

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - CAMPUS MACAÉ**

**NÚCLEO EM ECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO SOCIO-AMBIENTAL  
DE MACAÉ - NUPEM**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E  
CONSERVAÇÃO**

**MARTA MACIEL DUDUS**

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA CANTAXANTINA SOBRE A PROLE  
DE CAMUNDONGAS CONSUMIDORAS DE TRUTA SALMONADA**

**MACAÉ – RJ  
Março/2017**

**MARTA MACIEL DUDUS**

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA CANTAXANTINA SOBRE A PROLE  
DE CAMUNDONGAS CONSUMIDORAS DE TRUTA SALMONADA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé/NUPEM, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia CalviLenzi de Almeida

Coorientadora : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> . Juliana Tomaz Pacheco Latini

MACAÉ - RJ  
Março/2017

Dudus, Marta Maciel

Efeitos Toxicológicos da Cantaxantina sobre a Prole de  
Camundongas Consumidoras de Truta Salmonada / Marta  
Maciel Dudus. Macaé: UFRJ NUPEM, 2017.

xi, 60f.: il.

Orientadora: Kátia Lenzi Calvi de Almeida

Dissertação (Mestrado) UFRJ / NUPEM / Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação,  
2017.

Referências Bibliográficas: f. 54-58.

1. Cantaxantina. 2. Truta salmonada. I.

Lenzi-Almeida, Kátia Calvi; Latini, Juliana Tomaz Pacheco II.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro. III. Título.

**MARTA MACIEL DUDUS**

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA CANTAXANTINA SOBRE A PROLE  
DE CAMUNDONGAS CONSUMIDORAS DE TRUTA SALMONADA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé/NUPEM, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cintia Monteiro de Barros**

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

---

**Prof. Dr<sup>º</sup>. André Manoel Correia dos Santos**

Universidade Federal Fluminense

---

**Prof. Dr<sup>ª</sup>. Kátia Calvi Lenzi de Almeida**

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Presidente

MACAÉ – RJ  
Março/2017

*Dedico esse trabalho à minha mãe  
pelo valor que sempre deu ao estudo, e pelo exemplo marcante  
de luta, dedicação, superação, fé e alegria de viver.*

## AGRADECIMENTOS

*Minha profunda gratidão:*

*À Deus, meu Pai, por essa realização e por todo o zelo para com a minha vida,*

*À Gérson, Michel e Simone, pela compreensão das horas roubadas e apoio incondicional,*

*À Kátia Calvi Lenzi de Almeida, minha orientadora e agora amiga, pelo estímulo amoroso, dedicação e competência.*

*À Juliana Pacheco Tomaz, Latini, minha co-orientadora por toda a disponibilidade e ajuda marcantes.*

*À Raiane Fonseca, Brenda Cintra, Thayana Musse, Thamyres Campelo, Sabrina Henriquellén e Núbia Grandini, pela fundamental cooperação,*

*À Thélia Maria Santos Soares pela grande generosidade que só uma amiga pode demonstrar na hora da dificuldade,*

*À Adriana Martins Fidalgo, Alessandra Mara Santana e Larissa Neves, pela disposição em ajudar com um trabalho carinhoso e competente,*

*Ao Nupem pela oportunidade e pela recepção e qualidade do seu corpo docente,*

*À UFRJ Campus Macaé e ao IMCT pela disponibilidade dos laboratórios,*

*À todas e todos os colegas e coordenadores do HPM pelo suporte e compreensão durante esses dois anos.*

*Sem vocês, eu não teria conseguido!*

## Resumo

O comércio de salmonídeos no mercado mundial tem apresentado um crescimento acentuado na última década, mas a grande maioria dos produtos oferecidos como salmão nos supermercados tem sido de trutas ou salmão criados em cativeiro, onde a cor adquirida pela sua carne provém de corantes como a cantaxantina. O objetivo principal foi avaliar os efeitos toxicológicos da cantaxantina em camundongos. Foram formados quatro grupos: 1- Grupo Caseína (GC) recebendo dieta padrão como controle, 2- Grupo Cantaxantina (GCX) recebendo a ração padrão acrescida de 0,6% de cantaxantina, 3- Grupo Truta Salmonada (GTS) recebendo ração à base desse peixe, e 4- Grupo Salmão Selvagem (GSS), alimentado com ração à base de salmão selvagem. As mães dos camundongos alvo do estudo foram alimentadas durante a gestação e amamentação com as mesmas dietas que sua prole. Após o desmame os animais receberam as rações citadas e foram eutanasiados em dois períodos distintos - 40 e 70 dias de vida. Foi realizado estudo macro e microscópico dos fígados, rins e globos oculares dos mesmos. Os resultados mostraram que houve sinais de toxicidade em fígado e rins nos grupos GCX e GTS, com esteatose, necrose de células hepatocitárias, perda de limites celulares, vasos congestos e hemossiderina. Os rins dos animais dos mesmos grupos apresentaram glomérulos tumefeitos, túbulos com necrose epitelial, perda dos limites celulares e vasos congestos. Esses resultados nos permitem perceber que ainda são necessários outros estudos para melhor avaliar a toxicidade da cantaxantina, bem como a segurança do consumidor dos alimentos que a contém.

**Palavras-chaves:** Corantes carotenóides. Toxicologia. Aditivos alimentares.

## ***ABSTRACT***

The salmon trade on the world market has shown a marked increase in the last decade, but the products great majority offered as salmon in the supermarkets has been trouts or salmon raised in captivity, where the color acquired by its meat comes from dyes such as canthaxanthin . The main objective was to evaluate the toxicological effects of canthaxanthin in mice. Four groups were formed: 1 - Casein Group (GC) receiving standard diet as a control, 2 - Canthaxanthin Group (GCX) receiving standard ration plus 0.6% canthaxanthin, 3 - Salmon Trout Group (GTS) receiving diet of this fish, and 4- Wild Salmon Group (GSS) fed with wild salmon. Study mice mothers were fed during gestation and breastfeeding with the same diets as their offspring. After weaning, the animals received the above-mentioned diets and were euthanized at two different periods - 40 and 70 days of age. A macro and microscopic study of livers, kidneys and ocular globes was made. The results showed that there were signs of liver and kidney toxicity in the GCX and GTS groups, with steatosis, hepatocyte cell necrosis, loss of cell boundaries, congestive vessels and hemosiderin. Animals kidneys from the same groups showed swollen glomeruli, tubular epithelial necrosis, cell borders loss and congestive vessels. These results allow us to understand that further studies are needed to better evaluate the canthaxanthin toxicity as well as the consumer foods safety containing it.

**Keywords:** Carotenoid dyes, Toxicology, Food additives.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIN** - American Institute of Nutrition

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**CCG** - Camada de Células Ganglionares

**CNE** - Camada Nuclear Externa

**CNI** - Camada Nuclear Interna

**CNS** - Conselho Nacional de Saúde

**CODEX** - Comitê *Alimentarius*

**CPE** - Camada Plexiforme Externa

**CPI** - Camada Plexiforme Interna

**DDA** - Dose Diária Admissível

**DHA** - ácido docosahexaenóico

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**EFSA** - European Food Safety Authority

**ELM** - Eukaryotic Linear Motif

**EPA** - ácido eicosapentaenóico

**FAO** - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

**FDA** - Food and Drug Administration

**GC** - Grupo Caseína (controle)

**GCX** - Grupo Cantaxantina

**GSS** - Grupo Salmão Selvagem

**GTS** - Grupo Truta Salmonada

**IMCT** - Instituto Macaé de Ciência e Tecnologia

**INH** - *Instituto* Nacional de Saúde (dos Estados Unidos)

**IR** - Instrução Normativa

**JEFCA** - Expert Committee on Food Additives

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e de Abastecimento

**MS** - Ministério da Saúde

**NCBI** - National Center of Biotechnology Information

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**RBP II** - Proteína Celular Ligadora de Retinol

*SCF* - *Scientific Committee for Food*

**SEF** - Segmento Externo dos Fotorreceptores

**SLiMs** - *Motifs* Lineares Curtos

**SVS** - Secretaria de Vigilância Sanitária

**UFRJ** - Universidade Federal do Rio de Janeiro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura Química da Cantaxantina	14
Figura 2 - Cantaxantina Sintética	15
Figura 3 - Salmão Selvagem ( <i>Oncorhynchus keta</i> )	19
Figura 4 - Embalagem contendo informação a respeito do cultivo e coloração do pescado	20
Figura 5 - Retinopatia por Cantaxantina	22
Figura 6 – Summary for sequence unknown	31
Figura 7 – Peso corporal dos animais aos 40 e 70 dias de vida (P40 e P70)	33
Figura 8 – Peso dos cérebros dos animais aos 40 e 70 dias de vida (P40 e P70)	34
Figura 9 - Peso dos fígados dos animais aos 40 e 70 dias de vida (P40 e P70)	35
Figura 10 – Pesos dos rins dos animais aos 40 e 70 dias de vida (P40 e P70)	36
Figura 11 - Macroscopia dos órgãos dos animais aos 40 dias de vida (P40)	38
Figura 12 – Macroscopia dos órgãos dos animais aos 70 dias de vida (P70)	39
Figura 13 – Microscopia dos órgãos dos animais aos 40 dias de vida (P40)	42
Figura 14 – Microscopia dos órgãos dos animais aos 70 dias de vida (P70)	43
Figura 15 – Comparação de <i>mfifs</i> relacionados a proteína RBP II	44
Figura 16 – Presença dos SLiMs por organismo	45



## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b>	I
<b>Lista de Figuras</b>	II
<b>Lista de gráficos</b>	III
<b>Resumo</b>	IV
<b>Abstract</b>	V
<b>1. Introdução</b>	13
<b>2. Referencial Teórico</b>	14
2.1 Cantaxantina	14
2.2 Ácidos graxos ômega-3	16
2.3 Salmão e Truta Salmonada	18
2.4 Patologias associadas ao efeito toxicológico da cantaxantina	20
2.5 Contextualização interdisciplinar	24
<b>3. Objetivos</b>	24
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
<b>4. Metodologia</b>	25
4.1 Material	25
4.1.1 Rações experimentais	25
4.1.2 Animais	26
4.2 Métodos	27
4.2.1 Delineamento experimental	27
4.2.2 Peso corporal	28
4.2.3 Peso de órgãos	28
4.2.4 Análise macroscópica	29
4.2.5 Análise Microscópica	29
4.2.6 Genética química	29
4.2.7 Análise estatística	32
<b>5. Resultados</b>	33
5.1 Dados referentes aos animais com 40 e 70 dias de vida	33
5.1.1 Peso corporal	33
5.1.2 Peso de órgãos	33
5.1.2.1 Peso cerebral	33
5.1.2.2 Peso de fígado	34
5.1.2.3 Peso de rim direito e esquerdo	35
5.1.3 Análise Macroscópica	36
5.1.4 Análise Microscópica	40
5.1.5 Genética química	44
<b>6. Discussão</b>	46
<b>7. Conclusão</b>	52
<b>8. Referências bibliográficas</b>	53
<b>9. Anexo</b>	59

## 1. Introdução

Durante muito tempo a produção e fabricação dos alimentos eram realizadas na mesma região ou em regiões próximas às de comercialização. Com a necessidade de acessar regiões mais distantes na ampliação do comércio, foi necessário se criar estratégias para manter a qualidade e integridade dos alimentos por longo tempo. Dentre estas estratégias encontra-se a utilização de aditivos alimentares como forma de melhorar a armazenagem, aumentar a vida de prateleira dos alimentos (ANTUNES et al., 2000), torná-lo mais atraente visualmente e também de baratear a produção. Segundo a PORTARIA Nº 540 - SVS/MS, de 27 de Outubro de 1997 chama-se de aditivo químico:

“qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas e sensoriais durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento.“

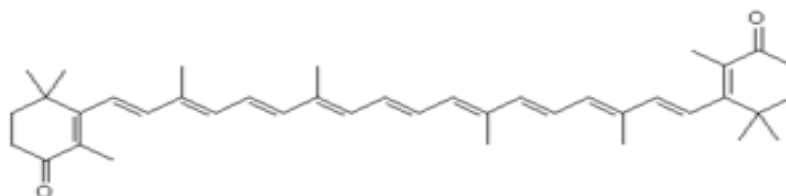
Dentre os tipos de aditivos ressalta-se a cantaxantina, que na última década vem sendo largamente utilizada na indústria do pescado para a coloração da carne do peixe, buscando a similaridade com a carne do salmão (SUJAK, 2005). O salmão normalmente era considerado um peixe raro de se achar e caro, no entanto, nos últimos anos, tanto no Brasil como no exterior, encontramos com muita facilidade ofertas de pescado intitulado de salmão pelos comerciantes. Ocorre que com o crescimento da indústria de pesca de cativeiro e com o avanço contemporâneo da divulgação da importância do ômega 3 através dos meios de comunicação, e em se sabendo que o salmão é naturalmente rico em ômega 3, houve a expansão dos criadouros de peixes, não necessariamente salmão, sendo alimentados com ração acrescida da cantaxantina. (FUJIWARA, 2015)

Os peixes normalmente criados na maioria dos cativeiros dessa forma são trutas, que pertencem à mesma família do salmão, e portanto semelhantes ao salmão em sabor e textura. Hoje, este é um mercado em franca expansão e a população de modo geral recebeu muito bem esse produto. Levanta-se, então a questão sobre o grande consumo da cantaxantina, e também do consumo de um peixe que leva o nome de salmão no comércio, mas não tem a riqueza de ômega 3 do salmão, mas ao contrário, rica em gorduras saturadas da ração oferecida. Poucos trabalhos existem, na literatura científica, a respeito do potencial toxicológico da cantaxantina, e esse trabalho então, está buscando ampliar um pouco mais desse conhecimento.

## 2. Referencial Teórico

### 2.1 – Cantaxantina

A cantaxantina é um carotenóide polar pertencente à classe das xantofilas, cuja fórmula é  $C_{40}H_{52}O_2$  (Figura 1), e tem peso molecular de 564,84 (ACOFARMA). O nome carotenóides é derivado do nome científico da cenoura - *Daucus carote*, reconhecido por Wackenroder em 1831 como a primeira fonte de caroteno (MORAIS, 2006; *Apud* GOODWIN, 1952). Isso remete à cor desse pigmento, que tem suas variações possíveis entre o amarelo e o vermelho.



**Figura 1.** Estrutura química da cantaxantina Fonte: Ogawa, 2007.

Como pigmento, é naturalmente extraído de algas (como a *Dictyococcus cinnabarinus*), por cianobactérias (*Anabaena variabilis*, *Aphanizomenon flos-aqua* e *Nostoc commune*), e por bactérias (*Mycobacterium breviciae* e *Rhodococcus maris*), e quando é produzida de forma sintética (Figura 2) através de procedimentos químicos, utiliza-se a nomenclatura "corante" (VALDUGA, 2009). Fornece uma coloração que vai do amarelo ao vermelho. É um pigmento lipossolúvel (GOODWIN, 1986) que possui grande propriedade antioxidante, tendo sido relatada como sendo um dos mais potentes, inclusive mais que o beta-caroteno (TERAO, 1989).



**Figura 2** - Cantaxantina sintética.

Fonte: <http://canario-mestre.blogspot.com.br>

Essa propriedade deve-se à alta capacidade de sequestrar radicais livres e desativar espécies reativas de oxigênio. Tem sido demonstrada sua capacidade de alteração da membrana lipídica (SUJAK *et al*, 2005), protegendo-a, e evitando assim, seu envelhecimento e morte. Esse grande efeito protetor da cantaxantina pode ser observado sob várias condições de estresse (SURAI, 2012).

É esse papel que confere proteção aos alimentos, prevenindo a oxidação de matérias primas alimentares e, conseqüentemente, estendendo sua vida de prateleira (DECKER *et al*, 2005; EDGE *et al*, 1997).

Como corante alimentar, a cantaxantina é muito utilizada em rações para pescados de cativeiro, em aves de pequeno porte, em criadouros de galinhas e para produção de ovos. Aumenta a coloração amarelo/alaranjada da pele e gorduras dessas aves e da gema de seus ovos.

Apesar da atividade antioxidante, o uso da cantaxantina mostrou riscos para a saúde humana e animal. Em um estudo realizado por Shih *et al*. (2008), *in vivo*, constatou-se que a capacidade antioxidante da cantaxantina foi mais potente no plasma do que no fígado, embora sua concentração se apresentasse maior no fígado, o que demonstra haver uma relação inversamente proporcional entre a capacidade antioxidante e a concentração (SHIH *et al*, 2008).

Segundo Gradelet (1996), a interação que ocorre entre a cantaxantina e alguns fármacos, dá-lhe capacidade de alterar, diminuindo ou aumentando, a atividade de várias enzimas que metabolizam esse fármaco.

Em humanos, o efeito tóxico mais comum é o desenvolvimento de retinopatia, e mais raramente, também da anemia aplásica, causadas pelo uso de bronzeadores orais contendo cantaxantina. No uso animal há relato de danos ao fígado de ratos (LOBER, 1985; ROUSSEAU, 1983; BLUHM *et al*, 1990).



A regulamentação dos produtos alimentícios é feita por organizações internacionais que garantem a segurança e inocuidade desses produtos. Os principais órgãos de regulamentação são: O Comitê *Alimentarius* CODEX (CODEX), criado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - da Organização Mundial de Saúde (FAO - OMS) em 1963, e o Expert Committee on Food Additives (JECFA), que é um comitê misto com a FAO/OMS, especializado na avaliação de risco associado ao consumo de aditivos alimentares, contaminantes e toxinas de ocorrência natural, criado em 1956. Mais de 187 países têm representação no JECFA, inclusive o Brasil.

Em nosso país, a regulação referente a aditivos alimentares intencionais foi publicada pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) Ministério da Saúde através da Resolução CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988. A cantaxantina tem aprovação para uso como corante natural e artificial, porém o documento não traz nenhuma referência à dose limite permitida. Suas determinações a respeito são fundamentadas e apoiadas em referências internacionais, como o Codex *Alimentarius*, Comitê da União Européia e complementada pelo Food and Drug Administration (FDA). (ALMEIDA, 2015).

Com base em estudos toxicológicos, o JECFA estabelece a Dose Diária Admissível (DDA) dos aditivos como:

" a quantidade estimada do aditivo alimentar, expressa em mg/quilo de peso corporal, que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida sem oferecer risco apreciável à saúde, à luz do conhecimento científico disponível na época da avaliação." (ANVISA, 2009)

Periodicamente, ou quando um fato novo justifica, estes dados são revistos.

Atualmente a DDA de cantaxantina admitida para ingestão humana é de 0,03 mg/kg de peso/dia, e a dose permitida na ração dos salmonídeos é de até 80 mg/kg. Após a metabolização, a carne do pescado deve conter, no máximo, 25 mg/kg. (EFSA Journal, 2010).

## 2.2 – Ácidos Graxos Ômega 3

Ômega 3 são um conjunto de ácidos graxos poliinsaturados, dos quais os mais importantes são o EPA (ácido eicosapentaenóico) e o DHA (ácido docosahexaenóico).

Suas principais fontes são os peixes, a linhaça, e atualmente a chia. Como não o produzimos, é necessário que o busquemos na alimentação ou através de suplementação. Eles podem ser úteis na prevenção de diferentes patologias, tais como doenças cardiovasculares, psiquiátricas, neurológicas e dermatológicas (MAZZA, 2007). Também tem papel importante no câncer e na formação e desenvolvimento fetal.

Nos casos de câncer, estudos mostram que eles podem inibir a carcinogênese, retardar o crescimento de tumores e otimizar a ação da radioterapia e de várias drogas quimioterápicas. Além disso ele pode ter importante papel na caquexia induzida pelo câncer (CARMO E CORREA, 2009). Na vida intra-uterina e nos primeiros meses de vida, atuam na formação dos neurônios, da retina, da função imune, e na diminuição de processos alérgicos no futuro. Grandes quantidades de DHA são acumuladas na substância cinzenta cerebral e nos elementos visuais da retina durante o desenvolvimento, e se estiver em quantidade insuficiente nestes tecidos poderá resultar em diminuição do desenvolvimento visual e psicomotor.

A dieta materna antes da gravidez é de grande importância, uma vez que ela determina o tipo de ácido graxo que se acumulará no tecido fetal. O transporte é realizado através da placenta e são depositados no cérebro e retina do feto. Além disso, ocorre um acúmulo simultâneo nas glândulas mamárias durante essa fase, o que garantirá a manutenção da oferta nos primeiros dias de vida através do leite materno. A nutriz necessita manter uma alimentação rica em ômega 3 após o parto para suprir as necessidades do bebê, principalmente nos primeiros vinte e quatro meses de vida, que é o período onde ocorre o maior e mais rápido desenvolvimento cerebral, do nascimento à velhice. O leite materno apresenta três vezes mais DHA e EPA que o leite de vaca, sendo este último insuficiente para atender às necessidades do lactente (VALENZUELA e NIETO, 2003).

Alguns autores também sugerem o uso de ômega 3 durante a gestação de mulheres com partos prematuros prévios, com o objetivo de evitar a repetição da prematuridade (SWANSON, 2012; LARQUÉ, 2012).

Essas ações positivas para a saúde humana, têm-se difundido na mídia geral e especializada, levando à busca por produtos ricos em ômega 3. Em todos os seus papéis contributivos, considero o de maior importância aquele que se refere à criança. Os obstetras sabem dessa importância, por isso há, para as gestantes durante o pré-natal, a orientação para seu consumo através dos alimentos. Os peixes gordos como o salmão e também a sardinha são um dos mais ricos em ômega 3.

A busca por esses alimentos tem mantido a demanda alta, favorecendo o crescimento da aquicultura, e tem impactado significativamente os mercados globais de salmão e truta salmonada, com diminuição substancial dos preços. Podemos imaginar o efeito negativo que esse consumo pode desencadear, sobretudo na gestante e em seu bebê; iludida pela fraude, pensa estar consumindo uma dieta rica em ômega 3, no entanto recebe pouco deste nutriente e muita gordura saturada que agride a saúde, além de corante que pode trazer efeitos tóxicos (ROPKE, 1988).

### 2.3 – Salmão e Truta Salmonada

Salmão e truta são de diferentes espécies, porém pertencem à mesma família - *Salmonidae* - possuindo portanto, características morfológicas e sensoriais semelhantes (VALLANDRO, 2010).

Há salmão produzido em cativeiro, mas que também recebem corante. Estão fora de seu ambiente natural onde a alimentação é feita através de crustáceos, de onde vem sua fonte de coloração. Mas o que tem chegado mais frequentemente ao consumidor é a truta.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e de Abastecimento (MAPA) nos mercados, os peixes da família *Salmonidae* que são considerados de fato salmão, são os das espécies: *Oncorhynchus nerka* (Salmão vermelho), *Oncorhynchus shawytsch* (Salmão-Rei), *Salmo salar* (Salmão do Atlântico), *Oncorhynchus gorbuscha* (Salmão pink), *Oncorhynchus keta* (Salmão cão) (Figura 3) e *Oncorhynchus kisutch* (Salmão prateada). A truta normalmente criada em fazendas e que se confunde com salmão é o *Oncorhynchus mykiss* (Truta Arco-Íris).

A então chamada truta salmonada é obtida a partir da adição do corante cantaxantina e/ou astaxantina em sua ração para que se consiga uma coloração mais alaranjada na carne, que acaba por se assemelhar com o salmão (BUCK, 2010; VALLANDRO, 2010). Ela apresenta um custo de produção menor, o que pode ser extremamente conveniente aos produtores e comerciantes (DA SILVA *et al*, 2012), mas o consumidor, ao comprar a truta salmonada pensando ser salmão, é fraudado nutricionalmente.

Uma pesquisa feita com consumidores a respeito das características do salmão mostraram que a qualidade foi o atributo mais importante, seguido de estado (fresco ou

congelado), cor da carne e preço. A fonte de produção (selvagem ou cultivado) era o atributo menos importante e a espécie e a forma do produto eram de importância intermediária (SYLVIA, 1996).



**Figura 3** – Salmão Selvagem  
(*Oncorhynchus keta*)

Isso certamente se deve ao fato do consumidor não possuir informação a respeito dos aditivos usados nos criadouros e as consequências desse fato. Apenas muito recentemente temos observado que alguns desses produtos têm acrescentado na sua embalagem a informação: "Peixe de cultivo. Coloração resultante de uso de corante utilizado na ração". (Figura 4).

A Instrução Normativa (IR) nº 29 do Ministério da Agricultura, Pecuária e de Abastecimento (MAPA) de 23 de setembro de 2015, instituiu a obrigatoriedade de os rótulos de pescados conterem o nome popular além do nome científico de cada tipo de pescado.



**Figura 4** – Embalagem contendo informação a respeito do cultivo e coloração do pescado. Fonte: Comércio local.

Essa IR foi baseada na Operação Poseidon, realizada pelo MAPA e pela Polícia Federal em 2014 em Santa Catarina, e lançou, em março de 2015 o Programa de Controle Oficial da Fraude por Substituição de Espécie em Pescado. Em novembro de 2014 foi realizado em Belo Horizonte o evento intitulado "Cenário da Fraude em Pescado no Brasil. Histórico e Perspectivas. O caso do município de Florianópolis", onde apresentaram os resultados da ação "DNA do Pescado" realizada em Florianópolis em 2014. Concluiu-se que a realização do DNA é a única forma de se obter, de forma segura e com efeito de prova, a comprovação da fraude no pescado.

## 2.4 - Patologias associadas ao efeito toxicológico da cantaxantina

Segundo Gautam (2015), o uso de corantes artificiais sobre os naturais aumentou no mundo moderno. Ele citou um dos estudos sobre toxicidade de corantes desenvolvido em 1996, que mostrou um crescimento anual da ordem de 5 a 10% no uso de corantes industriais. Atualmente, a cantaxantina usada no cultivo de pescado é praticamente toda de produção artificial (DUTRA, 2015). Sabemos que ela é lipossolúvel e de baixo peso molecular, e também segundo Gautam (2015), os corantes menos solúveis em água ficam em contato com o nosso organismo por um período mais longo e isso resultaria em efeitos negativos para o nosso corpo a longo prazo. Também relaciona o tamanho molecular dos corantes como significativo na toxico-cinética. Quanto maior o tamanho molecular, menor a capacidade de absorção e toxicidade, enquanto o contrário também é verdadeiro para o menor.

Efeitos toxicológicos são:

"efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposição. É geralmente proporcional à concentração do agente tóxico." (BRASIL 2010)

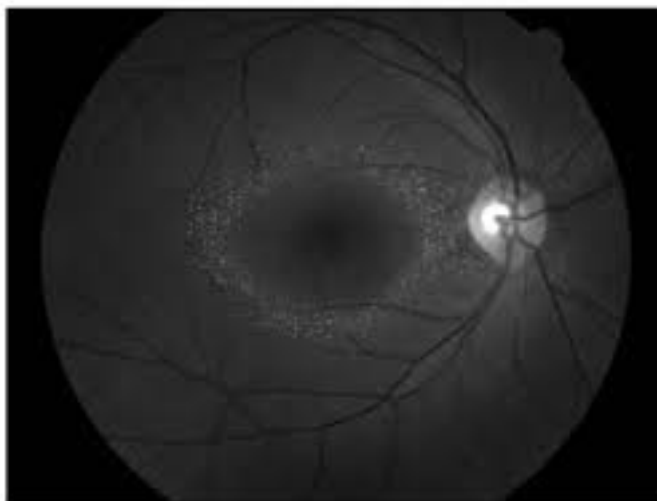
A maioria dos estudos sobre os efeitos da toxicidade da cantaxantina em seres humanos são referentes ao uso deste corante em autobronzeadores causando retinopatia. (Figura 5). Nesses casos a dose ingerida era de 100 a 150 mg por dia (LONN, 1987). A retinopatia está associada à deposição de cristais formados a partir de um complexo cantaxantina-lipoproteína na mácula lútea do olho (DAICKER *et al*, 1987). Existem evidências de que alguns tecidos são especializados nos processos de absorção de carotenóides, como observado na retina e na glândula pineal, onde foram encontrados carotenóides. A mácula do olho naturalmente tem concentrações de luteína e zeaxantina (LIMA, 2012). Com a ingestão de doses altas de cantaxantina, e por pertencer à mesma classe dos carotenóides acima, a mácula a retém com facilidade. Ela também está relacionada com danos aos vasos sanguíneos em torno do local, além de crescimento de vasos anormais (DAICKER *et al*, 1987; HARNOIS *et al*, 1989).

Os efeitos clínicos da retinopatia tóxica incluem visão borrada, transtorno do senso cromático, desvios na adaptação à luz ou ao escuro, perda visual progressiva e

alterações do campo visual. Atualmente o produto é proscrito, porém ainda está disponível para compra, sem receita, pela internet (GARONE, 2015). A diferença mais marcante entre a cantaxantina e outros pigmentos maculares é que os efeitos de cantaxantina a um nível molecular são observados com concentração muito baixa deste pigmento em relação aos demais, tão baixo como 0,05% molar (ESATBEYOGLU, 2016).

Além da retinopatia, o uso da cantaxantina como autobronzeador também tem sido associado à anemia aplásica e danos ao fígado, embora com poucos dados na literatura (LOBER, 1985; ROUSSEAU, 1983; BLUHM *et al*, 1990). Um caso fatal de anemia aplásica foi relatado associado a ingestão de cantaxantina, presente em cápsulas de bronzeamento, onde o efeito bronzeador é conseguido através da deposição de carotenóide na derme e tecido subcutâneo. Porém a toxicidade da cantaxantina associado a anemia aplásica ainda é desconhecida. (BEAULIEU, 2013; BLUHM, 1990). Shih, (2008) relatou alterações no fígado, como aumento de glutathione redutase e superóxido dismutase, enzimas hepáticas.

Nas aves de pequeno porte, como canários, tem-se descrito lesão hepática grave, porém com pouquíssimos relatos.



**Figura 5** - Retinopatia por cantaxantina.  
Fonte: <http://oftalmologos.org>

Sujak (2009) relacionou a toxicidade da cantaxantina com as interações moleculares que poderiam ocorrer entre a cantaxantina e as moléculas lipídicas. Dentre os mecanismos propostos por ele, a formação de ligações de hidrogênio entre grupos da

cantaxantina e dos lipídeos bem como entre a cadeia polieno do carotenóide e a água, sejam cruciais para a formação dos agregados. Os carotenóides possuem mecanismos de digestão e absorção semelhante aos lipídios. Na digestão ocorre a sua emulsificação, seguida de hidrólise pelas lipases salivar e gástrica, e incorporados em micelas mistas constituídas de ácidos biliares. Essas micelas transportam os carotenóides para o enterócito de forma passiva, pela solubilização na camada lipídica da membrana do enterócito. Os carotenóides não precursores de vitamina A, como a cantaxantina, saem dos enterócitos carregados por quilomícrons que, pela ação da enzima lipase lipoprotéica, vão sendo retirados e absorvidos de forma passiva por vários tecidos, como as adrenais, rins, tecido adiposo, etc. e em seguida se liga à Proteína de Ligação de Retinol (RBP) plasmática para passar ao plasma ou é captado pela Proteína de Ligação Celular de Retinol (RBP II) citoplasmática e levado aos sítios de estocagem (LIMA, 2012).

A incorporação nos tecidos pode variar conforme a classe de carotenóides a que pertencem. A zeaxantina e a luteína encontram-se em concentrações maiores no tecido adiposo, ovário e pigmento macular. Nesse último caso são componentes comuns e fundamentais ao bom funcionamento da visão. Fica claro, pela semelhança, que a cantaxantina também tem afinidade com a mácula retiniana, o que explica a sua deposição formando os cristais (LIMA, 2012).

A literatura aborda muito pouco o modo de ação da cantaxantina a partir desse ponto. Mas, baseados em dados de alguns trabalhos, podemos supor, por semelhança, como seria sua ação.

Segundo Oliveira (2006), analisando a nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos, o ponto inicial da nefrotoxicidade é a ligação da substância tóxica com o túbulo proximal. Parece existir receptores específicos nesse tecido, onde ocorre endocitose (da mesma maneira como ocorre com a absorção de aminoácidos e pequenos peptídeos). A ligação na membrana tubular ocorre com a megalina, um receptor endocitótico expressado na membrana do epitélio tubular. Ela é responsável pela reabsorção do filtrado glomerular, e também se liga a proteínas de baixo peso molecular.

Após essa ligação, o complexo megalina-aminoglicosídeo é transportado para dentro da célula e se une ao lisossomo onde se ligará a estruturas lá existentes, causando a progressiva deposição de lipídeos polares, formando o corpo mielóide. Ao mesmo tempo ocorrem várias outras alterações em organelas (como mitocôndrias e ribossomos) e enzimas. Ele observa que a formação de corpos mielóides não é exclusiva dos aminoglicosídeos, ocorrendo também com outras substâncias catiônicas.



A RBP II, assim como a megalina, é um receptor que também se liga a substâncias de baixo peso molecular, e sabemos que é ela que transporta a cantaxantina, que tem baixo peso molecular (564,84u segundo a Acofarma). No caso dos aminoglicosídeos, é a partir daí que começam as reações lesivas à célula. Então nos perguntamos se com a cantaxantina o mecanismo seria o mesmo, ou ao menos semelhante.

## **2.5 – Contextualização Interdisciplinar**

Hoje, qualquer tipo de mercadoria pode ser produzido em um determinado país e ser comercializado em todo o mundo, e quando acontece com espécies animais, que são adaptados em criadouros fora de sua área natural, pode gerar modificações genéticas, biológicas, bioquímicas e ambientais, além de poderem gerar fraudes nas leis que determinam controle alimentar em cada país. Nesse sentido, precisamos considerar de muita importância os estudos que podem incluir participação de várias áreas, porque cada vez mais os temas se inter-relacionam. Naturalmente estes estudos inter e transdisciplinares permitem a troca de informações que enriquece o conteúdo e o entendimento que o tema traz para cada área envolvida.

O grande espectro de questões que esse estudo traz, vai deixando clara a possível interação entre diversas áreas. Começando pela motivação econômica das empresas em ampliar seus mercados e lucros e às possíveis fraudes que atinjam o consumidor, inicia-se um processo que inclui ação na área da economia e das legislações.

As implicações biológicas e ambientais podem ser amplas no que diz respeito a alteração genotípica e fenotípica de um animal, culminando num extenso leque de efeitos negativos ao meio ambiente. Um trabalho feito com salmões que escaparam de gaiolas marinhas para o Rio Glenarm, na Irlanda do Norte em 1990, mostrou impacto genético significativo na população de salmão selvagem (CROUZIER, 1993).

Deve ser de interesse da farmácia e da química quanto à pesquisa que envolve a cantaxantina, considerando seu uso cada vez maior nos mercados e estudos ainda pouco expressivos sobre sua toxicidade. Da nutrição, quanto aos riscos dos aditivos contidos nos alimentos industrializados e à composição nutricional real desses alimentos.

Dentro da área da medicina, é preciso mensurar os efeitos que elementos acrescentados artificialmente aos alimentos podem trazer à saúde, e nesse caso em

especial, desenvolver a educação com orientação mais adequada de como essa substância deverá ser consumida, sem agregar riscos. (GREENBER at al, 2008).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Geral**

Avaliar os aspectos toxicológicos da cantaxantina utilizada no processamento tecnológico de trutas salmonadas sobre os rins, fígado e sistema visual da prole de camundongos alimentadas com estas trutas.

#### **3.2 Específicos**

- 1) Identificar o modo de ação da cantaxantina nos organismos envolvidos no estudo;
- 2) Verificar o peso corporal da prole aos 40 e 70 dias de vida;
- 3) Mensurar os pesos dos rins, fígado e cérebro da prole aos 40 e 70 dias de vida;
- 4) Realizar avaliação macroscópica dos rins, fígado e globos oculares da prole aos 40 e 70 dias de vida;
- 5) Realizar avaliação anatomopatológica e histopatológica dos rins, fígado e retina da prole aos 40 e 70 dias de vida;
- 6) Comparar os dados dos grupos experimentais, caracterizando assim os efeitos da cantaxantina.

### **4. Metodologia**

O projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFRJ/Campus Macaé, e aprovado sob o protocolo MAC034. (Anexo)

#### **4.1 Material**

##### **4.1.1- Rações Experimentais**

As amostras de truta salmonada, salmão selvagem e cantaxantina foram obtidas em comércio local, de modo que pudesse ser assegurada sua inocuidade. As rações foram

formuladas através da mistura dos ingredientes com água até obtenção de massa com textura homogênea. Essa massa foi peletizada, levada à estufa e seca por 24h. Em seguida foi ensacada, lacrada e armazenada em geladeira (4°C). Em todas as rações foram adicionadas misturas de minerais e de vitaminas, seguindo recomendações da American Institute of Nutrition (AIN 93G) (REEVES, 1993) (Tabela 1).

#### 4.1.2 – Animais

No ensaio biológico, foram utilizados inicialmente 30 camundongos swiss (*Mus musculus*), sendo 24 fêmeas e 6 machos, provenientes da colônia do Instituto Macaé de Ciência E Tecnologia- Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMCT/UFRJ), que foram acasalados poligamicamente na proporção 1 macho / 4 fêmeas. As fêmeas prenhas foram separadas em quatro grupos diferentes quanto à composição da ração consumida: Grupo Controle (GC) composto por caseína, Grupo Cantaxantina (GCX), Grupo Truta Salmonada (GTS) e Grupo Salmão Selvagem (GSS).

A prole destes animais deu origem aos grupos experimentais propriamente ditos, descritos no delineamento a seguir.

Tabela 1. Ingredientes adicionados para o preparo das rações (g/100g).

<b>Grupos/ Ingredientes</b>	<b>GC</b>	<b>GTS</b>	<b>GCX</b>	<b>GSS</b>
Caseína	10,87	6,35	18,92	6,35
Truta Salmonada	-	21,70	-	-
Salmão Selvagem	-	-	-	21,70
Cantaxantina	-	-	0,6	-
Amido	62,08	50,11	53,42	50,11
Açúcar	10,00	10,00	10,00	10,00
Mistura de minerais	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura de vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00
Óleo	7,00	1,79	7,00	1,79
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00
B-colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Cistina	0,30	0,30	0,30	0,30
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

GC: ração à base de caseína; GCX: ração à base de caseína+cantaxantina;

GTS: ração à base de truta salmonada; GSS: ração à base de salmão selvagem

## 4.2 Métodos

### 4.2.1. Delineamento experimental

Durante o período de amamentação, as mães continuaram se alimentando com a dieta específica do grupo ao qual faziam parte. Posteriormente ao desmame, aos 21 dias, os animais foram divididos nos quatro grupos aos quais suas mães pertenciam: Grupo Caseína (Controle) (GC) - animais alimentados com ração à base de caseína, recebendo água *ad libitum*; Grupo Caseína + Cantaxantina (GCX) - animais alimentados com ração à base de caseína, recebendo adição de 0,6% de suplemento de cantaxantina e água *ad libitum*, Grupo Truta Salmonada (GTS) - animais alimentados com ração à base de truta salmonada e recebendo água *ad libitum*, e Grupo Salmão Selvagem (GSS) - animais alimentados com ração à base de salmão selvagem e recebendo água *ad libitum*.

Durante o ensaio biológico os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em ambiente com temperatura constante ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação controlada (ciclo claro e escuro de 12 em 12 horas) até o momento da eutanásia, que aconteceu em períodos de tempo distintos.

Ao completarem quarenta dias, metade dos filhotes de cada mãe de cada grupo foi sacrificada para coleta de amostras; a outra metade foi sacrificada com setenta dias de vida para nova coleta de amostras.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação animal (Publicação NIH nº.85 23, revisado em 1996) e as recomendações nacionais impostas pela Lei Arouca (11.794/2008).

#### 4.2.2 - Peso Corporal

Para que o animal se mantivesse limitado na balança no lugar específico de pesagem foi usado um recipiente plástico de policarbonato medindo aproximadamente 15cm de largura, por 15cm de comprimento e 15cm de altura. Antes de iniciar a pesagem dos animais, foi aferido o peso do recipiente em balança de precisão (Marte-AD 2000, carga máxima 210g; sensibilidade 0,01g), para que seu valor fosse subtraído do peso total de cada animal. Um animal de cada vez foi retirado de sua gaiola, colocado no recipiente, conduzido até a balança, seus valores foram anotados e os animais retornaram para suas gaiolas.

Para obtenção dos valores finais dos pesos dos animais, antes das eutanásias, o mesmo procedimento utilizado na pesagem inicial foi aplicado. Os valores obtidos na pesagem inicial, nas periódicas, bem como na final, foram encaminhados para a análise estatística.

#### 4.2.3 - Peso dos Órgãos

Após a eutanásia, foi feita a tricotomia do ventre com lâmina cirúrgica e descontaminação da pele com álcool 70%. Com auxílio de uma tesoura cirúrgica foi feita uma incisão vertical para coleta de fígados e rins. A cabeça foi separada do corpo com o auxílio de uma tesoura, e a partir daí foram retirados cérebro, globos oculares e nervos ópticos. Os órgãos foram colocados em placa de Petri estéril e com o auxílio de uma pipeta Pasteur foram lavados com solução salina estéril (0,9% NaCl) para retirada de qualquer resíduo de sangue.

Para pesagem dos órgãos, uma nova placa de Petri estéril foi utilizada, porém antes de dar início à pesagem dos órgãos foi aferido o peso da placa em balança de precisão (Sartorius-BP 221S, capacidade máxima: 220g; d= 0,1mg), para que seu valor fosse subtraído ao peso total de cada órgão. Os órgãos retirados foram individualmente colocados na placa e encaminhados à balança para pesagem.

#### 4.2.4 - Análise Macroscópica

Após a aferição dos pesos dos órgãos, os mesmos foram encaminhados a uma bancada anteriormente preparada e descontaminada com álcool 70% para análise macroscópica. Os órgãos foram apoiados em uma plataforma de cor azul, onde suas faces foram analisadas de forma comparativa com os seguintes critérios: forma, volume ou tamanho, coloração, presença de lesões e qualquer outra alteração aparente quando comparada com o grupo controle. Cada órgão foi fotografado para montagem e exibição de um quadro comparativo.

#### 4.2.5 - Análise Microscópica

As amostras dos tecidos dos fígados e rins foram posicionadas em cassetes, armazenadas em formaldeído a 10% com pH entre 6 e 7 por 48h, e encaminhados ao laboratório de Histologia, onde foram submetidos às técnicas de rotina para confecção de lâminas. Os cortes foram feitos com 3,0 µm de espessura para montagem das lâminas, que foram coradas em hematoxilina-eosina.

Após o processo de confecção das lâminas, as mesmas foram analisadas em microscópio óptico (modelo LX 500) e fotografadas utilizando uma câmera iVm 5000, através do programa ProgRes Capture Pro 2.7, no laboratório de Histologia & Patologia da UFRJ - Campus Macaé, para descrição histopatológica.

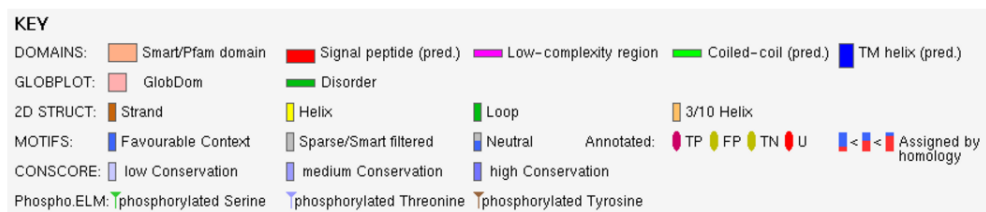
#### 4.2.6 – Genética química

Como dito anteriormente, com o objetivo de entendermos um pouco mais sobre a ação da cantaxantina, realizamos uma busca através da genética química com o objetivo de entendermos mais especificamente essa ação em nível molecular.

Para essa pesquisa utilizamos a ferramenta Eukaryotic Linear Motif (ELM). “Essa ferramenta serve à anotação e detecção dos *motifs* eucarióticos lineares (ELMs), que funciona como um repositório de dados de *motifs* já conhecidos, e como uma maneira de se explorar esses dados para a previsão de outros”. Os *motifs* são locais de interação de proteínas com pequenos aglomerados moleculares de aminoácidos. São pontos de localização nos proteomas que, uma vez acionados, fornecem uma ampla gama de funcionalidade às proteínas. Conforme a funcionalidade acionada, desempenham papéis fundamentais na regulação celular. Por isso também estão envolvidas no desencadeamento de diversas doenças. Iniciamos a investigação escolhendo a proteína de interesse na pesquisa, e o organismo eucariótico (usando-se a taxonomia) onde se deseja buscá-la. No site do National Center of Biotechnology Information (NCBI), buscamos a estrutura linear da proteína escolhida e esta foi então aplicada na ferramenta ELM que nos apresentou uma série de informações sobre os *motifs* que se relacionam a essa proteína.

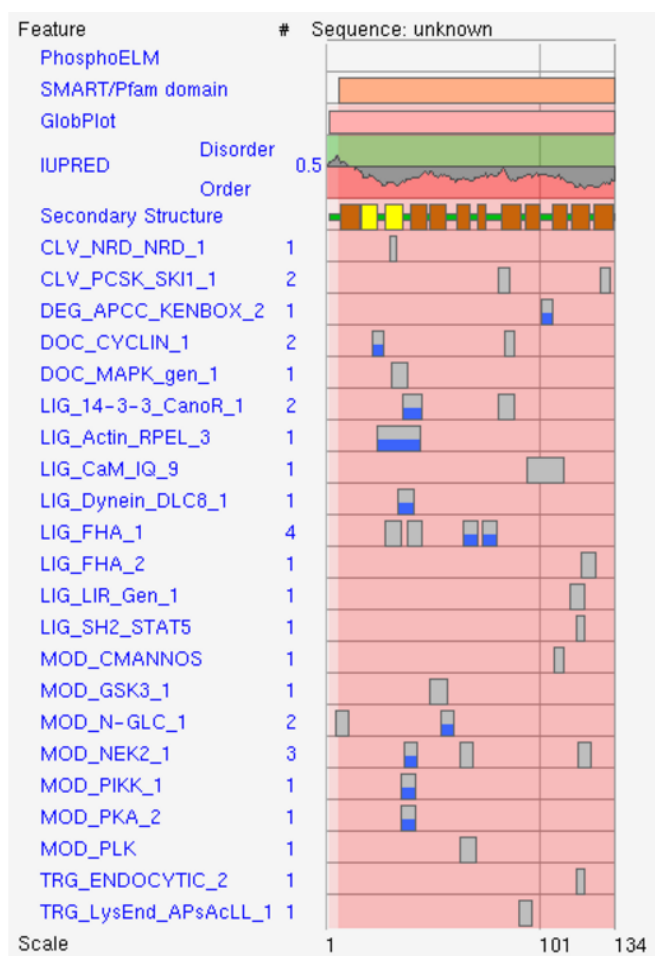
Com o intuito de tentar esclarecer de que maneira ela levava às lesões celulares descritas acima, decidimos pesquisar sua estrutura relacionada aos *motifs* que nela podem atuar. As instâncias ELM são classificadas por tipos de *motifs*, local funcional na proteína pesquisada e suas classes. Abaixo (figura 6) podemos ver a maneira como as informações são apresentadas na tela do site: [www.elm.eu.org](http://www.elm.eu.org)

#### ■ Summary for sequence 'unknown'.



**Figura 6** – Summary for sequence unknown

Fonte: Disponível elm.eu.org



A proteína RBP II encontra-se no domínio das proteínas lipocalinas. Esta é uma família de proteínas que se ligam a pequenas moléculas hidrofóbicas (como a cantaxantina). Os diversos retângulos identificam os locais dos *motifs*, a extensão da sequência de aminoácidos onde atuam, o nível de conservação evolutiva e se o contexto para expressão é muito ou pouco favorável em termos de evolução genética.

Como o trabalho estende o raciocínio sobre a presença da cantaxantina nos salmonídeos, camundongos e seres humanos, utilizamos a ferramenta digital ELM, buscando a presença da proteína RBP II em *Salmo salar*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*.



#### 4.2.7 - Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada e estes foram submetidos à comparação entre si utilizando-se o teste one-way ANOVA. Nos resultados que não apresentaram a distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pos-teste de *Dunn*. A significância em todos os testes foi estabelecida ao nível de  $p \leq 0,05$ . Tais análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPadPrism* versão 4.03 para *Windows* (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA).

## 5. Resultados

### 5.1 Dados referentes aos animais dos grupos de 40 e 70 dias de vida

#### 5.1.1 Peso corporal

Ao avaliarmos o peso corporal dos animais dos quatro grupos (GC: 33,24g, GCC: 33,21g, GTS: 31,80g e GSS: 31,46g) (figura 7/A, abaixo), notamos que não houve significância entre os grupos, ou seja, a cantaxantina, a truta salmonada e o salmão selvagem não interferiram na evolução ponderal destes animais, até os 40 dias de vida.

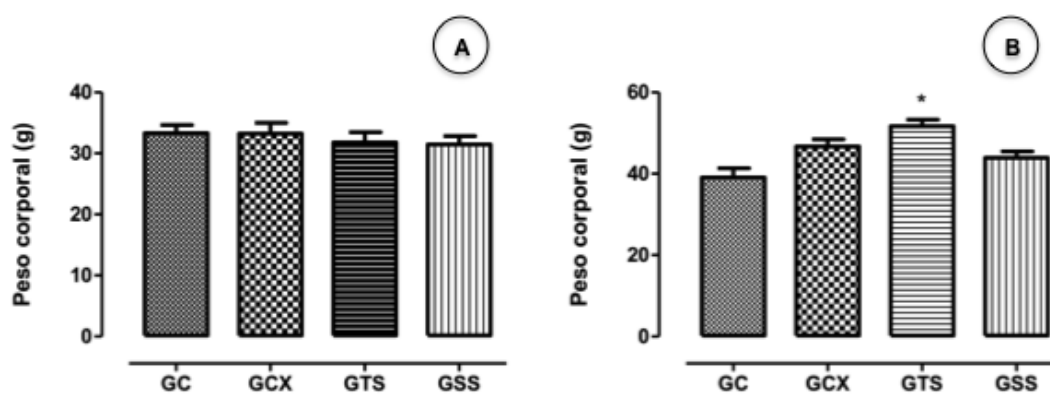


Figura 7 - Peso corporal dos animais ao P40 (A) e ao P70 (B). Grupos: GC, grupo controle; GCX, grupo cantaxantina; GTS, grupo truta salmonada e GSS, grupo salmão selvagem. O asterisco (\*) representa diferença estatística comparada do Grupo controle,  $P < 0,05$ .

Nos quatro grupos de 70 dias de vida (GC: 40,88g, GCX: 49,37g, GTS: 51,68g e GSS: 43,90g) (Figura 7/B) notamos que houve significância, onde os camundongos que receberam ração a base de truta salmonada apresentaram peso corporal maior quando comparados aos animais do grupo controle (GC). Já entre os grupos GCX, GTS e GSS, não houve diferença significativa para este dado.

#### 5.1.2 - Peso de órgãos

##### 5.1.2.1 – Peso cerebral

Ao observarmos a figura 8/A abaixo referente ao peso cerebral dos animais, notamos que aos 40 dias de vida não houve significância estatística entre os grupos GC ( $0,400 \pm 0,32g$ ), GCX ( $0,398 \pm 0,37g$ ), GTS ( $0,438 \pm 0,006g$ ) e GSS ( $0,460 \pm 0,009g$ ), apesar do GSS apresentar valor numericamente superior aos demais.

Aos 70 dias de vida, (Figura 8/B, abaixo) também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparados os 4 grupos de estudo: GC ( $0,389 \pm 0,03g$ ), GCX ( $0,391 \pm 0,03g$ ), GTS ( $0,479 \pm 0,002g$ ) e GSS ( $0,476 \pm 0,002g$ ).

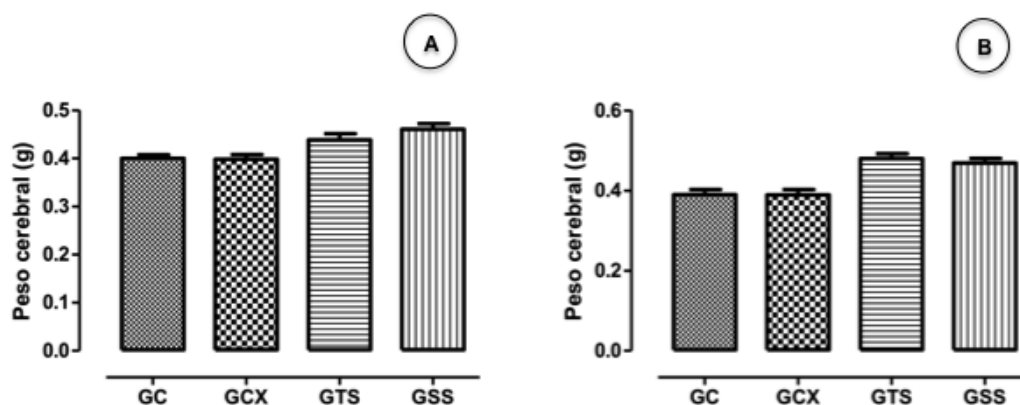


Figura 8 - Peso cerebral dos animais ao P40 (A) e ao P70 (B). Grupos: GC, grupo controle; GCX, grupo cantaxantina; GTS, grupo truta salmonada e GSS, grupo salmão selvagem

#### 5.1.2.2 – Peso de fígado

Ao observarmos a figura 9/A abaixo, referente ao peso hepático dos animais, notamos que aos 40 dias de vida não houve significância estatística entre os grupos avaliados: GC ( $1,775 \pm 0,13g$ ), GCX ( $1,635 \pm 0,32g$ ), GTS ( $2,167 \pm 1,16g$ ) e GSS ( $2,066 \pm 1,18g$ ), apesar dos animais do GTS terem apresentado valores superiores quando comparados aos demais grupos. Já aos 70 dias de vida (Figura 9/B, abaixo) notamos que os animais do GTS ( $3,177 \pm 0,78g$ ) apresentaram valores superiores, com significância estatística para peso hepático, quando comparados aos animais do GSS ( $2,500 \pm 0,66g$ ); e ambos quando comparados ao GC ( $1,521 \pm 0,20g$ ). Já o GCX apresentou o valor de  $2,002 \pm 0,25g$ .

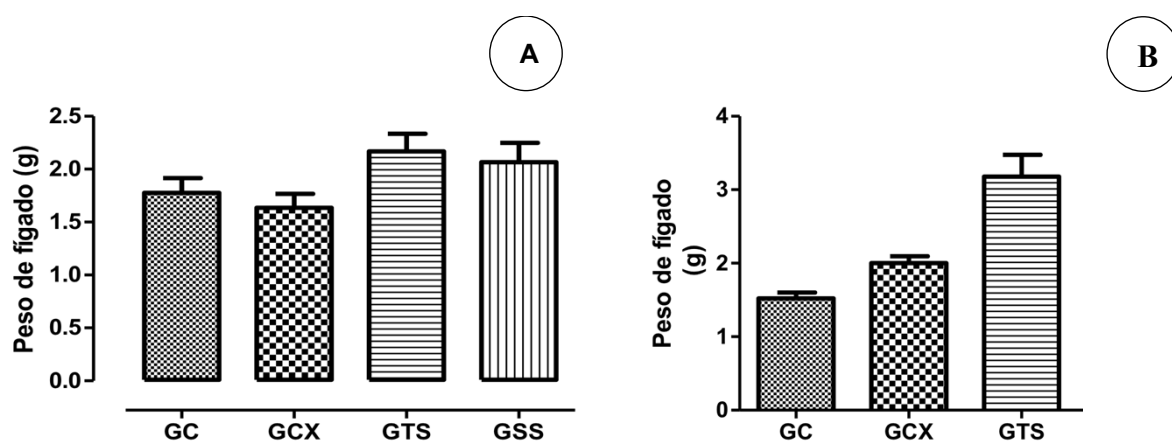


Figura 9 - Peso de fígado dos animais ao P40 (A) e ao P70 (B). Grupos: GC, grupo controle; GCX, grupo cantaxantina; GTS, grupo truta salmonada e GSS, grupo salmão selvagem. O símbolo \* representa diferença estatística comparada do Grupo controle,  $P < 0,05$ .

### 5.1.2.3 – Peso de rim direito e esquerdo

Ao analisarmos os rins direitos (GC:  $0,189 \pm 0,16g$ ; GCX:  $0,215 \pm 0,19g$ ; GTS:  $0,230 \pm 0,006g$  e GSS:  $0,234 \pm 0,007g$  – figura 10/A) e esquerdos (GC:  $0,184 \pm 0,42g$ ; GCX:  $0,209 \pm 0,13g$ ; GTS:  $0,232 \pm 0,007g$  e GSS:  $0,238 \pm 0,007g$ , na figura 10/B), notamos que aos 40 dias de vida não houve significância estatística entre os 4 grupos estudados.

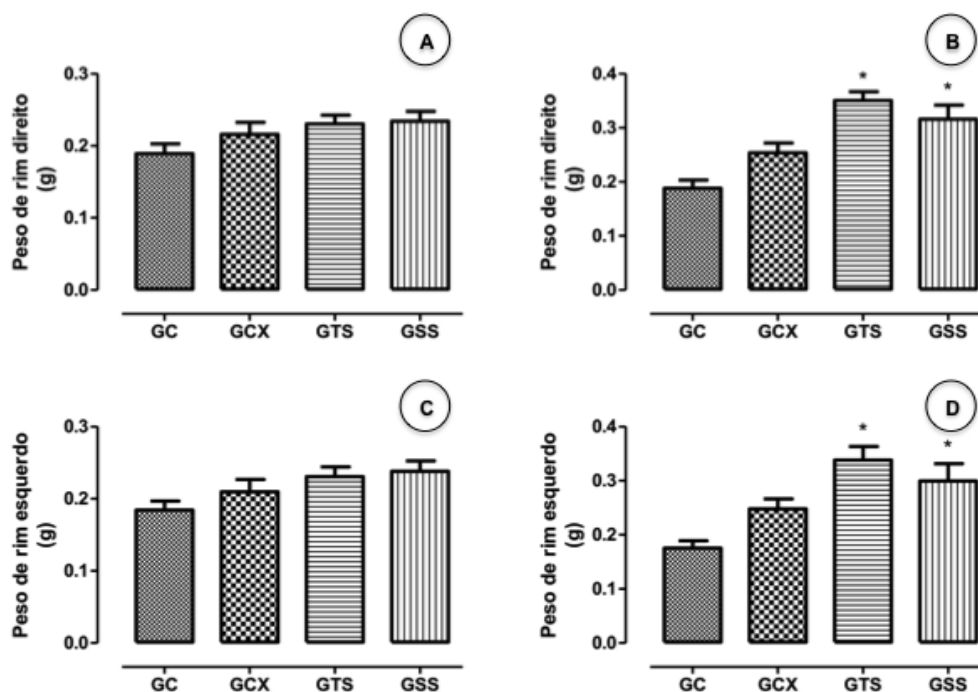


Figura 10 - Peso de rim direito e esquerdo dos animais ao P40 (A,C) e ao P70 (B,D). Grupos: GC, grupo controle; GCX, grupo cantaxantina; GTS, grupo truta salmonada e GSS, grupo salmão selvagem. O asterisco (\*) representa diferença estatística comparada do Grupo controle,  $P < 0,05$ .

A figura 10, acima, também nos permite avaliar os pesos renal direito (figura 10/C) e esquerdo (figura 10/D) aos 70 dias de vida dos animais, onde notamos que os animais do GTS ( $0,350 \pm 0,001g$ ) apresentaram valores superiores (com significância estatística) para o rim direito quando comparados ao GSS ( $0,315 \pm 0,013g$ ), e ambos foram superiores ao GC ( $0,188 \pm 0,04g$ ). O mesmo foi observado para o rim esquerdo dos animais, onde GC:  $0,175 \pm 0,03g$ ; GCX:  $0,215 \pm 0,04g$ ; GTS:  $0,338 \pm 0,005g$  e GSS:  $0,301 \pm 0,024g$ .

### 5.1.3 - Análise Macroscópica

Foram analisados os seguintes órgãos: Rins D e E, fígado, globo ocular e nervo óptico, conforme descrito a seguir.

Na análise anatomopatológica dos rins dos animais com 40 dias de vida, pertencentes ao grupo controle caseína (GC), não foi observada qualquer alteração, visto que os órgãos apresentaram superfície lisa, consistência adequada, formato normal reniforme, cor avermelhada e volume preservado (Figura 11). Nos grupos GCX, GTS e GSS (Figura 11),

também foram observados os mesmos aspectos verificados no GC, indicando que não houve diferença entre os grupos no que se refere a macroscopia deste órgão.

No entanto no grupo dos 70 dias observamos que os rins do GCX (Figura 12) apresentaram uma cor vermelho violáceo, e também um aumento de volume, quando comparado ao GC. Já nos rins dos grupos GTS e GSS (Figura 12) foram observados os mesmos aspectos de normalidade vistos no GC.

À análise hepática nos animais de 40 e 70 dias, dos quatro grupos (Figuras 11 e 12) observamos normalidade no que diz respeito a coloração, preservação tecidual e bordos regulares, conforme descrito na literatura para fígados de camundongos. A exceção foi o GTS, tanto com 40 como com 70 dias, apresentaram uma coloração muito mais clara, principalmente nos de 70 dias, o que sugere esteatose.

Avaliando os globos oculares e os nervos ópticos dos animais em ambos os grupos de 40 e 70 dias, com a vista desarmada, também não notamos alterações entre os quatro grupos. Os globos oculares se apresentaram brilhantes, sem opacidade visível em todos os grupos (Figuras 11 e 12).

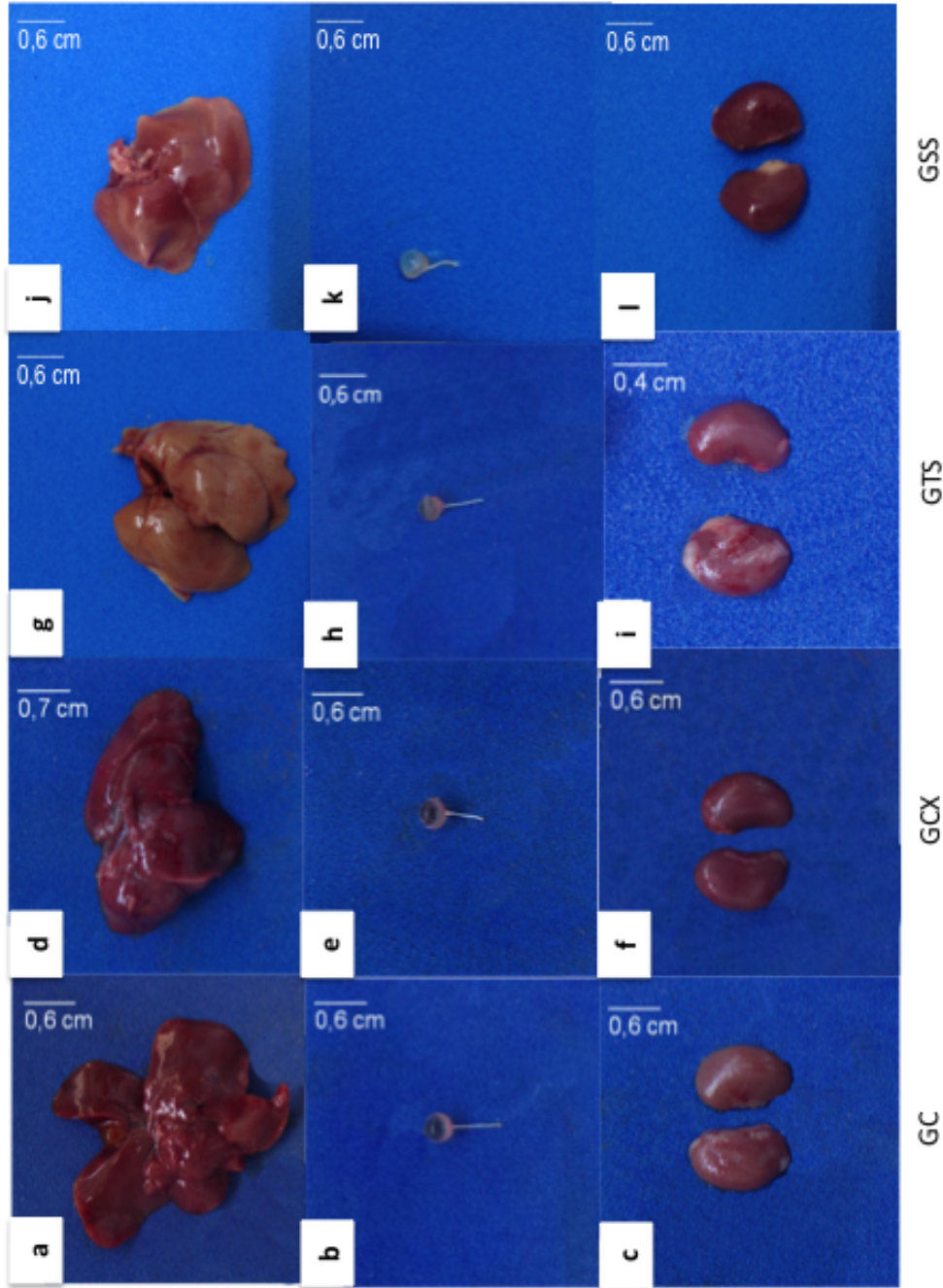


Figura 11— Macroscopia de fígado (a, d, g, j), globo ocular (b, e, h, k) e rins (c, f, l), dos animais ao P40. Grupos: GC-Grupo Caseína, GCX-Grupo Cantaxantina, GTS-Grupo Truta Salmonada e GSS-Grupo Salmão Selvagem.

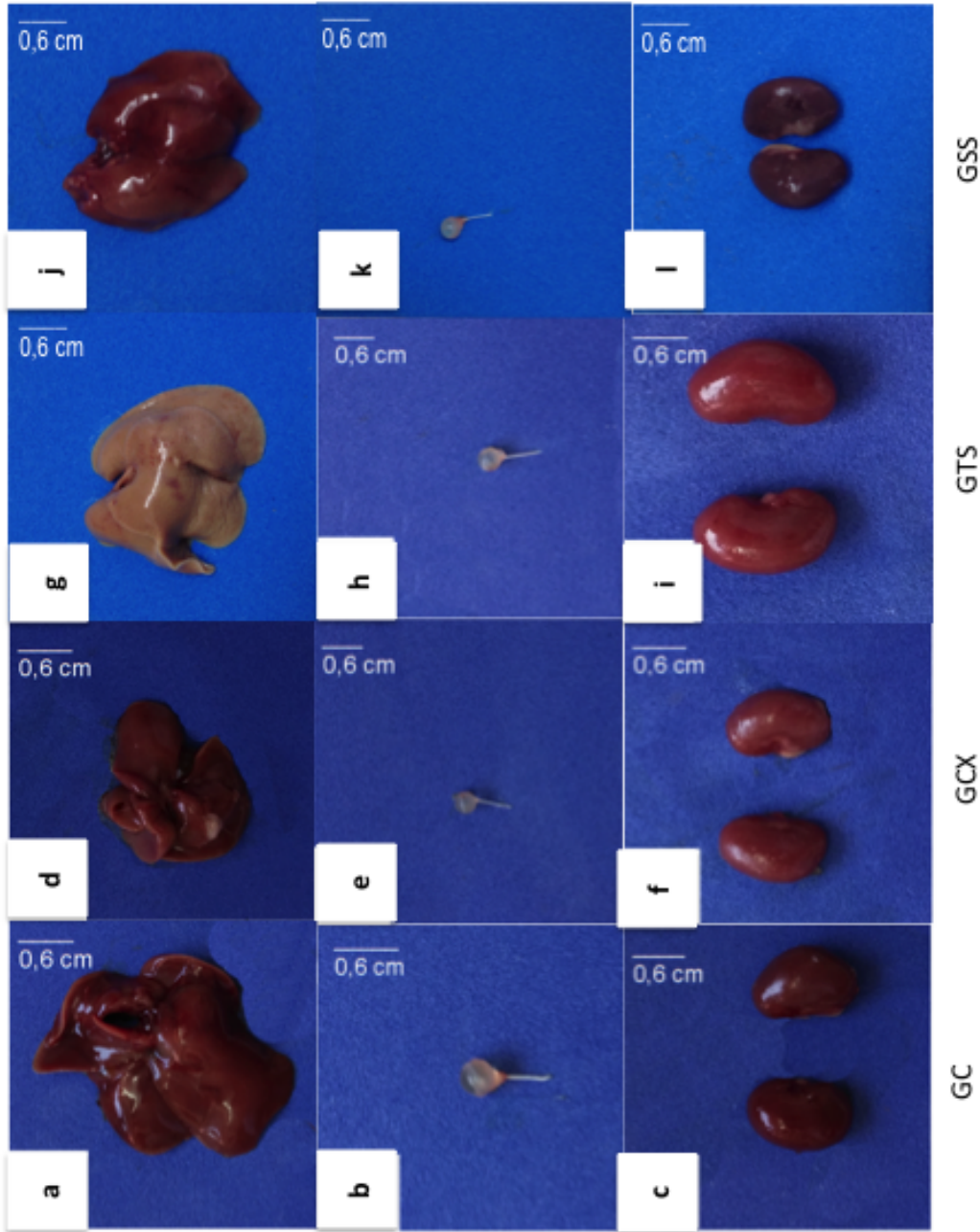


Figura 12- Macroscopia de fígado (a, d, g, j), globo ocular (b, e, h, k) e rins (c, f, i, l), dos animais ao P70. Grupos: GC-Grupo Caseína, GCX-Grupo Cantaxantina, GTS-Grupo Truta Salmonada e GSS-Grupo Salmão Selvagem.



#### 5.1.4 Análise Microscópica

Na análise histopatológica, tanto dos grupo com 40 dias (Figura 13) quanto no de 70 dias de vida (Figura 14), nos rins do grupo GC foram observados os glomérulos com celularidade normal e os túbulos contornados com citoplasma róseo e abundante.

No grupo GCX foram observados glomérulos tumefeitos, túbulos com necrose do epitélio de revestimento (eosinofilia) apresentando perda dos limites celulares e vasos congestos, tanto no grupo de 40 quanto no de 70 dias de vida (Figuras 13 e 14).

No grupo GTS, tanto de 40 quanto no de 70 dias de vida, foram observados alguns glomérulos congestos e outros apresentando células glomerulares invadindo o espaço de Bowman; as estruturas tubulares apresentam perda dos limites e ainda uma discreta vacuolização (Figuras 13 e 14). Já o GSS equiparou-se ao observado no GC, com aspecto de normalidade e preservação tecidual, aos 40 e aos 70 dias de vida.

Na análise histopatológica do fígado, observamos que no GC o tecido apresentava-se com aspecto morfológico normal onde pudemos observar os lóbulos hepáticos preservados, bem como o espaço porta íntegro, tanto para o grupo de 40 quanto de 70 dias de vida (Figuras 13 e 14).

Já ao observamos o tecido hepático do grupo GCX (Figuras 13 e 14), notamos a presença de necrose (eosinofilia) das células hepatocitárias que apresentavam perda dos limites celulares, grande número de vasos congestos, vacúolos lipídicos, pleomorfismos nucleares e depósito de pigmentação do tipo hemossiderina, nos grupos de 40 e 70 dias.

No grupo de 40 dias de vida, a observação dos fígados do grupo GTS mostrou manutenção da arquitetura do órgão em seu aspecto geral, apenas com uma discreta tumefação de hepatócitos (Figura 13). Já o grupo dos 70 dias apresentou maior lesão, com perda da arquitetura do órgão em seu aspecto geral, além de tumefação de hepatócitos, que apresentavam citoplasma eosinofílico. Também foi observada intensa esteatose, inclusive com ruptura de células adiposas, aos 70 dias de vida. (Figura 14) Já o GSS apresentou arquitetura preservada, equiparando-se ao GC.

A histopatologia da retina não mostrou diferença entre os grupos de 40 e 70 dias de vida. Entre os animais dos 4 grupos encontramos uma organização laminar, onde as células estavam dispostas em camadas. O tecido retiniano mostrou-se composto por um epitélio externo e uma porção neural. Na porção neural, as células estavam organizadas em camadas:

Segmento Externo dos Fotorreceptores - cones e bastonetes (SEF), Camada Nuclear Externa (CNE), Camada Plexiforme Externa (CPE) e Camada Nuclear Interna (CNI). Em seguida, uma segunda camada de processos nervosos, a Camada Plexiforme Interna (CPI). Os corpos das células ganglionares e algumas amácrinas deslocadas formavam a camada mais interna da retina, a Camada de Células Ganglionares (CCG) (Figuras 13 e 14). O nosso trabalho não conseguiu evidenciar depósito de cristais na retina de nenhum dos camundongos, com o aparelho simples de microscopia que nos estava disponível. As imagens encontradas nos trabalhos pesquisados foram feitas com uso de microscópio eletrônico. Certamente isso fez a diferença.

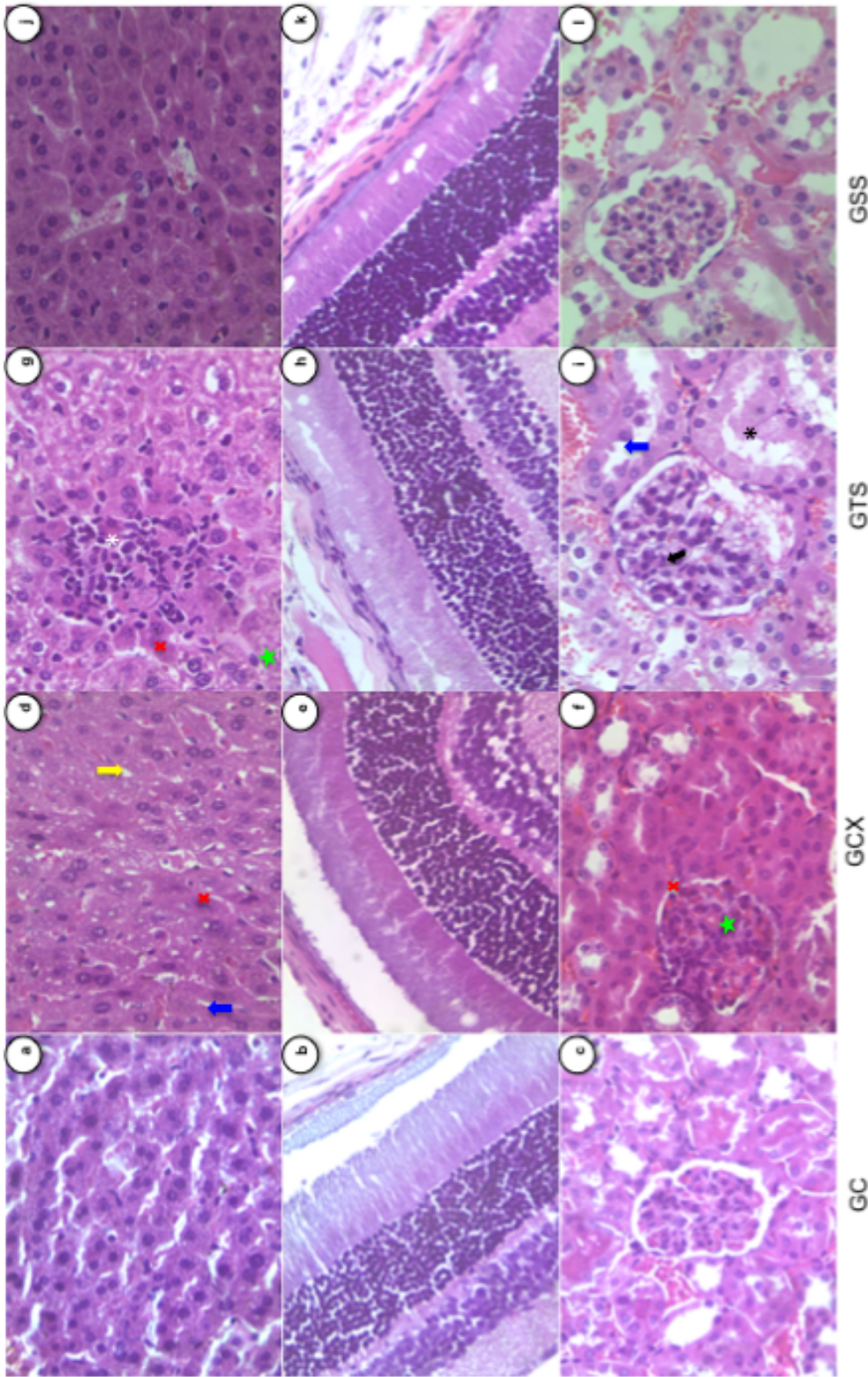


Figura 13 - Histopatologia de fígado (a, d, g, j), retina (b, e, h, k) e rim (c, f, i, l) dos animais ao P40, coradas com H&E, aumento de 20x, onde: seta amarela = perda de limites celulares, x vermelho = eosinofilia, estrela verde = tumefação, seta azul = vaso congestionado, seta preta = invasão do espaço de Bowman, asterisco preto = vacuolização, asterisco branco = pleomorfismo e asterisco azul = esteatose. Grupos: GC, grupo controle; GCX, grupo truta salmoadada; GTS, grupo truta cantaxantina; GSS, grupo salmão selvagem.



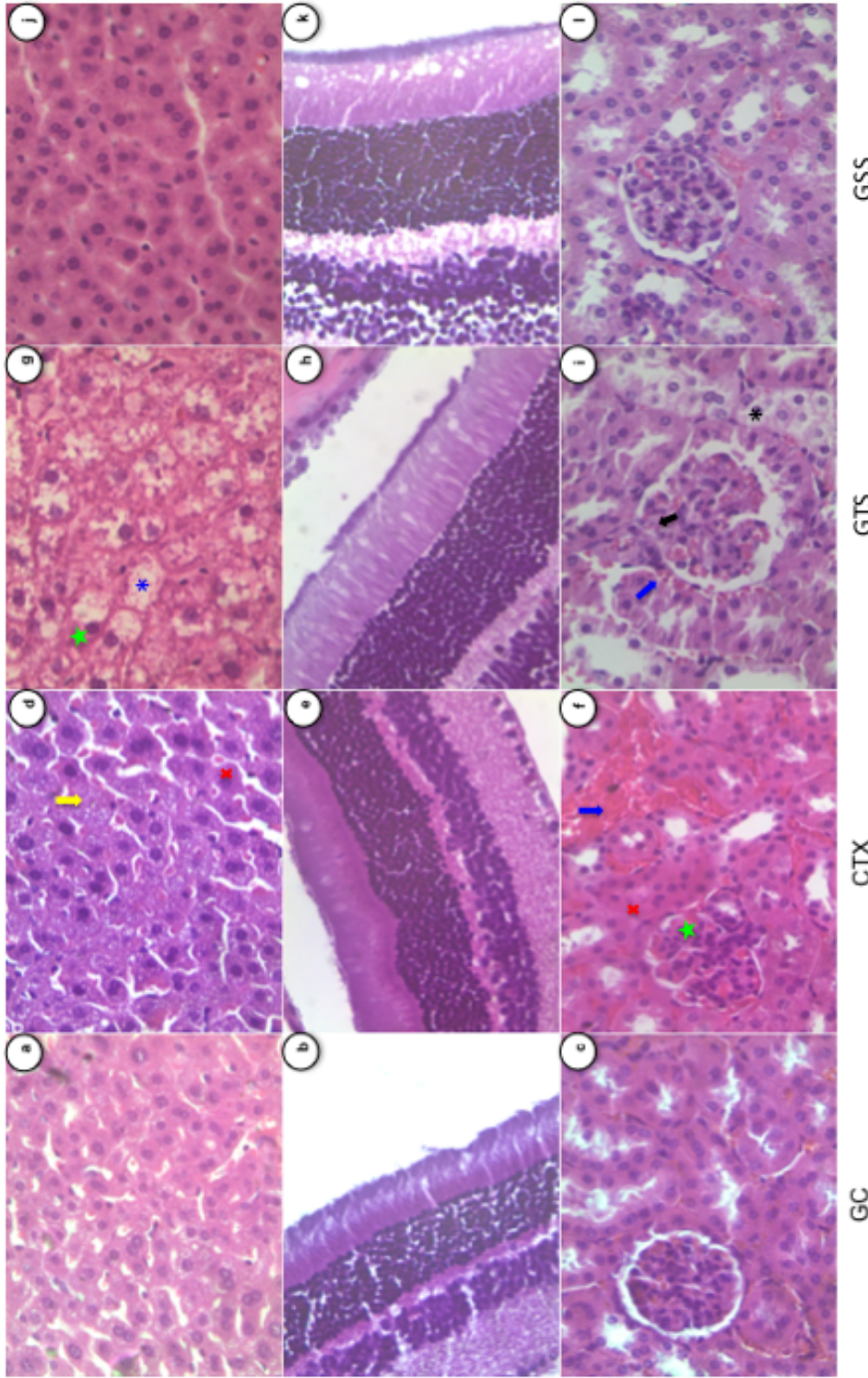
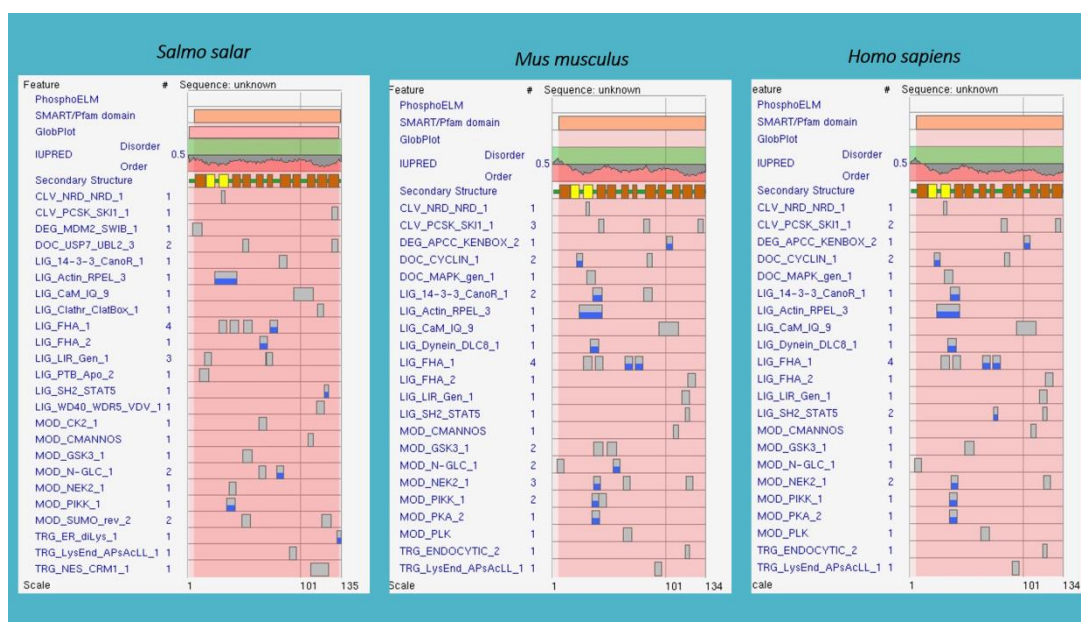


Figura 14 - Histopatologia de fígado (a, d, g, j), retina (b, e, h, k) e rim (c, f, i, l) dos animais ao P70, coradas com H&E, aumento de 20x, onde: seta amarela = perda de limites celulares, x vermelho = eosinofilia, estrela verde = tumefação, seta azul = vaso congestionado, seta preta = invasão do espaço de Bowman, asterisco preto = vacuolização e asterisco azul = esteatose. Grupos: GC, grupo controle; GCX, grupo cantaxantina; GTS, grupo truta salmonada; GSS, grupo salmão selvagem.

### 5.1.5 – Genética Química

A proteína RBP II existe em todos os três tipos de organismos envolvidos nesse trabalho, e com grande semelhança no que diz respeito aos *motifs* existentes em cada um. Abaixo (Figura 16) vemos a comparação dos *motifs* relacionados à proteína RBP II em cada organismo envolvido na pesquisa.

**Figura 15** – Comparação de *motifs* relacionados a proteína RBP II



As siglas à esquerda do quadro, identificam os *Motifs* Lineares Curtos (SLiMs) que se relacionam à proteína RBP II. Suas letras iniciais são indicadoras das classes às quais pertencem, que por sua vez determinam cada tipo de ação: proteínas de clivagem, proteínas ligadoras, adaptadoras, de fosforilação, etc.

O quadro a seguir (Figura 17) mostra os SLiMs relacionadas à RBP II, evidenciando a semelhança da existência desses em cada organismo.

**Figura 16 – Presença dos SLiMs nos organismos.**

	Salmo salar	Mus musculus	Homo sapiens
CLV_NRD_NRD_1	X	X	X
CLV_PCSK_SKI1_1	X	X	X
LIG_14-3-3_CANOR_1	X	X	X
LIG_Actin_RPEL_3	X	X	X
LIG_CaM_IQ_9	X	X	X
LIG_FHA_1	X	X	X
LIG_FHA_2	X	X	X
LIG_LIR_Gen_1	X	X	X
LIG_SH2_STAT5	X	X	X
MOD_CMANNOS	X	X	X
MOD_GSK3_1	X	X	X
MOD_N-GLC_1	X	X	X
MOD_NEK2_1	X	X	X
MOD_PI3K_1	X	X	X
TRG_LysEnd_APsAcLL_1	X	X	-
DEG_MDM2_SWIB_1	X	-	-
DOC_USP7_UBL2_3	X	-	-
LIG_Clatr_ClatBox_1	X	-	-
LIG_PTB_APO_2	X	-	-
LIG_WD40_WDR5_VDV_1	X	-	-
MOD_CK2_1	X	-	-
MOD_SUMO_rev_2	X	-	-
TRG_LysEnd_APsAcLL_1	X	-	-
TRG_ER_dilys_1	X	-	-
TRG_NES_CRM1_1	X	-	-
DEG_APCC_KENBox_2	X	X	-
DOC_CYCLIN_1	-	X	X
DOC_MAPK_gen_1	-	X	X
LIG_Dynein_DLC8_1	-	X	X
MOD_PLK	-	X	X
TRG_ENDOCYTIC_2	X	X	-

## 6. Discussão

Conforme Daleprane (2008), “assumindo que as variações nas proteínas corporais ocorrem devido a diferenças na qualidade proteica da dieta, é comum e aceitável medir variações de peso corporal como um indicador global do desempenho da proteína ingerida no organismo.”

Olsen (1996), em um estudo realizado pelo Instituto de Toxicologia da Agência Nacional de Alimentos na Dinamarca, relatou sobre ratos que foram tratados com cantaxantina obtiveram uma média de ganho de peso corporal inferior aos não tratados. Essa redução do ganho de peso foi pequena em comparação com o controle de placebo, e foi observada a 25 mg/kg/dia. A sua experiência não envolvia rações à base de truta salmonada e nem de salmão selvagem.

Sabemos que os peixes criados em cativeiro ração recebem alimentação diferente da natural utilizado pelo salmão selvagem. Essa é preparada à base de farinha de peixe e muita gordura saturada. Imaginamos que isso altere a composição da carne da truta salmonada no tocante ao aumento de calorias, e isso pudesse ter colaborado com o ganho de peso maior dos animais alimentados à base de truta salmonada.

O aumento de um órgão é um dos dados semiológicos que sugerem alteração. As substâncias tóxicas podem alterar os sistemas enzimáticos das células, alterar sua permeabilidade, destruir componentes celulares estruturais ou causar depósito anormal dessas substâncias em seus compartimentos. Essas e outras alterações podem culminar em tumefação celular aguda, e quanto mais tempo o indivíduo estiver exposto a essas substâncias, maior o dano (ZACHARY, 2013).

Interessante observarmos que apenas o grupo dos 70 dias de vida apresentou aumento nos fígados e rins, corroborando uma possível agressão mais prolongada. Além disso, os grupos contendo carne de truta ou salmão é que apresentaram significância estatística em relação ao grupo controle. O grupo cantaxantina não apresentou significância apesar de também ter aumentado. Isso nos faz pensar que o diferencial causador desse aumento não seja a ação da cantaxantina isolada, mas dela no GCX e dela e das gorduras em maior volume contidas na carne dos peixes.

Sabemos que no ser humano, o distúrbio metabólico denominado Síndrome Metabólica cursa, entre outras alterações, com esteatose hepática e esta leva ao aumento do peso do fígado.

Monetti (2007), em um estudo relacionando esteatose hepática e resistência à insulina, mostrou claramente que o peso nos fígados dos camundongos que desenvolveram esteatose hepática era maior que os demais.

A esteatose, que é o acúmulo de gordura nas células, é o primeiro estágio da insuficiência hepática, e sempre leva ao aumento do fígado (MIGUEL JR., 2007).

Em relação ao cérebro, tanto no grupo dos 40 dias como no de 70, os cérebros dos grupos GTS e GSS se apresentaram maiores em relação aos demais (GC e GCX), embora não apresentando significância. Apesar da possibilidade da truta conter grande volume de gordura saturada, ela também apresenta ômega 3, e esse dado é comum a esses dois grupos que apresentaram maior volume. Sabe-se que o cérebro é quase 60% composto de gorduras (KITAJKA et al, 2004), e durante seu desenvolvimento, os ácidos graxos poliinsaturados têm intensa participação, sendo acumulados no cérebro durante sua formação (CRAWFORD, 1976). E conforme mostra Clandinin (1980) em uma pesquisa feita em cérebros de fetos de camundongas, esse acúmulo, bem como o teor total de ácidos graxos, aumentam de forma diretamente proporcional ao peso total do cérebro.

Sobre o peso renal dos animais com 70 dias de vida (B e D do gráfico), notamos que houve significância entre os grupos onde os animais que receberam ração à base de cantaxantina (GCX) apresentaram maior peso para este órgão quando comparados aos animais do GC, indicando uma possível ação tóxica sobre este órgão. Já na relação entre os grupos GCX com GTS e GSS, não houve diferença para este dado.

As pesquisas referentes ao modo de ação da cantaxantina são escassas. A maioria dos autores se refere às interações moleculares que poderiam ocorrer entre a cantaxantina e as moléculas lipídicas (já que ela é lipossolúvel), e que as ligações de hidrogênio entre a cantaxantina e os lipídeos e entre a cadeia polieno do carotenóide a água, sejam cruciais para sua ação e efeito (SUJAK, 2009).

Seu efeito antioxidante é inversamente proporcional à concentração. Shih *et al.* (2008), mostraram num experimento *in vivo*, que a capacidade antioxidante foi mais potente no plasma do que no fígado, onde neste sua concentração era maior. Isso parece ser coerente com o fato de órgãos como o fígado serem agredidos em doses grandes, ao invés de sofrerem apenas os efeitos benéficos da antioxidação.



No nosso trabalho sobre o modo de ação da cantaxantina, a lógica da ação tóxica está relacionada à quantidade, uma vez que supõem-se que em altas doses ela aja ocupando sítios de ação de outras moléculas que têm, cada uma, um papel fundamental na manutenção da estrutura e funcionalidade da célula.

As funções fundamentais para a saúde celular que estariam inibidas se referem a expressão gênica, diferenciação, inibição da montagem de filamentos celulares, deslocamentos de organelas no citoplasma, controle do ciclo celular, reparação do DNA, regulação da transcrição, controle das condições de stress intra e extracelular, regulação do metabolismo do glicogênio, apoptose, formação das proteínas de membrana, adesão célula-célula, formação do revestimento de vesículas, endocitose e na regulação da importação e exportação de macromoléculas que é a principal forma de comunicação entre o citosol e o núcleo.

Acreditamos assim, que as lesões que ocorrem nas células do fígado e dos rins vistas na microscopia, seja decorrente da falta ou diminuição desses mecanismos protetores e fundamentais, quando os sítios comuns a elas são demasiadamente ocupados pela cantaxantina (ação por competição).

No ser humano a desregulação de enzimas responsáveis pela execução das atividades acima está relacionada a várias doenças, incluindo câncer, diabetes e processos inflamatórios (BORON E BOULPAEP, 2015).

Ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos com o intuito de definir, de maneira mais aproximada, a dose tóxica para uso da cantaxantina que pode causar cada uma das lesões orgânicas. A maioria delas é feita em modelo animal, como também o são os estudos através dos quais o JEFCA determina os valores de DDA. No homem, tem-se dados mais específicos apenas para a retinopatia, a partir dos estudos em pessoas que utilizavam os autobronzeadores e que desenvolveram essa patologia. A própria definição dos níveis gerais aprovados pelos órgãos responsáveis passaram por muitas mudanças ao longo dos anos, mostrando a dificuldade em se estabelecer valores seguros. O JECFA avaliou várias vezes a cantaxantina até chegar aos valores atuais: em sua 18ª reunião a DDA estabelecida era de 0 a 25 mg/kg/dia, na 31ª reunião foi reduzida para 0 a 0,5 mg/kg/dia, e apenas na sua 44ª reunião, em 1995, ficou estabelecida a dose atual, de 0,03mg/ kg pc. A quantidade de cantaxantina permitida na ração oferecida aos salmonídeos de cativeiro, atualmente, é definida pelo JEFCA em 80 mg/kg. No entanto, o Scientific Committee for Food (SCF), através da avaliação de segurança dos princípios estabelecidos na Diretiva 2001/79, sugere que esse limite seja de 25 mg/kg de ração, a fim de cobrir os segmentos potencialmente vulneráveis da população e

hábitos de consumo extremos. Essa dosagem ocasionaria uma queda na concentração da cantaxantina na carne do salmão para 4 mg/kg, o que não atenderia às necessidades do mercado, e para resolver essa questão, sugere a substituição da cantaxantina por outros corantes. Em 1997, a mesma entidade havia delimitado a dose permitida em 43 mg/kg de ração (BAKER, 2001).

Isso nos faz concluir que não há consenso a respeito desses valores. Strube (1999), em seu livro sobre ocorrência de agentes naturais antitumorais, apresenta resultados de vários estudos, mostrando que existem resultados divergentes quanto à dose de cantaxantina para desenvolver algumas das mesmas alterações. Em relação ao desenvolvimento da retinopatia por cristais, alguns autores relatam que só houve ocorrência dessa patologia em humanos, em doses entre 100 a 150 mg/kg/dia; outros demonstram a ocorrência em doses de 30 a 120 mg/kg/dia por períodos que também podem variar de três meses a vários anos. Sabe-se que a retinopatia causada pela cantaxantina é reversível após parada do uso, no entanto os vários trabalhos mostram que há grande diferença no tempo necessário para essa reversão, variando de 9 meses a 12 anos em alguns casos. Essa diferença também se dá entre as diferentes espécies, para desenvolvimento da retinopatia.

Segundo Strube (1999), um trabalho desenvolvido por Harnois *et al* (1990) e citado em FAO-OMS, 1996, mostrou que macacos que receberam 11mg/kg/dia por 40 meses desenvolveram retinopatia. E um outro trabalho mais recente também com macacos que receberam a cantaxantina em óleo vegetal em doses altas como 200 a 1000mg/kg/dia não desenvolveram retinopatia. Apesar dessa lesão poder acontecer tanto em homens como em macacos, em relação à concentração de cantaxantina na retina, no homem esta foi mais de 100 vezes maior que a da retina de macacos. Estudos sobre os efeitos da cantaxantina feitos com coelhos, gatos e cães, mostrou também grande diferença de doses diárias entre eles necessárias para desenvolver retinopatia.

Sobre a hepatotoxicidade causada por cantaxantina, Strube relatou que dois longos estudos demonstraram que roedores a apresentaram, mas macacos com doses de até 1000 mg/kg/dia e nem em humanos com doses de 2mg/kg/dia a desenvolveram.

Outros dados sobre lesão hepática, foi demonstrado que camundongos com doses de 250 a 1000 mg/kg/dia de cantaxantina por 94 semanas não apresentaram alteração carcinogênica, mas em ratos recebendo a mesma dose por 104 semanas foi encontrada alta incidência de tumores benignos no fígado, independente da dose usada (BIBRA, 1991).

Hepatotoxicidade em seres humanos devido à ingestão de cantaxantina não tem sido notificados e, embora o número de casos tenha sido limitado, sinais de

hepatotoxicidade foram observados em pacientes portadores de protoporfíria tratados com um total de 3-150 g de cantaxantina sobre um período de 1-12 anos.

Olsen, em um pesquisa usada pelo JEFCA na determinação da DDA da cantaxantina (JEFCA, 2004), relatou um estudo com camundongos que foram tratados com cantaxantina nas doses de 5, 25, 75 e 250 mg/kg/dia. O ensaio biológico foi dividido em três partes, tendo sido os animais eutanasiados com 52, 78 e 104 semanas a fim de analisar a histopatologia do fígado dos mesmos. Nos grupos que consumiram 5 e 25 mg/kg/dia apresentaram alterações como vacuolização e esteatose. Já nos demais grupos foram observadas alterações como alargamento dos hepatócitos, aumento da incidência de vacuolizações, presença de células em vidro fosco, pigmentos marrons intra-hepatocitários e esteatose.

A concentração de cantaxantina usada em nosso trabalho, na ração do Grupo Cantaxantina (GCX), foi de 0,6%, que corresponde, considerando a média diária de consumo do grupo, a uma dose de 785 mg/kg/dia. Essa dose encontra-se entre os valores dos vários estudos pesquisados. Os resultados por nós encontrados são similares aos encontrados por Olsen.

Com relação aos rins, vale ressaltar que não foi encontrado nenhum trabalho que avaliasse possíveis lesões renais sob a ação da cantaxantina. Citamos, a seguir, alguns trabalhos sobre toxicidade renal causada por outras substâncias.

Lins *et al* (2010), em avaliações toxicológicas e ambientais sobre peixes, citando Camargo (2007 e 2009), Barreto (2007) e Albinati (2009), descreveram agressões renais por tóxicos existentes em seus ambientes. Microscopicamente os peixes apresentaram lesões como degeneração hialina, oclusão de túbulos renais hipertrofia celular intensa, metaplasia cartilaginosa e congestão renal.

Oliveira, (2011) realizou um ensaio biológico para avaliar o tipo de agressão tóxica que os rins de ratos *Wistar* sofriam sob a ação do álcool. A análise histológica dos rins desses animais evidenciou vacuolização em células de túbulo renal, diminuição do espaço na cápsula de Bowman e redução da espessura cortical.

Barbieri (2012) realizou um experimento utilizando ratos machos com 90 dias de idade, onde ratos foram expostos a soluções de conservação: formaldeído e Complucad® (solução à base de peróxidos denominada Complucad® tem como principal componente o peróxido de metiletilcetona, solução em ftalato de dimetilo, álcool 70°, glicerina e aromatizante). Os resultados dos exames histológicos do rim, mostraram que os animais expostos ao formaldeído tiveram o tecido mais lesado, apresentando desestruturação tubular, com diminuição de seus diâmetros, presença de células eosinofílicas no epitélio tubular e no

espaço extra-tubular, em praticamente todos os animais do grupo, e sendo de maneira mais discreta no grupo exposto ao Complucad®.

O nosso trabalho avaliou esse dado raro, encontrando as lesões citadas acima descritas tanto no grupo cantaxantina (GCX), como no grupo truta salmonada (GTS), que têm em comum a presença da cantaxantina, levando-nos a crer que as lesões encontradas sejam, de fato, causadas pela cantaxantina.

Todas essas proteínas participam de importantes e fundamentais processos celulares, tais como: processamento proteolítico (principalmente de precursores neuropeptídeos e peptídeos hormonais), regulação de várias atividades celulares como expressão gênica, mitose, diferenciação, promovem a interação de centenas de proteínas diferentes, promovem ou inibem a montagem de filamentos celulares, são responsáveis pelos deslocamentos de organelas no citoplasma, participam do controle do ciclo celular, da reparação do DNA e regulação da transcrição. São essenciais para a homeostase celular e controle das condições de stress intra e extracelular.

Muitas agem no funcionamento cerebral (como na produção de serotonina), regulam o metabolismo do glicogênio, a apoptose, a transdução de sinal e destino celular, e participam da formação das proteínas de membrana, além da adesão célula-célula. Atuam também na formação do revestimento de vesículas, na endocitose e agem em conjunto com outras proteínas de ação específica na transcrição que regula o ciclo celular, além de regular a importação e exportação de macromoléculas que é a principal forma de comunicação entre o citosol e o núcleo (BORON e BOULPAEP, 2015).

Diante das informações que evidenciam a importância da ativação dos sítios por essas proteínas, podemos intuir que a ausência ou desregulação de suas ações serão responsáveis por inúmeros eventos nocivos, podendo levar a alterações e morte celular, que por sua vez irão determinar a condição do organismo afetado.

O estudo alvo dessa dissertação é sobre a ação toxicológica que altas doses de cantaxantina podem causar no organismo que a consome. Após sabermos que os sítios que ela pode ocupar são também alvo de outras proteínas que têm por função executar as atividades fundamentais acima descritas, podemos supor que uma quantidade muito grande de cantaxantina ingerida poderá fazê-la ocupar muitos sítios (ação por competição), impedindo assim essas ações fundamentais para o adequado funcionamento do organismo. Como vimos que a grande maioria dos SLiMs são comuns aos camundongos e ao homem, podemos esperar que as lesões que serão demonstradas nos estudos anatomopatológicos dos camundongos,

também possam ocorrer no homem. Resta determinar a quantidade a ser ingerida necessária para causar o mesmo efeito em cada espécie.

## **7. Conclusão**

Concluimos que:

- a) A cantaxantina utilizada no processamento tecnológico de trutas salmonadas tem ação tóxica importante sobre os rins e fígado de prole de camundongas alimentadas com estas trutas.
- b) Que devido ao crescente mercado de salmonídeos de cativeiro, tornam-se extremamente necessários estudos mais específicos e detalhados sobre o poder tóxico da cantaxantina, sobretudo sobre fígados e rins, para se garantir a inocuidade desse pescado sobre a saúde humana.
- c) Há necessidade de se fazer vigilância desses produtos quanto à concentração de cantaxantina encontrada para verificar se estão dentro das doses permitidas. As diferentes intensidades de cores desses nos mercados faz supor que é grande a possibilidade de estar havendo excesso desse corante no cultivo desses peixes.
- d) Faz-se necessária também a ampliação de informações ao consumidor a respeito da diferença da qualidade nutricional de salmão selvagens em relação aos salmonídeos de cativeiro no que se refere à grande quantidade de gorduras saturadas decorrentes da dieta oferecida aos peixes de cativeiro.

## 8. Referências bibliográficas

- ANVISA, Informes Técnicos Informe Técnico nº. 40, de 2 de junho de 2009  
Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/40\\_020609.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/40_020609.htm)>. Acesso em: 10 jul.2016.
- ANVISA, Resolução - CNNPA nº 44 Corantes Alimentares 1977  
Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/44\\_77.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/44_77.htm)>. Acesso em: 23 jan.2016.
- BAKER, R.T.M. Canthaxanthin in aquafeed applications: is there any risk? Trends in Food Science & Technology, 12(7) Elsevier July 2001. Disponível em:  
<[https://www.researchgate.net/publication/263690971\\_Canthaxanthin\\_in\\_aquafeed\\_applications\\_Is\\_there\\_any\\_risk](https://www.researchgate.net/publication/263690971_Canthaxanthin_in_aquafeed_applications_Is_there_any_risk)>. Acesso em: 08 jul.2016
- BARBIERI, D. et al. Avaliação Da Toxicidade Subcrônica Por Formaldeideo E Complucad® Em Ratos Wistar. [S.D.]. Perspectiva, Erechim. v.36, n.133, p.179-189, março/2012
- BEAULIEU, R. A. et al. Canthaxanthin Retinopathy with Visual Loss: A Case Report and Review, Canthaxanthin Retinopathy with Visual Loss: A Case Report and Review. **Case Reports in Ophthalmological Medicine, Case Reports in Ophthalmological Medicine**, v. 2013, 2013, p. e140901, 30 out. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833018/>>. Acesso em: 20 dez.2016
- BLUHM, R; BRANCH,R; JOHNSTON, P ; STEIN, R . Aplastic anemia associated with canthaxanthin ingested for'tanning'purposes. **JAMA**.,264(9):1141-1142 1990  
Disponível em: <<http://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/383078>>. Acesso em: 12 dez.2015.
- BORON, W; BOUPAEP, E. L. **Fisiologia Médica** Elsevier 2015  
Disponível em:  
<<https://books.google.com.br/books?isbn=8535268510>>. Acesso em: 12 fev.2016.
- BUCK, E. H. Seafood Marketing: Combating Fraud and Deception. **Congressional Research Service**. July 2, 2010. Disponível em: < <https://www.google.com.br/url>>. Acesso em 13 fev.2016
- CARMO, M; CORREIA , M . A importância do Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2009; 55(3): 279-287  
Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_55/v03/pdf/83\\_revisao\\_literatura3.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_55/v03/pdf/83_revisao_literatura3.pdf)>. Acesso em: 02 set. 2016.
- CLANDININ, MT.; CHAPPELL,J. L.; HEIM, S T.; Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. **Earle Human Development**, volume 4, Issue 2 Pages 121-129,1980 .Disponível em  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378378280900158>>. Acesso em: 10 jun.2015.
- CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. *Resolução CNS-MS 04 de 24-11-88 –03-05-2002*. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/busca>. Acesso em 13 mar. 2016.

CRAWFORD, M.A.; WILLIAMS, G.; HASSAM, A.G.; WHITEHOUSE, W.L. Essential fatty acids and fetal brain growth. **The Lancet** Volume 307, Issue 7957, 28 February 1976, Pages 452-453  
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/> . Acesso em 11 ago. 2016.

CROUZIER, W.; Evidence of genetic interaction between escaped farmed salmon and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a Northern Irish river; *Aquaculture*, volume 113, Issue 1-2. June 1993, Pages 19-29  
Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004484869390337X>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

DALEPRANE, J. B.; Avaliação da qualidade nutricional de duas variedades de soja e sua influência de seu consumo nos indicadores de doenças cardiovasculares em ratos senis. Dissertação de mestrado em Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, 2008. Disponível em: [www.btdt.ndc.uff.br/tde\\_arquivos](http://www.btdt.ndc.uff.br/tde_arquivos). Acesso em 23 nov. 2016.

DUFOSSÉ, L. ; Microbial production of food grade pigments. **Food technology and Biotechnology**. Disponível em:  
<[https://www.researchgate.net/publication/228336966\\_Microbial\\_Production\\_of\\_Food\\_Grade\\_Pigments](https://www.researchgate.net/publication/228336966_Microbial_Production_of_Food_Grade_Pigments)>. Acesso em: 15 dez. 2016.

DUTRA, B. I. C.; Salmão - Vida e Aprendizado  
<Disponível em: [www.vidaaprendizado.com.br/artigo](http://www.vidaaprendizado.com.br/artigo)>. Acesso em: 11 mai. 2015.

ESATBEYOGLU, T. et al. Free radical scavenging and cellular antioxidant properties of astaxanthin. **International Journal of Molecular Science**. 2016, 17(1), 103  
Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/103/htm>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

FELIX, M.B. Canthaxanthin retinopathy.- **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**, Vol 7 item 3, 1988. Disponível em:  
<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15569528809052330>>. Acesso em: 13 abr. 2015.

FUJIWARA, C. ; Salmão proporciona benefícios para o coração e o cérebro. **Minha Vida, Saúde** - 2016. Disponível em: <http://www.minhavidacom.br/alimentacao/materias/18536-salmaaoproporciona-beneficios-para-o-coracao-e-o-cerebro>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

GAUTAM, N. ; Food Colorants and their Toxicology: An Overview **Sunsari Technical College Journal**, 2(1):69-75. 2015.Nepal. Disponível em:  
<<http://www.nepjol.info/index.php/STCJ/article/view/14803>>. Acesso em 02 dez. 2016.

GARONE, M; HOWARD, J.; FABRIKANT, J.; A Review of Common Tanning Methods. **Journal Clin Aesthet Dermatol** v.8(2); 2015  
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4345932/>>. Acesso em: 21 jan. 2017.

GORALCZYK, R; BUSER, S; BAUSCH, J; Bee, W. ; Occurrence of birefringent retinal inclusions in cynomolgus monkeys after high doses of canthaxanthin. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** Vol.38, 741-752 1997  
Disponível em: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161679>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

GRADELET, S.; Astorg, P.; Leclerc, J.; Chevalier, J.; Vernevaut, M. F.; Siess, M. H.; Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic - metabolizing enzymes in the rat. **Xenobiótica** 26, 49-63, 1996. Acesso em 12 abr. 2016.

GREENBERG, N.A.; Enteral nutrition and medical foods having soluble fiber  
**Patent US 5260279 A**

GÜNGÖRMÜŞ, C KILIÇ, A. The safety assessment of food additives by reproductive and developmental toxicity studies. Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy (Ed) InTech, 2006  
Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/28907.pdf>>. Acesso em: 22 mar.2016.

INNIS, S.M.; Polyunsaturated fatty acids in human milk - Protecting Infants Through Human Milk, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Volume 554 pp 27-432004. Disponível em:  
<[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-4242-8\\_5](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-4242-8_5)>. Acesso em: 13 fev.2016.

KITAJKA, K et all.; Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brais gene expression, **Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS USA**, 101(30): 10931–10936. 2004  
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC503722/>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. ; 2010 High Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function and Therapeutics. **The Journal of Lipid Research**, Nov; 54(11): 2950–2963.  
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793600>. Acesso em: 13 abr. 2016.

LEYON, H; ROS, A. M.; NYBERG, S.; ALGVERE, P.; Reversibility of canthaxanthin deposits within the retina- **Acta ophthalmologica** Wiley Online Library 1990. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2125796>>. Acesso em: 15 mar.2016.

LIMA, J. P.; Atividade e Biodisponibilidade dos Carotenóides no Organismo **Revista Ciências em Saúde**. Faculdade de Medicina de Itajubá Vol 2 n.1 2012  
Disponível em: <[http://200.216.240.50:8484/rcsfmit/ojs-2.3.3-3/index.php/rcsfmit\\_zero/article/view/75](http://200.216.240.50:8484/rcsfmit/ojs-2.3.3-3/index.php/rcsfmit_zero/article/view/75)>. Acesso em: 14 fev. 2016.

LINS. J. A. P. N. ; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S. ; CIRIO, S.M.; Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias**, PUC Paraná 2010. Disponível em:  
<[www2.pucpr.br/reol/index.php/academica?dd99=pdf&dd1=4518](http://www2.pucpr.br/reol/index.php/academica?dd99=pdf&dd1=4518)>. Acesso em 10 jan.2017.

LONN, L.; Canthaxanthin retinopathy. **Arch Ophthalmology**, 1987;105(11):1590-1591  
Disponível em: <<http://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/article>>. Acesso em: 14 out.2015.

MAZZA, M.; POMPONI, M.; JANIRI, L.; BRIA, P. ; Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric, **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Volume 31, Issue 1, 2007  
Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584606002983>>. Acesso em: 23 jan.2017.

MERCOSUL; Regulamento Técnico MERCOSUL Sobre “Lista Geral Harmonizada de Alimentares e suas Classes Funcionais” Resolução Nº 384, de 5 de Agosto de 1999  
Disponível em: <<https://prosig.alvessilva.com.br/textos/6310.DOC>>. Acesso em: 23 jan.2017.



MIGUEL JR. A.; Cirrose Hepática - Hepatite Alcoólica. **Medicina Geriátrica Geriatria e Gerontologia**. Disponível em: <http://www.medicinageriatria.com.br/2007/02/21/cirroze-hepatica-por-alcoolismo/>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

MONETTI, M. et al. ; Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver, **Cell Metabolism**, Volume 6, Issue 1, Pages 69–78, 2007  
Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413107001325>>. Acesso em: 11 set. 2016.

MORAIS, F. L. de.; Carotenóides: características biológicas e químicas, Monografia. (Especialização em Qualidade em Alimentos) UNB, Brasília 2007

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 23 nov. 2016.

OLIVEIRA, A. S. de; *et al.*; Efeitos do alcoolismo crônico na morfologia renal de ratos Wistar. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 9, n. 1, 2011. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2011/v9n1/a1723.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

PARKER, R. S.; Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB Journal**. 10(5):542-51. 1996.  
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621054>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

REEVES, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey Jr, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, nov;123(11);1939-51;1993.

RIOS, G.; Salmão Selvagem versus Salmão de Cativeiro. **Flanar e Gastronomia**  
Disponível em: <<https://gustavorios.wordpress.com/2009/07/01/salmaa-selvagem-x-cativeiro>>  
Acesso em 23 fev. 2016.

ROPKE, A.; Canthaxanthin concentration in different colored fillets of farmed rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) in relation to dietary doses. International Council on Exploration of the Sea, Maricult. Cttee, F34: 1-7 1988  
Disponível em: <[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed\\_additives\\_rules\\_scan-old\\_report\\_out81.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed_additives_rules_scan-old_report_out81.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2017.

SILVIA, G. ; MORRISSEY, M.T.; GRAHAM, T.; SALVADOR, G.; Changing trends in seafood markets: the case of farmed and wild salmon. **Journal of Food Products Marketing**, Vol 3: 49- 63. 1996. Disponível em:  
< [http://dx.doi.org/10.1300/J038v03n02\\_05](http://dx.doi.org/10.1300/J038v03n02_05)>. Acesso em : 08 jan. 2017.

STOREBAKKEN, T.; et al.; Carotenoids in diets for salmonids: III. Utilization of canthaxanthin from dry and wet diets by Atlantic salmon, rainbow trout and sea trout, **Aquaculture**, Volume 51, Issues 3–4, , Pages 245-255, 1986. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848686903169>>. Acesso em: 13 mai. 2015.

STRUBE, M. ; Naturally Occurring Antitumorogens. Pt. 4: Carotenoids except beta-carotene. Nordic Council of Ministers, 2009  
Disponível em:  
<<https://books.google.com.br/books?id=MMx43y2i8IsC&pg=PA67&dq=Scientific+Committee+for+Food+%28SCF%29+and+canthaxanthin&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKewi35fPgtgXSAhUJxpAKHTA5DcMQ6AEIGjAA#v=onepage&q=Scientifi>>

c%20Committee%20for%20Food%20(SCF)%20and%20canthaxanthin&f=false>. Acesso em: 13 jan. 2016.

SUJAK, A.; GABRIELSKA, J. ; MILANOWSKA, J.; MAZUREK, P.; Studies on canthaxanthin in lipid membranes, *Biomembranes - Biochemica et Biophysica Acta BBA*, Volume 1712 Issue 1, Pages 17–28 Elsevier 2005. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273605000714>>. Acesso em: 19 set. 2016.

SUJAK, A.; Interactions between canthaxanthin and lipid membranes—possible mechanisms of canthaxanthin toxicity. *Cellular and Molecular Biology Letters, Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* Volume 7- Issue 3, 1988. Disponível em:  
<<https://www.degruyter.com/view/j/cmbles.2009.14.issue-3/s11658-009-0010-8/s11658-009-0010-8.xml>>. Acesso em: 07 jan.2016.

TAKAHASHI, N. S. ; TSUKAMOTO, R. Y. ; TABATA, Y. A. ; RIGOLINO, M. G. ; Truta Salmonada: Processo Produtivo em Constante Aprimoramento no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, RJ, p. 28 - 33, 26 fev. 2008.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.; TEW, K. ; The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, n. 2, p. 100–110, mar. 2004.

TERAO, J.; Antioxidant activity of b-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*. 24:659-661, 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2779372>. Acesso em 23 mar. 2015.

THE EUKARYOTIC LINEAR MOTIF RESOURCE FOR FUNCTIONAL SITES IN PROTEINS (Site)  
<http://elm.eu.org>. Acesso em 21. nov. 2016.

TORRISSEN, O.J; INGEBRIGTSEN, K.; *Tissue distribution of <sup>14</sup>C-astaxanthin in the Atlantic salmon (Salmo salar, Aquaculture*, Volume 108, Issues 3–4, December 1992, Pages 381-385, Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004484869290121Z>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

VALENZUELA, A.B.; NIETO, S.K. ; Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importância en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev Chil Pediatr*. 2003; 74: 149-57.

VALLANDRO, M. J. ; *Avaliação da qualidade microbiológica de Sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre- RS*. Dissertação de mestrado, Porto Alegre: UFRGS, 69p, 2010.

WHO; Canthaxanthin. International Programme on Chemical Safety/World Health Organization (WHO Food Additives Series 35) Disponível em:  
<<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je08.htm>>. Acesso em: 23 jun.2016.