



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMPUS MACAÉ

PROFESSOR ALOÍSIO TEIXEIRA



ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DECORRENTES DO CONSUMO EXCESSIVO DA
CANTAXANTINA UTILIZADA NO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE TRUTAS
SALMONADAS.

BRENDA CINTRA DE SOUZA

Macaé

Abril 2016

BRENDA CINTRA DE SOUZA

Título: Aspectos toxicológicos decorrentes do consumo excessivo da cantaxantina utilizada no processamento tecnológico de trutas salmonadas.

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Juliana Tomaz Pacheco Latini

Co-orientador: Helene Nara Henriques Blanc

Macaé
Abril 2016

C719a Cintra de Souza, Brenda
Aspectos toxicológicos decorrentes do consumo excessivo da cantaxantina utilizada no processamento tecnológico de trutas salmonadas / Brenda Cintra de Souza. -- Rio de Janeiro, 2016. 56 f.

Orientadora: Juliana Tomaz Pacheco Latini. Coorientadora: Helene Nara Henriques Blanc. Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Bacharel em Farmácia, 2016.

1. Truta salmonada. 2. Fraudes. 3. Toxicologia de alimentos. 4. Cantaxantina. 5. Corantes I. Tomaz Pacheco Latini, Juliana, orient. II. Nara Henriques Blanc, Helene, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, mas principalmente:

Aos meus pais, Roosevelt e Isabel.

“Teus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Teu coração sabe compreender quando preciso de um amigo. Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar”.

(Samantha Bader)

“E voltou, então, à raposa:

- Adeus... - disse ele.

- Adeus - disse a raposa. - Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.

- O essencial é invisível aos olhos -repetiu o príncipezinho, para não esquecer.

- Foi o tempo que perdeste com tua rosa que a fez tão importante.

- Foi o tempo que eu perdi com a minha rosa... - repetiu ele, para não esquecer.

- Os homens esqueceram essa verdade - disse ainda a raposa. - Mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. Tu és responsável pela tua rosa...

- Eu sou responsável pela minha rosa... - repetiu o príncipezinho, para não esquecer.”

Da obra “O Pequeno Príncipe”, de Antoine de Saint – Exupéry.

AGRADECIMENTOS

“Dai graças ao Senhor porque ele é bom, eterna é sua misericórdia” (Sal 117,29). À Deus, supremo e único orientador da minha vida.

Durante essa jornada, muitas pessoas entraram e passaram a fazer parte de minha vida colaborando direta ou indiretamente com minha formação pessoal e com a conclusão deste trabalho. Por isso, deixo aqui registrada minha sincera gratidão.

Agradeço à minha orientadora, Professora Juliana Latini, não só pela paciência, orientação, aprendizagem e contribuição em meu desenvolvimento profissional, mas também pela confiança depositada em mim.

À minha co-orientadora, Professora Helene Nara, pela paciência, atenção e ensinamentos histológicos essenciais para a conclusão deste trabalho.

À professora Kátia Lenzi pela colaboração durante todo o projeto, conhecimento e ajuda na análise estatística dos dados.

Às minhas companheiras de projeto, Professora Marta, Raiane, Thamyres, Thayana e Talita pela ajuda no cuidado dos animais e nas etapas de realização desse trabalho e a Carol pelos treinamentos dados na utilização do micrótomo e emblocamento para as análises histológicas.

Ao professor Clemilson pelas análises do perfil sorológico dos animais.

Ao pessoal do LABNE/UFF pela ajuda na elaboração das rações experimentais e pelas análises da composição centesimal.

À Flávia Calixto, pesquisadora da Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (Fiperj), pela escolha das amostras de pescado utilizadas nesse trabalho.

Ao professor Shaft pelas análises cromatográficas.

Às minhas companheiras de jornada Aline, Patrícia, Luana, Desirré que se tornaram verdadeiras amigas. Cada qual com seu jeito peculiar, agradeço pelo convívio, pelas risadas e momentos de descontração, pelos apuros, sofrimentos, preocupações e apoio ao longo desses 5 anos.

À Livia por ter me recebido tão bem em sua casa, pelas sessões de desabafo e companhia.

A toda a minha família pelo incentivo e apoio a cada nova etapa da minha vida. Vocês são muito importantes pra mim, sou eu que tenho orgulho de vocês.

À minha avó Iraide, em memória, por todo apoio, pela força, pelo amor enquanto estive conosco. Levarei a senhora pra sempre em meu coração. Te amo.

Ao meu irmão querido, por simplesmente existir na minha vida.

Aos meus pais que nunca deixaram de me incentivar e apoiar. Obrigada por me fazerem ser o que sou hoje, pelas palavras, carinho e amor. Minha admiração por vocês é imensa, obrigada por serem meu porto seguro.

À minha avó Maria por cuidar de mim todos os dias, pela preocupação, amor e chocolates.

Às minhas cachorrinhas, Sol e Lua, pelos momentos de descontração, brincadeiras e carinho.

Aos camundongos.

LISTA DE ABREVIACOES

AG	Ácidos graxos
AIN	American Institute of Nutrition
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AST	Aspartato aminotransferase
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CCAC	Canadian Council on Animal Care
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT	Colesterol total
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FIPERJ	Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro
g	Gramas
GC	Grupo Cantaxantina
GCC	Grupo Controle Caseína
GTS	Grupo Truta Salmonada
H&E	Hematoxilina e Eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
hs	Horas
IMCT	Instituto de Macaé de Ciência e Tecnologia
IP	Intraperitoneal
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Ltda	Limitada
Ltda-ME	Micro Empresa Limitada
mg	Miligramas
mg/dL	Miligramas por decilitro
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
°C	Grau Celsius

Pc	Peso corporal
PE	Pernambuco
PER	Protein Efficiency Ratio
Pvalor	Nível descritivo
RJ	Rio de Janeiro
RPM	Rotações por minuto
S	Significância
S/A	Sociedade anônima
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
SFA	Ácidos graxos saturados
SP	São Paulo
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGL	Triglicerídios
U/L	Unidades por litro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VET	Valor energético total
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Equação de redução do ânion superóxido (O_2^-) pelo carotenóide 19
- Figura 2** - Estrutura química da Cantaxantina 20
- Figura 3** - Fotomicrografias de fígado de camundongos tratados com truta salmonada... 35 e cantaxantina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes adicionados para o preparo das rações (g/100g).....	28
Tabela 2 - Composição centesimal das rações experimentais, representada em g/100g... de dieta	31
Tabela 3 - Variação de peso, consumo de ração, consumo de proteína e <i>Protein</i> <i>Efficiency Ratio</i> (PER) dos animais após 28 dias	32
Tabela 4 - Perfil Sorológico dos animais ao final de 60 dias	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - <i>Protein Efficiency Ratio</i> (PER) dos animais após 28 dias	33
Gráfico 2 - Valores de colesterol total	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Industrialização de alimentos	18
2.2 Carotenoides como conservantes.....	19
2.3 Cantaxantina	20
2.4 Fraudes Alimentares	22
2.5 Toxicologia da Cantaxantia	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Materiais	27
4.1.1 Grupos experimentais	27
4.1.2 Preparo das rações experimentais.....	27
4.2 Métodos	29
4.2.1 Análises Físico-Químicas	29
4.2.2 Variação de peso e perfil alimentar dos animais	29
4.2.3 Coeficiente de eficácia proteica.....	29
4.2.4 Determinação do perfil sorológico dos animais	29
4.2.5 Histopatológicos	30
4.2.6 Análise estatística	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Composição Centesimal das rações experimentais	31
5.2 Variação de peso, perfil alimentar dos animais e PER.....	32
5.3 Perfil sorológico dos animais.....	33
5.4 Histopatológicos	35
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÕES	41
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
9 ANEXO	48
Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal	48

RESUMO

A cantaxantina é um corante muito utilizado em pescados de cativeiro, em especial o salmão e a truta. É utilizada em fraudes alimentares com trutas salmonadas, que acabam sendo comercializadas como salmão devido à cor laranja da cantaxantina. Porém, seu uso, mesmo em pequenas quantidades, resulta em riscos para a saúde, como a retinopatia por excesso de cantaxantina e alterações hepatológicas, como aumento da atividade das enzimas hepáticas. Tendo em vista a escassez de trabalhos publicados, objetiva-se avaliar os aspectos toxicológicos associados ao consumo excessivo de cantaxantina. No ensaio biológico de 60 dias, foram utilizados 21 camundongos swiss (*Mus musculus*), machos, divididos em três grupos experimentais (n=7): Grupo Controle Caseína (GCC): animais alimentados com ração à base de caseína, recebendo água *ad libitum*; Grupo Controle + Truta Salmonada (GTS): animais alimentados com ração à base de caseína + 6% de truta salmonada liofilizada, recebendo água *ad libitum*; e Grupo Controle + Cantaxantina (GC): animais alimentados com ração à base de caseína, recebendo adição de 6% de suplemento de cantaxantina e água *ad libitum*. Durante o ensaio biológico, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em ambiente com temperatura constante (22°C ± 2°C) e iluminação controlada (ciclo claro e escuro de 12/12 horas). A caracterização da composição centesimal das amostras de pescado e de rações experimentais se deu de acordo com as técnicas descritas por Gonçalves (2009). Para a determinação da eficácia protéica das rações através do *Protein Efficiency Ratio* (PER) foi realizada a pesagem dos animais e das rações ofertadas duas vezes por semana para verificar a quantidade ingerida de cada animal e variação de peso dos mesmos. Ao final do experimento, estes foram anestesiados com tiopental (Tiopentax® - 0,6 ml/100g pc, i.p.) para a coleta do sangue, que foi centrifugado e o soro obtido utilizado para quantificação do perfil sorológico (colesterol total (CT), triglicerídios (TGL) e AST (aspartato aminotransferase)). Os fígados foram removidos e armazenados em formalina a 10% por 48h, incluídos em parafina e corados pelo método histológico da hematoxilina & eosina. As alterações celulares encontradas neste material foram lidas em microscópio óptico observando-se a presença de figuras de mitose, binucleação, esteatose, megalocitose, presença de infiltrado inflamatório, hemorragia, hiperemia, necrose e fibrose. Os resultados demonstram que as rações experimentais estavam de acordo com o previamente balanceado. Os valores de PER obtidos foram: GCC 2,343; GC 1,506 e GTS 1,010. Observamos que o GTS se apresentou significativamente inferior ao GCC e GC, sendo p= 0,0006, sugerindo uma ação negativa da cantaxantina. Não foi observada diferença estatística entre os grupos para os valores de AST, TGL e CT. Os resultados histopatológicos demonstraram que o grupo controle apresentou arquitetura hepática normal. O grupo cantaxantina e truta salmonada apresentaram megalocitose e binucleação. Em um dos animais do grupo truta salmonada foi observada esteatose hepática e hiperemia. Concluímos que a cantaxantina apresentou toxicidade no que se refere à alimentação dos animais. Entretanto, acreditamos ser necessário um tratamento por maior período de tempo para que seu efeito seja mais bem compreendido.

Palavras-chave: cantaxantina, truta salmonada, fraudes, toxicologia de alimentos, corantes.

ABSTRACT

Canthaxanthin is a dye widely used in captive fish, especially salmon and trout. It is used in food fraud salmonadas trout, which end up being marketed as salmon because of the orange canthaxanthin. However, its use, even in small quantities, resulting in health risks, such as retinopathy excess canthaxanthin and changes in the liver, as increased activity of liver enzymes. Given the scarcity of published works, the objective is to evaluate the toxicological aspects associated with excessive consumption of canthaxanthin. In bioassay 60 days, were used 21 Swiss mice (*Mus musculus*), males, divided into three groups (n = 7): control group Casein (GCC): animals fed diets based on casein, receiving water ad libitum ; Group Control + salmon trout (GTS): animals fed diets based on casein + 6% freeze-dried salmon trout, receiving water ad libitum; and Group Control + Canthaxanthin (GC): animals fed with diet based on casein, receiving the addition of 6% canthaxanthin supplement and water ad libitum. During the assay, the animals were housed in polypropylene cages in environment with constant temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and controlled illumination (light and dark cycle of 12/12 hours). The characterization of the chemical composition of the samples and experimental fish feed was in accordance with the techniques described by Goncalves (2009). To determine the protein efficiency of feed through the Protein Efficiency Ratio (PER) was performed weighing the animals and the feed offered twice a week to check the consumed amount of each individual animal weight change thereof. At the end of the experiment, they were anesthetized with thiopental (Tiopentax® - 0.6 ml / 100 g bw, ip) for blood collection, which was centrifuged and the serum obtained used to quantify the serologic profile (total cholesterol (TC) triglycerides (TGL) and AST (aspartate aminotransferase)). Livers were removed and stored in 10% formalin for 48 hours, embedded in paraffin and stained for histological hematoxylin & eosin method. The cellular changes found in this material were read in light microscope observing the presence of mitotic figures, binucleation, steatosis, megalocytosis, presence of inflammatory infiltrate, hemorrhage, hyperemia, necrosis and fibrosis. The results demonstrate that the experimental diets were in agreement with previously balanced. The PER values were obtained: 2.343 GCC; GC 1,506 and 1,010 GTS. We note that the GTS performed significantly lower than the GCC and GC, $p = 0.0006$, suggesting a negative action canthaxanthin. There was no statistical difference between the groups for AST, TGL and CT. Histopathological results showed that the control group showed normal liver architecture. The canthaxanthin and salmon trout group had megalocytosis and binucleation. In one of the animals of the sea trout group was observed hepatic steatosis and hyperemia. We conclude that canthaxanthin showed toxicity in relation to animal nutrition. However, we believe the need for a treatment for a longer period of time so that its effect is better understood.

Keywords: canthaxanthin, salmon trout, fraud, food toxicology, dyes.

1. Introdução

Antigamente, a produção e a fabricação dos alimentos eram realizadas na mesma região ou em regiões próximas às de comercialização. Dessa forma, com o aumento da industrialização e da globalização, assim como a produção e a fabricação de alimentos em regiões longínquas, houve a necessidade de se criar estratégias para manter a qualidade e a integridade dos alimentos como, por exemplo, a utilização de aditivos alimentares (ANTUNES e ARAÚJO, 2000). Dentre esses aditivos destaca-se a cantaxantina, carotenoide ainda pouco estudado.

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis (GOODWIN, 1986) pertencentes à família dos tetraterpenos sendo divididos em duas classes: os carotenoides não polares, como o β -caroteno, e as xantofilas polares, como a cantaxantina, que possuem pelo menos um átomo de oxigênio (TAPIERO et al, 2004). Suas propriedades antioxidantes devem-se a alta capacidade de sequestrar radicais livres e desativar espécies reativas de oxigênio, o 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).

Dentre os carotenoides, a cantaxantina foi relatada como sendo o antioxidante mais potente (TERAO, 1989). Possui a capacidade de ser supressor eficiente de oxigênio singlete e eficaz sequestrante de radicais livres. Dentro das membranas, tanto a cantaxantina quanto os carotenoides podem ser considerados parte integrante do sistema antioxidante, além de ter sido demonstrada sua capacidade de alteração das membranas lipídicas (SUJAK et al, 2005). Surai (2012) demonstrou esse efeito protetor sob várias condições de estresse. Em um estudo realizado por Shih e colaboradores (2008), *in vivo*, foi demonstrado haver uma relação inversamente proporcional entre a capacidade antioxidante da xantofila e a sua concentração. Embora utilizada como conservante, é utilizada também em fraudes alimentares.

Como corante alimentar, a cantaxantina vem sendo muito utilizada em rações para aves de pequeno porte e em pescados de cativeiro, em especial o salmão (*Salmo salar*). Este é um peixe que apresenta alto valor comercial, dessa forma seu comércio deve ser constantemente monitorado, já que fraudes podem ser facilmente realizadas por parte dos comerciantes ao colocar outra espécie como, por exemplo, a truta salmonada, sendo comercializada como salmão (VALLANDRO, 2010).

A truta salmonada é obtida a partir da adição do corante cantaxantina e/ou astaxantina na alimentação do pescado para que se consiga uma coloração mais alaranjada na carne, que acaba por se assemelhar sensorialmente com o salmão (BUCK, 2010), embora apresente

menor valor nutricional e significativo menor custo de produção (DA SILVA et al, 2012). O consumidor, ao comprar a truta salmonada por preço semelhante ao salmão, é ludibriado, uma vez que existem diferenças entre os dois tipos de pescado, caracterizando a fraude alimentar.

Apesar da atividade antioxidante, o uso da cantaxantina mostrou resultar em riscos para a saúde, como é o caso da retinopatia por excesso de cantaxantina. Esta patologia está associada à deposição de cristais formados a partir de um complexo cantaxantina-lipoproteína na mácula lútea do olho. Está relacionada também com danos nos vasos sanguíneos em torno do local, além de crescimento de novos vasos anormais (DAICKER et al, 1987; HARNOIS et al, 1989). 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 acredita-se que 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. Além da retinopatia, seu uso como autobronzeador tem sido associado à anemia aplásica e danos no fígado (LOBER, 1985; ROUSSEAU, 1983; BLUHM et al, 1990).

2. Referencial Teórico

2.1 Industrialização de Alimentos

Ao longo dos anos, a fabricação e o preparo dos alimentos tem se modificado muito, principalmente quanto as suas formas de distribuição e apresentação ao consumidor. No passado, os alimentos eram provenientes da região onde eram produzidos ou de regiões muito próximas. Atualmente, boa parte dos alimentos é proveniente de regiões longínquas e necessitam freqüentemente de aditivos para manter a sua integridade (ANTUNES e ARAUJO, 2000).

Com o avanço da indústria química, a indústria alimentícia passou a utilizar um grande número de aditivos nos alimentos, para melhorar as condições de armazenagem e oferecer alimentos seguros, e assim atender às expectativas do mercado consumidor. Elas desempenham um papel importante no desenvolvimento de alimentos, porém, nos últimos anos, os consumidores tornaram-se cada vez mais cautelosos sobre segurança alimentar, pois o uso dos aditivos alimentares está entre os mais controversos (HONORATO et al, 2013).

A Portaria nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997, define que: “aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais” (BRASIL, 1997).

Dentre os aditivos, os pigmentos e corantes são muito utilizados na indústria alimentícia, tendo como objetivo geral melhorar a apresentação do alimento ao consumidor. São utilizados na produção de alimentos e bebidas no intuito de compensar a perda da cor durante a fabricação e estocagem, garantir a uniformidade da cor e atribuir coloração àqueles originalmente incolores (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).

Dentre os principais benefícios da utilização de corantes têm-se, adicionalmente, suas propriedades antioxidantes que podem proteger os alimentos prevenindo a oxidação de matérias primas alimentares estendendo sua vida de prateleira (DECKER et al, 2005). Este é o caso dos carotenoides, grupo onde está presente a cantaxantina.

2.2 Carotenoides como conservantes

Os carotenoides pertencem à família dos tetraterpenos e são representados por mais de 600 variantes estruturais naturais conhecidas. São sintetizados em plantas, fungos, bactérias e algas. O metabolismo humano não é capaz de produzir estas substâncias e depende da alimentação para obtê-las, pois muitas delas se convertem em vitamina A no organismo. São divididos em duas classes, carotenos, contendo apenas átomos de carbono e hidrogênio, e oxocarotenoides (xantofilas), que possuem pelo menos um átomo de oxigênio (TAPIERO et al, 2004; ZERAIK e YARIWAKE, 2008).

Os carotenoides são antioxidantes que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres a partir da doação de um elétron. Podem ser definidos como compostos que protegem as células contra os efeitos danosos dos radicais livres oxigenados e nitrogenados, formados nos processos oxidativos. Os radicais livres em excesso geram um desbalanço, dando início ao estresse oxidativo, processo metabólico responsável pelo desencadeamento de diversos tipos de doenças crônico-degenerativas (SANTOS et al, 2010; SOARES D. G. et al, 2005). Na figura 1 pode-se observar a reação de redução do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelo β -caroteno devido à capacidade do carotenoide de doar elétrons para espécies reativas de oxigênio. (RIOS et al, 2009)



Fig 1. Equação de redução do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelo carotenoide (RIOS et al, 2009)

Os antioxidantes naturais, como os carotenoides, estão recebendo maior atenção por poderem representar uma alternativa às substâncias sintéticas, como o butil-hidroxi-tolueno (BHT, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) ou o butil-hidroxi-anisol (BHA, mistura dos isômeros 2-terc-butil-4-metoxifenol e 3-terc-butil-4-metoxifenol), usadas como conservantes alimentares. Dentre os pigmentos naturais, os carotenóides tem sido os mais adicionados em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais (ZERAIK e YARIWAKE, 2008).

Tem sido proposto que alguns tipos de carotenoides, como β -caroteno e cantaxantina, podem reduzir o risco de aparecimento de câncer assim como suas propriedades antioxidantes podem ajudar a evitar o aparecimento de outras doenças que se crê serem iniciadas por radicais livres como, aterosclerose, cataratas, degeneração macular relacionada com a idade e a esclerose múltipla (EDGE et al, 1997).

A cantaxantina, assim como outros carotenoides que possuem grupos oxo na posição 4 (4') no sistema de anel β -ionona, são antioxidantes mais eficazes do que o β -caroteno na peroxidação lipídica radical dependente (TERAO, 1989).

2.3 Cantaxantina

A cantaxantina pertence a um grupo de carotenoides conhecido como xantofilas. Consiste predominantemente de todo trans β -caroteno-4,4'-diona (Fig. 2) em conjunto com quantidades menores de outros carotenoides. Apresenta estrutura de anel no final da cadeia da dupla ligação conjugada com função polar (ZARIPHEP e ERDMAN, 2002; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010).

É um pigmento que pode ser encontrado em frutas, vegetais, e peixes e sua presença no tecido humano é resultante, exclusivamente, da ingestão alimentar. Possui uma tonalidade que passa do vermelho ao laranja sendo utilizado basicamente para corar alimentos, bronzeamento de pele, (GUPTA et al, 1985) pigmentação de ovos ou carnes de galinhas poedeiras, frango, salmão e truta (FURUSAWA, 2011).

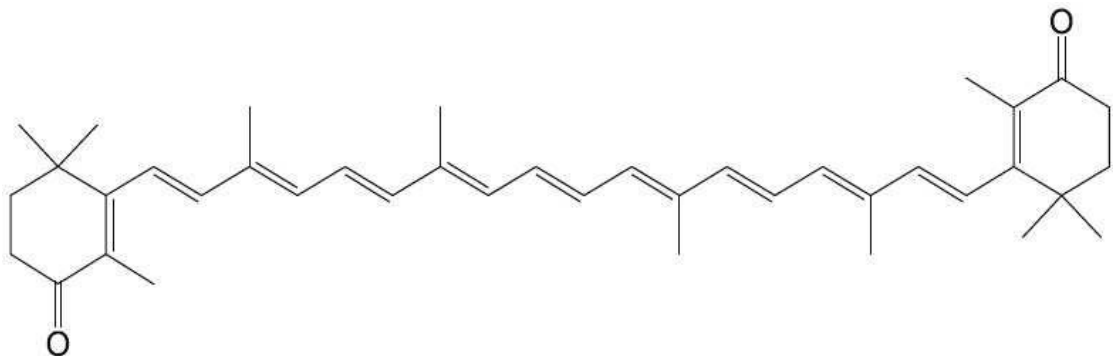


Fig 2. Estrutura química da Cantaxantina (FURUSAWA, 2011)

A absorção da xantofila ocorre com seu movimento ou de seu metabólito ativo através das células da mucosa até o sistema porta onde primeiramente, deve ser liberada de sua matriz alimentar. A segunda etapa de absorção é a transferência da xantofila para micelas lipídicas no intestino delgado, o que requer a presença de gordura alimentar para estimular a vesícula biliar a liberar os ácidos biliares que atuam como emulsionantes. Em seguida são absorvidas pelas micelas mistas de lipídeos no lúmen do intestino delgado, provavelmente orientando-se na superfície da micela, onde são levadas através do quimo hidrofílico no intestino à superfície de células da mucosa intestinal. Após isso ocorre a absorção, onde as xantofilas se difundem passivamente através da membrana celular e são liberadas no enterócito. São, então,

incorporadas em quilomicrons e finalmente entregues a corrente sanguínea (ZARIPHEH, 2002).

É postulado que os componentes não triglicéridicos do quilomicron, incluindo moléculas de superfície, tais como as xantofilas, podem ser tomados pelos tecidos extra-hepáticos ou transferidos para outras lipoproteínas do sangue. Eventualmente, o quilomicron remanescente, incluindo as xantofilas restantes, é tomado pelo fígado. Logo após, as xantofilas podem permanecer no fígado ou serem transportadas para a corrente sanguínea através de VLDL. Elas são, então, transferidas para a LDL e HDL com a maturação das lipoproteínas (ZARIPHEH, 2002).

A cantaxantina é importante não somente por fornecer colorações maravilhosas, mas, também, por desempenhar importantes funções biológicas como antioxidantes para reduzir o estresse oxidativo. Não apresenta atividade de pró-vitamina A, porém se mostrou mais potente que outros carotenoides (TERAO, 1989). Essas tensões oxidativas causadas por espécies reativas de oxigênio como, por exemplo, superóxido, radicais hidroxil e peroxil, peróxido de hidrogênio e outros, podem ser neutralizadas pela cantaxantina, por meio do seqüestro eficaz destas espécies através de reações químicas com a porção polieno conjugado nas estruturas (CHOI e KOO, 2005).

Terao (1989) demonstrou que a atividade antioxidante apresentada pela cantaxantina e astaxantina durou mais tempo do que a apresentada pelo β -caroteno e zeaxantina devido a realização de uma substituição na estrutura de um átomo de hidrogênio por um grupo oxo na posição 4 (4') no sistema de anel β -ionona. Em 2002, um estudo realizado por Surai também demonstrou que a cantaxantina foi bastante eficaz como antioxidante para medidas de prevenção para formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), formação de hidroperóxido lipídico, quebra de DNA e outros.

A cantaxantina, assim como os carotenoides, pode ser considerada parte integrante do sistema antioxidante por possuir capacidade de ser supressor eficiente de oxigênio singlete e eficaz sequestrante de radicais livres sob várias condições de estresse. Além disso, foi demonstrada sua capacidade de alteração das membranas lipídicas (SUJAK et al, 2005; SURAI, 2012). Em um estudo realizado por Shih e colaboradores (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. Por ser um corante natural e possuir excelente capacidade antioxidante, acaba sendo utilizada em fraudes alimentares.

2.4 Fraudes Alimentares

As fraudes em alimentos são alterações, adulterações e falsificações realizadas com a finalidade de obtenção de maiores lucros. Estas operações procuram ocultar ou mascarar as más condições estruturais e sanitárias dos produtos e atribuir-lhes requisitos que não possuem (TEIXEIRA et al, 2014). Considera-se fraude, os artificios usados sem o consentimento oficial, resultado da modificação de um produto, visando lucro ilícito e que não fazem parte de uma prática universalmente aceita (KOLICHESKI, 1994).

As fraudes em alimentos são praticadas em diversas modalidades, desde a mais grosseira que nos leva a uma imediata percepção, a mais astuta e difícil de ser identificada. Pode-se classificá-las em quatro grandes grupos: fraudes por alteração, por adulteração, por falsificação e por sofisticação (TEIXEIRA et al, 2014).

A falsificação é a modalidade de fraude levada a efeito na ocasião da venda do produto e consiste em enganar o consumidor, induzindo-o a adquirir o alimento de nível inferior, julgando-o de categoria superior. A falsificação de alimentos pode proceder de diferentes maneiras: quanto à qualidade; quanto ao peso; quanto à apresentação; quanto à procedência; quanto à propaganda. Em relação à qualidade, este tipo de falsificação está relacionado com a categoria do produto, como se este fosse de alta qualidade, quando na verdade é de classe inferior (TEIXEIRA et al, 2014). Como exemplo tem-se a truta salmonada sendo comercializada como salmão, sendo aquele um pescado de menor valor nutricional e significativo menor custo de produção (DA SILVA et al, 2012).

Algumas operações de aquacultura utilizam aditivos de cor como a cantaxantina e/ou astaxantina na alimentação para dar uma cor mais laranja à carne de salmão e/ou truta. A carne das variedades exploradas destes peixes seria, se não fosse por esses aditivos de cor, uma cor mais pálida, menos atraente. Sob determinadas condições, o uso destes aditivos nos alimentos para peixes salmonídeos é permitido, sendo na ordem de 25mg/Kg de peixe de acordo com o Decreto-Lei nº322/2003, desde que os peixes estejam devidamente rotulados para identificar que este tratamento foi utilizado. Entretanto, esses pescados, onde os aditivos têm sido usados para realçar a cor, são suscetíveis de serem indevidamente rotulados e este produto de forma fraudulenta e enganosamente comercializado como salmão "selvagem" (BUCK, 2010).

O salmão é um peixe de alto valor comercial. Dessa forma, seu comércio deve ser monitorado constantemente, já que fraudes podem ser facilmente realizadas colocando outra espécie, como a truta salmonada, por apresentar características morfológicas e sensoriais semelhantes às do salmão (VALLANDRO, 2010). A truta salmonada apresenta a coloração

da carne muito semelhante à do salmão, no entanto, apresenta um valor nutricional menor e um custo de produção significativamente menor quando comparado ao custo de produção do salmão, que vive em águas salgadas enquanto a truta pode ser facilmente cultivada em tanques de piscicultura (SOSISNKI, 2004).

O salmão e a truta pertencem à família dos Salmonídeos e são classificados como “pescado branco”. A característica cor vermelho-rosa da carne de salmonídeos, um importante critério de qualidade para os agricultores e os consumidores, é devido à capacidade destes peixes para combinar xantofilas, tais como astaxantina e cantaxantina, com complexos de actomiosina em músculos (BRIZIO et al, 2013). É de grande importância econômica que a carne seja pigmentada para atender as preferências dos consumidores. A pigmentação do músculo é devido à deposição de carotenoides dietéticos, cantaxantina e astaxantina, que o peixe não pode sintetizar, sendo obtidos principalmente a partir da alimentação de crustáceos que contém os pigmentos em sua composição. (SALVADOR et al, 2009). Dessa forma, a presença do carotenoide em pequena concentração no salmão selvagem não acarreta em risco para o consumidor.

Nos peixes criados em aquacultura o uso da cantaxantina sintética é uma fonte de carotenoides na dieta (SALVADOR et al, 2009). Contudo, seu uso em excesso pode trazer riscos à saúde do consumidor, pois apresenta aspectos toxicológicos, como por exemplo, a retinopatia por cantaxantina.

2.5 Toxicologia da Cantaxantina

Apesar de relatado sua atividade antioxidante, o uso da cantaxantina em excesso demonstrou riscos para a saúde como é o caso da retinopatia por cantaxantina causada principalmente pela formação de cristais nas membranas da mácula lútea da retina (SUJAK, 2009). A maioria dos pacientes com retinopatia por cantaxantina permanecem assintomáticos, porém podem apresentar defeitos do campo visual, diminuição da acuidade visual, teste eletrorretinograma anormal e de baixo limiar de luminância estática (BEAULIEU et al, 2013).

A retinopatia é um termo que se refere a formas de danos não-inflamatórios na retina que são muitas vezes progressivos, e pode resultar em cegueira ou severa perda de visão. A ingestão de cantaxantina está associada com depósitos cristalinos birrefringentes, amarelo ou vermelho dourado na retina em torno da mácula (SUJAK, 2009). Daicker e colaboradores (1987) concluíram, pelo grande número e tamanho dos cristais e a quantidade relativamente pequena de cantaxantina isolada, que os cristais presumivelmente representam um complexo cantaxantina-lipoproteína, ao invés de cantaxantina sozinha. Foi relatado que a retinopatia por

cantaxantina está relacionada principalmente a danos nos vasos sanguíneos em torno do local de deposição do cristal e o crescimento de novos vasos sanguíneos anormais.

A toxicidade da cantaxantina em relação às membranas lipídicas foi relacionada como o resultado da forte interação entre o corante e moléculas de lipídios e da formação de agregados cristalinos de cantaxantina em membranas, mesmo em concentrações muito pequenas, o que afetaria as propriedades físicas das paredes dos capilares da retina resultando na destruição da vasculatura retiniana e no desenvolvimento de retinopatia. Os mecanismos propostos relacionam-se a formação de agregados da cantaxantina com as moléculas lipídicas, forte interação de *Van der Waals* entre a cadeia da cantaxantina e do lipídio, modificações nas propriedades do lipídeo, introdução de novas fases termotrópicas nos lipídeos e formação de ligações de hidrogênio entre grupos da cantaxantina e dos lipídeos, bem como entre a cadeia polieno do carotenoide e a água. Acredita-se que este último seja crucial para a formação dos agregados (SUJAK, 2009; SUJAK et al, 2005).

Bluhm e colaboradores relataram, em 1990, um caso de anemia aplásica com desfecho fatal de uma mulher de vinte anos de idade, que há cerca de quatro meses antes da hospitalização utilizou cápsulas contendo cantaxantina com a finalidade de bronzeamento corporal, que foi fornecido por um salão comercial de bronzeamento. A coloração fornecida à pele deve-se a deposição do pigmento na epiderme e gordura subcutânea sem estimulação da síntese de melanina. Tem sido utilizada experimentalmente em pacientes com fotodermatoses e distúrbios da pigmentação. A cantaxantina pode permanecer no corpo por longos períodos, assim como foi observada sua presença no plasma de indivíduos saudáveis que doaram sangue vários meses depois do término da utilização das cápsulas. Contudo, a frequência dos efeitos adversos associados ao uso da cantaxantina como a supressão da medula óssea ainda são desconhecidos (MACDONALD et al, 1984). O uso de cápsulas de cantaxantina destinadas ao bronzeamento demonstrou causar, também, retinopatia (ROUSSEAU, 1983), urticária (JUHLIN, 1981) e desordens no fígado (SHIH et al, 2008).

Em relação ao fígado, estudos *in vivo* revelaram alterações como aumento da atividade das enzimas hepáticas (ex. superóxido dismutase e glutatona redutase) e aumento do peso do fígado nas fêmeas (SHIH et al, 2008). Um estudo realizado por Palozza e colaboradores (2000), demonstraram que a cantaxantina pode alterar a proteção contra o estresse oxidativo *in vivo*, o que poderia justificar o duplo papel de carotenoides como antitumoral ou agentes promotores de tumor. Quando a atividade pró-oxidante dos carotenoides ocorre em células normais, o que poderia gerar danos oxidativos, pode ocorrer diminuição da integridade celular e/ou indução da transformação neoplásica. Em contrapartida, quando os carotenoides atuam

como pró-oxidantes em células já transformadas, que exibem baixas defesas antioxidantes, estes podem ter efeitos benéficos, inibindo o crescimento do tumor. (MASOTTI et al, 1988)

Além disso, a cantaxantina foi capaz de interagir com medicamentos, uma vez que foi relatado atuar como indutora substancial de enzimas responsáveis pela metabolização de fármacos. Essa interação pode levar a efeitos adversos severos ou falha terapêutica (GRADELET et al, 1996).

Sendo assim, devido à escassez de trabalhos publicados acerca desse tema, esse trabalho visa avaliar os aspectos toxicológicos da ingestão excessiva da cantaxantina utilizada no processamento tecnológico de trutas salmonadas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os aspectos toxicológicos hepáticos associados ao consumo excessivo de cantaxantina em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar a composição centesimal das rações experimentais utilizadas;
- 2) Avaliar a qualidade proteica das rações a partir da determinação do Coeficiente de Eficiência Proteica (PER) dos animais;
- 3) Determinar o perfil sorológico a partir dos valores de colesterol total (CT), triglicéridios (TGL) e AST (aspartato aminotransferase) dos camundongos;
- 4) Realizar avaliação histopatológica dos fígados dos camundongos;
- 5) Comparar os dados dos grupos experimentais, caracterizando, assim os efeitos da cantaxantina.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

O projeto foi submetido à avaliação ética pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFRJ/Campus Macaé e aprovado sob o protocolo MAC034 (Anexo 1).

No ensaio biológico de 60 dias, foram utilizados 21 camundongos swiss (*Mus musculus*), machos, provenientes da colônia do Instituto de Macaé de Ciência e Tecnologia (IMCT/UFRJ), que formaram os grupos experimentais descritos a seguir.

4.1.1 Grupos Experimentais

Posteriormente ao desmame, realizado no 21º dia de vida, os animais foram, então, aleatoriamente divididos em três grupos (n=7): Grupo Controle Caseína (GCC): animais alimentados com ração à base de caseína, recebendo água *ad libitum*; Grupo Controle + Truta Salmonada (GTS): animais alimentados com ração à base de caseína + truta salmonada liofilizada, recebendo água *ad libitum*; e Grupo Controle + Cantaxantina (GC): animais alimentados com ração à base de caseína, recebendo adição de 6% de suplemento de cantaxantina e água *ad libitum*.

A utilização desse percentual referente à cantaxantina se deu após a compilação de dados da literatura de autores que trabalharam com valores semelhantes. Dessa forma, se adicionou 6% de suplemento de cantaxantina.

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) durante todo o período experimental.

4.1.2 Preparo das Rações Experimentais

As amostras de truta salmonada foram doadas pela Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ) de modo que não só possamos garantir a inocuidade das mesmas, mas também a variedade e espécie de pescado usado, atestado por veterinário responsável da Instituição. O suplemento de cantaxantina utilizado foi adquirido em comércio local em lojas varejistas especializadas em criação de animais.

A truta salmonada foi submetida ao processo de liofilização, onde o pescado foi levado ao congelamento à -80°C e em seguida encaminhado para o liofilizador por aproximadamente 6 horas. Após a liofilização, esta foi passada no multiprocessador e em seguida em peneira para a obtenção de um pó (TATTINI JR et al, 2006).

As rações foram formuladas através da mistura dos ingredientes com água até a obtenção de massa com textura homogênea. Em seguida essa massa foi peletizada, levada à estufa e seca por 24hs. Após este tempo, foi ensacada, lacrada e armazenada em geladeira (4°C) até posterior uso.

Em todas as rações foram adicionadas misturas de minerais e de vitaminas, seguindo as recomendações da *American Institute of Nutrition* (AIN 93G) (REEVES, 1993) (Tabela 1).

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

Grupos Ingredientes	GCC	GTS	GC
Caseína ^a	10,87	6,35	18,92
Truta Salmonada ^b	-	21,70	-
Suplemento de Cantaxantina ^c	-	-	6,00
Amido ^d	62,08	50,11	48,03
Açúcar ^e	10,00	10,00	10,00
Óleo ^f	7,00	1,79	7,00
Mistura de minerais ^g	3,50	3,50	3,50
Mistura de vitaminas ^h	1,00	1,00	1,00
Celulose ⁱ	5,00	5,00	5,00
B-colina ^j	0,25	0,25	0,25
Cistina ^k	0,30	0,30	0,30
Total	100,00	100,00	100,00
VET ^l	394,8	388,75	417,76

^a Comércio e Indústria Farnos Ltda. (Rio de Janeiro RJ, Brasil); ^b Netuno Alimentos S/A (Imbiribeira, Recife, PE); ^c Adquirido em comércio local; ^d Maizena da Unilever Bestfoods Brasil Ltda. (Mogi Guaçu, SP, Brasil); ^e União (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); ^f Liza da Cargill Agricultura Ltda. (Mairinque, SP, Brasil); ^{g, h} PragSoluções Comércio e Serviços Ltda-ME (Jáu, SP, São Paulo); ⁱ Microcel da Blanver Ltda. (Cotia, SP, Brasil); ^{e, j, k} M. Cassab Comércio e Indústria Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). ^l VET – Valor Energético Total.

4.2 Métodos

4.2.1 Análises Físico-químicas

Para composição centesimal das rações experimentais, as características físico-químicas estudadas compreenderam: teor de umidade, proteína bruta, lipídios totais e cinzas. As análises foram realizadas em triplicatas segundo a metodologia descrita por GONÇALVES, 2009.

4.2.2 Variação de peso e Perfil alimentar dos animais

Foi realizada a pesagem dos animais duas vezes por semana em balança da marca FILIZOLA®, com capacidade máxima de 3 kg e precisão de 0,5g. Os animais foram pesados individualmente, suspensos pelo terço distal caudal e colocados em recipiente de polipropileno com a balança previamente tarada, determinando-se assim a variação de peso dos mesmos (SOARES et al, 2005). As rações ofertadas foram pesadas na mesma balança em dias alternados para verificar a quantidade ingerida de cada animal. Contabilizou-se a oferta e o resto de ração dos animais.

4.2.3 Coeficiente de eficácia proteica (PER)

O PER foi determinado através do método de Osborne, Mendel e Ferry, de acordo com a AOAC, método esse que relaciona o ganho de peso dos animais com o consumo de proteína e esses são comparados a uma proteína padrão, nesse caso à caseína. Assumindo que ocorre variação do total de proteína corporal motivada por diferenças da qualidade protéica da dieta, é comum medir-se a variação do peso corporal como um reflexo global da atuação da proteína ingerida. O tempo de experimentação sugerido para o PER é de 28 dias. (ANGELIS, R. C., 1995; ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1975).

O PER foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{PER} = \frac{\text{Ganho de peso do grupo - teste (g)}}{\text{Proteína consumida pelo grupo - teste (g)}}$$

4.2.4 Determinação de perfil sorológico dos animais

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com tiopental (Tiopentax® - 0,6 ml/100g pc, i.p.) para a coleta do sangue, o qual foi armazenado em tubos esterilizados. Os tubos contendo sangue foram centrifugados em centrífuga (Sigma®) durante 30 minutos a

3.500 rpm (MILLER, 1977) para a obtenção do soro. Este foi acondicionado em *ependorfs* individuais em freezer (-20°C) para posterior análise.

Para quantificação do perfil sorológico dos camundongos, foram determinados os valores de colesterol total (CT), triglicerídios (TGL) e enzima hepática AST (aspartato aminotransferase). Para tais dosagens, foram utilizados Kits Cinéticos da BIOCLIN (Quibasa-Química Básica Ltda) e a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro termostaticado.

4.2.5 Avaliação Histopatológica

Após o sacrifício dos animais, os fígados foram removidos e armazenados em formalina a 10% por 48hs, incluídos em parafina e corados pelo método histológico da hematoxilina & eosina de acordo com COTRAN e colaboradores (1994). Para a comparação entre os grupos, a análise microscópica consistiu na avaliação morfológica descritiva de cortes histológicos de 4 µm obtidos de fígado. Foram avaliados os seguintes aspectos: figuras de mitose, binucleação, esteatose, megalocitose, presença de infiltrado inflamatório, hemorragia, hiperemia, necrose e fibrose. As alterações celulares encontradas neste material foram lidas em microscópio óptico (H&E Stain x 200®). Esta análise foi conduzida no Laboratório Integrado de Morfologia localizado no Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (UFRJ/Macaé).

4.2.6 Análise Estatística

Os dados encontrados foram submetidos ao teste estatístico Mann Whitney, com $p < 0,005$, ou seja, o intervalo de confiança é de 95%.

5. Resultados

5.1 Composição centesimal das rações experimentais

Tabela 2. Composição centesimal das rações experimentais, representada em g/100g de dieta

Composição química	Rações		
	Grupo Controle (GCC)	Grupo Cantaxantina (GC)	Grupo Truta Salmonada (GTS)
Umidade (%)	1,91	1,75	1,92
Lipídios (%)	7,31	7,99	7,31
Cinzas (%)	3,79	3,96	4,78
Proteína (%) [†]	9,84	9,72	10,86
Carboidrato (%) [*]	77,15	76,58	75,13
VET ^{**} (Kcal)	413,75	417,11	409,75

Grupo Controle (GCC): ração à base de caseína; Grupo Truta Salmonada (GTS): ração à base de caseína + 6% de truta salmonada liofilizada; e Grupo Cantaxantina (GC): ração à base de caseína, recebendo adição de 6% de suplemento de cantaxantina. Os valores apresentados referem-se às médias de 3 determinações; ^{*}calculado pela diferença; [†]fator de conversão de 6,25. ^{**}VET, Valor Energético Total.

De acordo com as análises químicas, as rações utilizadas neste trabalho estavam de acordo com o previamente balanceado, ou seja, atenderam as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN) (REEVES et al, 1993), para os teores de macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios), assim como foram isocalóricas e isoproteicas.

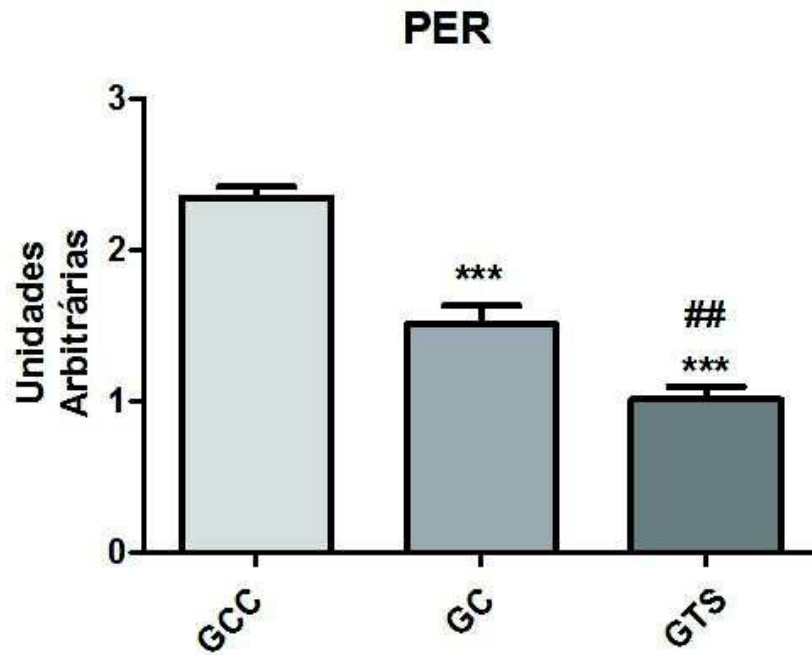
5.2 Variação de peso, Perfil alimentar dos animais e PER

Tabela 3. Variação de peso, consumo de ração, consumo de proteína e *Protein Efficiency Ratio* (PER) dos animais após 28 dias.

Dados	Grupos Experimentais		
	GCC	GC	GTS
Consumo de Ração (g)	231,82	198,96*	243,91
Consumo de proteína (g)	13,63	11,70*	14,34
Variação de peso (g)	31,99	17,61*	14,53*
PER	2,34	1,50*	1,01*

Grupo Controle (GCC): ração à base de caseína; Grupo Truta Salmonada (GTS): ração à base de caseína + 6% de truta salmonada liofilizada; Grupo Cantaxantina (GC): e ração à base de caseína, recebendo adição de 6% de suplemento de cantaxantina. *Símbolos diferentes na mesma coluna denotam significância estatística ao nível de $p < 0,05$.

Na Tabela 3, observamos que o consumo de ração do GTS e do GCC foram semelhantes, porém ambos superiores ($p=0,0050$) ao GC. O mesmo pode ser observado quando avaliamos o consumo de proteína após 28 dias de experimento. Pode-se observar que os GC e GTS foram semelhantes entre si e inferiores ($p=0,0018$) ao GCC, quando tratamos da variação de peso dos animais, o que se deve, provavelmente, à toxicologia da substância. Quando discutimos o valor do PER, observamos que o GTS e o GC se apresentaram semelhantes entre si e estatisticamente inferiores ao GCC, sendo $p < 0,005$ (Gráfico 1).



Teste estatístico Mann Whitney, com $p < 0,005$, ou seja, intervalo de confiança de 95%. *: GCC comparado a GC e GCC comparado a GTS; #: GC comparado a GTS.

Gráfico 1. *Protein Efficiency Ratio* (PER) dos animais após 28 dias

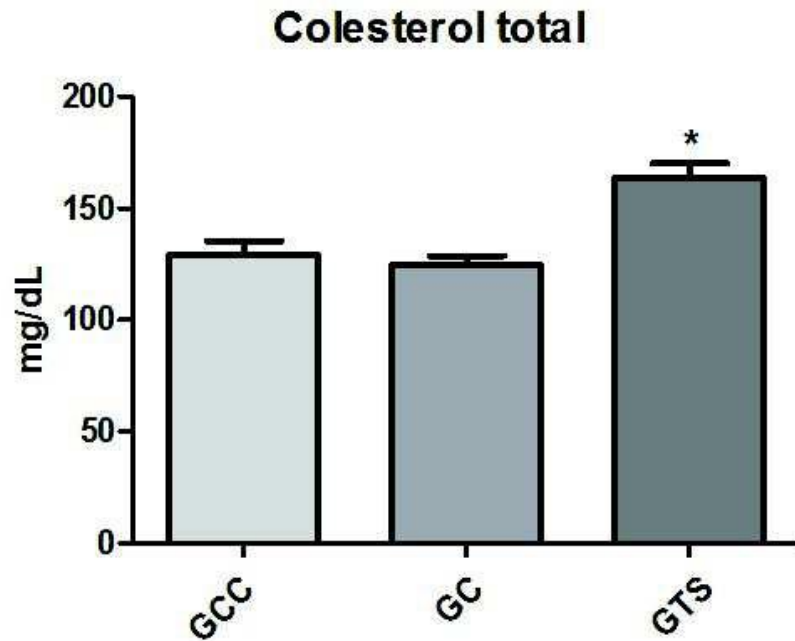
5.3 Perfil sorológico dos animais

Tabela 4. Perfil sorológico dos animais ao final de 60 dias

Dados	Grupos Experimentais		
	GCC	GC	GTS
Colesterol Total (mg/dL)	129,18	124,82	163,7*
TGL (mg/dL)	218,53	178,98	205,64
AST (U/L)	24,6	21,07	18,4

Grupo Controle (GCC): ração à base de caseína; Grupo Truta Salmonada (GTS): ração à base de caseína + 6% de truta salmonada liofilizada; e Grupo Cantaxantina (GC): ração à base de caseína, recebendo adição de 6% de suplemento de cantaxantina. *Símbolos diferentes na mesma coluna denotam significância estatística ao nível de $p < 0,05$

Nos valores de colesterol total descritos na Tabela 4 e no Gráfico 2 pode-se observar que o GCC e GC foram estatisticamente semelhantes entre si. O GTS apresentou valor estatisticamente ($p < 0,005$) superior ao GCC e GC. Não foi observada diferença estatística entre os grupos para os valores de AST e TGL, sendo $p = 0,376$.



Teste estatístico Mann Whitney, com $p < 0,005$, ou seja, intervalo de confiança de 95%. *: GCC comparado a GC e GCC comparado a GTS.

Gráfico 2. Valores de colesterol total

5.4 Avaliação Histopatológica

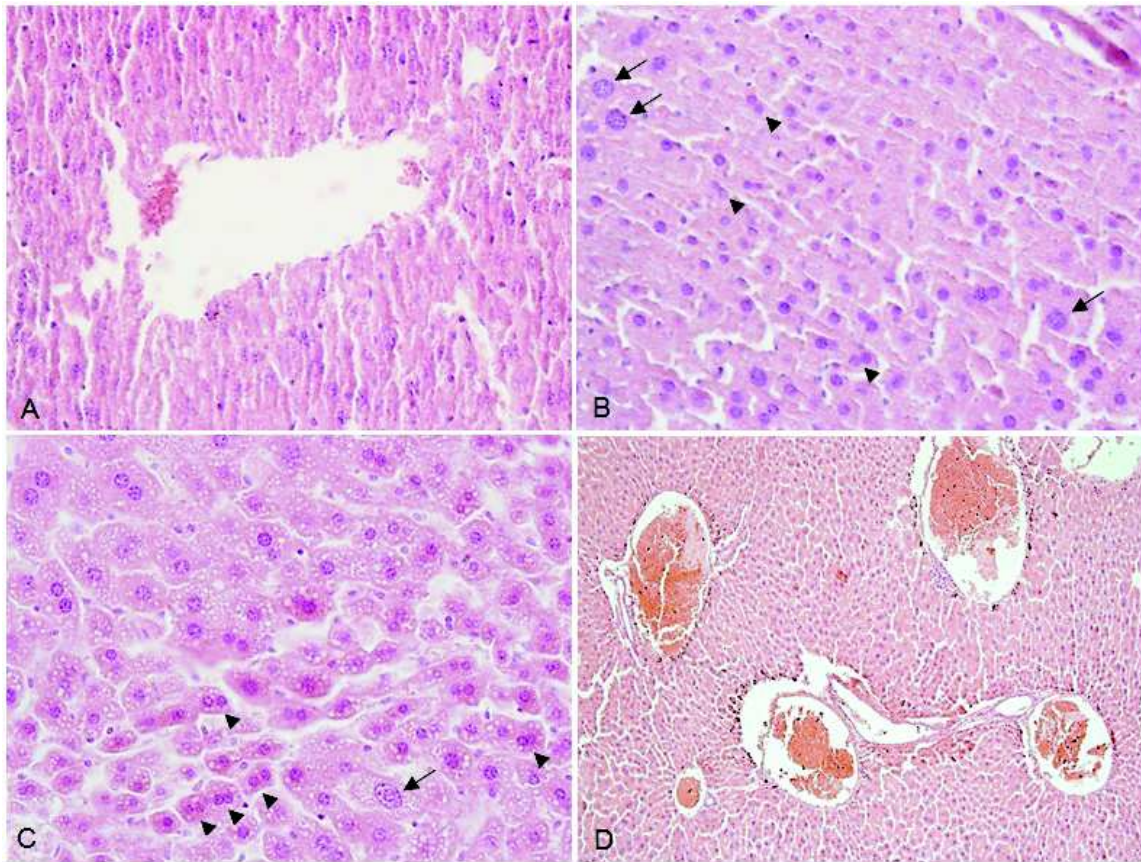


Fig. 3. Fotomicrografias de fígado de camundongos tratados com truta salmonada e cantaxantina.

A-GCC mostrando Tecido hepático com arquitetura normal; B-GC mostrando megalocitose (seta) e binucleação (cabeça de seta); C-GTS apresentando esteatose (gotículas de gordura), megalocitose (seta) e binucleação (cabeça de seta); e D-GTS apresentando hiperemia. HE, aumento original 400x em A, B e C e 100x em D.

O grupo controle (GCC) apresentou arquitetura hepática normal, sem qualquer alteração significativa sendo observada. Lóbulos hepáticos apresentavam-se preservados, com cordões de hepatócitos e sinusoides de aspecto normal. No grupo cantaxantina (GC) foi observada megalocitose e binucleação. A arquitetura hepática mostrou-se normal, sem alterações marcantes. Não foi observada necrose, esteatose, figuras de mitose, infiltrado inflamatório, hemorragia, hiperemia e fibrose. No grupo truta salmonada (GTS) foi observada megalocitose e binucleação. Em um dos animais foi observada esteatose hepática moderada. Foi observada também grande hiperemia nos vasos sanguíneos. Não foi visualizada necrose, figuras de mitose, infiltrado inflamatório, hemorragia ou fibrose.

6. Discussão

Nesse trabalho procuramos observar os efeitos toxicológicos da cantaxantina onde o tratamento dos animais foi realizado por um período de 60 dias. Quanto aos valores de PER, aos 28 dias do experimento pode-se observar que o GTS e o GC apresentaram crescimento menor que o GCC, fato que pode estar relacionado com um efeito tóxico da cantaxantina. O GTS consumiu mais ração e proteína que o GCC, mas obteve menor variação de peso e menor PER. O GC apresentou menor consumo de ração, proteína e, conseqüentemente, menor variação de peso e PER quando comparado ao GCC.

De acordo com o cálculo do PER, foi encontrado um valor de 1,01 e 1,50 para a média do GTS e GC, respectivamente. Comparando com o padrão do GCC, que apresentou PER de 2,34, podemos verificar que tanto a cantaxantina quanto a truta salmonada se mostraram de baixa qualidade nutricional. Valores de PER acima de 2 são relacionados com proteína de boa qualidade, e valores abaixo de 1,5 com proteína de baixa qualidade. Portanto, ambos, cantaxantina e truta salmonada, podem ser consideradas de baixa qualidade proteica, já que apresentaram PER inferior a 1,5 (FRIEDMAN, 1996). Porém não se pode levar em conta somente o valor do PER para avaliação da qualidade proteica já que o valor proteico de um alimento é determinado pela sua composição em aminoácidos essenciais, e o aproveitamento biológico dos aminoácidos (biodisponibilidade) depende também da digestibilidade da proteína, (BRESSANI, 1991; YOUNG e PELLETT, 1994) parâmetro que não foi avaliado nesse trabalho.

A carne do pescado possui uma excelente qualidade nutricional, é uma fonte de proteínas de alto valor biológico, além de ser rica em vitaminas e Omega-3. A digestibilidade das proteínas de pescado é alta. Eles estimulam mais a secreção gástrica do que a carne bovina e possuem baixo teor de tecido conectivo o que facilita a mastigação. A digestibilidade média é de 96%, sendo para aves 90% e para bovinos 87%. (NICOLUZZI, 1998; SENAI-DR, 2007). Em contrapartida, pode-se observar que os animais tratados com a truta apresentaram menor crescimento frente aos outros grupos, o que não era esperado, já que a truta é fonte de proteínas de alto valor biológico. Era esperado que os animais tratados com a truta apresentassem um valor de PER elevado, porém isso não ocorreu, provavelmente por conta da ação interferente de algum componente existente na truta salmonada.

Ao observarmos os valores de colesterol total encontrados, verificamos que o GTS apresentou-se estatisticamente ($p < 0,005$) superior ao GCC e GC. Kalinowski e colaboradores (2015) demonstrou após 24 semanas de estudo avaliando o efeito da cantaxantina no crescimento e composição lipídica de peixes da espécie *Pagrus pagrus*, que o colesterol total

dos animais alimentados com dieta contendo cantaxantina se mostrou elevado em comparação com o grupo controle. Porém, outros parâmetros como triglicerídeos plasmáticos e fosfolipídeos não sofreram influência pela inclusão da cantaxantina na dieta. Em nosso trabalho podemos observar que o elevado valor encontrado para colesterol total nos animais do GTS é condizente com a presença de algum interferente na truta salmonada, entretanto, no GC não foram encontradas alterações significativas. Palloza e colaboradores (1997) observou que a cantaxantina foi mais eficientemente acumulada pelos camundongos fêmeas do que por machos, demonstrado pelos níveis do carotenóide no plasma e no fígado. Estes dados sugerem uma possível diferença entre camundongos machos e fêmeas na absorção e/ou metabolismo da cantaxantina intestinal. Em nosso trabalho, a suplementação foi realizada por um período de 60 dias utilizando camundongos machos onde foram encontradas alterações estatisticamente significativas quanto ao colesterol total somente no GTS. Por isso, pode ser que a cantaxantina possa requerer períodos de suplementação mais longos além da utilização de camundongos fêmeas como modelo experimental a fim de que tais alterações sejam mais bem estudadas.

O valor de referência para a enzima hepática AST apresentado pelo *Canadian Council on Animal Care* (CCAC, 1984) está entre 23-48 U/L. Ao observarmos os valores encontrados para os grupos experimentais, vemos que o GCC apresentou valor normal, e os GC e GTS apresentaram valores inferiores, sendo, respectivamente, 21,07 e 18,4, o que não demonstra alteração significativa.

O consumo de gordura saturada e trans é classicamente relacionado com elevação do LDL-c plasmático e aumento de risco cardiovascular. As repercussões da ingestão de gordura, no entanto, não se restringem ao metabolismo lipídico; o tipo de gordura ingerida pode influenciar também outros fatores de risco, como a resistência a insulina e a pressão arterial. Os ácidos graxos saturados podem ser divididos em dois grupos: cadeia média (entre 8 e 12 átomos de carbono na cadeia) e cadeia longa (acima de 14 átomos de carbono). Após a absorção intestinal, os de cadeia média são transferidos para a circulação sanguínea, transportados ligados à albumina, pela veia porta, diretamente para o fígado, sendo, então, metabolizados, não sendo responsáveis pelo aumento do colesterol sérico. Os ácidos graxos saturados (SFA) de cadeia longa encontram-se no estado sólido à temperatura ambiente. Após a absorção, os ácidos graxos (AG) de cadeia longa são esterificados nos enterócitos, formando os triglicérides. São então transportados pelos quilomícrons no sistema linfático e em seguida na corrente sanguínea. Os triglicérides dos quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lipase, liberando os ácidos graxos para os tecidos, onde são re-esterificados, formando

novamente os triglicérides, forma de armazenamento da gordura no organismo. De maneira geral, a gordura saturada eleva a concentração plasmática de colesterol. Existe forte associação entre o alto consumo de colesterol com maior incidência de aterosclerose. Além disto, os ácidos graxos trans podem gerar a diminuição de HDL-c (SANTOS et al, 2013; FARRET, 2005). Dessa forma, o valor estatisticamente elevado ($p < 0,005$) encontrado para colesterol total no GTS pode estar relacionada à adição de gordura saturada à alimentação na criação do pescado, visando acelerar o processo de engorda, já que durante essa fase são fornecidas 3 ou mais refeições ao dia, o que, embora acelere o crescimento dos peixes, contribui para maior deposição de gordura corporal e nas vísceras (KUBITZA, 1999).

Na cultura de espécies marinhas são tradicionalmente usadas rações cuja composição se baseia essencialmente em farinhas e óleos de peixe, ou seja, ricas em lípidos contendo elevados teores de ácidos gordos polinsaturados do tipo ômega-3 (n-3), em particular os ácidos eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA) e docosahexaenóico (22:6 n-3, DHA) (SARGENT e TACON, 1999). Todavia, a diminuição da disponibilidade dos recursos pesqueiros bem como a necessidade de diminuir os resíduos provenientes das rações, tem conduzido à procura de fontes alternativas de proteínas e de lípidos, para substituição parcial ou total das farinhas e óleos de peixe. Esta substituição tem sido testada principalmente com ingredientes de origem vegetal, como soja, milho, colza, entre outras (REGOST et al., 2003; FRANCESCO et al., 2004; IZQUIERDO et al., 2005; DIAS et al., 2009). Atualmente, a maioria das rações comerciais para peixe já incluem na sua composição mais de 30% de proteínas de origem vegetal (FRANCESCO et al., 2004). Não é possível associar o consumo desses ácidos graxos ao aumento do colesterol total. Posteriormente será realizado o perfil de ácidos graxos do pescado para melhor compreensão.

O efeito da alteração da composição das rações na estrutura química do peixe deve-se, sobretudo, ao tipo de matéria prima utilizada, à sua qualidade e ao nível de inclusão. Em particular, o elevado nível de incorporação de óleos vegetais provoca a alteração do perfil de ácidos graxos do músculo do peixe, devido principalmente à diminuição dos teores de EPA e DHA e ao aumento do nível de ácidos graxos do tipo ômega-6 (n-6), em especial do ácido linoleico (18:2 n-6) (REGOST et al., 2003; IZQUIERDO et al., 2005). Esta situação pode desequilibrar o valor nutricional do pescado de aquacultura, designadamente o balanço entre os ácidos graxos n-3 e n-6, importante para a saúde humana (SIMOPOULOS, 2004). O ômega-6, encontrado em óleos vegetais como o de milho e soja, embora não prejudicial, é mais suscetível à oxidação e talvez reduza as concentrações do HDL-c. (MACGOWAN, 1997)

O fígado é o principal órgão responsável pela manutenção da homeostase metabólica, participa da biotransformação de metabólitos circulantes, na desintoxicação e excreção de resíduos metabólicos e de contaminantes externos. É um órgão muito susceptível a potenciais lesões por substâncias farmacêuticas e químicas, que podem provocar hepatotoxicidade. Diante de possíveis lesões a que o fígado é submetido, os hepatócitos contam com mecanismos eficientes para enfrentar as modificações ao seu entorno seja aumentando o seu tamanho (hipertrofia) ou incrementando o número de células, por meio da divisão celular (hiperplasia), como resposta adaptativa ao estresse (ALVARADO-RICO e CASTRO, 2010).

Os hepatócitos têm como características a presença de dois ou mais núcleos, e geralmente apresentam tamanho uniforme. A hipertrofia acontece quando estas células aumentam consideravelmente de tamanho, podendo ocorrer também o aumento do núcleo. A hipertrofia, tumefação ou aumento de células são achados morfológicos comuns em várias doenças inflamatórias do fígado, resultando de alterações funcionais na bomba de sódio com retenção citoplasmática deste e de água. A hiperplasia celular pode ser identificada com a maior frequência de hepatócitos binucleados, sendo este um indicativo da etapa final da divisão. Aumento na frequência de hepatócitos binucleados também pode indicar maior atividade metabólica do tecido (LORA, 2007). Neste trabalho, pode-se observar maior frequência de hepatócitos binucleados entre os grupos que receberam tratamento com cantaxantina e truta salmonada. O achado de núcleos binucleados nesses grupos é um provável sinal de concomitante proliferação celular. Além disso, foi possível observar maior relação núcleo/citoplasma, indicando que o tratamento provocou alteração no volume nuclear dos hepatócitos (megalocitose) (Figura 6 – B e C). No presente estudo, este processo pode ter ocorrido em razão do potencial tóxico da cantaxantina. Não foram encontradas alterações na frequência e morfologia dos vasos sanguíneos, porém no grupo TS foi observada grande hiperemia (Figura 6 – D).

Um estudo realizado por Kalinowski e colaboradores (2015) utilizando o modelo animal Pargo (*Pagrus pagrus*) alimentados com cantaxantina foram observadas que as características morfológicas de hepatócitos revelaram diferenças entre os grupos. Os peixes alimentados com a dieta de cantaxantina apresentaram hepatócitos com morfologia regular em torno de espaços sinusoidais, e uma redução na vacuolização lipídica no citoplasma e diminuição do número de hepatócitos com os núcleos deslocados para a periferia celular, ou seja, presença de hepatócitos com núcleos centrais. Tais alterações não foram encontradas nas amostras analisadas em nosso trabalho, provavelmente devido ao pouco tempo de tratamento dos animais com a cantaxantina e a truta salmonada.

A esteatose é a forma inicial de lesão hepática sendo diagnosticada quando a gordura representa mais de 5% do peso do fígado (AGUIAR, 2008; STOUT et al, 2011). Caracteriza-se pelo acúmulo de triglicerídeos no citoplasma celular, na forma de gotículas de lipídeos, geralmente com a manutenção da função hepática. De acordo com Aguiar (2008), a esteatose hepática decorre de um conjunto de alterações: diminuição da oxidação dos lipídeos pelo fígado, aumento da lipogênese hepática, diminuição da síntese e liberação de lipoproteínas, aumento da mobilização de tecido hepático e aumento da entrada hepática dos lipídeos circulantes (WOUTERS et al, 2008). Não foi observada frequência de esteatose no GC, porém no GTS houve presença de esteatose em um dos animais tratados, o que poderia estar relacionado com a gordura saturada adicionada ao pescado no processo de engorda da truta salmonada (Figura 6 - C), como já descrito anteriormente.

7. Conclusões

Neste trabalho, a partir das alterações encontradas, concluímos que a cantaxantina apresentou toxicidade no que se refere à alimentação dos animais. Além disso, as alterações histológicas encontradas estão relacionadas com possíveis mecanismos eficientes para enfrentar as modificações entorno dos hepatócitos, ou seja, em resposta a lesões a que o fígado é submetido. Entretanto, acreditamos ser necessário um tratamento por maior período de tempo para que seu efeito seja mais bem compreendido, já que outros autores obtiveram resultados positivos com tratamento prolongado.

8. Referências Bibliográficas

Aguiar, A. S. de. Toxicidade do consumo crônico de baixas doses de etanol e predisposição ao alcoolismo em animais desnutridos. Tese de doutorado. Universidade Federal Fluminense. 170p., 2008.

Alvarado-Rico, S.; Castro, L. Histologia Del Hígado de Ratas Tratadas com uma infusión de hojas de Higuera (*Ficus carica*). Reporte de Caso. Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias. 51 (2): 99-103, 2010.

Angelis RC. Valor nutricional das proteínas: métodos de avaliação. Cad Nutr. 1995; 10(1):8-29.

Antunes, L. M. G.; Araujo, M. C. P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. Revista de Nutrição, Campinas, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington, DC, 1094 p, 1975.

Beaulieu, R. A.; Warwar, R. E.; Buerk, B. M. **Canthaxanthin Retinopathy with Visual Loss: A Case Report and Review**. Case Reports in Ophthalmological Medicine, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/criopm/2013/140901/>>. Acesso em: 24 de setembro de 2015.

Bluhm, R.; Branch, R.; Johnston, P.; Stein, R. “Aplastic anemia associated with canthaxanthin ingested for “tanning” purposes,” The Journal of the American Medical Association, vol. 264, no. 9, pp. 1141–1142, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificações e emprego**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 19 de setembro de 2015.

Bressani, R. Protein quality of high lysine maize for humans. Am. Assoc. Cereal Chem., 36 (9): 806-811, 1991.

Brizio, P.; Benedetto, A.; Righetti, M.; Prearo, M.; Gasco, L.; Squadrone, S.; Abete, M. C. Astaxanthin and Canthaxanthin (Xanthophyll) as Supplements in Rainbow Trout Diet: In Vivo Assessment of Residual Levels and Contributions to Human Health. Journal Agriculture and Food Chemistry, 61, 10954–10959, 2013.

Buck, E. H. Seafood Marketing: Combating Fraud and Deception. Congressional Research Service. July 2, 2010. Disponível em: <http://nationalaglawcenter.org/wp-content/uploads/assets/crs/RL34124.pdf>. Acesso em: 22 de outubro de 2014.

Choi, S.; Koo, S. Efficient Syntheses of the Keto-carotenoids Canthaxanthin, Astaxanthin, and Astacene. *J. Org. Chem*, 70, 3328-3331, 2005.

Cotran R. S.; Robbins S. L.; Kumar V. Pathologic basis of disease. 5.ed. Philadelphia: McGraw-Hill, p.1400, 1994.

Da Silva, S. A.; Kavalco, K. F.; Pazza, R. Uso do sequenciamento de genes mitocondriais na identificação de filés de salmão. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*. Rio Paranaíba, Vol. 3 nº 2 | 64-67 | 2012.

Daicker, B.; Schiedt, K.; Adnet, J. J.; Bermond, P. Canthaxanthin retinopathy. An investigation by light and electron microscopy and physicochemical analysis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 222, 189-197, 1987.

Decker, E. A.; Warner, K.; Richards, M. P.; Shahidi, F. Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v 53, p.4303–4310, 2005.

Decreto-Lei nº322/2003 de 24 de Dezembro. Legislação e Regulamentação Nacional sobre Alimentação e Segurança Alimentar. Disponível em: <http://segurancalimentar.com/leg_desc1.php?id=897>. Acesso em: 17 de março de 2016.

Dias, J.; Conceição, L.E.C.; Ribeiro, A.R.; Borges, P.; Valente, L.M.P.; Dinis, M.T. Practical diet with low fish-derived protein is able to sustain growth performance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during the grow-out phase. *Aquaculture*, 293: 255-262, 2009.

Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. The carotenoids as anti-oxidants--a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, Lausanne, v.41, n.3, p.189-200, 1997.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of canthaxanthin (E 161 g) as a food additive. *EFSA Journal* 8(10):1852, 2010. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1852.pdf>. Acesso em: 22 de setembro de 2015.

FARRET, J. F. Nutrição e Doenças Cardiovasculares: Prevenção Primária e Secundária. São Paulo: Atheneu, p. 12-13, 2005.

Francesco, M.; Parisi, G. ; Médale, F.; Lupi, P.; Kaushik, S.J.; Poli, B.M. Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 236: 413-429, 2004.

Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. *J Agr Food Chem*, 44(1):6-29, 1996.

Furusawa, N. A simple and small-scale sample preparation technique to determine canthaxanthin in hen egg yolk. *Food Chemistry* 124, 1643–1646, 2011.

Gonçalves, E. C. B. A. *Análise de Alimentos – Uma visão química da nutrição*. 2ª edição. Editora Varela: São Paulo, 2009.

Goodwin, T. W. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* 6: 273–297, 1986.

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. *Xenobiotica* 26, 49–63, 1996.

Gupta, A. K.; Haberman, H. F.; Pawlowski, D. "Canthaxanthin." *International Journal of Dermatology*, vol. 24, no. 8, pp. 528–532, 1985.

Harnois, C.; Samson, J.; Malenfant, M.; Rousseau, A. Canthaxanthin retinopathy. Anatomic and functional reversibility. *Arch. Ophthalmol.* 107, 538-540, 1989.

Honorato, T. C.; Batista, E.; Do Nascimento, K. O.; Pires, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 8, n. 5, p. 01 - 11, (Edição Especial) dezembro, 2013.

Izquierdo, M.S.; Montero, D.; Robaina, L.; Caballero, M.J.; Rosenlund, G.; Ginés, R. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250: 431-444, 2005.

Juhlin L. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *Br J Dermatol* 1;104:369-381, 1981.

Kalinowski, C. T.; Socorro, J.; Robaina, L. E. Effect of dietary canthaxanthin on the growth and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Research*, 46, 893–900, 2015.

Kolicheski, M. B. Fraudes em Alimentos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 12, n. 1. Curitiba. 1994.

Kubitza, F. “Off-flavor”, Nutrição, Manejo Alimentar e Manuseio Pré-Abate Afetam a Qualidade do Peixe Destinado à Mesa. *Panorama da AQUICULTURA*, julho/agosto, 1999.

Lober, C. W. Canthaxanthin - the "tanning" pill. *J Am Acad Dermatol* 13:660, 1985.

Lora, J. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de Folhas de *Eugenia uniflora* L., (Myrtaceae). Dissertação de mestrado. Universidade do Extremo Sul Catarinense. 59p., 2007.

Macdonald, K.; Holti, G.; Marks, J. Is there a place for beta-carotene/canthaxanthin in photochemotherapy for psoriasis? *Dermatologica*, 169 (1):41-46, 1984.

Masotti, L.; Casali, E.; Galeotti, T. Lipid peroxidation in tumor cells. *Free Radic. Biol. Med.* 4: 377–386, 1988.

McGowan M. P. Am I at risk for developing heart disease? *Heart fitness for life*. New York: Oxford, 10-25, 1997.

Miller O. *Laboratório Para O Clínico*. Editora Atheneu.: 3ª Edição, 1977.

NICOLUZZI, R. Mercado Internacional de pescado: as oportunidades brasileiras na Europa, América do Norte e Cone Sul. *Higiene Alimentar*, v. 7, n. 28, p. 5-6, 1998.

Page, G. I.; Russell, P.M.; Davies, S.J. Dietary carotenoid pigment supplementation influences hepatic lipid and mucopolysaccharide levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 142, 398– 402, 2005.

Palozza, P.; Calviello, C.; Serini, S.; Moscato, P.; Luberto, C.; Bartoli, G. M. Antitumor effect of an oral administration of canthaxanthin in BALB/c mice bearing thymoma cells. *Nutr. Cancer* 28: 199–205, 1997.

Palozza, P.; Calviello, G.; De Leo, M. E.; Serini, S.; Bartoli, G. M. Canthaxanthin Supplementation Alters Antioxidant Enzymes and Iron Concentration in Liver of Balb/c Mice. *The Journal of Nutrition*, 130: 1303–1308, 2000.

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.

Regost, C.; Arzel, J.; Robin, J., Roselund, G.; Kaushik, S.J. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*). 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture*, 217: 465-482, 2003.

Rios, A. O.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com Cisplatina. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.20, n.2, p. 343-350, jan./mar. 2009.

Rousseau, A. Canthaxanthin deposits in the eye. *J Am Acad Dermatol* 8:123-124, 1983.

Salvador, A. M.; Alonso-Damián, A.; Choubert, G.; Milicuia, J. C. G. Impact of Different Dietary Phospholipid Levels on Cholesterol and Canthaxanthin Lipoprotein-Serum Transport and Muscle Deposition in Rainbow Trout. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 57, 2016–2021, 2009.

Santos, G. M.; Maia, G. A.; Sousa, P. H. M.; Figueiredo, R. W.; Costa, J. M. C.; Fonseca, A. V. V. Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.7, p.1636-1642, jul, 2010.

Santos, R. D.; Gagliardi, A. C. M.; Xavier, H. T.; Magnoni, C. D.; Cassani, R.; Lottenberg, A. M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.*; 100(1Supl.3):1-40, 2013.

Sargent, J. R.; Tacon, A. G. J. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Processing Nutrition Society*, 58: 377 – 383. 1999.

SENAI-DR BA. Tecnologia de Pescados. Salvador, 2007.

Shih, C. K.; Chang, J. H.; Yang, S. H.; Chou, T. W.; Cheng, H. H. β -Carotene and canthaxanthin alter the pro-oxidation and antioxidation balance in rats fed a high-cholesterol and high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 99, 59–66, 2008.

Simopoulos, A. P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, 20: 77-90, 2004.

Soares, D. G.; Andrezza, A. C.; Salvador, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

Soares, L. L.; Lucas, A. M. M.; Boaventura, G. T. Can organic and transgenic soy be used as a substitute for animal protein by rats? *Braz J Med Bio Res*; 38: 583-586, 2005.

Sosisnki, L. T. W. Introdução da truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*) e suas consequências para a comunidade aquática dos rios de altitude do sul do Brasil. *Tese de Doutorado*, Porto Alegre: UFRGS, 254p. 2004.

Stout, M. B.; Liu, L.; Belur, M. A. Hepatic steatosis by dietary-conjugated linoleic acid is accompanied by accumulation of diacylglycerol and increased membrane-associated protein kinase C ϵ in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55: 1010-1017, 2011.

Sujak, A. Interactions between canthaxanthin and lipid membranes – possible mechanisms of canthaxanthin toxicity. *Cellular & molecular biology letters*. Vol 14, pp 395-410, 2009.

Sujak, A.; Gabrielska, J.; Milanowska, J.; Mazurek, P.; Strzaaka, K.; Gruszecki, W. I. Studies on canthaxanthin in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1712. 17 – 28, 2005.

Surai, P. F. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, UK. 2002.

Surai, P. F. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 1. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 68, September, 2012.

Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 58, 100–110, 2004.

Tattini Jr, V.; Parra, D. F.; Pitombo, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

Teixeira, M. V.; Francez, Y.; Cola, A. P.; Oliveira, D. V.; Silva, E.; Mutran, T. J. Detecção da presença de amido em queijos do tipo prato e mozarela. *Science in Health*, 5(2): 79-85, maio-ago, 2014.

Terao, J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*. 24: 659-661, 1989.

Tocchini, L.; Mercadante, A. Z. Extração e determinação, por clae, de Bixina e Norbixina em coloríficos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 21(3): 310-313, set-dez. 2001.

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.

Wouters, K.; Van Gorp, P. J.; Bieghs, V.; Gijbels, M. J.; Duimel, H.; L' Utjohann, D.; Kerksiek, A.; Van Kruchten, R.; Maeda, N.; Staels, B.; Van Bilsen, M.; Shiri-Sverdlov, R.; Hofker, M. H. Dietary Cholesterol, Rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 48 (2), 2008.

Young, V. R.; Pellett, P. L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59 (suppl.): 1203S-1212S, 1994.

Zariphep, S.; Erdman, J. W. Factors That Influence the Bioavailability of Xanthophylls. *Journal of Nutrition*, 132: 531S–534S, 2002.

Zeraik, M. L.; Yariwake, J. H. Extração de β -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de Química. *Química Nova*, Vol. 31, No. 5, 1259-1262, 2008.



Macaé, 4 de Fevereiro de 2016

Prezado

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado **“Efeitos toxicológicos da cantaxantina sobre a prole de camundongas consumidoras de truta salmonada.”**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência MAC034 possuindo validade de 4 (quatro) anos.

Atenciosamente,

Prof. Andre Gustavo Calvano Bonavita
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
SIAPE: 2738212
Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira