M.; WANG, Y., On data efficiency of univariate time series anomaly detection models. **Journal Of Big Data**, v. 11, n. 1, 11 jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40537-024-00940-7>. Acesso em 25 mai. 2025.

TASAKI, H. Heat flows from hot to cold: A simple rigorous example of thermalization in an isolated macroscopic quantum system. **arXiv:cond-mat/0009206**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2404.04533>. Acesso em: 23 jan. 2025.

THANH, N. M.; JUNG, H.; LYONS, RE.; CHAND, V.; TUAN, N. V.; THU, V. T.; MATHER, P. A. transcriptomic analysis of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in response to salinity adaptation: De novo assembly, gene annotation and marker discovery. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**. v. 10, p. 52–63, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.04.001>. Acesso em 10 mar. 2025.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 3, p. 603–611, 2005.

RØNNESTAD, I., VOLKOFF, H. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. **Temperatura (Austin)**. 7, 307 – 320. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23328940.2020.1765950>. Acesso em: 21 dez. 2024.

YAN, Y.; XIE, X. Metabolic compensations in mitochondria isolated from the heart, liver, kidney, brain and white muscle in the southern catfish (*Silurus meridionalis*) by seasonal acclimation. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 183, p. 64–71, maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.011>. Acesso em: 23 abr. 2025.

YANG, C.-X.; WANG, T.; GAO, L.-N.; YIN, H.-J.; LÜ, X., Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 6, p. 1447–1460, 22 out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13562>. Acesso em: 15 jan. 2025.

YANG, S., ZHAO, T., MA, A., HUANG, Z., LIU, Z., CUI, W., ZHANG, J., ZHU, C., GUO, X., YUAN, C., Metabolic responses in *Scophthalmus maximus* kidney subjected to thermal stress. **Fish Shellfish Immunol**, v. 103, p. 37–46, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.003>. Acesso em: 4 fev. 205.

YOUNIS, E.M. Variation in metabolic enzymatic activity in white muscle and liver of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, in response to long-term thermal acclimatization. **Chin. J. Ocean. Limnol.** 33, 696–704 (2015). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00343-015-4093-y>. Acesso em: 17 mar. 2025.

WANG, L.; ZHAO, J. Mathematical Optimization. Apress eBooks, p. 87–119, 27 dez. 2022.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, p. 384–421, 1942.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; GAO, J. Z. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1372–1381, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.401>. Acesso em: 24 fev. 2025.

WHITAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food sciences*. New York: Marcel Dekker, 1994.

WU, K., ZHANG, K., FAN, W., EDWARDS, A., YU, P. S., RS-Forest: A Rapid Density Estimator for Streaming Anomaly Detection, IEEE International Conference on Data Mining, Shenzhen, China, 2014, pp. 600–609, Disponível em: <https://doi.org/10.1109/ICDM.2014.45>. Acesso em 4 mai. 2025.