



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRENDA FRANCISCONI DIAZ

**EFEITO DA POLPA DA JUÇARA *IN NATURA* E
FERMENTADA POR *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*
LR92 EM RATAS *WISTAR* COM IDADE AVANÇADA:
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E A FERTILIDADE.**

Londrina
2023

BRENDA FRANCISCONI DIAZ

**EFEITO DA POLPA DA JUÇARA *IN NATURA* E
FERMENTADA POR *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*
LR92 EM RATAS *WISTAR* COM IDADE AVANÇADA:
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E A FERTILIDADE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Karla Bigetti Guergoletto
Co-orientador: Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Diaz, Brenda Francisconi.

EFEITO DA POLPA DA JUÇARA IN NATURA E FERMENTADA POR LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI LR92 EM RATAS WISTAR COM IDADE AVANÇADA : PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E A FERTILIDADE. /

Brenda Francisconi Diaz. - Londrina, 2023.

69 f. : il.

Orientador: Karla Bigetti Guergoletto .

Coorientador: Daniela Cristina Ceccatto Gerardin.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Juçara - Tese. 2. Antioxidantes - Tese. 3. Probióticos - Tese. 4. Fertilidade - Tese. I. Bigetti Guergoletto , Karla . II. Ceccatto Gerardin, Daniela Cristina . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

BRENDA FRANCISCONI DIAZ

**EFEITO DA POLPA DA JUÇARA *IN NATURA* E
FERMENTADA POR *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*
LR92 EM RATAS *WISTAR* COM IDADE AVANÇADA:
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E A FERTILIDADE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientadora: Prof. Dra. Karla Bigetti
Guergoletto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Co-Orientadora: Prof. Dr. Daniela
Cristina Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Giselle Aparecida Nobre Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Graziela Scialanti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 4 de agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado até aqui e por todas as bênçãos a mim concedidas em cada momento.

Expresso aqui minha gratidão à minha orientadora, Prof^a Karla Bigetti Guergoletto, por prontamente me aceitar como orientanda e pelo apoio ao longo de todo o processo de pesquisa. Seu conhecimento, dedicação e paciência foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à minha coorientadora, Prof^a Daniela Cristina Ceccatto Gerardin, por, literalmente, ter pegado na minha mão e me conduzido durante o processo. Mais do que aprendizados acadêmicos, compartilhou valiosas lições de vida, e sou imensamente grata por isso.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, Prof^a. Giselle Aparecida Nobre Costa e Prof^a. Graziela Scaliante Ceravolo pela avaliação criteriosa e pelos *insights* valiosos fornecidos durante a pesquisa desta dissertação.

Sou grata aos colegas de laboratório e amigos que compartilharam seu tempo e conhecimento, enriquecendo assim a minha pesquisa. Agradeço especialmente à Natalia, Carolina, Eduardo, Vinicius, Victor e Marina pelo apoio mútuo ao longo desta jornada acadêmica. Agradeço também à professora Débora e pós-doutoranda Franciane da UNESP - Botucatu pela parceria.

Não posso deixar de mencionar o apoio e incentivo da minha família. Agradeço à minha mãe e à minha avó por serem meu alicerce, acreditarem em mim e me proporcionarem o suporte emocional necessário para enfrentar os desafios dessa jornada.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão a CAPES pela oportunidade e recurso financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

A todos vocês, o meu sincero agradecimento pelo apoio, incentivo e contribuição para a conclusão desta dissertação. Vocês foram essenciais nessa conquista e sou grata por ter tido a oportunidade de contar com cada um de vocês ao longo dessa jornada.

“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.”
Max Weber

DIAZ, Brenda Francisconi. **Efeito da polpa da juçara *in natura* e fermentada por *limosilactobacillus reuteri* LR92 em ratas *Wistar* com idade avançada: propriedades antioxidantes e a fertilidade.** 2023. (69). Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

O envelhecimento reprodutivo feminino está relacionado à redução das taxas de fertilidade em razão da perda gradual das funções de órgãos e tecidos, redução da qualidade do ovócito, aumento do dano ao DNA mitocondrial e aneuploidia cromossômica. O estilo de vida que grande parte das mulheres tem se submetido nas últimas décadas contribui para a maternidade tardia, o que tem demonstrado ser um fator de risco para aborto espontâneo, anomalias cromossômicas e congênitas. Além disso, sabe-se que o desequilíbrio no estresse oxidativo pode contribuir para o envelhecimento e afetar a reprodução feminina, interferindo negativamente na implantação do embrião e relacionando-se com a perda gestacional precoce observada no estudo. No entanto, hábitos de vida saudáveis como o consumo de bioativos como antioxidantes e probióticos podem amenizar os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo e, portanto, podem minimizar o risco associado de infertilidade. Nesse sentido, esse estudo objetivou analisar os efeitos da administração, via gavagem, da polpa de juçara e da polpa de juçara fermentada por *Limosilactobacillus reuteri* LR92 (4,45 mL/kg/dia), durante 6 semanas, sobre os parâmetros reprodutivos e marcadores oxidativos em ratas *Wistar* de idade avançada. O presente estudo evidenciou que a fermentação da polpa da juçara não alterou o conteúdo de compostos fenólicos totais, mas reduziu significativamente a atividade antioxidante quando analisada pelo método FRAP. A administração da juçara, fermentada ou não, não esteve associada a alterações nas taxas de gestação, natalidade, acasalamento e fertilidade. As amostras ovarianas demonstraram diminuição na atividade antioxidante enzimática da glutathione-S-transferase (GST) no grupo tratado com juçara fermentada, enquanto as amostras uterinas apresentaram aumento na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no grupo tratado com juçara não fermentada, indicando maior capacidade antioxidante *in vivo*. Observou-se ainda que a administração da juçara *in natura* foi associada à maior taxa de implantação e menor taxa de perda pré-implantação. Essa descoberta pode ser atribuída à diminuição na área de senescência celular nos tecidos ovarianos e uterinos (estroma) e a uma maior atividade antioxidante no grupo tratado com juçara *in natura*, quando comparado ao grupo tratado com juçara fermentada por LR92 e ao grupo controle. Concluiu-se que a juçara possui propriedades antioxidantes e capacidade de retardar o envelhecimento celular no útero e ovário, resultando em taxas aumentadas de implantação e redução das taxas de perda pré-implantação. Esses resultados sugerem que a juçara pode ser benéfica para a saúde reprodutiva, oferecendo potenciais aplicações na área da fertilidade.

Palavras-chave: Juçara; Probióticos; Gestação tardia; Antioxidantes; Fertilidade.

DIAZ, Brenda Francisconi. **Effect of juçara pulp in natura and fermented by *limosilactobacillus reuteri* LR92 in aged Wistar rat: antioxidant properties and fertility.** 2023. (69). Dissertation (Master's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The female reproductive aging is related to reduction of fertility rates due to the gradual loss of organ and tissue function, reduced oocyte quality, increase of mitochondrial DNA damage, and chromosomal aneuploidy. The lifestyle that most women have undergone in recent decades contributes to late motherhood, which has been shown to be a risk factor for miscarriage, chromosomal and congenital anomalies. Furthermore, it is known that imbalance in oxidative stress can contribute to aging and affect female reproduction, negatively interfering with embryo implantation and being related to early pregnancy loss. However, healthy lifestyle habits like the consumption of bioactives, such as antioxidants and probiotics can mitigate the harmful effects of oxidative stress and, therefore, can minimize the associated risk of infertility. In this perspective, this study aimed to analyze the effects of administration, via gavage, of juçara pulp and juçara pulp fermented by *Limosilactobacillus reuteri* LR92 (4.45 mL/kg/day), for 6 weeks, on reproductive parameters and oxidative markers, in advanced age female Wistar rats. The present study pointed that juçara pulp fermentation did not change the content of phenolic compounds, but significantly reduced the antioxidant activity. The administration of juçara, fermented or not, was not associated with changes in pregnancy, birth, mating and fertility rates. The ovarian samples showed a decrease in the enzymatic antioxidant activity of glutathione-S-transferase (GST) in the group treated with fermented juçara, while uterine samples presented an increase in the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) in the group treated with unfermented juçara, indicating a higher antioxidant capacity in vivo. It was also observed that the administration of juçara in natura was associated to a higher rate of implantation and a lower rate of pre-implantation loss. This discovery can be attributed to a decrease in the area of cellular senescence in the ovarian and uterine tissues (stroma) and to a greater antioxidant activity in the group treated with in natura juçara, when compared to the group treated with juçara fermented by LR92 and the control group. It was concluded that juçara has antioxidant properties and the capacity to delay cellular aging in the uterus and ovary, resulting in increased rates of implantation and reduced rates of pre-implantation loss. These results suggest that juçara can be beneficial for reproductive health, offering potential applications in the field of fertility.

Key-words: Juçara; Probiotics; Late gestation; Antioxidants; Fertility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental das fêmeas <i>Wistar</i>	29
Figura 2 – Esfregaço vaginal e diagnóstico de prenhez positivo	37
Figura 3 – Gráfico da viabilidade celular (Log UFC/mL) de <i>Limosilactobacillus reuteri</i> LR92 durante 24 horas de fermentação	40
Figura 4 – Acúmulo de lipofucsina corado por Sudan-Black em seções ovarianas das ratas dos diferentes grupos experimentais	49
Figura 5 – Acúmulo de lipofucsina corado por Sudan-Black em seções do estroma uterino das ratas dos diferentes grupos experimentais	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da polpa de juçara	39
Tabela 2 – Fenólicos totais e capacidade antioxidante da polpa de juçara antes e após fermentação por <i>L. reuteri</i>	40
Tabela 3 – Peso corporal das ratas e peso dos órgãos dos diferentes grupos experimentais	42
Tabela 4 – Avaliação do ciclo estral das ratas dos diferentes grupos experimentais	43
Tabela 5 – Análise morfométrica folicular e uterina das ratas dos diferentes grupos experimentais	44
Tabela 6 – Contagem de corpos lúteos e quantificação folicular ovariana.....	45
Tabela 7 – Frequência de parâmetros reprodutivos entre os grupos experimentais	45
Tabela 8 – Taxa de fertilidade entre os grupos experimentais.....	46
Tabela 9 – Resultados obtidos dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo a partir de análise uterina das ratas dos diferentes grupos experimentais	47
Tabela 10 – Resultados obtidos dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo a partir de análise ovariana das ratas dos diferentes grupos experimentais	48
Tabela 11 – Área de acúmulo de lipofucsina marcada por Sudan-Black.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tratamento dos diferentes grupos experimentais.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS+	2,2 'azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina sulfônico-6)
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética Para Uso Animal
CTR	Controle
DG	Dia Gestacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPN	Dia pós-natal
DPPH	2,2 Difenil-1-picrilhidrazil
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FRAP	Ferric Reducing Ability Power
GPX	Glutathione Peroxidase
GST	Glutathione-S-Transferase
GSH	Glutathione Reduzida
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
JU	Juçara
JUF	Juçara Fermentada
LR92	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> 92
MDA	Malondialdeído

ND	Não detectado
OGG1	8-oxoguanina glicosilase
PR	Paraná
TBH	Terc-butila
SOD	Superóxido Dismutase
SB	Sudan-Black
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tiobarbitúrico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA/ REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	JUÇARA (<i>EUTERPE EDULIS</i>)	17
2.2	PROBIÓTICOS	19
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES	20
2.4	FERTILIDADE E GESTAÇÃO TARDIA	21
2.5	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ANIMAIS	26
4.2	POLPA DA JUÇARA	26
4.3	MICROORGANISMOS E PREPARAÇÃO PRÉ-INÓCULO	27
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DA JUÇARA <i>IN NATURA</i> E FERMENTADA	27
4.4.1	Composição Centesimal	27
4.4.2	Determinação da Contagem de Células Viáveis	27
4.4.3	Análise de Fenólicos Totais	27
4.4.4	Determinação da Atividade Antioxidante	28
4.5	PROTOCOLO EXPERIMENTAL EM RATAS <i>WISTAR</i>	28
4.5.1	Avaliação de Ciclo Estral	30
4.5.2	Avaliação do Peso Corporal	30
4.5.3	Avaliação Histológica	31
4.5.3.1	Coleta de órgãos	31
4.5.3.2	Morfometria do epitélio uterino, quantificação de corpos lúteos e folículos ovarianos	31
4.5.3.3	Detecção e análise de lipofucsina celular	32
4.5.4	Avaliação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Úteros e Ovários	33

4.5.4.1	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica.....	33
4.5.4.2	Determinação das enzimas antioxidantes.....	33
4.5.4.2.1	<i>Concentração de proteínas pelo método de Bradford</i>	33
4.5.4.2.2	<i>Glutathione-s-transferase (GST)</i>	34
4.5.4.2.3	<i>Glutathione reduzida (GSH)</i>	34
4.5.4.2.4	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	35
4.5.4.2.5	<i>Catalase (CAT)</i>	36
4.5.5	Fertilidade.....	36
5	ESTATÍSTICA	38
6	RESULTADOS	39
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE JUÇARA.....	39
6.2	CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO.....	39
6.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA POLPA DE JUÇARA ANTES E APÓS A FERMENTAÇÃO.....	40
6.4	PESO CORPORAL E DE ÓRGÃOS.....	411
6.5	CICLO ESTRAL.....	42
6.6	HISTOMORFOMETRIA DE ÚTERO E OVÁRIO.....	43
6.7	PARÂMETROS REPRODUTIVOS.....	444
6.8	ESTRESSE OXIDATIVO.....	466
6.9	ACÚMULO DE LIPOFUCSINA E SENESCÊNCIA CELULAR.....	48
7	DISCUSSÃO	51
8	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	71

1 INTRODUÇÃO

A juçara (*Euterpe edulis*) é uma palmeira amplamente distribuída na Mata Atlântica com destaque no meio científico pela sua composição nutricional rica em antioxidantes (CARDOSO et al., 2018). A espécie está incluída na lista das espécies ameaçadas de extinção (BRANCALION et al., 2012). Tão notável é a importância do fruto e o risco iminente de extinção que alguns estudos buscam manejos sustentáveis da palmeira bem como estímulo para a utilização comercial de seus frutos, estudando, dessa forma, a evolução da sua produtividade (CEMBRANELI et al., 2009; MARÇAL et al., 2015).

O gênero *Euterpe* reúne diferentes espécies dentre as quais duas principais se destacam por apresentar grande importância econômica e cultural (GATTI; CAMPANELLO; GOLDSTEIN, 2011): a juçara (*E. edulis*) e o açazeiro (*E. oleraceae*), que apresentam potencial de produção de frutos com elevado valor nutricional, ricos em ácidos graxos, proteínas, fibras, minerais e vitaminas, bem como compostos bioativos como antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos, que estão associados à atividade antioxidante (SCHULZ et al., 2016).

De fato, extratos de juçara, em diferentes concentrações, incubados por 24 horas, mostraram, através de métodos como Ferric Reducing Ability Power (FRAP) e 2,2 Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ter efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por hidroperóxido de terc-butila (TBH) em cultura de células Vero, provavelmente pela predominância de ácidos fenólicos e flavonoides (BORGES et al., 2013).

A associação de compostos bioativos e o uso de microrganismos potencialmente benéficos tem sido usada visando melhorar o metabolismo do hospedeiro ocasionando incremento no estado de saúde geral. Nesse contexto, os probióticos, segundo Hill e colaboradores (2014), são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Entre os benefícios da sua utilização, estão o equilíbrio microbiano e ação imunomoduladora (JEŻEWSKA-FRAŃKOWIAK et al., 2018).

Antioxidantes são moléculas capazes de inativar radicais livres e prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), atuando como agente redutor, evitando, dessa forma, a oxidação de outras substâncias. Essas moléculas atuam por meio de diferentes mecanismos, sendo capazes de prevenir a ocorrência de ERO ou

bloquear e capturar os radicais já formados. Dessa forma, as funções antioxidantes implicam na redução do estresse oxidativo, de mutações no DNA, transformações malignas, bem como outros parâmetros de dano celular (PISOSCHI; POP, 2015).

Atualmente, as mulheres vêm ocupando novas atribuições sociais e profissionais, dessa forma a escolha da maternidade tem sido decorrente da inserção da mulher no mercado de trabalho, bem como da busca pela estabilidade financeira (ALVES; FRONZA; STRAPASSON, 2021), fatores que têm levado postergação da gravidez. Segundo o Ministério da Saúde, a gestação em idade avançada é aquela que ocorre após os 35 anos de idade (BRASIL, 2012). Embora as taxas de fertilidade declinem com o avanço da idade, a maior redução é observada a partir dos 35 anos (MENKEN; TRUSSEL; LARSEN, 1987), idade em que a fecundidade da mulher apresenta progressivo declínio, devido a mudanças na qualidade dos ovócitos, frequência e eficiência da ovulação, função sexual, saúde uterina e risco de complicações gestacionais (CRAWFORD; STEINER, 2015). Além disso, a idade materna avançada demonstrou ser um fator de risco para aborto espontâneo e anomalias cromossômicas (GONÇALVES; MONTEIRO, 2012).

A suplementação antioxidante tem sido estudada sob parâmetros inflamatórios relacionados, principalmente, a dietas ricas em ácidos graxos (SANTAMARINA et al., 2018; SANTAMARINA et al., 2019; MORAIS et al., 2015). Foi relatado que os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo são amenizados com o auxílio de antioxidantes e, portanto, podem minimizar o risco associado de infertilidade (AGARWAL et al., 2012).

Sabendo que a fermentação por bactérias probióticas é capaz de adicionar benefícios à saúde, nosso grupo de pesquisa avaliou a influência do processo de fermentação na atividade antioxidante. Foi observado que a fermentação de 100 mL de juçara pasteurizada, a uma contagem inicial de 10^6 UFC/mL de *Limosilactobacillus reuteri*, promoveu aumento significativo no conteúdo fenólico total e na atividade antioxidante medida pelos métodos DPPH e ABTS+, alcançando até 50% de aumento na atividade antioxidante (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017). Além disso, em humanos, a suplementação com produtos simbióticos contendo amplo espectro de cepas benéficas, como *Lactobacillus*, além de prebióticos como frutooligossacarídeos, mostrou melhorar parâmetros reprodutivos em homens com infertilidade idiopática, possivelmente através da melhora do balanço de estresse oxidativo do fluido seminal (ABBASI; ABBASI; NIROUMAND, 2021).

Considerando a possível correlação entre o estresse oxidativo e sua relação com a infertilidade ligada à idade avançada, bem como a falta de estudos sobre os efeitos da polpa da juçara sobre o sistema reprodutivo feminino, esse estudo tem como objetivo analisar os efeitos da atividade antioxidante promovidos pela administração da polpa de juçara e da polpa de juçara fermentada por *Limosilactobacillus reuteri* LR92 em ratas *Wistar* de idade avançada, correspondente à faixa etária entre 35 e 45 anos, classificada por Matt et al. (1986).

2 REVISÃO DE LITERATURA/ REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 JUÇARA (*EUTERPE EDULIS*)

O gênero *Euterpe* é composto por várias espécies de palmeiras. Duas espécies em particular se destacam por sua importância econômica e cultural: a juçara (*Euterpe edulis*) e o açazeiro (*Euterpe oleracea*) (GATTI; CAMPANELLO; GOLDSTEIN, 2011). Ambas têm potencial de produção de frutos com alto valor nutricional, contendo ácidos graxos, proteínas, fibras, minerais e vitaminas. Além disso, os frutos são ricos em compostos bioativos, como antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos, que possuem propriedades antioxidantes (SCHULZ et al., 2016).

A juçara (*Euterpe edulis*) é uma espécie de palmeira amplamente encontrada na Mata Atlântica e enfrenta o risco de extinção, sendo incluída na lista de espécies ameaçadas (BRANCALION et al., 2012). A importância dos frutos da juçara e a urgência em sua preservação são tão significativas que diversos estudos abordam o desenvolvimento de práticas de manejo sustentável da palmeira e estímulo do seu uso comercial. Essas pesquisas também buscam compreender a evolução da produtividade dos frutos (CEMBRANELI et al., 2009; MARÇAL et al., 2015).

As frutas são ricas em compostos bioativos que conferem benefícios à saúde dado a presença de fibras, micronutrientes e compostos bioativos. A quantidade de compostos fenólicos nos frutos é correlacionada, entre outros fatores, ao do grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e condições de armazenamento (FU et al., 2011).

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes naturais presentes nas frutas ricas nesses fitoquímicos (HAMINIUK et al., 2012). Um estudo aponta que as frutas apresentam capacidades antioxidantes diferentes e que os compostos fenólicos podem ser um dos principais componentes responsáveis pela capacidade redutora das frutas. Dessa forma, as frutas são importantes fontes alimentares de antioxidantes naturais para prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (FU et al., 2011).

A juçara é considerada uma fruta rica por conter, em sua polpa, importantes antioxidantes dietéticos e representar uma fonte de componentes de alto valor nutricional relacionado ao teor de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, antocianinas e outros flavonoides (SCHULZ et al., 2015). Os resultados de vários

estudos indicaram que a polpa da juçara pode exercer efeitos antioxidantes *in vitro* (BORGES et al., 2013; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014).

Antioxidantes são moléculas capazes de inativar radicais livres e prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), atuando como agente redutor, evitando, dessa forma, a oxidação de outras substâncias. Quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante, ocorre o chamado “estresse oxidativo”, que pode gerar danos à saúde, como doenças cardiovasculares, degenerativas, tumores etc. (HALLIWELL, 2012).

Os compostos fenólicos são substâncias provenientes do ambiente externo que possuem a capacidade comprovada de atuar como antioxidantes, auxiliando na eliminação de ERO. Os antioxidantes atuam por meio de diversos mecanismos, sendo capazes de prevenir a formação de ERO ou bloquear e capturar os radicais livres já existentes. Essas ações antioxidantes desempenham um papel importante na redução do estresse oxidativo e prevenção de danos celulares (PISOSCHI; POP, 2015).

Portanto, compostos fenólicos têm atraído cada vez mais atenção como potenciais agentes para prevenir e tratar muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e inflamatórias (PISOSCHI; POP, 2015).

Um estudo mostrou que, além dos benefícios relacionados ao valor nutricional da polpa de juçara, sua fermentação demonstrou potencial efeito prebiótico (GUERGOLETTTO et al., 2016). Nesse estudo, a polpa de juçara foi fermentada por microbioma de fezes doadas por humanos saudáveis, representando a região distal do intestino grosso humano. Após a digestão *in vitro*, a polpa da juçara foi capaz de promover mudanças nas populações microbianas relevantes e resultou em um aumento significativo no número de bifidobactérias, bem como constatou manutenção de 46% do conteúdo fenólico total. Analisando resultados prévios da otimização dos benefícios da polpa de juçara por meio da fermentação a partir de *Limosilactobacillus reuteri* LR92, notou-se um aumento significativo no total de conteúdo fenólico e atividade antioxidante (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017).

Além do efeito prebiótico, o estudo mostrou que benefícios à saúde proporcionados pelos antioxidantes podem estar relacionados aos componentes fenólicos remanescentes após a degradação pela microbiota colônica, haja vista que

a hidrólise pela microbiota intestinal pode aumentar a biodisponibilidade dos polifenóis, facilitando sua absorção pela mucosa intestinal (TUOHY et al., 2012).

2.2 PROBIÓTICOS

O termo "probiótico" foi definido, inicialmente, por Lilly e Stillwell (1965) como "substâncias secretadas por um microrganismo para estimular o crescimento de outro", com efeito oposto aos antibióticos. Desde então, várias definições foram propostas, sendo a definição de Hill e colaboradores (2014) a mais aceita internacionalmente: "probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro".

A observação original do papel positivo desempenhado por algumas bactérias é atribuída a Eli Metchnikoff (1856-1916), que recebeu o Prêmio Nobel russo por seu trabalho no Instituto Pasteur no início do século XX. O autor afirmou que a alimentos saudáveis podem modificar benéficamente a microbiota do hospedeiro. Segundo seu estudo, o consumo de probióticos associado ao consumo de produtos lácteos fermentados está relacionado à boa saúde e longevidade de grupos de habitantes da Europa Oriental (METCHNIKOFF, 1907).

De acordo com os autores Havenaar e Huis In't Veld (HAVENAAR & HUIS IN'T VELD, 1992), um probiótico é uma cultura mono ou mista de microrganismos vivos que, quando aplicado a um animal ou humano, afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando as propriedades da microbiota intestinal. Essa definição amplia os modos de aplicação possíveis para os probióticos e enfatiza a atividade positiva dos microrganismos probióticos.

No entanto, esta definição proposta implica que o termo "probiótico" é restrito a produtos que: 1) contenham microrganismos vivos, por exemplo, como células liofilizadas ou em um produto fermentado; 2) melhoram a saúde humana ou animal (que pode incluir a promoção do crescimento animal); 3) causam um efeito na boca ou no trato gastrointestinal (JEŻEWSKA-FRAÇKOWIAK, et al. 2018).

Como habitantes regulares do trato gastrointestinal de humanos e animais, os probióticos podem regular a composição da microbiota intestinal ao inibir a proliferação excessiva de bactérias nocivas, o que pode contribuir para a diminuição

do estresse oxidativo. Além disso, estes podem produzir vários metabólitos com atividade antioxidante, como a glutathiona reduzida, butirato e folato e, dessa forma, exercer capacidade antioxidante de diferentes maneiras (WANG et al., 2017).

Sabendo que a fermentação por bactérias probióticas é capaz de adicionar benefícios à saúde, uma vez que o consumo regular de microrganismos probióticos estimula o sistema imunológico, atua na inibição da ação de patógenos, regulação da função intestinal (JEŻEWSKA-FRAĆKOWIAK, et al. 2018), um estudo avaliou a influência do processo de fermentação na atividade antioxidante e na sua estabilidade durante o armazenamento. Foi observado que a fermentação de juçara pasteurizada, a uma contagem inicial de 10^6 UFC/mL de *Limosilactobacillus reuteri*, promoveu um aumento significativo no total conteúdo fenólico e na atividade antioxidante medida pelos métodos DPPH e ABTS+, alcançando até 50% de aumento na atividade antioxidante (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017). Entretanto, outro estudo, realizado a partir da polpa do maracujá, indicou que a fermentação por *Limosilactobacillus reuteri*, em diferentes condições, reduziu o conteúdo de compostos fenólicos totais (SANTOS et al., 2020).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção de pró-oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio na produção de ERO em relação aos níveis de defesa antioxidante. A produção excessiva de ERO e o estresse oxidativo resultante podem contribuir para o envelhecimento e afetar a reprodução feminina, interferindo negativamente na implantação do embrião e relacionando-se com a perda gestacional precoce e recorrente, além de trabalho de parto prematuro (AGARWAL et al., 2012).

O corpo humano desenvolveu uma variedade de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos disponíveis para combater o excessivo estresse oxidativo. A proteção enzimática antioxidante consiste em enzimas-chave, nomeadamente catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD), e moléculas como a glutathiona reduzida (GSH), que são importantes na prevenção da peroxidação lipídica e na manutenção do bom funcionamento das membranas celulares (COUTO et al., 2016).

Os antioxidantes não enzimáticos, principalmente consumidos em alimentos ou biossíntese endógena, incluem polifenóis (quercetina, resveratrol, baicalina), carotenóides (β -caroteno, licopeno, luteína), antioxidantes de baixo peso molecular (glutathiona, ácido úrico), oligoelementos (zinco e selênio), vitaminas (A, E, C, B9) e outros (L-carnitina, melatonina, acetilcisteína). O nível de antioxidantes endógenos é praticamente estável e esses são ativados apenas quando necessário. Os antioxidantes exógenos são recebidos dos alimentos, de modo que seus níveis se alteram com base na dieta (AGUILAR et al., 2016).

De fato, o estresse oxidativo gera um impacto negativo em diversos processos fisiológicos, mas principalmente com relação sistema reprodutivo feminino, pode afetar significativamente a ovulação, qualidade do ovócito, esteroidogênese ovariana, manutenção gestacional, desenvolvimento de folículos e blastocistos, bem como a implantação de blastocisto e o desenvolvimento do embrião (VAŠKOVÁ et al., 2023).

A geração de ERO em baixas concentrações e em compartimentos celulares têm um importante papel de sinalização na ovulação, decidualização, cicatrização do endométrio e angiogênese, além de regular a resposta inflamatória no ciclo menstrual feminino. Uma das principais formas de melhorar a fertilidade feminina é reduzir ou normalizar as condições de estresse oxidativo para um nível fisiologicamente adequado e criar um ambiente favorável à reprodução por meio de um estilo de vida saudável e suplementação antioxidante (VAŠKOVÁ et al., 2023).

2.4 FERTILIDADE E GESTAÇÃO TARDIA

Na sociedade moderna, há uma tendência à gestação tardia é mais comumente atribuída a mulheres que atrasam a gravidez por escolha de estilo de vida ou devido à subfertilidade subjacente, mas também inclui mulheres multíparas que continuam tendo filhos. Embora fatores socioeconômicos e avanços na tecnologia reprodutiva tenham contribuído para essa mudança, ela traz consigo possíveis riscos clínicos (LEAN et al., 2017).

A redução da fertilidade relacionada à idade ocorre devido a perda gradual das funções de órgãos e tecidos. A qualidade do ovócito diminui com o aumento da idade materna. Estudos têm mostrado que ovócitos de baixa qualidade contêm aumento do dano ao DNA mitocondrial e aneuploidia cromossômica, disfunções relacionadas à

idade, sendo o envelhecimento um fator associado ao desfecho adverso da gravidez (AGARWAL et al., 2012; LEAN et al., 2017). Outro estudo recente tem demonstrado, ainda, que o estresse oxidativo influencia todo o processo reprodutivo da mulher, considerando que a produção excessiva de ERO causa danos ao DNA, peroxidação de lipídios e danos às proteínas (LU et al., 2018).

O envelhecimento reprodutivo em mulheres está relacionado a um declínio fisiológico na função do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, bem como a anormalidade do alinhamento dos cromossomos no fuso meiótico na metáfase II. O aumento transitório da secreção hipofisária de FSH e LH foi observado em mulheres em idade reprodutiva avançada (KLEIN et al., 1996).

Estudos mostram que a eficácia dos mecanismos de reparo da quebra da fita dupla do DNA é atenuada em ovócitos envelhecidos. Além disso, os ovócitos são extremamente suscetíveis a danos acumulados no DNA em razão de sua prolongada interrupção da prófase. O aumento do dano oxidativo causado por mutações no DNA mitocondrial e na enzima de reparo oxidativo do DNA, OGG1, leva a fenótipos de envelhecimento acelerado, incluindo fuso e anormalidades cromossômicas em camundongos com senescência acelerada (TANISAWA et al., 2013).

O estresse oxidativo e encurtamento dos telômeros estão correlacionados exponencialmente com o envelhecimento das células somáticas. As ERO geradas por mitocôndrias comprometidas poderiam potencialmente oxidar as proteínas necessárias para a manutenção dos telômeros. Os telômeros carecem de proteínas protetoras e ficam na membrana nuclear, onde são suscetíveis à peroxidação lipídica.

Durante a foliculogênese, os ovócitos são protegidos do dano oxidativo por antioxidantes como a CAT, SOD, GST, paraoxanase, proteína de choque térmico (HSP) 27 e proteína isomerase, de forma que os danos induzidos por ERO podem ocorrer por meio da modulação da expressão de citocinas e substratos pró-inflamatórios (AGARWAL et al., 2012).

No entanto, ovócitos envelhecidos reprodutivamente produzem um declínio na eficácia dos mecanismos de proteção contra danos oxidativos, ou seja, o metabolismo de eliminação de ERO, reparo de DNA e o sistema de proteassoma e autofagia para proteínas danificadas por ERO são comprometidos. Consequentemente, o aumento de ERO e o aumento da vulnerabilidade dos ovócitos a ERO levam à instabilidade do fuso, anormalidades cromossômicas, encurtamento dos telômeros e redução da competência de desenvolvimento de ovócitos envelhecidos (SASAKI et al., 2019).

2.5 ENSAIOS *IN VIVO*

Em humanos, a suplementação com produtos simbióticos contendo amplo espectro de cepas benéficas, como *Lactobacillus*, além de prebióticos como frutooligosacarídeos, mostrou melhorar parâmetros reprodutivos em homens com infertilidade idiopática, possivelmente através da melhora do balanço de estresse oxidativo do fluido seminal (ABBASI; ABBASI; NIROUMAND, 2021).

Embora roedores e humanos tenham muitas características anatômicas, histológicas e fisiológicas semelhantes em seus intestinos, existem grandes diferenças relacionadas a tamanho, taxa metabólica e hábitos alimentares. Ao todo, apenas uma parte dos genes bacterianos são compartilhados entre murinos e humanos e um exemplo importante é a presença do biofilme de *Lactobacillus* spp. no estômago anterior dos ratos. Em vista desses resultados, nota-se que os modelos murinos são utilizados com frequência para tradução de resultados para humanos (HUGENHOLTZ; DE VOS, 2018).

Um estudo em camundongos fêmeas envelhecidas indicou que a dieta rica em antioxidante, obtida por meio da administração das vitaminas C (10 mL/kg) e E (0,6 mL/kg), pode prevenir a deterioração da saúde reprodutiva associada ao envelhecimento feminino, exercendo efeito positivo no número e qualidade de ovócitos, independentemente de o início da administração oral de antioxidantes ser instituído no desmame ou no meio da vida reprodutiva (TARÍN; PÉREZ-ALBALÁ; CANO, 2002).

Recentemente, resultados positivos também foram encontrados em outro trabalho que investigou a capacidade da quercetina, um flavonoide natural, de melhorar a função ovariana e inibir o estresse oxidativo em um modelo de insuficiência ovariana prematura em ratos (ZHENG et al., 2022).

Estudos com a polpa da juçara liofilizada, a partir de diferentes doses (0,25% e 0,5% da dieta), durante 7 dias, foram realizados em modelos murinos (ratos *Wistar*) tratados com dieta hiperlipídica para indução da alteração do perfil inflamatório, a fim de avaliar os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios da juçara (SANTAMARINA et al., 2018; SANTAMARINA et al., 2019).

Considerando que a obesidade e as dietas ricas em ácidos graxos estão ligadas a mecanismos pró-inflamatórios, ambos os estudos concluíram que os grupos tratados com juçara liofilizada 0,25% obtiveram melhores efeitos protetores e prevenção da ativação inflamatória, embasando-se na relevância da riqueza de sua polpa em bioativos antioxidantes, dentre eles as antocianinas (SANTAMARINA et al., 2018; SANTAMARINA et al., 2019).

Já a inclusão da juçara liofilizada (0,5%) nas dietas ricas em gordura *trans* de ratas Wistar durante a gestação e lactação restaurou a microbiota intestinal, preveniu efeitos adversos e reduziu a inflamação e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta da sua prole (MORAIS et al., 2015).

Em estudo com humanos saudáveis, o consumo diário de 200 mL de suco de juçara por dia, durante 4 semanas, apontou potencial efeito antioxidante e concluíram que seu consumo regular ocasionou efeitos positivos nos níveis de HDL-c, atividade de enzimas antioxidantes e possível contribuição para a saúde cardiovascular (DE LIZ et al., 2020; CARDOSO et al., 2015).

Sob os parâmetros reprodutivos relacionados ao envelhecimento ovariano, até o momento não existem estudos com a juçara, porém, um estudo avaliou a suplementação de açaí e o impacto do tratamento antioxidante sistêmico em camundongos fêmeas com idade reprodutiva avançada (9 meses). O tratamento com açaí (50 mg/dia de polpa liofilizada) induziu um aumento de três vezes do poder antioxidante sérico, não afetou o número de ovócitos, mas melhorou a formação de blastocistos, além de reduzir a diminuição do potencial de implantação relacionada ao envelhecimento, de forma que a administração foi capaz de diminuir os efeitos do envelhecimento ovariano (LANE et al., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da administração da polpa de juçara *in natura* e da polpa da juçara fermentada pelo probiótico *Limosilactobacillus reuteri* LR92, no que tange sua ação antioxidante em ratas *Wistar* com idade avançada, sob parâmetros reprodutivos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a polpa de juçara em termos de composição centesimal;
- Caracterizar a polpa de juçara “*in natura*” e fermentada por *Limosilactobacillus reuteri* LR92 em relação a sua atividade antioxidante e compostos fenólicos totais;
- Analisar os efeitos da administração da polpa de juçara *in natura* e da polpa da juçara fermentada por LR92 em ratas *Wistar* com idade avançada, sob parâmetros reprodutivos (fertilidade, ciclo estral, histologia de útero e ovário e senescência celular), bem como marcadores oxidativos em órgãos reprodutivos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Para Pesquisa Animal (CEUA), protocolo nº 33/2022. Todos os esforços para minimizar o sofrimento e o número de animais foram feitos.

Foram obtidos do Biotério Central da Universidade, 51 ratas *Wistar* e, posteriormente, para o acasalamento (teste de fertilidade), 15 ratos *Wistar*, ambos com 65 dias de vida, considerando que o dia pós-natal (DPN) 80 é estabelecido como início da idade reprodutiva (LAFFAN et al., 2018). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas com cepilho e mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, em ambiente controlado, com exaustão de ar, a uma temperatura de 21 ± 2 ° C; 12 h de luz/escuridão (luzes acesas às 6:00 da manhã e apagadas às 18:00) com acesso livre à ração (Nuvilab, Colombo, Brasil) e água “ad libitum”.

As fêmeas foram mantidas nas condições descritas por um período de 168 dias, o que corresponde à idade avançada, em termos de reprodução, considerando a diminuição significativa da fertilidade observada a partir dos 6 meses de idade (MATT et al., 1986). Essa faixa etária é análoga ao intervalo de 35 a 45 anos em seres humanos, classificado por Matt e colaboradores (1986).

4.2 POLPA DA JUÇARA

A fim de garantir a homogeneidade durante todo o experimento, a polpa de juçara do presente trabalho foi adquirida congelada em sacos de polietileno com 250 g cada, a partir de um único lote do mesmo fornecedor (Estrela Guia, Morretes, Brasil, localizada a 25°46'11" de latitude sul e 49°42'57" de longitude oeste), produzida na safra de 2022. Previamente aos experimentos, a polpa de juçara foi descongelada, filtrada em um coador descartável e pasteurizada por 1 minuto a 80°C (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017). As polpas *in natura* e fermentada por LR92, utilizadas para a administração, foram preparadas semanalmente a fim de garantir a integridade das suas propriedades.

4.3 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO PRÉ-INÓCULO

A cepa probiótica liofilizada de *Limosilactobacillus reuteri* LR92 (DSM 26866) foi fornecida por Clerici Sacco (Itália).

Para a produção do pré-inóculo, primeiramente a cultura LR92 foi diluída na concentração de 0,1% (p/v) em polpa de juçara pasteurizada, seguida de duas ativações de 1% (v/v) em polpa de juçara. O tempo de fermentação foi determinado a partir de uma curva de crescimento celular (Log UFC/mL) à 37°C por até 24 horas, o qual estabeleceu que o início da fase estacionária após 24 horas, atingindo a maior contagem de células viáveis 10^9 UFC/mL (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DA JUÇARA *IN NATURA* E FERMENTADA

4.4.1 Composição Centesimal

A polpa de juçara foi caracterizada por meio das seguintes determinações: teor de umidade foi medido em estufa de laboratório a 105°C, proteína pelo método Kjeldahl, cinzas em mufla a 550°C e fibra total pelo Método Enzimático-Gravimétrico (AOAC, 2005). O pH foi medido em pHmetro (potenciômetro - Ion PH300) e os sólidos solúveis em refratômetro portátil (refratômetro Atago, Japão). O teor de açúcar total foi analisado pelo método do ácido fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) usando como padrão a glicose e os lipídios pelo método de Bligh e Dyer (1959).

4.4.2 Determinação da Contagem de Células Viáveis

A viabilidade celular foi determinada pelo método Pour-Plate (PELCZAR et al., 1997). Diluições da polpa de juçara fermentada por LR92 (1:9) foram feitas com água peptona estéril 0,1% (p/v), seguidas de plaqueamento em ágar MRS (Himedia - Mumbai, Índia) e incubação a 37 °C em por 48h.

4.4.3 Análise de Fenólicos Totais

O conteúdo fenólico total da polpa *in natura* e da polpa fermentada foi analisado

de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (FANG; BHANDARI, 2011) usando ácido gálico como padrão.

4.4.4 Determinação da Atividade Antioxidante

Foram adotados diferentes métodos de determinação a fim de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante da substância. O radical livre 2,2 Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH.) e o radical catiônico [2.2 'azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina sulfônico-6)] (ABTS. +) foram usados como métodos para determinar o potencial de eliminação de radicais livres de cada amostra. Foi utilizado também o ensaio FRAP (Ferric Reducing Ability Power) que determina o poder de redução de antioxidantes utilizando o reagente ferricianeto de potássio ou o hexacianoferrato (III) de potássio (BOROSKI et al., 2015).

4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL EM RATAS *Wistar*

Foram utilizadas 51 ratas *Wistar* no DPN 168, divididas em 3 grupos, conforme o Quadro 1 e a Figura 1.

Quadro 1 – Tratamento dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Tratamento
Controle (CTR):	Ratas (n=17) - água administrada via intragástrica por gavagem.
Juçara (JU):	Ratas (n=17) - polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg/dia administrada via intragástrica por gavagem.
Juçara fermentada por LR92 (JUF):	Ratas (n=17) - polpa de juçara fermentada por LR92 com 10^9 UFC/mL na dose de 4,45 mL/kg/dia administrada via intragástrica por gavagem.

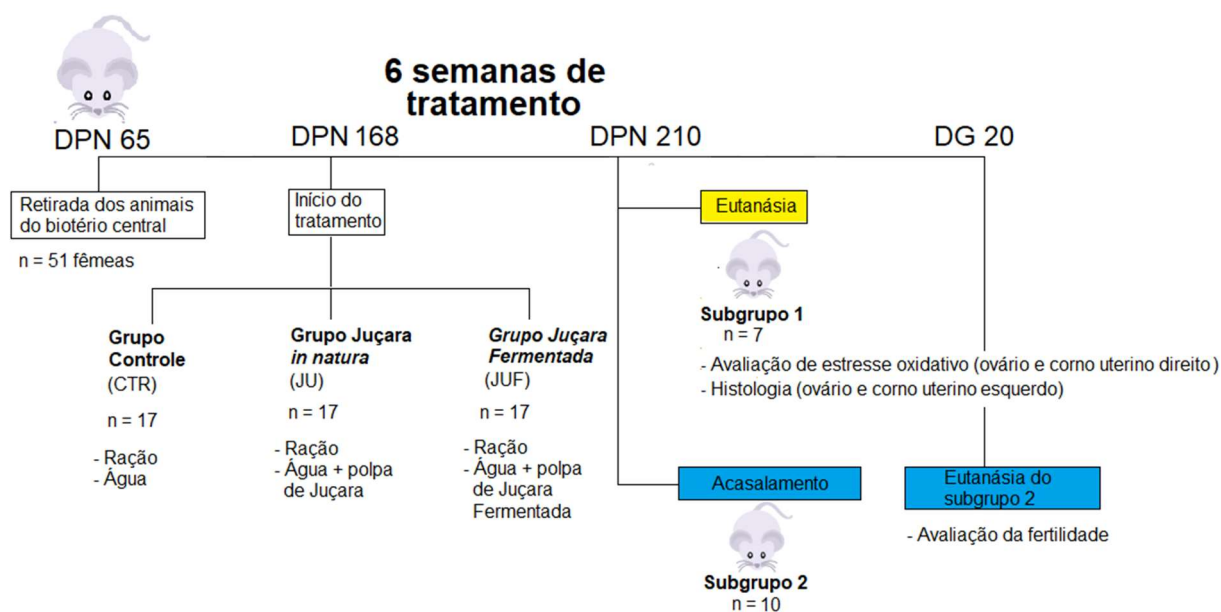
As ratas receberam polpa da juçara *in natura* ou fermentada ou água, por 6 semanas, de acordo com o estudo de Santamarina et al. (2018), sendo ofertado por

gavagem uma vez ao dia na dose (4,45 mL/kg/dia). A dosagem foi estabelecida com base no estudo prévio com o açaí sob parâmetros reprodutivos (LANE et al., 2021), ajustando a dose para ratos *Wistar*, considerando as recomendações de consumo de compostos fenólicos segundo o FDA e o Guia de doses seguras para ensaios clínicos iniciais (2005). Por fim, segundo o guia alimentar brasileiro, a dose escolhida, correspondente a aproximadamente 50 g de polpa de juçara fresca para um humano de 70 kg, se adequa às orientações do Ministério da Saúde e suas orientações a respeito do consumo de frutas (BRASIL, 2014).

Para a readequação da quantidade de polpa administrada, a avaliação do peso corporal foi feita semanalmente. A variação de peso foi calculada subtraindo o peso final do peso inicial das ratas após a administração.

Após a administração, cada grupo foi dividido em 2 subgrupos, um deles para avaliar a fertilidade (n=10) e outro para investigar o estresse oxidativo e histologia (n=7).

Figura 1 – Delineamento experimental das fêmeas *Wistar*.



Fonte: o próprio autor.

DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal.

4.5.1 Avaliação de Ciclo Estral

Durante todo o período experimental, as fêmeas foram monitoradas diariamente quanto ao bem-estar geral (lacrimejamento, piloereção, tremores e padrão respiratório). O ciclo estral foi avaliado por meio de esfregaços diários 15 dias antes do final de cada tratamento. O material foi então observado sob um microscópio de luz modelo Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, Japão) e as fases do ciclo estral foram classificadas como proestro, estro, metaestro e diestro de acordo com as características citológicas (MARCONDES; BIACHI; TANNO, 2002). A fase de proestro foi definida por esfregaços sem leucócitos e com predominância de células epiteliais nucleadas. A fase de estro foi definida pela ausência de leucócitos, algumas células nucleadas e muitas células epiteliais cornificadas. Os esfregaços de metaestro e diestro foram definidos pela presença de leucócitos. A duração do ciclo estral foi calculada como o número de dias entre uma fase de estro para o próximo.

A classificação proposta por Marcondes, Bianchi e Tanno (2002) define que os ciclos estrais em ratas são considerados irregulares quando há uma prolongada permanência na mesma fase por 4 a 5 dias, ou quando a sequência das fases (proestro, estro, metaestro e diestro) não é seguida de maneira consistente. Esses critérios de classificação foram utilizados para identificar irregularidades nos ciclos estrais das ratas, permitindo uma análise mais detalhada e comparativa dos padrões reprodutivos.

4.5.2 Avaliação do peso corporal

O peso corporal das ratas foi registrado semanalmente desde o primeiro dia de administração da juçara, juçara fermentada por LR92 ou água. O ganho de peso corporal foi calculado utilizando o peso do último dia de administração subtraindo o peso do primeiro dia.

4.5.3 Avaliação Histológica

4.5.3.1 Coleta de órgãos

Após 6 semanas, no primeiro estro, as fêmeas do subgrupo 1 foram submetidas à eutanásia com o uso do tiopental (40 mL/kg), precedido de uma injeção de anestésico local sem ação vasoconstritora (lidocaína 7 mL/kg).

Os animais foram submetidos à laparotomia para visualização dos órgãos reprodutores. O ovário esquerdo, útero, fígado e rins foram retirados e pesados em balança analítica. O corno uterino e ovário direito removidos foram imediatamente armazenados em recipientes criogênicos com nitrogênio líquido e em seguida congelados a -80°C para posterior análise de estresse oxidativo (item 4.5.4). O ovário e corno uterino esquerdos foram fixados na solução fixadora de Alfac (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial) por 24h e posteriormente preservados em álcool 70%.

4.5.3.2 Morfometria do epitélio uterino, quantificação de corpos lúteos e folículos ovarianos

Os órgãos preservados foram cortados em fragmentos de tecido, desidratados concentrações em crescentes de etanol (95% e 99,8%) e embebidas em paraplast. Os blocos foram seccionados a 5 µm e separados por uma distância de 25 µm (PICUT et al., 2015). As secções foram coradas com hematoxilina e eosina para análise histomorfométrica (24 secções ovarianas e 10 secções uterinas por animal/grupo) ou Sudan-Black para análise da deposição de lipofucsina (5 secções ovarianas e uterinas por animal/grupo). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de luz.

Nos ovários, os números de cada tipo de folículo e corpos lúteos formados foram contados. Os folículos foram avaliados por microscopia de luz (aumento de 400x). Os folículos primordiais (tipos 1-3), crescentes (tipos 4-5b) e antrais (tipos 6-8) foram identificados usando uma ligeira modificação dos critérios de Pedersen e Peters (1968). O número médio de folículos ovarianos e corpos lúteos foram calculados nas seções selecionadas. Para a análise da altura média da camada folicular, através dos cortes histológicos, foram selecionados dez folículos primários/rata/grupo. Em cada

folículo, quatro medições em regiões diferentes foram analisadas, resultando em um total de 40 medições por animal.

No útero, o epitélio uterino, o estroma endometrial e o miométrio foram avaliados na porção média do útero, em relação à posição do oviduto e do ovário e suas alturas foram medidas por meio de sistema de captura (Moticam 5, Motic) acoplado a um microscópio ocular a 100× de aumento final. As glândulas endometriais e os vasos sanguíneos foram desviados para as medições. Em cada corte histológico, cinco diferentes regiões foram analisadas, correspondendo a um total de 25 medidas.

4.5.3.3 Detecção e análise de lipofuscina celular

A senescência celular foi detectada através da coloração Sudan-Black (SB), uma coloração histoquímica lipofílica que identifica a lipofuscina. Como marcador de senescência celular, a lipofuscina está presente células em circunstâncias degenerativas, consistindo em agregados de proteínas oxidadas, lipídios e metais, que se acumulam em tecidos envelhecidos (GEORGAKOPOULOU et al., 2013).

Com essa finalidade, a parafina foi removida e reidratada em uma série descendente de etanol. As lâminas foram coradas com SBB 0,7% em etanol a 70% de acordo com a metodologia de Evangelou & Gorgoulis (2017) com adaptações. As seções foram analisadas usando um microscópio Nikon modelo Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic Inc. Xiamen, China) com ampliação de 100x usando o software Motic 2.0. Foi analisado o acúmulo quantitativo da coloração de lipofuscina com SB em imagens da glândula intersticial, utilizando o software ImageJ. As imagens foram convertidas para tons de rosa/vermelho, a escala foi definida e, usando a opção de limite, o conteúdo de lipofuscina foi destacado. Foi utilizada uma área retangular previamente estabelecida captando a imagem por completo (62.998,17 μm^2). Nos ovários, foi posicionada aleatoriamente na região intersticial de cada imagem, de forma que foram analisados cinco cortes por ovário (cinco áreas por corte), totalizando 25 medições (DÍAZ-HERNÁNDEZ et al., 2022). Nos úteros, a área retangular foi posicionada aleatoriamente na região do estroma endometrial. Em cada uma dessas regiões, foram analisados três cortes (5 áreas por corte), totalizando 15 medições por região.

4.5.4 Avaliação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Úteros e Ovários

4.5.4.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica

O resultado reflete a intensidade da peroxidação lipídica (LUSHCHAK et al., 2009). As medidas foram realizadas pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com absorvância de 535 nm e 572 nm (BUEGE; AUST, 1978) em comparação com a curva padrão para o malondialdeído (MDA), principal subproduto do lipídio celular peroxidação. Para preparar o teste, 50 µL de cada amostra homogenizada normalizada foi pipetado em duplicata em uma microplaca, seguido da adição de FeCl₃ (1M), ácido ascórbico (0,5M), ácido tricloroacético TCA (2,8%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1%). As amostras foram agitadas e colocadas em banho-maria a 90° C por 15 minutos. As amostras foram, então, resfriadas para parar a reação e, em seguida, lidas em espectrofotômetro a 535 e 572 nm. A peroxidação lipídica (LPO) foi estimada corrigindo a quantidade de proteína, e os resultados são expressos em nmol de TBARS por mg de proteína.

4.5.4.2 Determinação das enzimas antioxidantes

4.5.4.2.1 Concentração de proteínas pelo método de Bradford

A metodologia consistiu em preparar e analisar amostras em estudos bioquímicos a fim de quantificar a concentração de proteínas em uma amostra por meio da coloração e medida espectrofotométrica. Durante o processo, as amostras foram mantidas em gelo. A normalização das concentrações foi realizada por meio de diluições.

O procedimento envolveu pipetar 500 ou 1000 µL de PBS (pH 7,2) em um microtubo contendo a amostra, homogeneizar e centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado e armazenado sob refrigeração.

Para o preparo do reagente de Bradford, foram pesados 0,05 g do corante azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 e dissolvidos em 25 mL de etanol 95%. Em seguida, adicionou-se 50 mL de ácido ortofosfórico 85% e completou-se o volume para 500 mL com água destilada.

Para a preparação da curva de calibração, 2 mg de BSA foram diluídos em 2

mL de água destilada para obter uma solução mãe. A partir dessa solução, foram preparadas soluções nas concentrações de 0,06 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL.

O ensaio de Bradford é baseado na capacidade das proteínas de ligar corantes, como o azul de Coomassie, resultando em uma mudança de cor proporcional à quantidade de proteínas presentes (BRADFORD, 1976). A intensidade da cor foi medida espectrofotometricamente e comparada com uma curva padrão de concentrações conhecidas para determinar a concentração de proteínas na amostra desconhecida.

4.5.4.2.2 *Glutathione-s-transferase (GST)*

A atividade da GST foi avaliada por espectrofotometria com CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) de acordo com Keen et al (1976) com base na respectiva conjugação com a glutathione. Para isso, o meio de reação foi preparado para um total de 100 poços (equivalente a 20 mL). Foram utilizados 0,0093 g de GSH para obter uma concentração final de 1,5 mM. Além disso, foram pesados 0,0122 g de CDNB e diluídos em 1 mL de etanol 100%, resultando em uma concentração final de 2 mM para o CDNB. Essas substâncias foram então diluídas em 19 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5).

Para a montagem da microplaca de 96 poços, foram pipetados 20 µL de tampão fosfato de potássio como controle branco, seguidos de 20 µL das amostras. Em seguida, foram adicionados 180 µL do meio de reação preparado em todos os poços utilizados, utilizando uma micropipeta multicanal. A absorbância a 340 nm foi imediatamente medida, com um tempo total de 160 segundos e intervalos de 40 segundos, totalizando 5 medições.

As unidades utilizadas para expressar os resultados foram $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹, representando a atividade enzimática específica.

4.5.4.2.3 *Glutathione reduzida (GSH)*

O nível de GSH foi avaliado de acordo com método descrito por Rahman et al. (2007), com adaptações. Os níveis de GSH foram determinados com DITIOBIS-5,5-

(2-NITRO-ACIDO BENZOICO) em sobrenadante de homogenato e evidenciados pela formação de coloração amarela.

Primeiramente, o DTNB (1,5 mg) foi diluído em 1 mL de NaHCO₃ 0,5% para formar a solução de DTNB diluído. Em seguida, a GSH (1 mg) foi diluída em 325 µL de água deionizada para obter a solução de GSH diluída. O tampão foi preparado utilizando duas soluções:

- Solução A: 1,75 g de K₂HPO₄ foi dissolvido em 100 mL de água deionizada.
- Solução B: 1,36 g de KH₂PO₄ foi dissolvido em 100 mL de água deionizada.

Para preparar o tampão final, foram misturados 80,4 mL da solução A, 19,6 mL da solução B e 0,0372 mL de EDTA 5 mM.

A solução MIX foi preparada combinando 17,6 mL do tampão preparado anteriormente com 360 µL da solução de DTNB diluído. Por fim, os tubos de eppendorf foram preparados para a leitura da curva padrão. Após 15 minutos, os níveis de GSH foram avaliados em 412 nm e os resultados expressos em micromol/mg de proteína.

4.5.4.2.4 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o descrito por Senthilkumar e colaboradores (2021) com algumas alterações. A avaliação ocorreu através da quantificação de complexos formados por ânions superóxido com a adição de NBT e NH₂OH· HCl de coloração amarelada com a redução do NBT, formando coloração azulada.

Para o tampão carbonato de sódio (50 mM) pH 10.2, foi pesado 5,2995 g de Na₂CO₃ e completado o volume para 1 L com água deionizada. A solução de EDTA 0,1 mM foi preparada pesando 0,37224 g de EDTA e completando o volume para 1 L com água deionizada. A solução NBT 96 mM foi preparada pesando 0,0785 g de NBT e completando o volume para 1 L com EDTA 0,1 mM. Para o Triton X-100 0,6%, pipetou-se 0,6 mL de Triton X-100 e diluiu-se em 99,4 mL de água deionizada. A solução de hidroxilamina (20 mM) pH 6,0 foi preparada pesando 1,3898 g de hidroxilamina e completando o volume para 1 L com tampão carbonato.

A hidroxilamina foi acrescentada somente ao iniciar a reação, ou seja, 2 minutos antes de pipetar nos poços da microplaca. Após 2 minutos de incubação, a amostra contendo a enzima foi adicionada. A pipetagem foi realizada com a pipeta multicanal, em todos os poços da coluna ao mesmo tempo. A absorbância foi medida

imediatamente a 560 nm, por 2 minutos, em intervalos de 15 segundos. Os resultados foram expressos em micromol/mg de proteína.

4.5.4.2.5 *Catalase (CAT)*

A atividade enzimática da CAT foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. O meio de reação foi preparado a partir de 2,5 ml de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA (5,0 mM), pH 8,0 e 47,32 ml de água desionizada. Além disso, foi adicionado ao meio de reação 180 µl de H₂O₂ (30%, d=1,1 g.ml⁻¹, MM = 34 g.mol⁻¹; concentração final no ensaio = 30 mM), somente no momento da leitura.

Após a determinação da concentração de proteínas (normalizadas 1,0 mg/ml em PBS), o procedimento envolveu a pipetagem de 3 µL do branco (PBS) ou 3 µL das amostras em triplicata e 297 µL do meio de reação em todos os poços utilizados. Em seguida, a leitura foi realizada imediatamente em um espectrofotômetro a 240 nm por 1 minuto, com intervalos de 15 segundos. Os resultados foram expressos em micromol/mg de proteína. (AEBI et al., 1984).

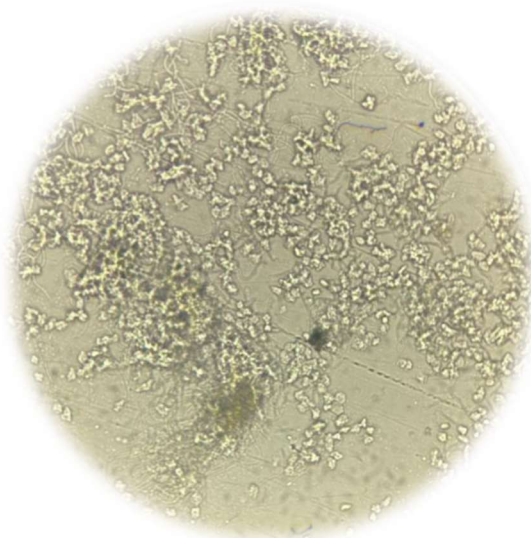
4.5.5 Fertilidade

Após 6 semanas, as fêmeas do subgrupo 2 (n=10/grupo) foram colocadas para acasalar com os machos. Para o acasalamento, os animais foram coabitados diariamente durante a noite (um macho e uma fêmea, não-irmãos por gaiola) até o diagnóstico de prenhez positivo (Figura 2), confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. As fêmeas foram então mantidas em gaiolas individuais até o dia gestacional (DG) 20, as quais foram submetidas à eutanásia com o uso do tiopental (40 mL/kg), precedido de uma injeção de anestésico local sem ação vasoconstritora (lidocaína 7 mL/kg) e posteriormente laparatomizadas, para que os cornos uterinos pudessem ser analisados. Os filhotes foram submetidos a eutanásia por decapitação. Dessa forma, foi possível determinar o número de implantações uterinas, fetos vivos e mortos, bem como quantificar corpos lúteos, após isolamento dos ovários.

Assim, o desempenho reprodutivo foi definido pelos seguintes índices: índice de acasalamento (%): (número de fêmeas acasaladas = [esperma vaginal ou prenhez/número de fêmeas colocadas com machos] × 100); índice de fertilidade (%):

(número de fêmeas prenhes [embriões ou fetos no útero ou parto/número de fêmeas colocadas com machos] \times 100); índice de gestação (%): (número de fêmeas prenhes/número de fêmeas inseminadas) \times 100; índice de natalidade (%): (número de filhotes vivos/número de nascidos vivos + filhotes mortos) \times 100; perda pós-implantação (%): (número de implantações - número de filhotes vivos/número de implantações) \times 100; perda pré-implantação (%): (número de corpos lúteos – número de pontos de implantação/número de corpos lúteos) \times 100; viabilidade fetal (%): (número de filhotes vivos/número de pontos de implantação) \times 100; taxa de implantação (%): (número de pontos de implantação/número de corpos lúteos) \times 100.

Figura 2 – Esfregaço vaginal e diagnóstico de prenhez positivo.



5 ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise exploratória com o objetivo de avaliar a distribuição (Shapiro-Wilk test) e a homogeneidade de variância (Teste de Levene) de cada variável. Variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância foram aplicadas foram conduzidas análises paramétricas e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade, os dados foram submetidos aos testes não-paramétricos, apresentados como mediana (1º e 3º quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

- Teste t para a quantificação de fenólicos totais, capacidade antioxidante e glicemia basal.

- Análise de covariância (ANCOVA) para variação de peso dos órgãos reprodutivos (útero vazio e ovário) utilizando o peso corporal final como covariável.

- Kruskal-Wallis e ANOVA: avaliação de ciclo estral, testes de fertilidade, estresse oxidativo, histomorfometria de útero e ovário, parâmetros reprodutivos, acúmulo de lipofucsina.

- Teste Fisher/qui-quadrado: parâmetros reprodutivos, avaliação de ciclo estral.

Os tratamentos estatísticos foram realizados usando A plataforma de software SPSS (IBM® SPSS® statistics 25) e Software Prism 8 (GraphPad Prism® Software, Inc., San Diego, CA).

6 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a caracterização da polpa da juçara antes e após a fermentação. O resultado indica que a fermentação reduziu o pH e a quantidade de açúcares, evidenciando o consumo de açúcares pelas bactérias durante a fermentação.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE JUÇARA

Tabela 1 - Composição química da polpa de juçara.

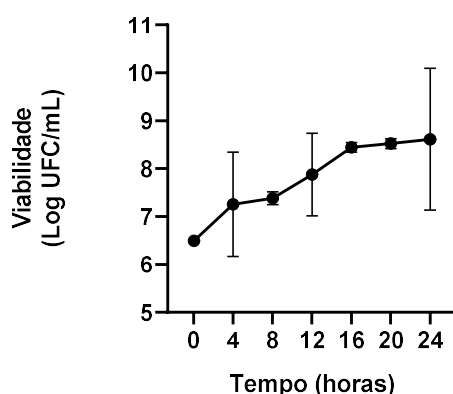
Composição	Valor médio ± desvio padrão	Composição	Valor médio ± desvio padrão
Polpa <i>in natura</i>		Polpa fermentada	
Umidade %	98,42 ± 0,01	Umidade %	98,42 ± 0,01
Proteínas %	0,01 ± 0,01	Proteínas %	0,01 ± 0,01
Lipídios %	0,01 ± 0,01	Lipídios %	0,01 ± 0,01
Sólidos solúveis %	2,13 ± 0,32	Sólidos solúveis %	2,13 ± 0,32
Cinzas %	0,17 ± 0,00	Cinzas %	0,17 ± 0,00
pH	4,41 ± 0,02 ^a	pH	4,10 ± 0,02 ^b
Açúcares %	0,37 ± 0,04 ^a	Açúcares %	0,21 ± 0,06 ^b
Fibras totais %	ND	Fibras totais %	ND

Resultados apresentados como média ± DP Considerando a igualdade de variâncias, segundo o teste de Levene ($p > 0,05$), o teste t mostra diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias da quantidade de açúcar presente na polpa e na polpa fermentada. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste t. ND = não detectado.

6.2 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A curva de viabilidade celular de *Limosilactobacillus reuteri* LR92 durante a fermentação mostrou que a fase estacionária ocorre entre 16 e 24 horas, conforme apresentado na figura 3, sendo 24 horas o tempo escolhido padrão para a fermentação da polpa da juçara durante o tratamento. Dessa forma, a concentração de bactérias utilizada para a fermentação da polpa da juçara foi equivalente a 10^9 UFC/mL.

Figura 3 – Gráfico da viabilidade celular (Log UFC/mL) de *Limosilactobacillus reuteri* LR92 durante 24 horas de fermentação.



Viabilidade celular (log UFC/mL) de *Limosilactobacillus reuteri* durante 24 horas de fermentação da polpa de juçara em meio de cultura Ágar MRS.

6.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA POLPA DE JUÇARA ANTES E APÓS A FERMENTAÇÃO

Os resultados do conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante para a polpa de juçara antes e após fermentação estão apresentados na Tabela 2, em que é possível observar uma redução de 22 % na atividade pelo método FRAP após fermentação. A quantificação de compostos fenólicos presentes na polpa da juçara *in natura* utilizada nesse estudo (Morretes – PR) foi equivalente a $164,7 \pm 22,3$ mg/100 mL.

Tabela 2 - Fenólicos totais e capacidade antioxidante da polpa de juçara antes e após fermentação por *L. reuteri*.

Amostra	DPPH	ABTS	FRAP	Fenólicos totais
	Trolox mg/100 mL	Trolox mg/100 mL	Sulfato ferroso mg/100 mL	Ácido gálico mg/100 mL
Juçara (JU)	$32,68 \pm 3,57^a$	$46,38 \pm 11,47^a$	$129.239,66 \pm 2.954,59^a$	$164,71 \pm 22,33^a$
Juçara fermentada	$25,27 \pm 4,32^a$	$35,96 \pm 4,25^a$	$100.764,66 \pm 6.142,65^b$	$162,63 \pm 35,03^a$

por LR92
(JUF)

Resultados apresentados como média \pm DP de três repetições. Considerando a igualdade de variâncias, segundo o teste de Levene ($p > 0,05$), o teste t mostra diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias os grupos (juçara e juçara fermentada) avaliados pelo método FRAP. Grupo JU (juçara): polpa *in natura*; Grupo JUF (juçara fermentada): polpa fermentada por LR92 durante 24 horas. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

6.4 PESO CORPORAL E PESO DE ÓRGÃOS

Conforme apresentado na Tabela 3, o peso corporal das ratas ao final do tratamento (6 semanas) não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, segundo o teste estatístico ANOVA. ANCOVA mostrou que não há efeito do peso corporal das fêmeas sobre o peso de útero, ovário e fígado ($p > 0,05$). Além disso, o peso desses órgãos, segundo ANCOVA, não foi influenciado pela administração de juçara ($p > 0,05$). No entanto, há efeito do peso corporal das fêmeas sobre o peso dos rins [$F(1,25) = 18,509$; $p < 0,05$], porém, não há efeito da administração de juçara e de juçara fermentada no peso dos rins das ratas quando comparado ao grupo controle.

Tabela 3 – Peso corporal e peso dos órgãos das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Órgãos	Grupo experimental		
	CTR	JU	JUF
Peso corporal (g)	270,20 \pm 7,30	261,20 \pm 18,90	274,30 \pm 6,00
Ovário (mg)	34,00 \pm 2,00	35,00 \pm 2,00	35,00 \pm 2,00
Útero (g)	0,59 \pm 0,05	0,55 \pm 0,06	0,73 \pm 0,06
Fígado (g)	8,69 \pm 0,03	9,60 \pm 0,35	8,26 \pm 0,34
Rins (g)	1,60 \pm 0,04	1,76 \pm 0,05	1,63 \pm 0,05

Valores expressos em média \pm EPM, (n = 7/grupo). Peso corporal avaliado por ANOVA e peso de órgãos avaliado por ANCOVA com o peso corporal final como covariante. $p > 0,05$. Grupo CTR

(controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg.

6.5 CICLO ESTRAL

O teste qui-quadrado mostrou, ao grau de confiança de 95%, que não há diferença na frequência de ciclos estrais irregulares entre os grupos experimentais JU e JUF em relação ao CTR. Além disso, segundo o teste de Kruskal-Wallis, não foi encontrada diferença significativa no número de estros entre os grupos experimentais, bem como no número de estros entre as ratas com ciclos estrais regulares, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação do ciclo estral das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupo experimental		
	CTR [17]	JU [17]	JUF [17]
Ciclos regulares (%)	35,3% (6/17)	58,8% (10/17)	58,8% (10/17)
Ciclos irregulares (%)	64,7% (11/17)	41,2% (7/17)	41,2% (7/17)
nº de estros (ciclos totais)	4,00 (2,50 - 6,50)	4,00 (4,00 - 6,00)	4,00 (3,50 - 5,00)
nº de estros (ciclos regulares)	5,00 (3,75 - 6,25)	4,50 (4,00 - 6,00)	4,50 (4,00 - 5,25)

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo e o número entre parênteses indicam o número de animais que apresentaram ciclos regulares e irregulares/número total de animais no grupo. Resultados das frequências de ciclos regulares e irregulares expressos em porcentagem (χ^2 , $p > 0,05$). Número de estros foram submetidas a testes não paramétricos (Kruskal-Wallis) e expressos como mediana (1º - 3º quartil). Controle (CTR); Juçara (JU); Juçara fermentada por LR92 com LR92 (JUF). $p > 0,05$.

6.6 HISTOMORFOMETRIA DE ÚTERO E OVÁRIO

O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis mostrou que não há diferença significativa, ao grau de confiança de 95%, entre as medidas foliculares das ratas tratadas com juçara e juçara fermentada por LR92 quando comparadas ao grupo controle, conforme indicado pela Tabela 5. A análise morfométrica uterina (ANOVA) não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados em relação ao controle.

Tabela 5 – Análise morfométrica folicular e uterina das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Medida (μM)	Grupo experimental		
	CTR [6]	JU [6]	JUF [6]
Altura média da camada folicular	10,4 (8,6 - 13,9)	11,2 (10,7 - 13,3)	10,7 (10,1 - 12,6)
Epitélio luminal	26,26 \pm 1,35	27,20 \pm 1,68	26,70 \pm 1,31
Estroma endometrial	768,91 \pm 78,72	703,67 \pm 39,05	731,65 \pm 36,45
Miométrio	404,53 \pm 19,99	395,96 \pm 34,08	439,01 \pm 33,25

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média \pm EPM nas medidas do epitélio luminal, estroma endometrial e miométrio. Alturas médias das camadas foliculares foram submetidas a testes não paramétricos (Kruskal-Wallis) e expressos como mediana (1^o - 3^o quartil). Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg. $p > 0,05$.

A contagem de corpos lúteos e a quantificação de folículos ovarianos não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, segundo o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, ao grau de confiança de 95%. Os resultados apresentados indicam que a administração de juçara e juçara fermentada não modificou a contagem de corpos lúteos e a quantificação de folículos ovarianos primários, em crescimento e antrais, em relação ao grupo controle, conforme

apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Contagem de corpos lúteos e quantificação folicular ovariana.

Estrutura ovariana	Grupo experimental		
	CTR [6]	JU [6]	JUF [6]
Folículos primários	5,15 (4,50 - 7,97)	7,42 (4,44 - 9,18)	5,48 (3,97 - 7,66)
Folículos em crescimento	0,10 (0 - 0,34)	0,29 (0,29 - 0,31)	0,17 (0,12 - 0,29)
Folículos antrais	0,23 (0,12 - 0,57)	0,52 (0,31 - 0,77)	0,33 (0,18 - 0,51)
Corpos lúteos	0,21 (0,08 - 0,25)	0,19 (0,12 - 0,22)	5,92 (4,56 - 8,72)

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos como mediana (1º - 3º quartil) $p > 0,05$. Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg.

6.7 PARÂMETROS REPRODUTIVOS

A Tabela 7 mostra que os parâmetros reprodutivos analisados dentro dos grupos experimentais, como as taxas de fertilidade, natalidade, gestação e acasalamento não apresentaram diferença significativa ao grau de confiança de 95%, segundo o Teste Fisher.

Tabela 7 – Frequência de parâmetros reprodutivos entre os grupos experimentais.

Parâmetros	Grupo experimental		
	CTR	JU	JUF
Fertilidade %	88,9 [8/9]	88,9 [8/9]	100,0 [9/9]
Natalidade %	96,8 [90/93]	99,0 [105/106]	99,0 [98/99]
Gestação %	88,9 [8/9]	88,9 [8/9]	100,0 [9/9]

Acasalamento % 100,0 [9/9] 100,0 [9/9] 100,0 [9/9]

Resultados expressos em porcentagem (χ^2 , $p > 0,05$). Número entre colchetes indica o número de animais que apresentaram os parâmetros/número total de animais do grupo. Teste Fisher. Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg.

As taxas de fertilidade foram analisadas entre os grupos experimentais pelos testes ANOVA e Kruskal-Wallis (não-paramétrico). O teste estatístico ANOVA complementado com Bonferroni mostrou que o grupo tratado com juçara obteve maior taxa de implantação e menor taxa de perda pré-implantação em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com juçara fermentada, conforme indicado pela Tabela 8.

Tabela 8 – Taxa de fertilidade entre os grupos experimentais.

Taxa	Grupo experimental		
	CTR [8]	JU [8]	JUF [9]
Viabilidade fetal	86,66 (80,93 - 88,21)	89,90 (83,19 - 98,43)	90,91 (76,66 - 96,66)
Implantação	76,54 ± 3,67 ^a	91,69 ± 2,52 ^b	76,30 ± 4,76 ^a
Perda pré-implantação	23,45 ± 3,67 ^a	8,31 ± 2,52 ^b	23,70 ± 4,76 ^a
Perda pós-implantação	13,34 (1,78 - 19,16)	10,10 (1,56 - 16,81)	9,09 (3,33 - 23,33)

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média ± EPM nas taxas de implantação e de perda pré-implantação (ANOVA complementado com Bonferroni). As taxas de viabilidade fetal e perda pós-implantação foram submetidos a testes não paramétricos (Kruskal-Wallis) e expressas como mediana (1º - 3º quartil) $p > 0,05$. Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

6.8 ESTRESSE OXIDATIVO

No tecido uterino, não foi constatada diferença significativa entre os grupos experimentais com relação à quantificação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), realizada por meio da quantificação de malondialdeído, GSH, bem como a atividade da GST e CAT. No entanto, a atividade da enzima antioxidante SOD, segundo o teste não paramétrico Kruskal-Wallis complementado com Bonferroni, foi maior no tecido uterino das ratas administradas com juçara em comparação ao grupo controle e ao grupo juçara fermentada por LR92.

Tabela 9 – Resultados obtidos dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo a partir de análise uterina das ratas dos diferentes grupos experimentais.

ANÁLISE UTERINA			
Parâmetro	Grupo experimental		
	CTR	JU	JUF
Malondialdeído (nmol/mg de proteína)	4,62 ± 0,18	5,17 ± 0,34	4,65 ± 0,20
GSH (µg/mg de proteína)	30,67 (27,58 - 63,62)	30,67 (24,04 - 67,87)	35,71 (24 - 52,70)
GST (nmol ⁻¹ .ml ⁻¹ .mg de proteína)	117,20 ± 10,47	124,42 ± 16,81	105,93 ± 16,04
SOD (U/mg de proteína)	7,54 (3,60 - 8,73) ^a	18,92 (9,18 - 23,77) ^b	8,12 (7,06 - 9,10) ^a
CAT (nmol ⁻¹ .ml ⁻¹ .mg de proteína)	64,50 ± 11,57	56,25 ± 15,32	56,10 ± 12,35

Valores expressos em média ± EPM nos parâmetros TBARS, GST e CAT (ANOVA). (n=5-7/grupo). Os parâmetros GSH e SOD foram submetidos ao teste não paramétrico (Kruskal-Wallis complementado com Bonferroni) e expressas como mediana (1º - 3º quartil). Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada):

tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Com relação às amostras ovarianas, constatou-se que a atividade da GST, indicada na Tabela 10, apresentou diferença significativa, ao grau de confiança de 95%, no grupo tratado com juçara fermentada por LR92 em relação ao grupo controle [$F(2, 19) = 6,493$; $p < 0,05$], mas o grupo juçara não diferiu de nenhum dos outros grupos. A quantificação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e de GSH, bem como a atividade da CAT e a atividade da SOD, segundo ANOVA ou Kruskal-Wallis, não obteve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 10 – Resultados obtidos dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo a partir de análise ovariana das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetro	ANÁLISE OVARIANA		
	CTR	Grupo experimental JU	JUF
Malondialdeído (nmol/mg de proteína)	4,37 (4,21 - 4,43)	4,65 (4,24 - 4,78)	4,70 (4,05 - 5,07)
GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)	61,15 \pm 5,96	55,47 \pm 6,56	58,38 \pm 7,28
GST ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína)	283,82 \pm 28,71 ^a	230,47 \pm 24,32 ^{ab}	150,45 \pm 24,23 ^b
SOD (U/mg de proteína)	8,71 \pm 0,82	11,13 \pm 1,39	9,33 \pm 1,17
CAT ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína)	38,25 (30,25 - 68,75)	25,00 (16,25 - 79,25)	36,00 (23,00 - 44,75)

Valores expressos em média \pm EPM nos parâmetros GSH, GST e SOD (ANOVA complementado com Teste Tukey). (n=5-7/grupo). Os parâmetros TBARS e CAT foram submetidos ao teste não paramétrico (Kruskal-Wallis complementado com Bonferroni) e expressos como mediana (1º - 3º quartil). Grupo

CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

6.9 ACÚMULO DE LIPOFUCSINA E SENESCÊNCIA CELULAR

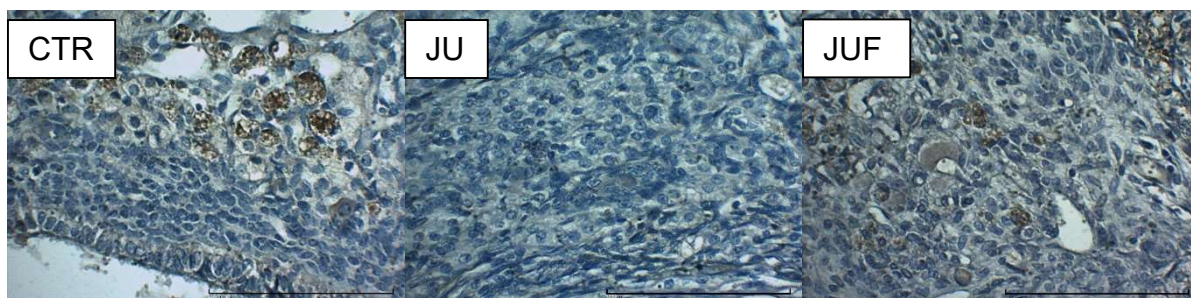
O teste estatístico ANOVA, complementado pelo Teste Tukey, mostrou que as secções ovarianas coradas com SB apresentaram menor área marcada nas ratas tratadas com juçara em comparação ao grupo controle e ao grupo tratado com juçara fermentada por LR92 [$F(2, 12) = 4,200$; $p < 0,05$]. As secções do estroma uterino, por sua vez, também apresentaram menor área marcada nas ratas tratadas com juçara em comparação ao grupo controle e ao grupo tratado com juçara fermentada, segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com Bonferroni. Dessa forma, constatou-se que as ratas tratadas com juçara apresentaram menor acúmulo de lipofucsina e menor marcação de senescência celular nos úteros (estroma) e ovários, conforme apresentado pela Tabela 11 e ilustrado pelas Figuras 4 e 5.

Tabela 11 – Área de acúmulo de lipofucsina marcada por Sudan-Black.

Tecido	Área (μm^2)		
	CTR [6]	JU [6]	JUF [6]
Ovário	824.245,40 \pm 168.807,95 ^a	377.285,20 \pm 93.559,33 ^b	754.784,20 \pm 63.783,08 ^a
Útero (estroma)	120.666,00 (107.902,25 - 152.674,5) ^a	33.145,00 (21.313,50 - 64.045,25) ^b	158.686,50 (86.896,25 - 210.058,25) ^a

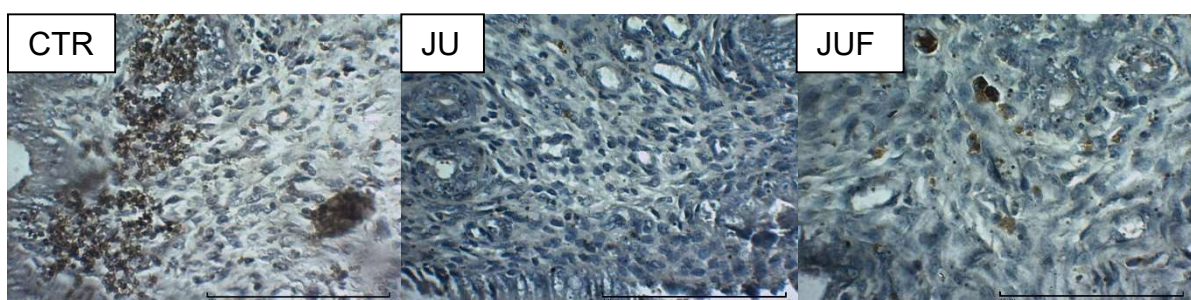
Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores de áreas ovarianas expressos em média \pm EPM (ANOVA complementado com Teste Tukey). Valores de áreas uterinas foram submetidos a testes não-paramétricos (Kruskal-Wallis complementado com Bonferroni) e expressos como mediana (1º - 3º quartil). Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Figura 4 – Acúmulo de lipofucsina corado por Sudan-Black em seções ovarianas das ratas dos diferentes grupos experimentais.



Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg.

Figura 5 – Acúmulo de lipofucsina corado por Sudan-Black em seções do estroma uterino das ratas dos diferentes grupos experimentais.



Grupo CTR (controle): tratado com água; Grupo JU (juçara): tratado com polpa de juçara na dose de 4,45 mL/kg; Grupo JUF (juçara fermentada): tratado com juçara fermentada por LR92 na dose de 4,45 mL/kg.

7 DISCUSSÃO

As frutas são ricas em compostos bioativos que conferem benefícios à saúde além daqueles proporcionados pelas fibras e micronutrientes. Há um interesse crescente em frutas nativas e exóticas de países tropicais, principalmente devido à sua composição nutricional e presença de bioativos (CARDOSO et al., 2018).

A polpa da juçara contém importantes compostos antioxidantes e representa um suprimento de componentes de alto valor agregado relacionado ao teor de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, antocianinas e outros flavonoides (SCHULZ et al., 2015). Vários estudos indicaram que a polpa da juçara pode exercer efeitos antioxidantes *in vitro* (BORGES et al., 2013; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014). Corroborando com esses achados, o presente estudo mostra que a polpa da juçara (*Euterpe edulis*) possui alto teor de antioxidantes, mensurado por diferentes métodos, quando comparado com o estudo de Freire e colaboradores (2013) que avaliou acerola (*Malpighia emarginata*), caju (*Anacardium occidentale*), goiaba (*Psidium guajava*) e morango (*Fragaria sp*).

A quantidade de compostos fenólicos nos frutos é correlacionada, entre outros fatores, ao grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e condições de armazenamento (FU et al., 2011). Além disso, podem ocorrer diferenças nas unidades relatadas e padrões espectrofotométricos empregados (CARDOSO et al., 2018). Desta forma, a variação nas condições e processamentos pode ser responsável pela redução de aproximadamente três vezes na concentração de compostos fenólicos encontrados na polpa *in natura* de juçara utilizada no presente estudo (Morretes – PR) , quando comparada à polpa utilizada em um estudo prévio, colhida em Rolândia – PR, (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017).

Contrastando com os dados de um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, cujos dados mostraram que a polpa da juçara fermentada por LR92 resultou em um aumento significativo no conteúdo total de compostos fenólicos e atividade antioxidante (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017), no presente trabalho, o teor de compostos fenólicos não apresentou diferença significativa entre a polpa da juçara *in natura* e fermentada. No entanto, a atividade antioxidante da polpa fermentada apresentou menor atividade antioxidante em relação a polpa *in natura* quando comparada pelo método FRAP.

O método FRAP avalia a capacidade antioxidante de uma substância ou amostra. Ele mede a capacidade de um antioxidante em reduzir o íon férrico (Fe^{3+}) para ferro ferroso (Fe^{2+}) em condições ácidas. Dessa forma, o FRAP é amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total de alimentos, bebidas, suplementos, extratos de plantas e outras substâncias (SILVA et al., 2022). Nesse sentido, embora seja necessário considerar todos os métodos de quantificação, é importante observar a maior atividade antioxidante total apresentada pela polpa *in natura* em relação à polpa fermentada.

A divergência nos resultados do estudo presente em relação ao estudo prévio, acerca da capacidade antioxidante da polpa *in natura* comparada à polpa fermentada por LR92, pode ser atribuída à padronização do tempo de fermentação com base no crescimento bacteriano máximo, em vez de considerar o ponto da curva em que a atividade antioxidante atinge seu pico. O trabalho prévio indicou um aumento na atividade antioxidante durante a fermentação por LR92, seguido por um declínio posterior (GUERGOLETTTO; ISHII MAURO; GARCIA, 2017). Os autores discutiram que a fermentação pode levar à quebra estrutural dos componentes da parede celular vegetal na polpa, devido à redução do pH, promovendo a liberação de compostos fenólicos ligados por meio de processos enzimáticos e a subsequente síntese de diversos compostos bioativos. Portanto, o consumo de bioativos antioxidantes pelas bactérias e a síntese de novos compostos podem depender da composição da polpa.

No presente estudo, a utilização de uma polpa pronta proveniente de outra região do Paraná, colhida em época distinta e submetida a diferentes métodos de preparo, pode ter resultado em uma redução no teor de compostos bioativos o que pode ter influenciado o processo de fermentação. Portanto, hipotetizamos que a redução da capacidade antioxidante após a fermentação da polpa de juçara pode ser atribuída às variações na composição devido a safra, época de colheita, região geográfica e método de preparo. Ademais, a hipótese levanta a possibilidade de que o momento de máxima ação antioxidante da polpa não tenha coincidido com o período de maior crescimento bacteriano utilizado no estudo (24 horas). Isso sugere que outros períodos de fermentação podem ser mais adequados para preservar a capacidade antioxidante da polpa de juçara.

No que tange a avaliação do peso corporal e dos órgãos, os resultados do presente estudo mostraram que a administração de juçara ou de juçara fermentada

não alterou significativamente o peso corporal das ratas e o peso dos órgãos, como rins, fígado, útero ou ovários.

Embora o potencial efeito antioxidante já esteja bem demonstrado em estudos *in vitro* (BORGES et al., 2011; BORGES et al., 2013; VIEIRA et al., 2013; BICUDO; RIBANI; BETA, 2014), poucos ensaios clínicos avaliaram biomarcadores de estresse oxidativo *in vivo* (CARDOSO et al., 2018). Considerando os resultados relacionados ao estresse oxidativo do tecido ovariano, as análises quantitativas realizadas (TBARS, GSH, CAT e SOD) identificaram semelhança entre os grupos experimentais. No entanto, constatou-se que a administração da juçara fermentada por LR92 reduziu a atividade da GST em relação ao grupo juçara e controle.

A GST é uma enzima responsável pela desintoxicação de substâncias estranhas (xenobióticos), toxinas e produtos reativos dentro do organismo. Sua principal função é catalisar a conjugação de eletrófilos endógenos e xenobióticos com a molécula de glutatona. Essa etapa de conjugação torna essas substâncias mais solúveis em água e facilita sua eliminação pelo organismo (BLADEREN, 1990). No entanto, uma dose excessiva de antioxidantes exógenos pode reduzir a capacidade da GST de desintoxicar substâncias nocivas, uma vez que esses antioxidantes podem competir com os substratos da GST pela ligação à glutatona (WIEGAND et al., 2009).

Acredita-se que a supressão da atividade da enzima GST, observada com a suplementação de juçara fermentada, possa ser atribuída à composição específica do produto fermentado. É possível que essa composição contenha substâncias bioativas ou metabólitos que influenciam a atividade da GST. Essa hipótese é reforçada por um estudo prévio que mostrou que níveis elevados de butirato celular, um ácido graxo de cadeia curta produzido pela fermentação de bactérias intestinais, podem levar à degradação do RNAm hGSTT1, resultando em uma expressão reduzida da proteína hGSTT1-1, um subtipo específico da família de enzimas GST (KAUTENBURGER et al., 2005).

Os resultados obtidos sugerem que a redução na atividade da GST nos ovários não teve um impacto direto no equilíbrio oxidante-antioxidante, mas está associada ao seu papel na desintoxicação de xenobióticos. Essa hipótese é reforçada por outro estudo que demonstrou que o consumo de quercetina em doses elevadas, reduziu significativamente a atividade da GST hepática em comparação com o grupo controle (WIEGAND et al., 2009). Os autores discutiram que os flavonoides dietéticos podem afetar de forma significativa as enzimas de fase II (GST) no fígado de ratos, mas têm

pouco efeito no equilíbrio oxidante-antioxidante, o que pode afetar a capacidade do organismo de desintoxicar substâncias endógenas e exógenas.

Embora vários experimentos tenham demonstrado uma relação entre a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como a GST, e a presença de estresse oxidativo (YOUNIS; KHAN; SAJID, 2016; SAMAGHANDIAN et al., 2017), essa hipótese não pode ser confirmada no contexto específico do estudo em questão. Isso se deve ao fato de que apenas a atividade da GST foi significativamente reduzida e não foram observadas alterações na GSH, e em outras enzimas como a CAT e a SOD. Além disso, não houve aumento na peroxidação lipídica, avaliada pela quantificação de malondialdeído. Esses resultados indicam que a diminuição seletiva da atividade da GST nos ovários pode não estar associada a um estado geral de estresse oxidativo.

Dados da literatura sugerem que a administração de uma dieta suplementada com *Limosilactobacillus casei* está associada a uma redução na atividade da enzima antioxidante GST no fígado (AZZARÀ et al., 2010). Essa diminuição na atividade da GST levanta a hipótese de uma possível diminuição nos níveis de estresse oxidativo. No entanto, no presente estudo, embora tenha sido observada uma redução na atividade da GST nos ovários, não houve melhora no equilíbrio oxidante-antioxidante, conforme avaliado pela peroxidação lipídica (TBARS). Isso indica que a redução na atividade da GST não afetou o estado oxidante-antioxidante nos ovários estudados.

Entretanto, é importante levar em consideração outros fatores e mecanismos que podem estar envolvidos na regulação do estresse oxidativo nesse contexto específico. São necessários mais estudos para investigar de forma mais aprofundada as implicações dessas alterações na atividade da GST, o consumo da juçara, fermentada ou não, e sua relação com o estresse oxidativo, a fim de obter uma compreensão mais completa dos mecanismos envolvidos e suas consequências funcionais.

O aumento da atividade da enzima SOD, observado no tecido uterino, pode ser considerado uma resposta adaptativa destinada a neutralizar os radicais livres e atenuar os danos oxidativos que podem ocorrer nessa região (SAMARGHANDIAN et al., 2017). Essa resposta adaptativa desempenha um papel importante na preservação da integridade celular, manutenção da função dos tecidos e minimização dos danos oxidativos associados ao processo de envelhecimento. Essa hipótese está em consonância com os resultados obtidos no presente estudo, que mostraram

aumento da taxa de implantação e redução da taxa de perda pré-implantação em ratas administradas com juçara.

Acerca da avaliação dos parâmetros reprodutivos, os resultados do presente estudo mostraram que as taxas de natalidade, gestação, acasalamento, fertilidade, viabilidade fetal e perda pós-implantação não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

No entanto, a administração da polpa de juçara resultou em um aumento significativo nas taxas de implantação e uma redução significativa na perda pré-implantação em comparação com o grupo controle. Esses resultados indicam que a juçara pode ter um efeito benéfico nos parâmetros reprodutivos, atenuando os efeitos negativos do envelhecimento reprodutivo. A taxa de implantação foi 19,8% maior no grupo tratado com juçara, enquanto a perda pré-implantação foi aproximadamente três vezes menor em comparação com o grupo controle. Essas descobertas sugerem que a administração da polpa de juçara pode aumentar as chances de implantação e reduzir as perdas precoces de embriões.

Embora não haja estudos específicos sobre os efeitos da juçara nos parâmetros reprodutivos de ratas com idade avançada, os achados desse estudo são apoiados por uma pesquisa anterior que investigou a administração de açaí. Esse estudo concluiu que o tratamento com açaí não afetou o número de ovócitos, mas melhorou a formação de blastocistos e reduziu a diminuição do potencial de implantação associada ao envelhecimento ovariano (LANE et al., 2021).

É importante ressaltar que mais pesquisas são necessárias para compreender plenamente os mecanismos pelos quais a juçara exerce esses efeitos e para confirmar sua eficácia na atenuação dos efeitos do envelhecimento reprodutivo em outras populações e espécies. No entanto, esses resultados preliminares são promissores e indicam o potencial da juçara como um tratamento para beneficiar parâmetros reprodutivos em indivíduos afetados pelo envelhecimento reprodutivo.

O envelhecimento das ratas *Wistar* está relacionado à redução gradativa da contagem de folículos em crescimento e maturação, bem como aumento de ciclos irregulares (KLOCHKOV; ALEKHINA; PROKUDINA, 2011). Entretanto, a contagem folicular realizada no presente estudo mostrou que não houve diferença significativa na quantificação de folículos ovarianos e corpos lúteos entre as ratas dos três grupos experimentais. Esse dado indica que a administração de juçara não preveniu a redução do número de folículos decorrentes do envelhecimento reprodutivo quando

comparado ao grupo controle, corroborando com o trabalho de Lane e colaboradores (2021). Da mesma forma, não foi identificada diferença significativa na análise morfométrica uterina e ovariana entre os grupos experimentais.

Em relação aos ciclos estrais, a administração de juçara (fermentada ou não) não alterou os parâmetros avaliados. No entanto, foi observado que a administração de juçara aumentou as taxas de implantação e reduziu as taxas de perda pré-implantação. Acredita-se que os resultados observados nas taxas de fertilidade em ratas tratadas com juçara possam estar relacionados à maior atividade antioxidante derivada da enzima SOD no tecido uterino, o que pode contribuir para a proteção contra danos oxidativos e a preservação da função reprodutiva. Além disso, a análise do acúmulo de lipofuscina, realizado por meio da coloração Sudan-Black, mostrou uma redução desse marcador de envelhecimento celular, indicando potencial redução da senescência celular ovariana e estroma uterino.

A senescência celular é o estado de degradação celular caracterizado pela parada de crescimento irreversível em que a célula permanece metabolicamente ativa. Esse processo pode ser desencadeado pela parada de proliferação celular após certo número de divisões devido ao atrito dos telômeros (GEORGAKOPOULOU et al., 2013).

Dessa forma, a senescência celular pode ser dividida em dois tipos: senescência replicativa e senescência prematura induzida por estresse oxidativo. A senescência replicativa ocorre após um número limitado de divisões celulares e encurtamento dos telômeros nos cromossomos. Isso causa a estagnação da proliferação celular e a perda da capacidade de diferenciação. Já a senescência prematura induzida por estresse ocorre como resposta a estímulos patológicos, como danos ao DNA e estresse oxidativo. Ambos os tipos de senescência causam a parada do ciclo celular por meio de vias de sinalização específicas (GUO et al., 2022).

O número de células senescentes aumenta com a idade e presença de afecções como obesidade e diabetes. Dessa forma, a redução dessas células pode amenizar doenças relacionadas ao envelhecimento e prolongar a vida útil em camundongos (KOWALD et al., 2020).

Com base nos resultados obtidos pela quantificação da atividade antioxidante da polpa de juçara, é plausível inferir que a maior capacidade antioxidante observada, conforme demonstrado pelo método FRAP, pode estar relacionada ao aumento da atividade antioxidante da enzima SOD *in vivo*, verificada no tecido uterino. Essa

capacidade antioxidante da polpa pode contribuir para atenuar os efeitos prejudiciais do envelhecimento reprodutivo, refletindo em uma maior taxa de implantação e uma menor taxa de perda pré-implantação. Além disso, essa maior capacidade antioxidante pode estar associada à atenuação da senescência celular observada no estroma uterino e ovários. Essas inferências sugerem que a polpa da juçara *in natura* pode desempenhar um papel benéfico na preservação da função reprodutiva e na amenização dos efeitos deletérios do envelhecimento.

No entanto, é necessário realizar mais pesquisas para compreender plenamente os mecanismos envolvidos, bem como confirmar a eficácia da juçara na atenuação dos efeitos do envelhecimento reprodutivo. Além disso, é fundamental explorar outros fatores e mecanismos relacionados ao estresse oxidativo nesse contexto específico. Estudos futuros também devem explorar diferentes tempos de fermentação da juçara, a partir de diferentes polpas, com base no pico de atividade antioxidante, a fim de avaliar seus efeitos nos parâmetros reprodutivos em modelos animais.

8 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a administração da polpa de juçara pode ter efeitos benéficos nos parâmetros reprodutivos em ratas *Wistar* em idade avançada. Observou-se que a polpa de juçara atenuou a senescência celular no útero e ovário, resultando em taxas aumentadas de implantação embrionária e redução das taxas de perda pré-implantação. Além disso, a polpa de juçara apresentou uma maior capacidade antioxidante *in vitro* em comparação com a polpa de juçara fermentada por LR92, refletindo em um maior efeito antioxidante *in vivo*, conforme evidenciado pelo aumento da atividade da enzima SOD no tecido uterino. Esses resultados sugerem que a juçara pode ter benefícios na promoção da saúde reprodutiva e apresenta potenciais aplicações na área da fertilidade. Sendo assim, é fundamental ressaltar a necessidade de conduzir mais estudos a fim de aprofundar a compreensão dos efeitos da fermentação por LR92 nas polpas de juçara. Além disso, a sequência deste estudo visa comparar os efeitos da fermentação por LR92 em duas polpas de juçara diferentes, provenientes de Rolândia e Morretes – PR e suas variações nos tempos de fermentação, bem como avaliar os impactos dessas polpas fermentadas nos parâmetros reprodutivos de ratas *Wistar* em idade avançada.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, Behzad; ABBASI, Homayoun; NIROUMAND, Hassan. Synbiotic (Famifact) administration in idiopathic male infertility enhances sperm quality, DNA integrity, and chromatin status: A triple-blinded randomized clinical trial. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 235–244, 2021. DOI: 10.18502/ijrm.v19i3.8571.
- AEBI, Hugo; SCHERZ, Bernhard; KUCHINSKAS, Edward J.; WYSS, Sonja R. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 69, p. 603–613, 1976. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03751.x/full>.
- ALVES, Tamires de Souza Ferreira; FRONZA, Edegar; STRAPASSON, Márcia Rejane. Motivos associados a opção da mulher pela gestação tardia. **Saúde Meio Ambiente**. v. 10, p. 29-44. Rio Grande do Sul, 2021.
- AGARWAL, Ashok; APONTE-MELLADO, Anamar; PREMKUMAR, Beena J.; SHAMAN, Amani; GUPTA, Sajal. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1, 2012.
- AGUILAR, Tomás Alejandro Fregoso; NAVARRO, Brenda Carolina Hernández; PÉREZ, Jorge Alberto Mendoza. Endogenous Antioxidants: A Review of Their Role in Oxidative Stress. In *A Master Regulator of Oxidative Stress — The Transcription Factor Nrf2*. **InTech**: London, 2016.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18^o ed, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AZZARÀ, Alessia et al. Increased Level of DNA Damage in Some Organs of Obese Zucker Rats by c-H2AX Analysis Alessia. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v. 405, n. April, p. 391–405, 2010.
- BLADEREN, Peter Van. Quantification of human hepatic glutathione S-transferases. **Biochemistry Journal**. [S. l.], v. 269, p. 609–613, 1990.
- BLIGH E.G; DYER W.J. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology Issued by The National Research Council Of Canada A Rapid Method Of Total Lipid Extraction And Purification1. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BICUDO, Milene Oliveira Pereira; RIBANI, Rosemary Hoffmann; BETA, Trust. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 142–147, 2014.

BORGES, Graciele Da Silva Campelo; VIEIRA, Francilene Gracieli Kunradi; COPETTI, Cristiane; GONZAGA, Luciano Valdemiro; ZAMBIAZI, Rui Carlos; MANCINI FILHO, Jorge; FETT, Roseane. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2128-2133, 2011.

BORGES, Graciele Da Silva Campelo; GONZAGA, Luciano Valdemiro; JARDINI, Fernanda Archilla; MANCINI FILHO, Jorge; HELLER, Melina; MICKE, Gustavo; COSTA, Ana Carolina Oliveira; FETT, Roseane. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 363–369, 2013.

BOROSKI, Marcela et al. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. **Appris**, 2015.

BRADFORD, Marion. **Analytical. Biochemistry**. v.72, 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Gestação de alto risco: manual técnico. 5. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde: Guia Alimentar para População Brasileira promovendo a alimentação saudável. Normas e manuais técnicos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014.

BRANCALION, Pedro Henrique Santin; VIDAL, Edson; LAVORENTI, Norberto Antonio; BATISTA, João Luís Ferreira; RODRIGUES, Ricardo Ribeiro. Soil-mediated effects on potential *Euterpe edulis* (Arecaceae) fruit and palm heart sustainable management in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, [S. l.], v. 284, p. 78–85, 2012.

BUEGE, John; AUST, Steven. Biomembranes - Part C: Biological Oxidations. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 52, p. 302–310, 1978.

CARDOSO, Alyne Lizane; DI PIETRO, Patricia Faria; VIEIRA, Francilene Graciele Kunradi; BOAVENTURA, Brunna Cristina Bremer; DE LIZ, Sheyla; DA SILVA CAMPELO BORGES, Graciele; FETT, Roseane; DE ANDRADE, Dalton Francisco; DA SILVA, Edson Luiz. Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 17, p. 152–162, 2015.

CARDOSO, Alyne Lizane; DE LIZ, Sheyla; RIEGER, Débora Kurrle; FARAH, Ana Carolina Aguiar; KUNRADI VIEIRA, Francilene Gracieli; ALTENBURG DE ASSIS, Maria Alice; DI PIETRO, Patricia Faria. An Update on the Biological Activities of *Euterpe edulis* (Juçara). **Planta Medica**, [S. l.], v. 84, n. 8, p. 487–499, 2018.

Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for industry:** estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. 2005.

CEMBRANELI, Fernando; FISCH, Simey Thury Vieira; DE CARVALHO, Camila Pereira. Exploração sustentável da palmeira *Euterpe edulis* Martius no Bioma Mata Atlântica, Vale do Paraíba – SP. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 3, p. 233-240, 2009.

CRAWFORD, Natalie; STEINER, Anne. Age-related infertility. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 15–25, 2015.

COUTO, Narciso; Wood, Jeniffer; Barber, Jill. The Role of Glutathione Reductase and Related Enzymes on Cellular Redox Homeostasis Network. **Free Radical Biology & Medicine** v. 95, p. 27–42, 2016.

DE LIZ, Sheyla et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and juçara (*Euterpe edulis* Mart.) juices improved HDL-c levels and antioxidant defense of healthy adults in a 4-week randomized cross-over study. **Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 39, n. 12, p. 3629–3636, 2020.

DÍAZ-HERNÁNDEZ, Veronica; MONTAÑO, Luiz; CALDELAS, Ivete; MARMOLEJO-VALENCIA, Alejandro. A High-Fat and High-Carbohydrate Diet Promotes Reminiscent Hallmarks of an Aging Ovary in the Rabbit Model. **Biomedicines**, 2022.

DUBOIS, Michel et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EVANGELOU, Konstantinos; GORGOULIS, Vassilis. Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. **Methods Molecular Biology**, p. 111-119, 2017.

FANG, Zhongxiang; BHANDARI, Bhesh. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 129, n. 3, p. 1139–1147, 2011.

FREIRE, Juliana Mesquita; DE ABREU, Celeste Maria Patto; ROCHA, Denise Alvarenga; CORRÊA, Angelita Duarte; MARQUES, Natália Rodrigues. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciencia Rural**, [S. l.], v. 43, n. 12, p. 2291–2296, 2013.

FU, Li; XU, Bo Tao; XU, Xiang Rong; GAN, Ren You; ZHANG, Yuan; XIA, En Qin; LI, Hua Bin. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 345–350, 2011.

GATTI, Maria Genoveva; CAMPANELLO, Paula I.; GOLDSTEIN, Guillermo. Growth and leaf production in the tropical palm *Euterpe edulis*: Light conditions versus developmental constraints. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, [S. l.], v. 206, n. 8, p. 742–748, 2011.

GEORGAKOPOULOU, Eleni et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. **Aging**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 37–50, 2013.

GUERGOLETTTO, Karla Bigetti; COSTABILE, Adele; FLORES, Gema; GARCIA, Sandra; GIBSON, Glenn R. In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 196, p. 251–258, 2016.

GUERGOLETTTO, Karla Bigetti; ISHII MAURO, Carolina Saori; GARCIA, Sandra. Juçara (*Euterpe edulis*) pulp as a substrate for probiotic bacteria fermentation: Optimisation process and antioxidant activity. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 29, n. 12, p. 949–959, 2017.

GONÇALVES, Záfia Rangel; MONTEIRO, Denise Leite Maia. Complicações maternas em gestantes com idade avançada. **Femina**, [S. l.], p. 1–5, 2012.

GOLDMAN, Jerome M.; MURR, Ashley S.; COOPER, Ralph L. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.

GUO, Jun et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. **Sig Transduct Target Ther**. V.7, 391, 2022.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HAMINIUK, Charles; MACIEL, Giselle Maria; PLATA-OVIEDO, Manuel; PERALTA, Rosane Marina. Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HAVENAAR, R, HUIS IN'T VELD, JHJ. Probiotics: a general view. In *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Science Publishers, pp 151–170. London and New York, 1992.

HILL, Colin; GUARNER, Francisco; REID, Gregor; GIBSON, Glen; MARENSTEIN, Daniel; POT, Bruno; MORELLI, Lorenzo; CANANI, Roberto; FLINT, Harry; SALMINEN, Seppo; CALDER, Philip; SANDERS, Mary. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the

term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 11(8):506-14, 2014.

HUGENHOLTZ, Floor; DE VOS, Willem. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 149–160, 2018.

JEŻEWSKA-FRĄCKOWIAK, Joanna et al. “The promises and risks of probiotic *Bacillus* species.” **Acta biochimica Polonica** vol. 65,4: 509-519, 2018.

KAUTENBURGER, Tanja et a. The gut fermentation product butyrate , a chemopreventive agent , suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. [S. l.], **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 131: 692–700, 2005.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KLEIN, Nancy; BATTAGLIA, David; MILLER, Paul; BRANIGAN, Emmett; GIUDICE, Linda; SOULES, Michael. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 81, n. 5, p. 1946–1951, 1996.

KLOCHKOV, Vladimir et al. Age-specific features of estrous cycles and folliculogenesis in GC female rats selected by catatonic reactivity. Bulletin of Experimental. **Biology and Medicine**, [S. l.], v. 151, n. 2, p. 219–222, 2011.

KOWALD, Axel et al. On the evolution of cellular senescence. **Aging Cell**, v.19, 2020.

LAFFAN, Susan; POSOBIEC, Lorraine; UHL, Jenny; VIDAL, Justin. Species Comparison of Postnatal Development of the Female Reproductive System. **Birth Defects Research**, [S. l.], v. 110, n. 3, p. 163–189, 2018.

LANE, Sydney; PARKS, Jason; RUSS, Jennifer; KHAN, Shaiha; SCHOOLCRAFT, William; YUAN, Ye; KATZ-JAFFE, Mandy. Increased systemic antioxidant power ameliorates the aging-related reduction in oocyte competence in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 23, 2021.

LEAN, SC., DERRICOTT, H., JONES, RL., HEAZELL, AEP. Advanced maternal age and adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**. 2017 Oct 17;12(10):e0186287. doi: 10.1371/journal.pone.0186287. PMID: 29040334; PMCID: PMC5645107.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 147, p. 747-748, 1965.

LU, Jiayin; WANG, Zixu; CAO, Jing; CHEN, Yaoxing; DONG, Yulan. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.

LUSHCHAK, Oleh V.; KUBRAK, Olha I.; LOZINSKY, Olexandr V.; STOREY, Janet M.; STOREY, Kenneth B.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Chromium (III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 93, n. 1, p. 45–52, 2009.

MARÇAL, Tiago de Souza; FERREIRA, Adésio; OLIVEIRA, Wagner Bastos dos Santos; GUILHEN, José Henrique Soler; FERREIRA, Marcia Flores Da Silva. Correlações Genéticas E Análise De Trilha Para Caracteres De Fruto Da Palmeira Juçara. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 692–698, 2015.

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J. and TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, 62(4A): 609-614, 2002.

MATT, D. W.; LEE, J.; SARVER, P. L.; JUDD, H. L.; LU, J. K. Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 478–487, 1986.

METCHNIKOFF, Élie. The prolongation of life: Optimistic studies. **The Knickerbocker Press**, 1907.

MENKEN, Jane; TRUSSEL, James; LARSEN, Ulla. Age and infertility. **Science**. 1986; 233:1389–94.

MORAIS, Carina Almeida; OYAMA, Lila Missae; DE MOURA CONRADO, Ricardo; DE ROSSO, Veridiana Vera; DO NASCIMENTO, Claudia Oller; PISANI, Luciana Pellegrini. Polyphenols-rich fruit in maternal diet modulates inflammatory markers and the gut microbiota and improves colonic expression of ZO-1 in offspring. **Food Research International**, [S. l.], v. 77, p. 186–193, 2015.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 555-557, 1968.

PELCZAR, Michael Joseph et al. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. v. 1. São Paulo: Makron Books, 1997

PICUT, Catherine; DIXON, Darlene; SIMONS, Michelle; STUMP, Donald; PARKER, George; REMICK, Amera. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study

and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. **Toxicologic Pathology**, 2015.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 97, p. 55–74, 2015.

RAHMAN, Irfan; KODE, Aruna; BISWAS, Saibal K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 3159–3165, 2007.

REPETTO, Marisa; REIDES, Claudia; GOMEZ CARRETERO, Maria L.; COSTA, Marta; GRIEMBERG, Gloria; LLESUY, Susana. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 255, n. 2, p. 107–117, 1996.

SAMARGHANDIAN, Saeed et al. Preventive Effect of Carvacrol Against Oxidative Damage in Aged Rat Liver. **International journal for vitamin and nutrition research**. vol. 87,1-2: 59-65, 2017.

SANTAMARINA, Aline Boveto; JAMAR, Giovana; MENNITTI, Laís Vales; DE ROSSO, Veridiana Vera; CESAR, Helena Cassia; OYAMA, Lila Missae; PISANI, Luciana Pellegrini. The use of Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) supplementation for suppression of NF- κ B pathway in the hypothalamus after high-fat diet in Wistar rats. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 1–13, 2018.

SANTAMARINA, Aline Boveto; JAMAR, Giovana; MENNITTI, Laís Vales; RIBEIRO, Daniel Araki; CARDOSO, Caroline Margonato; DE ROSSO, Veridiana Vera; OYAMA, Lila Missae; PISANI, Luciana Pellegrini. Polyphenols-rich fruit (*euterpe edulis* mart.) prevents peripheral inflammatory pathway activation by the short-term high-fat diet. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 1–14, 2019.

SANTOS, Vívian Silva; NARDINI, Viviani; CUNHA, Luís Carlos; BARBOSA, Fernando; DE ALMEIDA TEIXEIRA, Gustavo Henrique. Identification of species of the *Euterpe* genus by rare earth elements using inductively coupled plasma mass spectrometry and linear discriminant analysis. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 153, p. 334–339, 2014.

SANTOS, Shênia Monteiro et al. Production of Probiotic Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) Drink Using *Lactobacillus reuteri* and Microencapsulation via Spray Drying. **Foods**, 2020.

SASAKI, Hiroyuki; HAMATANI, Toshio; KAMIJO, Shintaro; IWAI, Maki; KOBANAWA, Masato; OGAWA, Seiji; MIYADO, Kenji; TANAKA, Mamoru. Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 10, n. November, p. 1–7, 2019.

SCHULZ, Mayara et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis Martius*) during ripening. **Food Research International**, [S. l.], v. 77, p. 125–131, 2015.

SCHULZ, Mayara; DA SILVA CAMPELO BORGES, Graciele; GONZAGA, Luciano Valdemiro; OLIVEIRA COSTA, Ana Carolina; FETT, Roseane. Juçara fruit (*Euterpe edulis Mart.*): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, [S. l.], v. 89, p. 14–26, 2016.

SENTHILKUMAR, M.; AMARESAN, N., SANKARANARAYANAN, A., 2021. **Plant-Microbe Interactions, Springer Protocols Handbooks**. Springer US, New York, NY.

SILVA, Alex Sander Lopes Da; SILVA, Amanda de Jesus; LATIF, Abdon Luiz Ornelas; SANTOS JÚNIOR, Aníbal de Freitas; BENEVIDES, Clícia Maria de Jesus. Uso de metodologias analíticas para determinação de compostos fenólicos em alimentos no Brasil: avanços e fragilidades. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. e1311225193, 2022.

TANISAWA, K., MIKAMI, E., FUKU, N., HONDA, Y., HONDA, S., OHSAWA, I. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. **BMC Genomics**, 2013.

TARÍN, Juan; PÉREZ-ALBALÁ, Sonia; CANO, Antonio. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 385–397, 2002.

TIETZE, Frank. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

TUOHY, Kieran; CONTERNO, Lorenza; GASPEROTTI, Mattia; VIOLA, Roberto. Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols, and/or fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 36, p. 8776–8782, 2012.

VALCARCE, David G.; RIESCO, Marta F.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, Juan M.; ROBLES, Vanesa. Long exposure to a diet supplemented with antioxidant and anti-inflammatory probiotics improves sperm quality and progeny survival in the zebrafish model. **Biomolecules**, [S. l.], v. 9, n. 8, 2019.

VAŠKOVÁ et al. "The Importance of Natural Antioxidants in Female Reproduction. **Antioxidants**. 12, no. 4: 907, 2023.

VIEIRA, G. S.; CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A.; HUBINGER, M. D. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by

ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 196–204, 2013.

WANG, Yang; WU, Yanping; WANG, Yuanyuan; XU, Han; MEI, Xiaoqiang; YU, Dongyou; WANG, Yibing; LI, Weifen. Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, [S. l.], v. 9, n. 5, 2017.

WIEGAND, Heike; BOESCH-SAADATMANDI, Christine; REGOS, Ionela; TREUTTER, Dieter; WOLFFRAM, Siegfried; RIMBACH, Gerald. Effects of quercetin and catechin on hepatic glutathione-s transferase (GST), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and antioxidant enzyme activity levels in rats. **Nutrition and Cancer**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 717–722, 2009.

YOUNIS, Tahira; KHAN, Muhammad; SAJID, Moniba. Protective effects of *Fraxinus xanthoxyloides* (Wall.) leaves against CCl₄ induced hepatic toxicity in rat. **BMC Complementary Alternative Medicine**. 16(1):407. 2016.

ZHENG, Shaoyan; MINGYING, Ma; YANXIA, Chen; MIAOXIA, Li. Effects of Quercetin on Ovarian Function and Regulation of the Ovarian PI3K/Akt/FoxO3a Signalling Pathway and Oxidative Stress in a Rat Model of Cyclophosphamide-induced Premature Ovarian Failure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, p. 240-53, 2022.

ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 33/2022

Londrina, 29 de abril de 2022.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: "EFEITO DA POLPA DA JUÇARA *IN NATURA* E FERMENTADA COM *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI* SOB PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATAS WISTAR EM IDADE REPRODUTIVA AVANÇADA: PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E A FERTILIDADE," protocolo CEUA n° 008.2022 sob a responsabilidade de Karla Bigetti Guergoletto que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em reunião do dia 25/04/2022.

Este projeto tem por objetivo caracterizar a polpa de juçara "*in natura*" e a fermentada com *Limosilactobacillus reuteri* em termos de composição centesimal; determinar a atividade antioxidante *in vitro* da polpa de juçara "*in natura*" e da polpa fermentada com *Limosilactobacillus reuteri*, pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP; analisar os benefícios da suplementação da polpa de juçara *in natura* e da polpa da juçara fermentada com probióticos em ratas Wistar com idade reprodutiva avançada, sob parâmetros reprodutivos (ciclo estral, fertilidade, histologia de útero e ovário e dosagem hormonal), marcadores oxidativos (útero, ovários e aorta), bem como a variação do peso corporal e o consumo alimentar das ratas. **Grau de invasidade: GI1.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/05/22 a 30/07/23
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico/Wistar
N° de animais	66, sendo 51 fêmeas, 15 machos Prole estimada: 240 filhotes
Peso/ Idade	65 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Células da mucosa vaginal, Sangue, Útero, Ovários e Aorta

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.


Prof. Dr.ª Patricia Chimin Perandini
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a) Karla Bigetti Guergoletto
Prof. (a) Dr (a). Responsável pelo projeto
C/C para a Chefia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA)
C/C para a Direção do Centro de Ciências Agrárias/C
C/C para Biotério do CCB