

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE-
UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

SÔNIA DOS SANTOS TORIANI

**AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO DE PEIXES DA
BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CACHOEIRA**

JOINVILLE/SC

2022

SÔNIA DOS SANTOS TORIANI

**AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO DE PEIXES DA
BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CACHOEIRA**

Tese de doutorado para ser apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville-Univille, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Saúde e Meio Ambiente.

Orientadora – Profa. Dr^a. Therezinha Maria Novais de Oliveira

Co-orientadora – Profa. Dr^a. Daniela Delwing-de Lima

Colaborador – Prof. Me. Eduardo Manoel Pereira

JOINVILLE/SC

2022

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

T683a Toriani, Sônia dos Santos
Avaliação toxicológica pré-clínica do consumo de peixes da bacia hidrográfica do Rio Cachoeira / Sônia dos Santos Toriani; orientadora Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira; coorientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: Univille, 2022.
161 f.
Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)
1. Peixes - Toxicologia. 2. Peixes como alimento. 3. Cachoeira, Rio (SC). I. Oliveira, Therezinha Maria Novais de (orient.). II. Lima, Daniela Delwing de. III. Título.

CDD 641.392

Termo de Aprovação

Avaliação Toxicológica Pré-Clinica do Consumo de Peixes da Bacia Hidrográfica do Rio Cachoeira

por

Sônia dos Santos Toriani

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Orientadora (UNIVILLE)

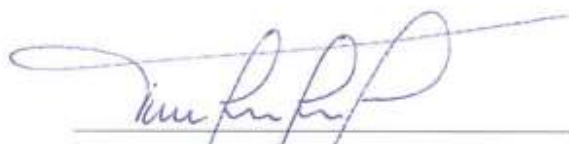
Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Coorientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Marilyn Gonçalves Ferreira
(IELUSC)

Prof. Dr. Cleiton Vaz
(CATÓLICA DE SC)

Profa. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Tese julgada para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 23 de agosto de 2022

AGRADECIMENTO

Agradeço imensamente a minha orientadora Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, a pessoa que me inspirou como pesquisadora, a qual admiro muito e que tenho como referência para a vida, que me proporcionou a possibilidade de desenvolver este belo trabalho, sempre me apoiando e me acompanhando nesta jornada, tão especial e grandiosa. Foi um prazer e uma honra ser sua orientanda, vou levá-la para sempre em meu coração.

Agradeço a querida Co-orientadora Dra Daniela Delwing-de Lima, grande profissional, dotada de muita sabedoria e que se apresenta de forma serena, doce e humilde, sempre com um belo sorriso, pessoa muito especial e pela qual tenho em grande apreço, mulher admirável.

Agradeço ao meu parceiro e especial amigo Mestre Eduardo Manoel Pereira, que participou ativamente em todos os momentos deste estudo, além de ser meu mentor no trato com os animais. Grande ser humano, de alma nobre e de uma generosidade inigualável. Homem de sabedoria vasta e que foi meu esteio nos momentos de dificuldades.

Agradeço a minha querida filha Victória e meu amado Marido Adelmo que me ajudaram no trato com os animais, mesmo durante suas férias de aula e finais de semana, além de todo o apoio durante esta caminhada, também ao meu querido filho pelo apoio e incentivo. Meus amores.

Agradeço a todos os acadêmicos da Univille, que participaram em alguns momentos deste estudo.

Agradeço a UNIVILLE pela oportunidade de poder fazer meu doutorado nesta instituição e o apoio através da bolsa CAPES, para realização das pesquisas.

Gratidão a todos, sou uma pessoa de muita sorte por encontrar nesta jornada tantas pessoas especiais.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Figura 1: Localização da Bacia Hidrográfica do rio Cachoeira em relação ao estado de Santa Catarina e ao município de Joinville.....	27
Figura 2: Pesca no rio Cachoeira 7/12/2014.....	29
Figura 3: Pesca no rio Cachoeira 7/12/2014.....	29
Figura 4: Pescaria com rede na ponte do rio Cachoeira 01/06/2018:.....	29
Figura 5: Pescaria esportiva de tilápia no rio Cachoeira no centro de Joinville, na frente do teatro Bolshoi 08/06/2015	29
Figura 6: Tilápia coletada em um mesmo trecho do rio Cachoeira no bairro Costa e Silva em Joinville-SC.....	30
Figura 7: Local onde os peixe foram coletado (A), individuo sendo retirado da rede de esmalhe (B), paisagem (C) e confirmação taxonômica (D).....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais	32
Tabela 2:Parâmetros bioquímicos mensurados.....	37

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: INFORMAÇÃO SOBRE PRODUÇÃO DO PEIXE DE CULTIVO.....	154
ANEXO B: 1ª COLETA DOS PEIXES DO RIO CACHOEIRA	155
ANEXO C: 2ª COLETA DOS PEIXES DO RIO CACHOEIRA	157
ANEXO D: PARECER DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIVILLE)	159
ANEXO E: TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES.....	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al³⁺: Alumínio

ALT: alanina aminotransferase

AST: Aspartato Aminotransferase

CAT: catalase

Cd²⁺: Cádmio

Cu: cobre

CHCM: concentração corpuscular média de hemoglobina

Cr⁺³: Cromo

CT: colesterol total

DTNB: ácido ditionitrobenzóico

DHA: Docosaexanóico

EPA: Eicosapentaenoicos

EDTA K3: ácido etilenodiamonotetracético tripotássio

EROS: Espécies reativas de oxigênio

FAO: Organização das Nações Unidas

Fe³⁺: Ferro

FURB: Fundação Universitária da Região de Blumenau

GSH-PX: glutathione peroxidase

HCM: concentração média de hemoglobina

HDL: lipoproteína de alta densidade

Hg²⁺: Mercúrio

IQA: Índice da qualidade da água

LDL: lipoproteínas de baixa densidade

Mda: malondialdeído

ME(Hg²⁺): Metilmercúrio

OMS: Organização mundial da saúde

Pb²⁺: Chumbo

PC: proteínas carboniladas

RDW:red cell distribution width (amplitude de distribuição de glóbulos vermelhos)

SH:sulfidrilas

SOD: superóxido dismutase

T3: triiodotironina

T4: tiroxina

T4L: tiroxina livre

TBAS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGO: transaminase oxalacética

TGP: transaminase pirúvica

TSH: hormônio tireo-estimulante

V³⁺: Vanádio

VCM: Volume corpuscular médio

Vldl: lipoproteína de muito baixa densidade

ω3: Ácido alfa-linolênico

ω6: Ácido linoleico

ω9: Ácido oleico

Zn⁺²: Zinco

AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO DE PEIXES DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CACHOEIRA

RESUMO

O peixe é uma das fontes de proteína alimentar mais saudáveis por conter vitaminas, minerais e ômega 3, essenciais para manutenção da saúde e prevenção de doenças. Contudo, para ser nutricionalmente eficaz, a carne de peixe deve vir de fontes seguras e livres de contaminantes. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos toxicológicos pré-clínicos em ratos expostos ao consumo de carne cozida de tilápias da bacia hidrográfica do rio Cachoeira, recurso hídrico receptor de efluentes industriais e domésticos tratados ou não do município de Joinville. Para tanto, grupos diferentes de ratos *Wistar* receberam ração, carne de peixe de cultivo (controle) e do rio Cachoeira cozidas, duas vezes por semana por 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Após o último dia de exposição de cada período, os animais foram eutanasiados e coletados sangue e órgãos (baço, córtex cerebral, cerebelo, coração, fígado e rim) para análise de parâmetros de estresse oxidativo, bioquímicos e hematológicos. Análise de quantidade de metais na carne de peixe também foi realizada. Evidenciou-se uma quantidade 5 vezes maior de Al^{+3} e Zn^{+2} na carne de peixe do rio Cachoeira. Observou-se aumento significativo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no cerebelo, plasma e Fígado, das Proteínas Carboniladas (PC) no coração, da Superóxido dismutase (SOD) no Fígado, da Catalase (CAT) nos rins e redução significativa das sulfidrilas (SF) no cerebelo e Fígado, da Glutathione peroxidase (GSH-PX) nos eritrócitos dos animais que consumiram peixe do rio cachoeira em todos os meses de exposição, sendo que todos os órgão sofreram ataque das espécies reativas de oxigênio (EROS) em alguns meses de exposição. Em relação aos dados bioquímicos verificou-se que Lipoproteína de alta densidade (HD) teve redução no primeiro mês nos animais que consumiram peixe do rio Cachoeira e do cultivo, seguido de um aumento no terceiro apenas para os que consumiram peixe do rio Cachoeira. A Lipoproteína de baixa densidade (LDL) aumentou apenas no nono mês e a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) diminuiu no terceiro e aumentou no nono mês. Transaminase oxalacética (TGO) apresentou diminuição apenas no nono mês, Transaminase pirúvica (TGP) diminuição no primeiro mês com elevação no sexto e nono meses, junto com ureia, enquanto a tiroxina livre (T4) apresentou diminuição no terceiro mês com aumento no sexto para os animais que consumiram peixe do rio cachoeira e aumento no nono mês juntamente com triglicerídeos (TG) que aumentaram apenas no terceiro mês de exposição dos animais que consumiram tanto a carne de peixe do rio Cachoeira como do cultivo. Não houve alterações hematológicas após qualquer período de exposição. Os dados apontam para as consequências patológicas do acúmulo desses metais, conforme consumida a carne de peixe contaminada em longo prazo em quantidade nutricionalmente recomendada, mesmo cozida, sendo necessário sensibilizar a população acerca dos riscos, além da adoção de políticas públicas de recuperação ambiental.

Palavras-chave: Peixe; toxicologia; alimentação; sustentabilidade; contaminação ambiental.

PRECLINICAL TOXICOLOGICAL EVALUATION OF FISH CONSUMPTION FROM THE CACHOEIRA RIVER HYDROGRAPHIC BASIN

ABSTRACT

Fish is one of the healthiest food sources of protein as it contains vitamins, minerals and omega 3, essential for maintaining health and preventing disease. However, to be nutritionally effective, fish meat must come from sources that are safe and free of contaminants. Therefore, the objective of this study was to investigate the preclinical toxicological effects in rats exposed to the consumption of cooked tilapia meat from the Cachoeira river basin, a water resource that receives treated or untreated industrial and domestic effluents in the city of Joinville. For this purpose, different groups of Wistar rats received food, cooked fish meat (control) and fish from the Cachoeira river, twice a week for 1, 3, 6, 9 and 12 months. After the last day of exposure of each period, the animals were euthanized and blood and organs (spleen, cerebral cortex, cerebellum, heart, liver and kidney) were collected for analysis of oxidative stress, biochemical and hematological parameters. Analysis of the amount of metals in fish meat was also performed. There was a 5 times greater amount of Al^{+3} and Zn^{+2} in fish meat from the Cachoeira River. There was a significant increase in thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in the cerebellum, plasma and liver, in carbonyl proteins (PC) in the heart, in superoxide dismutase (SOD) in the liver, in catalase (CAT) in the kidneys and a reduction in significant concentration of sulfhydryls (SF) in the cerebellum and liver, of Glutathione peroxidase (GSH-PX) in the erythrocytes of animals that consumed fish from the Rio Cascade in all months of exposure, and all organs were attacked by reactive oxygen species (EROS) in a few months of exposure. Regarding the biochemical data, it was verified that High Density Lipoprotein (HDL) had a reduction in the first month in the animals that consumed fish from the Cachoeira river and from the culture, followed by an increase in the third month only for those that consumed fish from the Cachoeira river. Low density lipoprotein (LDL) increased only in the ninth month and very low density lipoprotein (VLDL) decreased in the third and increased in the ninth month. Oxaloacetic transaminase (TGO) showed a decrease only in the ninth month, Pyruvic transaminase (TGP) decreased in the first month with an increase in the sixth and ninth months, together with urea, while free thyroxine (T4) showed a decrease in the third month with an increase in the sixth to animals that consumed fish from the Cachoeira river and increased in the ninth month along with triglycerides (TG) that increased only in the third month of exposure of the animals that consumed both fish meat from the Cachoeira river and culture. There were no hematological changes after any period of exposure. The data point to the pathological consequences of the accumulation of these metals, as long-term contaminated fish meat is consumed in nutritionally recommended amounts, even cooked, and it is necessary to sensitize the population about the risks, in addition to the adoption of public policies for environmental recovery.

Keywords: Fish; toxicology; food; sustainability; environmental contamination

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA PRECLÍNICA DEL CONSUMO DE PESCADO DE LA CUENCA HIDROGRAFICA DEL RÍO CACHOEIRA

RESUMEN

El pescado es una de las fuentes alimenticias de proteínas más saludables, ya que contiene vitaminas, minerales y omega 3, esenciales para mantener la salud y prevenir enfermedades. Sin embargo, para ser nutricionalmente efectiva, la carne de pescado debe provenir de fuentes seguras y libres de contaminantes. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar los efectos toxicológicos preclínicos en ratas expuestas al consumo de carne cocida de tilapia de la cuenca del río Cachoeira, recurso hídrico que recibe efluentes industriales y domésticos, tratados o no, de la ciudad de Joinville. Para ello, diferentes grupos de ratas Wistar recibieron alimento, carne de pescado cocida (control) y pescado del río Cachoeira, dos veces por semana durante 1, 3, 6, 9 y 12 meses. Después del último día de exposición de cada período, los animales fueron sacrificados y se recolectaron sangre y órganos (bazo, corteza cerebral, cerebelo, corazón, hígado y riñón) para análisis de estrés oxidativo, parámetros bioquímicos y hematológicos. También se realizó un análisis de la cantidad de metales en la carne de pescado. Hubo una cantidad 5 veces mayor de Al^{+3} y Zn^{+2} en la carne de pescado del río Cachoeira. Hubo un aumento significativo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) en el cerebelo, plasma e hígado, de proteínas carbonilo (PC) en el corazón, de superóxido dismutasa (SOD) en el hígado, de catalasa (CAT) en el riñones y una reducción en la concentración significativa de sulfhidrilos (SF) en el cerebelo y el hígado, de Glutación peroxidasa (GSH-PX) en los eritrocitos de los animales que consumieron pescado del Río Cascada en todos los meses de exposición, y todos los órganos fueron atacados por especies reactivas de oxígeno (EROS) en unos pocos meses de exposición. En cuanto a los datos bioquímicos, se verificó que la Lipoproteína de Alta Densidad (HD) tuvo una reducción en el primer mes en los animales que consumieron pescado del río Cachoeira y del cultivo, seguido de un aumento en el tercer mes solo para aquellos que consumieron pescado del río Cachoeira. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) aumentaron solo en el noveno mes y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) disminuyeron en el tercero y aumentaron en el noveno mes. La transaminasa oxaloacética (TGO) mostró una disminución solo en el noveno mes, la transaminasa pirúvica (TGP) disminuyó en el primer mes con un aumento en el sexto y noveno mes, junto con la urea, mientras que la tiroxina libre (T4) mostró una disminución en el tercer mes. mes con aumento en el sexto a los animales que consumieron pescado del río Cachoeira y aumentó en el noveno mes junto con los triglicéridos (TG) que aumentaron solo en el tercer mes de exposición de los animales que consumieron tanto carne de pescado del río Cachoeira y la cultura No hubo cambios hematológicos después de ningún período de exposición. Los datos apuntan a las consecuencias patológicas de la acumulación de estos metales, ya que la carne de pescado contaminada durante mucho tiempo se consume en las cantidades nutricionalmente recomendadas, incluso cocinada, y es necesario sensibilizar a la población sobre los riesgos, además de la adopción de medidas políticas de recuperación ambiental.

Palabras llave: Pescado; toxicología; alimentación; sustentabilidad; Contaminación ambiental.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Interdisciplinaridade.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Proteína da carne do peixe	21
3.2 Recomendação do Consumo do Peixe para a Saúde.....	22
3.3 Segurança Alimentar no Consumo de Peixe.....	23
3.4 Produção e modo de cultivo da Tilápia	25
3.5 Ecotoxicologia.....	25
3.6 Contaminação dos rios.....	26
3.7 Bacia Hidrográfica do Rio Cachoeira	27
3.8 Ictiofauna do Rio Cachoeira.....	29
4. METODOLOGIA	31
4.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	31
4.2 Desenho e Local do Estudo.....	31
4.3 Estudo Experimental in vivo.....	31
4.4 Preparo das Amostras.....	32
4.5 Escolha e coleta do peixe.....	32
4.6 Preparo da carne de peixe para análise dos metais pesados.....	34
4.7 Preparo da carne do peixe para consumo das ratas	35
4.8 Sangue total.....	36
4.9 Eritrócitos.....	36
4.10 Tecidos	36
4.11 Aferição dos Parâmetros bioquímicos	37
4.12 Aferição dos Parâmetros hematológicos	37
4.13 Aferição dos Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	38
4.14 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	38
4.15 Conteúdo total de sulfidrilas (SH).....	38
4.16 Conteúdo de Proteína Carboniladas (PC).....	39
4.17 Atividade das catalases CAT.....	39
4.18 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	39
4.19 Atividade da Glutathione Peroxidase (GSH-PX)	40
4.20 Proteínas.....	40
4.21 Descarte de resíduos.....	40
4.22 Análise estatística.....	41
5. FINANCIAMENTO.....	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1 Artigo 1: Exposição de 1 Mês.....	42
6.2 Artigo 2: Exposição de 3 e 6 Meses.....	57
6.3 Artigo 3: Exposição de 9 e 12 Meses	95
6.4 Artigo 4: Revisão de Literatura sobre Doenças Causadas pelo Consumo de Peixe Contaminado	130
7. CONCLUSÃO.....	144
8.REFERÊNCIAS.....	147
ANEXO A: INFORMAÇÃO SOBRE PRODUÇÃO DO PEIXE DE CULTIVO.....	154

ANEXO B: 1ª COLETA DOS PEIXES DO RIO CACHOEIRA RELATÓRIO DE CAMPO.....	155
ANEXO C: 2ª COLETA DOS PEIXES DO RIO CACHOEIRA RELATÓRIO DE CAMPO.....	157
ANEXO D: PARECER DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIVILLE)	159

1. INTRODUÇÃO

Conforme a FAO (2018), a alimentação é um direito inegável de todas as pessoas e deve ser acessível, com qualidade nutricional dentro das normas de segurança alimentar, ou seja, com nutrientes em adequadas e em condições de consumo, livre de contaminantes que possam afetar a saúde do consumidor.

A alimentação é necessidade básica para a garantia da sobrevivência e da melhora na qualidade de vida do ser humano e os alimentos são divididos em grupos de acordo com sua função no organismo, classificados em macro e micronutrientes, a quantidade consumida é definida conforme necessidade energética necessária para cada pessoa, de acordo com cada fase da vida (BRASIL, 2014; RIBEIRO, JAIME, VENTURA, 2017).

No grupo alimentar dos macronutrientes estão os carboidratos, com função de fornecer energia, os lipídios possuem função de reserva de energia, enquanto as proteínas possuem funções estruturais, de defesa, de transporte e formação dos metabólitos essenciais (NASCIMENTO, ANDRADE, 2010).

Em relação ao grupo das proteínas, estas são divididas em proteínas vegetais (as leguminosas) e proteínas animais (das carnes, ovos e peixes). Em relação a fonte de proteína advinda da carne destacamos os peixes, por ser de extrema importância para a saúde e devem fazer parte das refeições rotineiras, sendo sugerido seu consumo pelo menos 2 vezes por semana, por serem ricos em vitaminas A, E, D, B1, B2, B5, B6, B9 além dos minerais cálcio e fósforo, sódio, potássio, manganês, cobre e cobalto, zinco, ferro e iodo, e ainda contém todos os aminoácidos essenciais em equilíbrio (SILVA, 2016; FAO, 2018(b)).

O consumo de 2 a 3 porções de carne de peixe por semana na alimentação diária fornece nutrientes de forma equilibrada (proteínas, lipídios, vitaminas e minerais), além dos benefícios da presença de ômega 3, lipídio poli- insaturado com ação direta na prevenção de doenças cardiovasculares, além de sua ação em diversas doenças crônicas não transmissíveis, sendo a ingestão de peixe durante a gestação benéfica tanto para a mãe quanto para o desenvolvimento neurológico do feto (FAO 2018 (b)). Destaca-se também sua função nutricional primordial no crescimento e no desenvolvimento neurológico e crescimento das crianças na primeira infância (PESSOA *et al.*, 2020).

Atualmente a produção de peixe para consumo está crescendo, como mostra o Anuário do peixe (2021), houve aumento de 83% nos últimos 11 anos e de 2019 a 2020 este aumento foi de 4,9%, atingindo 758.006 toneladas, sendo assim o Brasil se encontra entre os quatro produtores, principalmente de tilapia do mundo. A região sul responde por 30% desta produção e Santa Catarina se destaca como terceiro maior produtor deste peixe com 38.559 toneladas (SCHULTER e FILHO, 2017).

A tilapia é um peixe que se adapta facilmente em qualquer ambiente aquático, principalmente onde possui grande contaminação e já está sendo cultivada em 24 dos 27 estados brasileiros, sendo largamente consumido (EMBRAPA, 2016).

O cultivo deste peixe no país ocorre através da aquicultura, normalmente em um espaço confinado e controlado, o sistema utilizado é o de viveiros escavados contendo água doce e em tanques-rede. Na água salgada, no caso da piscicultura marinha, predominam os tanques-rede (EMBRAPA, 2017).

Para que esta fonte de proteína seja ofertada e consumida dentro das normas de segurança alimentar e atenda às necessidades alimentares dos consumidores com a qualidade desejada, o local onde estes peixes se reproduzem deve estar livre de contaminações (PENHA et al., 2020). Dependendo do nível de contaminantes existentes neste peixe e da quantidade ingerida, tempo de consumo, pode gerar sérios problemas à saúde, como predisposição a doenças cardiovasculares e neurotóxicas, além de câncer (SILVA, SANTOS, 2016).

O Brasil e alguns países enfrentam problemas diversos em relação à contaminação dos rios pelo esgoto doméstico, industrial e de sistemas de aquicultura, sendo que a maior parte do esgoto não tratado é despejado em cursos de água sem tratamento prévio, contaminando também a vida aquática, refletindo diretamente sobre a saúde das pessoas que consomem peixes oriundos destes locais. Pela presença de substâncias químicas de pesticidas e fungicidas utilizados na agricultura, depositados nas águas, e que podem se concentrar no músculo dos peixes; e dos metais como o Cádmio (Cd^{2+}), Chumbo (Pb^{2+}), Cromo (Cr^{6+}) e Mercúrio (Hg^{2+}), Alumínio (Al^{3+}) Zinco (Zn^{2+}), que em graus variados, a médio e longo prazo, podem afetar a saúde da população (ROCHA, 2015; LIMA et al., 2015).

A cidade de Joinville-SC conta com um rio muito importante que pode estar sofrendo este tipo de poluição principalmente de metais pesados, a bacia do Rio Cachoeira, local onde se observa a pesca de peixe para consumo. Situa-se na região central da cidade de Joinville, abrange 83,12 Km^2 de extensão e representa 7,3% da área do município, tem sua nascente

localizada no bairro Costa e Silva, a 40 metros de altura do nível do mar e sua foz é caracterizada por estuário sobre influência de marés e onde se encontram áreas com remanescentes de manguezais (ZSCHORNACK, 2016).

Ao longo do canal principal, o rio Cachoeira, principal rio da bacia, recebe a contribuição de vários afluentes, destacando-se os rios Itaum-Açú, Bucarein, Jaguarão, Mathias, Morro Alto, Mirandinha e Bom Retiro (ZSCHORNACK, 2016).

Assim, o presente estudo visou investigar os efeitos toxicológicos pré-clínicos em ratas expostas ao consumo da carne de peixe da bacia hidrográfica do rio Cachoeira, que podem oferecer possíveis riscos à saúde dos consumidores devido a contaminação por esgoto residencial e industrial promotor de poluição do rio. Poluição confirmada pela variação espaço temporal de Índice de qualidade da água (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e da contaminação apontada por (SOUZA, MORASSUTTI, DEUS, 2018). Também avaliar possíveis contaminações por metais pesados em peixes de cultivo, ofertados a estes animais, a fim de verificar nível de contaminação dos peixes criados nos dois ambientes, rio e local confinado e controlado, bem como efeitos para organismo dos animais.

Dada a percepção da realidade social em relação a prática da pesca de peixe neste rio geralmente para consumo conforme mostra as figuras 1,2,3,4, o qual recebe efluentes de várias origens, inclusive de indústria química, surgiu a preocupação com a exposição da população que consumir este peixe, em longo prazo, aos possíveis contaminantes, em especial metais pesados, recebidos pelo rio que podem estar bioacumulando na carne do peixe.

1.1 Interdisciplinaridade

As questões ambientais são voltadas para os temas que envolvem o equilíbrio do sistema e ecossistema e relação dos seres vivos com o planeta, a forma que o homem usa e mantém a natureza e o seu espaço na terra, a garantia do desenvolvimento equilibrado com uso consciente e sustentável dos recursos naturais, atendo-se aos limites da exploração destes recursos, que são finitos e dos quais o ser humano depende para garantir sua sobrevivência neste planeta, com qualidade ambiental. Podemos considerar que os danos ao meio ambiente são uma grave violação dos direitos humanos e que por conseguinte também afeta a produção de alimentos saudáveis influenciando na garantia de vida de todos seres humanos (MACHADO & GARRAFA, 2020; JUNIOR & PEREIRA, 2017).

Para manutenção da vida dos seres humanos, as escolhas alimentares são de suma importância, e para tal os alimentos precisam ser nutritivos e de boa qualidade, consumidos de forma segura no que tange a presença de contaminantes que coloquem em risco a saúde do ser humano (VITOLLO, 2015).

Para compreender como diversos contaminantes despejados no meio ambiente contaminam os alimentos e, respectivamente, a saúde, é preciso de estudos interdisciplinares (TRAJANO, 2010) que verifiquem como a exposição às fontes ambientais dos alimentos relacionam-se com alterações fisiológicas significativas em curto, médio e longo prazo.

Assim, a inter-relação do estudo proposto de investigação dos efeitos toxicológicos pré-clínicos em ratos expostos ao consumo de carne de peixe da bacia hidrográfica do rio Cachoeira apresenta um problema discutido sob o olhar interdisciplinar das áreas da engenharia e toxicologia ambiental, bioquímica e hematologia clínicas e nutrição.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos tóxicológicos pré-clínicos em ratas expostas ao consumo de carne de peixes da bacia hidrográfica do rio Cachoeira.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar tipos de metais pesados contidos na carne dos peixes do rio Cachoeira e cultivo através de análise dos metais pesados Cádmio (Cd^{2+}), Chumbo (Pb^{2+}), Cromo (Cr^{6+}) e Mercúrio (Hg^{2+}), Alumínio (Al^{3+}) Zinco (Zn^{2+}).
- Verificar as possíveis alterações bioquímicas e de estresse oxidativo nas ratas da raça *Wistar* após o consumo de peixe cozido, pescado no rio Cachoeira e do peixe de cultivo em diferentes períodos por 1, 3, 6, 9 e 12 meses.
- Verificar as possíveis alterações sobre os parâmetros de estresse oxidativo e bioquímicos em plasma, eritrócitos, rim, fígado, coração, baço e cérebro de ratas da raça *Wistar* após o consumo de peixe cozido, pescados no rio Cachoeira e de cultivo por diferentes períodos de 1, 3, 6, 9 e 12 meses .
- Discutir as relações de causa e efeito entre os possíveis toxicantes e as alterações fisiológicas encontradas nos períodos de 1, 3, 6, 9 e 12 meses de ambos os peixes consumidos

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Proteína da carne de peixe

A proteína é um macronutriente que desempenha diversas funções no organismo, como produção de novas proteínas, enzimas, formação de diversas células que formam os órgãos internos dos músculos, ossos, células sanguíneas e de defesa do sistema imunológico. Suas fontes alimentares incluem carnes, ovos, leite e peixe (animais), feijão, grão-de-bico, lentilha, amaranto, chia, aveia, semente de cânhamo, tofu e leites vegetais. A proteína animal é considerada de maior valor biológico, por conter células que se identificam melhor com as do corpo humano, tornando-as melhor aproveitáveis (ARAUJO et al., 2013; GUYTON, HALL, 2011). O peixe é fonte de proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos insaturados e vitaminas, bem como apresenta baixo teor de colesterol, constituindo uma opção de consumo mais saudável do que as outras carnes (LEE *et al.*, 2016).

Estima-se que o pescado represente 16,7% de toda a proteína animal consumida por humanos no planeta e 6,5% de toda a proteína, considerando as duas origens, animal e vegetal (HU et al., 2019). Estes valores são superiores ao das carnes de suíno, frango, bovino, ovino e caprino, as mais consumidas na sequência (FAO, 2014). O peixe representa aproximadamente 20% da média de ingestão per capita de proteína animal, uma rica fonte de proteínas de alta qualidade e de fácil digestibilidade (FAO, 2016). A projeção do consumo global de peixes de 2016 para 2030, é chegar a 60% do consumo desta fonte de proteína animal pela FAO (2018 (a)).

Em relação a qualidade nutricional dos peixes, podemos destacar que são divididos em dois grupos, os peixes magros e peixes gordos, o que define esta característica é a idade, estado biológico, tipo de nutrição, tempo de alimentação e temperatura da água. Um dos valores nutricionais do consumo de alguns peixes se dá pela sua composição lipídica de ácidos poli-insaturados $\omega 3$, composto pelos eicosapentaenoico (EPA C25, $\omega 3$) e docosaexanoico (DHA C 22,6 $\omega 3$), que atuam como preventivos contra doenças cardiovasculares principalmente, e sobre o sistema imunológico, com função anti-inflamatória, com ação positiva na artrite reumatoide e asma (LUZ et al., 2012).

Para levantar o percentual de proteína contida nos alimentos oriundos do grupo dos macronutrientes classificados como proteínas, este é calculado para cada 100g do

alimento, nos peixes, o valor é de 10 a 22% de proteína, sendo esta altamente digerível e com qualidade superior das outras fontes alimentares de carnes, por ter reduzido tecido conjuntivo, conter todos os aminoácidos de forma equilibrada e algumas espécies podem chegar até 50.000UI de vitamina A e 45.000UI de vitamina D, porém peixes mais magros são pobres nestas vitaminas, sendo que as espécies cartilaginosas apresentam apenas traços da vitamina D. Esta fonte alimentar proteica conta com as vitaminas hidrossolúveis: B1, B2, B5, B6, B9 e C, além de cálcio, fósforo, potássio, manganês, cobre, cobalto, zinco, ferro e iodo, também pode estar presente em seus músculos o magnésio, Cromo e níquel (OLIVEIRA, 2017; FAO, 2010).

3.2. Recomendação do Consumo do Peixe para a Saúde

O índice mínimo de consumo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (FAO 2012-2014) é de 12kg de proteína de peixe por ano por habitante, o que pode ser alcançado com duas porções de 100g/dia 2 a 3 vezes por semana. Por ser esta fonte alimentar rica em importantes micronutrientes como vitamina D, A, zinco, ferro, iodo, vitaminas do complexo B, pode auxiliar o combate da deficiência destes, o que é um dos problemas enfrentados por um terço da população brasileira. Ainda, essa carência afeta negativamente o crescimento e desenvolvimento físico e mental das crianças e pode aumentar a mortalidade infantil, enquanto no adulto pode levar a letargia, diminuição da capacidade física e reprodutiva, declínio da função cognitiva e queda da função do sistema imunológico (FAO, 2010; KENNEDY, 2003).

Já se vislumbra a crescente procura por alimentos que sejam fonte de proteínas advindas de peixes, que pode refletir na mudança de hábitos alimentares e melhorar a qualidade de vida, em virtude do conhecimento sobre os benefícios que o pescado proporciona, pois o peixe é fonte de gorduras insaturadas que agem na proteção contra doenças cardiovasculares, contribui para o desenvolvimento infantil, principalmente do feto, especificamente do cérebro e do sistema nervoso, e auxilia no equilíbrio alimentar e no combate à obesidade (SILVA, 2016; FAO, 2018).

3.3 Segurança Alimentar do Consumo de Peixe

O consumo de pescado na América Latina e no Caribe Crescerá 33% até 2030 e o maior consumo de peixes comestíveis ocorrerá nos países asiáticos, representando 71% (aproximadamente 184 milhões de toneladas). No Brasil, o consumo médio de peixes da água doce da pesca de captura continental e aquicultura de água doce é considerado bastante baixo - somente 3,95 kg per capita por ano em 2013 - mas na Amazônia, esse consumo está próximo de 150 kg per capita por ano, enquanto a América latina e o Caribe se mantêm como regiões exportadoras, na Amazônia brasileira, as famílias obtêm 30% da renda familiar com a pesca (FAO, 2018 (a)).

Estima-se que mais de 120 milhões de pessoas no mundo dependam diretamente das atividades relacionadas à pesca e 90% dos pescadores. O consumo de peixe já é uma escolha de mais da metade do consumo de proteína animal pela população de Bangladesh, da Indonésia e das Ilhas Salomão (KAWARAZUKA, 2010; FAO, 2014).

O peixe é uma das fontes proteicas alimentares que devem estar incorporadas nas políticas nacionais e intersetoriais do programa de segurança alimentar e nutricional, focado especialmente no apoio aos programas especiais de atenção à promoção da produção em pequena escala e de arranjos locais (como aquisição através de mercados locais e para refeições escolares), além do incentivo ao consumo entre os grupos vulneráveis sujeitos a deficiência de micronutrientes, crianças, mulheres grávidas e idosos (FAO, 2014; HLPE, 2014).

A tilapia possui carne branca de boa qualidade, odor característico agradável e ausência de espinha intramuscular em forma de "Y", sendo de fácil filetagem e adequada para o processamento industrial, além de seu baixo teor de gordura e aspecto fibroso e succulento, gerando uma elevada aceitação no mercado consumidor com baixos custos, importante fonte de lipídios, proteínas, de fácil digestão e alto valor biológico, possui cálcio e fósforo e um níveis razoáveis de sódio, potássio, zinco, manganês, além de ferro e iodo (HE *et al.*, 2016).

Conforme o *codex alimentarius* (ORTEGA 2015), salienta-se atenção especial e adequada às normas para coleta, manuseio, manipulação e distribuição da carne de peixe, para não afetar a qualidade da carne, garantindo que esteja apta ao consumo e que não sejam coletados de ambientes aquáticos expostos a diversos contaminantes, como antibióticos, drogas e demais substâncias químicas, mantendo assim o princípio da segurança alimentar na oferta deste macronutriente à população (FAO, 2018 (b)).

A lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006, discorre sobre a regulamentação e garantia da qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica dos alimentos, bem como seu aproveitamento, estimulando práticas alimentares e estilos de vida saudáveis que respeitem a diversidade étnica e racial e cultural da população (BRASIL, 2006). Por isso o governo, organizações internacionais, setor privado e sociedade civil devem incentivar o desenvolvimento e utilização de padrões de certificação de sustentabilidade existentes (ou criação de novos) que incluam critérios de segurança alimentar e nutricional e facilitem o engajamento de atividades de pequena escala por meio de apoio adequado e construção de capacidade para a produção e cultivo de peixes (HLPE, 2018).

Embora a carne de peixe seja indubitavelmente uma fonte importante de proteína de fácil digestibilidade e com alto valor biológico, assim como boa fonte de lipídios poli-insaturados, vitaminas e minerais, a ingestão deste alimento pode ocasionar efeitos indesejados ao organismo humano de adultos e crianças, por estar sujeito ao risco de acumulação de toxinas oriundas de algas nocivas, bactérias, vírus, poluentes, além de diversos compostos inorgânicos e orgânicos, metais pesados como metilmercúrio, cádmio e estanho orgânico (STAP, 2012; SOARES & GONÇALVES, 2012).

As patologias advindas do consumo podem ser tanto por toxinas produzidas pelo próprio peixe ou por substâncias tóxicas ou micro-organismos contidos na água contaminada em que os peixes se reproduzem provenientes de áreas degradadas e locais de dejetos e de despejo de lixo. Os contaminantes podem ser principalmente as bactérias do genero *Vibrio*, *Listeria*, *monocitogenes* e *Clostridium botulinum*, os vírus da hepatite tipo A (VHA), adenovírus e norovírus (MAGALHÃES, 2012).

O nível de acumulação de elementos no peixe é influenciado por fatores abióticos, como: natureza e intensidade da poluição, pH, alcalinidade e temperatura da água, e fatores bióticos, como tamanho, idade, hábitos alimentares e ciclo reprodutivo (MILOŠKOVIĆ *et al.*, 2016). Estudo prospectivo de coorte para a saúde ambiental de mães e crianças realizado por Kim *et al.* (2018) verificou que a exposição ao mercúrio durante o início da gravidez (presente no sangue materno e do cordão umbilical na hora do nascimento dos bebês) pode atrasar o desenvolvimento neurológico durante a infância (primeiros 3 anos de vida).

3.4 Produção e modo cultivo da tilapia

A produção de pescados é dividida entre a pesca extrativa e a aquicultura. a aquicultura é o cultivo, normalmente em um espaço confinado e controlado, de organismos aquáticos de interesse econômico produtivo, difere em várias modalidades, destacando aqui a piscicultura. A pesca extrativista é realizada através da pesca manual do meio ambiente. Na água doce o sistema de criação utilizado é viveiros escavados e em tanques-rede. Na água salgada, no caso da piscicultura marinha, predominam os tanques-rede (EMBRAPA, 2017).

3.5. Ecotoxicologia

Esse ramo da toxicologia ocupa-se da avaliação dos efeitos de determinados contaminantes no meio ambiente, além dos seus efeitos para os seres humanos e as alterações ocasionadas ao organismo por substâncias químicas que podem ser prejudiciais. Esses compostos podem passar por bioconcentração e biomagnificação, quando a quantidade de substâncias químicas tóxicas capazes de gerar prejuízo à saúde alcança níveis tróficos superiores, podendo levar a consequências letais (SPARLING, 2016). A contaminação da água por substâncias xenoquímicas bioacumuláveis que vão se depositando nas diversas matrizes bióticas e abióticas acumulativas influencia sobremaneira o equilíbrio das espécies aquáticas, com potencial para atingir a saúde dos outros seres vivos na terra (SPARLING, 2016).

Os metais pesados contidos no organismo dos peixes e seus efeitos para o ser humano são reconhecidamente um dos principais focos dos estudos de contaminação, destacando-se: Cádmio (Cd^{+2}), chumbo (Pb^{+2}), Cromo (Cr^{+6}) e mercúrio (Hg^{+2}) Alumínio (Al^{+3}) e Zinco (Zn^{+2})(LIMA et al., 2015). Patologias como hipertensão arterial, disfunção renal e aterosclerose podem ser desenvolvidas devido ao excesso de Cd^{+2} , além de enfisema pulmonar, paralisia facial, lesões testiculares, gengivite, catarata, redução da capacidade cognitiva infantil e até mesmo câncer, conforme a intensidade e o tempo de exposição. O Pb^{+2} pode causar toxicidade relevante no sistema nervoso (trazendo sintomas como irritabilidade, cefaleia, vertigem e perda de memória), nos ossos e no sistema hematopoiético; pode atravessar a barreira placentária e contaminar o feto (TEIXEIRA, 2018). O Cr^{+6} pode levar a dermatite, formar espécies reativas de

oxigênio, causar danos no funcionamento do sistema de reparo do DNA, além de ser altamente cancerígeno, responsável particularmente pelo câncer de pulmão (LOZI, 2019).

A toxicidade do Hg^{+2} para seres vivos é facilitada por sua característica de não sofrer degradação ambiental, sendo considerado o metal pesado mais tóxico e através da bioacumulação e biomagnificação no organismo, pode gerar danos irreparáveis (LOPES, 2012). São passíveis de dano por excesso de mercúrio o sistema nervoso central, gastrointestinal, cardiovascular e renal (VASCONCELOS, 2015).

3.6. Contaminação dos rios

A superfície da terra conta com 71% de água em forma líquida e desta, apenas 3% servem para uso e consumo humano, caracterizada por água doce, responsável pela preservação da vida neste planeta. Sua importância vai desde a manutenção da hidratação da maioria dos seres vivos, como da produção de alimentos, do equilíbrio do clima e a garantia da existência dos lagos e rios. Sessenta por cento da água doce disponível está concentrada em 10 países: Brasil, Rússia, China, Canadá, Indonésia, EUA, Índia, Colômbia e Congo (RIBEIRO, 2017).

De todos os rios existentes no país, já é possível conhecer os mais poluídos por várias formas: despejo de água com temperatura maior, esgoto, compostos químicos industriais, metais contaminantes. A presença de uma porcentagem maior do que a exigida por lei contamina os rios a ponto de matar os peixes e outras formas de vida que dependem do rio (BRASIL, 2019).

A flora e fauna dos ecossistemas aquáticos do Brasil apresentam inúmeras características relacionadas com o regime hidrológico dos grandes rios e áreas alagadas e de várzeas. Locais de água doce, onde aproximadamente 40% do total de 20.000 espécies de peixes vive e a biota de águas interiores é muito mais diversa e rica do que a dos oceanos (RIBEIRO, 2017).

A poluição das águas produz nocivos efeitos ecológicos no equilíbrio da fauna e flora, também atinge atividades como turismo (impedindo banhos de mar ou rio) e a pesca, além da agricultura (irrigação e piscicultura) devido à falta de acesso a águas próprias para uso em certas localizações. Conforme descreve o Artigo 54 da Lei de Crimes Ambientais (Lei 9605/98) (BRASIL, 1998), é crime causar poluição de qualquer

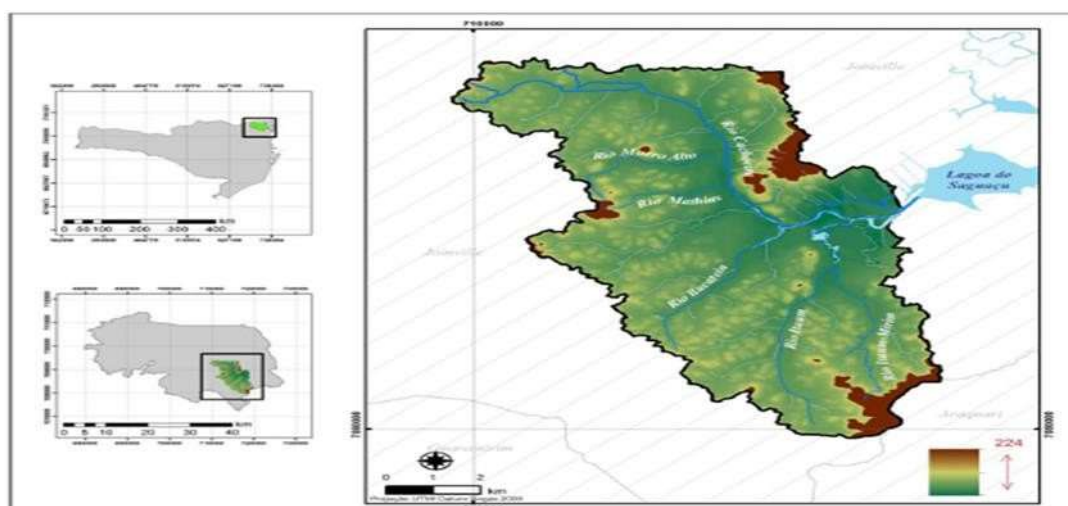
natureza em níveis que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana, ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora.

O esgoto urbano do início do século XX era diferente do esgoto do século XXI, devido à enorme variedade de compostos químicos produzidos, que são posteriormente lançados no esgotourbano, seja doméstico ou industrial, e eu podem trazer diversos efeitos negativos à vidamarinha, que podem ser deletérios e sinérgicos através da soma de diversos contaminantese refletir na saúde humana (VILLANI, 2017).

3.7 Bacia Hidrográfica do Rio Cachoeira

A bacia hidrográfica corresponde a agrupamento de terras escoado por um rio e seus afluentes, formada nas regiões mais altas do relevo por água da chuva (ANTONELI, 2007). A bacia hidrográfica do rio Cachoeira tem uma área de 81,4 km, perímetro de 59,2 km e extensão de 16km. Circunda uma região urbana bem expressiva na cidade de Joinville (SC), em 72,6% da área urbana (OLIVEIRA, 2017, IBGE, 2016), conforme mostra a figura 1.

Figura 1: Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Cachoeira em relação ao estado de Santa Catarina e ao município de Joinville.



Fonte: Oliveira *et al.*, 2017

Para Almeida (1999), os primeiros sinais de poluição no rio Cachoeira são antigos e datam do ano de 1877. No início do século passado, quando o mesmo ainda possuía águas limpas e era possível obter dele várias espécies de peixes. Nas primeiras décadas do

século XX, eram comuns também os banhos públicos. A partir da década de 30, quando o porto de Joinville passou por aumento relevante de movimento, o rio Cachoeira começou a ser explorado como meio de escoamento da produção de madeira e dos produtos do moinho de trigo. Essa movimentação durou pelas duas décadas seguintes, porém ainda era possível pescar e tomar banho no rio.

Com o aumento da industrialização e o crescimento populacional do município, ocorreu aumento preocupante da quantidade de resíduos lançados no rio Cachoeira, poluindo-o em vários pontos, tornando-o impróprio para banho e pesca, comprometendo toda a vida aquática, e devido a toda sua extensão passar pela área urbana, a contaminação foi sendo cada vez mais favorecida, devido ao despejo de resíduos de diversos produtos além do esgoto doméstico (ZSCHORNACK, OLIVEIRA, 2016).

Entretanto, a contaminação do rio Cachoeira continua ocorrendo, apesar de existirem leis específicas na cidade que regulamentam esta conduta, como a Lei complementar nº 29, de 14 de junho de 1996 (BRASIL, 1996), que institui o código municipal do meio ambiente capítulo IX da poluição das águas:

Art. 18 – “É proibido o lançamento, direto ou indireto em corpos d'água, de qualquer resíduo, sólido, líquido ou pastoso em desacordo com os parâmetros definidos na resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, e legislação estadual .Art. 19 - Todo e qualquer estabelecimento industrial ou de prestação de serviços potencialmente poluidor de águas, deverá possuir sistema de tratamento de efluentes líquidos cujo projeto seja aprovado pela FUNDAMA (LEI COMPLEMENTAR Nº 29, DE 14 DE JUNHO DE 1996”.

Trazendo para um cenário mais atual, o estudo de Coan (2019) verificou as características da água e de peixes coletados do rio Cachoeira e encontrou Chumbo (Pb^{2+}), Cromo (Cr^{6+}) Zinco (Zn^{2+}), (Ni^{2+}) e (Cu^{2+}) na água e principalmente no fígado dos peixes. Não foi encontrada toxicidade aguda, porém a exposição crônica à água ou ao sedimento deste rio perturbou a fecundidade do microcrustáceo *Daphnia magna*, também houve fitotoxicidade importante sobre a semente de *Euruca sativa*, evidenciando que o rio Cachoeira já apresenta efeitos tóxicos aos organismos testados, ainda que crônicos e de menor grau, mas que colocam em risco a manutenção adequada deste ecossistema.

Portanto verificou-se que a pesca neste rio é uma prática entre vários cidadãos da cidade de Joinville conforme mostram as figuras 2, 3, 4 e 5, ao consumir este peixe podem vir a desenvolver alguns problemas de saúde, através dos contaminantes presentes nesta

fonte de proteína tanto a médio como a longo prazo conforme mostra as figuras 2,3,4.5 abaixo,

Figura 2 e 3: Pesca no rio Cachoeira 7/12/2014



Fonte: You tube



Fonte: You tube



Fonte: Google

Figura 4: Pescaria com rede na ponte do rio Cachoeira 01/06/2018

Figura 5: Pescaria esportiva de tilápias no Rio Cachoeira no centro de Joinville em frente ao teatro do Bolshoi - 8/06/2015



Fonte Google

3.8 Ictiofauna do Rio Cachoeira

Conforme estudo de Pinheiro e Dalcin (2017), foram encontrados 899 peixes, pertencentes a 22 espécies, com predominância das famílias da ordem *Characiformes* e *Siluriformes* com seis espécies, seguidos dos *Cyprinodontiformes*, com cinco espécies e *Gymnotiformes*, *Synbranchiformes* e *Perciformes* (uma espécie cada). O peixe da espécie *Hoplias malabaricus*, Classe *Osteichthyes*, Ordem *Characiformes*, conhecida popularmente como traíra, com grande capacidade de resistência para viver e se

reproduzir em ambientes com pouca oferta de oxigênio, e característica de rios de água doce, também pode ser encontrado no rio Cachoeira. (IBGE, 2016).

A tilápia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) apresentada na figura 4, escolhida para o estudo proposto, também encontrada no Rio Cachoeira da cidade, está distribuída em aproximadamente 70 espécies e subespécies: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, *Petrotilapia* e *Tilapia*, oriundas do continente africano, rio Nilo e o lago Vitória, seus principais nichos ecológicos primitivos e originais. Utilizada como fonte alimentar pelos egípcios há 4 000 a.C e esta fonte proteica de alimento é encontrada na África, Ásia, Europa e América do Norte e do Sul, é uma espécie cultivada em aproximadamente 140 países (ZANIBONI, 2004; FAO, 2014).

Este peixe foi introduzido no Brasil de forma experimental em 1953 e adaptou-se às modificações de clima e ambiente, ambientes marinhos com grande poluição e contaminação. Atualmente, a tilápia como fonte alimentar oriunda da água doce (figura 4) é cultivada em 24 dos 27 estados brasileiros (EMBRAPA, 2016). Sendo a tilápia utilizada no estudo conforme mostra figura 6.

Figura 6: Tilápia coletada em um mesmo trecho do Rio Cachoeira, no bairro Costa e Silva (Joinville, Santa Catarina, Brasil).



Fonte: Imagem por Diogo Augusto Moreira (CrBIO nº 81154, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos da Pesquisa

Os experimentos foram conduzidos unicamente após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) central da UNIVILLE (Parecer 01/2019).

4.2 Desenho e Local do Estudo

Este foi um estudo pré-clínico experimental, realizado na Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), conduzido no biotério e nos laboratórios de práticas farmacêuticas e de análise instrumental.

4.3 Estudo Experimental *in vivo*

Foram utilizados *Rattus norvegicus* albinos da raça *Wistar*, fêmeas, com peso médio inicial de 100g, provenientes do Biotério da Universidade Regional de Blumenau (FURB – SC). Os animais foram recebidos com 21 dias de idade, acomodados (4 por gaiola) e aclimatados por 7 dias no biotério da Universidade da Região de Joinville para adaptação. As salas de manutenção dos animais eram mantidas em ciclo de 12h claro/escuro (luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), temperatura entre 22 ± 2 °C e umidade entre $50 \pm 5\%$, com sistema de exaustão de ar. Os animais tiveram livre acesso à ração e água durante o período de aclimatização. Durante a oferta de peixes do rio Cachoeira e do cultivo para os animais, os mesmos ficavam 8 horas em jejum no período anterior, para garantir o consumo do peixe e não ultrapassar a quantidade de proteína ofertada, somada a ração. Os experimentos foram realizados conforme o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2012) e as recomendações exigidas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, (1996)”.

Após a aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos que foram expostos por diferentes prazos (1, 3, 6, 9 e 12 meses) à carne de peixe de cultivo ou do rio Cachoeira, conforme a tabela abaixo:

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais.

Período de exposição dos grupos	Dias da semana	Grupo controle	Grupo peixe de cultivo	Grupo peixe do rio Cachoeira	Total de animais por grupo
1 mês	2º	Ração	Ração	Ração	8
3 meses	3º	Jejum 8h	Jejum 8h	Jejum 8h	8
6 meses	4º	Ração	Peixe	Peixe	8
9 meses	5º	Ração	Ração	Ração	8
12 meses	6º	Jejum 8h	Jejum 8h	Jejum 8h	8
	Sábado	Ração	Peixe	Peixe	8
	Domingo	Ração	Ração	Ração	8

Os animais do grupo controle receberam ração padrão (Nuvilab®) e os animais dos grupos experimentais receberam duas porções por semana de carne de peixe. Oito horas antes do fornecimento da carne de peixe foi retirada a ração das caixas de todos os grupos, inclusive o controle. Os animais foram expostos a carne de peixe pelos períodos de 1, 3, 6, 9 e 12 meses.

Para definição da porção de peixe ofertada a cada 15 dias para cada rata, utilizou-se a recomendação da OMS (2014) de consumo de 12Kg de peixe ano para um adulto de 70Kg (uma porção de 125g/70 Kg duas vezes por semana) .Ou seja 1,78mg de carne de peixe foi multiplicada pela massa corporal de cada animal, que foi pesado quinzenalmente.

Um dia após o término de cada período de exposição, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue total, e excisados o baço, cerebelo, coração, córtex cerebral, fígado e o rim direito.

4.4 Preparo das Amostras

4.5 Escolha e Coleta dos Peixes

Foi selecionada a tilápia para este estudo por ser um peixe bastante consumido entre os brasileiros, ter uma ótima relação custo/benefício para os consumidores, devido a sua carne ser considerada uma proteína de alto valor biológico e textura firme. Este peixe também pode se desenvolver em ambientes adversos, tem hábito alimentar onívoro, alimenta-se de todo tipo de material orgânico disponível na água, moluscos, sementes, vegetais de qualquer espécie, crustáceos, entre outros (BEMVENUTI, FISCHER, 2010).

Os peixes de cultivo selecionados foram tilápias do Nilo *Oreochromis*, provenientes de cultivo em monocultura de tilápias em viveiro escavado arraçoado, localizado na Estrada Quiriri na cidade de Joinville-SC. O local de cultivo é assistido regularmente pela equipe do setor de piscicultura da unidade de desenvolvimento rural da Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente que faz regularmente a análise da água de cultivo e confirmou que os parâmetros de cultivo discriminados estão dentro do ideal para a tilapicultura (anexo 1). A ração que foi ofertada aos peixes omnívoros possui 30% de proteína bruta (marca Nicoluzzi). Os peixes foram capturados em triplicata, com auxílio de redes, armazenados em caixa térmica e imediatamente entregues para a pesquisadora para posterior limpeza e congelamento a -18°C até a hora do preparo. A coleta se iniciou na mesma data que os peixes do rio Cachoeira e na frequência igual.

Os peixes do rio Cachoeira também foram tilápias do Nilo *Oreochromis*, coletados seguindo a metodologia de Lima *et al.* (2013), com o auxílio de redes, sendo capturados 3 peixes da mesma espécie, armazenados em caixas de isopor com gelo até a chegada ao laboratório de toxicologia da UNIVILLE, onde foram medidos e pesados. A coleta do peixe ocorreu a cada 6 meses, período seguro para armazenamento e manutenção da qualidade da carne para consumo. Todas as porções foram congeladas limpas.

A coleta dos peixes foi iniciada em dezembro de 2020, durante o dia, sempre considerando a condição de ausência de chuvas de, no mínimo, dois dias antes das coletas e levando-se em conta a facilidade de acesso e a presença da espécie alvo (PINHEIRO *et al.*, 2017). As tilápias foram coletadas no rio Cachoeira conforme as coordenadas geográficas 26°16'08.4" S 048°51.880' W), no bairro Costa e Silva, em Joinville (SC), primeira coleta e (26°16'01.1" S - 48°51'40.1" W), próximo a escola Geovani Pascoalini Franco, no bairro Costa e Silva, em Joinville, Santa Catarina, segunda coleta. Como mostra anexo A e B.

Os peixes foram coletados utilizando tarrafas de malha entre nós de 4cm e redes de emalhe, com 8 metros de comprimento e 1 metro de largura, com malha entre nós de 6cm

(Figura 7B). Após a captura, os indivíduos eram identificados ao menor nível taxonômico possível para confirmar que se tratava da espécie alvo, colocados em sacos plásticos, pesados, etiquetados, lacrados e acondicionados em caixa térmica com gelo (Figura 6). Foram coletados 19 indivíduos, totalizando 5100 g de tilápias. Os procedimentos de coleta adotados possuem autorização SISBIO nº 10476-3 e foram realizados pela Equipe de biólogos Diogo Augusto Moreira, (Biólogo - CrBio 81154) e Johnatas Adelir-Alves (Biólogo - CrBio 053967), conforme ilustrado na figura abaixo. Figura 7:

Figura 7: Local onde os peixes foram capturados. A - Indivíduo sendo retirado da rede de emalhe, B – pesagem, C e D - confirmação taxonômica.



Fonte: Diogo Augusto Moreira (CrBio nº 81154, 2020).

4.6 Preparo da carne de peixe para análise química dos metais pesados

As análises de concentração de metais pesados na carne de peixe foram conduzidas por espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) em aparelho Avio 200-Perkin Elmer, adaptadas das metodologias de Sanches Filho, Fonseca e Holbig (2013) e de Uysal, Emre e Köse (2008).

Foram pesadas 5g de cada amostra de carne cozida de peixe de cultivo e do rio Cachoeira, que foram colocadas em liofilizador por 24 horas. Após secagem, restaram 3,40 g da amostra da carne de peixe de cultivo e 3,22g da amostra de carne de peixe do rio Cachoeira. A cada amostra foram adicionados 10mL HCl (20%) + 4mL de HNO₃ (50%), colocadas na chapa de aquecimento a 90°C e deixadas por 30 minutos em refluxo. Em seguida as amostras foram filtradas para um balão de 100 mL e avolumadas com água Milli-Q. A análise dos metais pesados Cádmio (Cd⁺²), chumbo (Pb⁺²), Cromo (Cr⁺⁶) e mercúrio (Hg⁺²) Alumínio (Al⁺²) e

Zinco (Zn^{+2}) foram realizados para verificar a presença dos mesmos na carne do peixe do rio cachoeira e do cultivo.

Todo o material utilizado no preparo da amostra foi lavado com uma solução de Extran e água e, após, colocado em ácido nítrico a 10% (v/v) durante pelo menos 24 horas. Após imersão no ácido, o material foi lavado sete vezes na água Milli-Q. Os resultados da análise de metais foram expressos em ppm (mg/L).

4.7 Preparo da carne do peixe para consumo das ratas

A seleção e preparação da carne dos peixes para o consumo dos animais seguiu as normas de segurança alimentar da Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação (ANVISA, 2004). Logo após o peixe ser pescado, foi limpo, eviscerado e suas escamas e cabeça retiradas. A carne dos peixes de cultivo e do rio Cachoeira foi separada dos espinhos e apenas a carne crua, em forma de filé foi embalada individualmente ou no máximo dois filés em sacos plásticos, transparentes, selecionados de acordo com a norma RDC nº 259/2002 (ANVISA, 2002), mantida em temperatura entre -18°C e -20°C até o momento do descongelamento e cocção da carne.

O descongelamento da carne ocorreu em condições de refrigeração à temperatura inferior a -5°C , para evitar que as áreas superficiais deste alimento se mantivessem em condições favoráveis à multiplicação microbiana. A cocção foi realizada em recipiente de vidro, apenas em água potável sem adição de tempero, em temperatura de 150°C por 10 minutos (BRASIL, 2004).

Após o cozimento, a carne do peixe foi resfriada, separada em porções e em seguida congelada entre -18°C e -20°C , embalada em sacos plásticos conforme a RDC nº 259/2002 para garantir a segurança nutricional deste alimento e minimizar o risco de contaminação cruzada. A carne foi descongelada em forno de micro-ondas por 2 minutos antes de ser oferecida a cada animal. Em seguida, foi acondicionada em bolsa térmica para transporte até o biotério, onde pesou-se cada porção em balança de precisão (BRASIL, 2018 (b); Cribb *et al.*, 2018).

A carne de peixe foi ofertada aos animais duas vezes por semana, após um período de 8 horas de jejum. Cada animal foi colocado individualmente em uma gaiola, para garantir que cada um consumisse sua porção, e após verificação do consumo total da porção, eles foram

recolocados na caixa maior junto com os demais animais do seu grupo e ração à vontade foi disponibilizada novamente.

4.8 Sangue total

Para análise dos parâmetros hematológicos foi obtido de sangue dos animais por meio de decapitação e acondicionado em tubos com e sem ácido etilenodiamonotetracético tripotássio (EDTA K3). O sangue foi centrifugado a $1000 \times g$ por 10 minutos para separação de plasma e soro, que foram mantidos em freezer. O sangue recém-coletado foi utilizado para análise de parâmetros hematológicos e confecção de lâmina para contagem diferencial de células sanguíneas (LIMA *et al.*, 2017).

4.9 Eritrócitos

Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio) e os lisados foram preparados pela adição de 1mL de água destilada para 100 μ L de eritrócitos lavados e congelados.

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a $13,500 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5mg/mL de proteína (LIMA *et al.*, 2017).

4.10 Tecidos

O fígado, rim, coração, baço e estruturas cerebrais (córtex e cerebelo) foram removidos, decapsulados e mantidos em gelo com tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão adequado, conforme metodologia a ser empregada, usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a $3.000g$ a $4^{\circ}C$ por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante estocado em alíquotas e armazenado a $-80^{\circ}C$ para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) e de estresse oxidativo (TBA-RS, PC e conteúdo total de SH).

4.11 Aferição dos Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos de função hepática (TGO e TGP), tireoidiana (TSH, T4L e T3) e renal (creatinina) foram mensurados por processo automático no aparelho Advia Centaur Immunassay System da Siemens (laboratório Santa Helena de Jaraguá do Sul - SC). Demais parâmetros bioquímicos foram mensurados por espectrofotometria no laboratório de Práticas Farmacêuticas da UNIVILLE utilizando kits da Labtest (tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos mensurados.

Teste	Reagente /Laboratório	Orgão alvo/função
Albumina	Kit Liquiform (referência 133 da Labtest)	Fígado
Ácido úrico	Kit Liquiform (referência 73 da Labtest)	Metabolismo de proteínas e função renal
Glicose	Kit Liquiform (referência 133 ou 84 da Labtest)	Metabolismo de carboidratos
Colesterol total	Kit Liquiform (referência 76 da Labtest)	Lipidograma
Triglicerídeos	Kit Liquiform (referência 87 da Labtest)	Lipidograma
Colesterol HDL	Kit Liquiform (referência 13 da Labtest)	Lipidograma
Colesterol LDL	Calculado pela equação de Friedewald	Lipidograma
Colesterol VLDL	Calculado pela equação de Friedewald	Lipidograma
Lactato	Kit Liquiform (referência 116 da Labtest)	Metabolismo de carboidratos
Creatinina	Kit Liquiform (referência 35 da Labtest)	Rim
Ureia	Kit Liquiform (referência 27 da Labtest)	Rim
AST	Kit Liquiform (referência 109 da Labtest)	Fígado
ALT	Kit Liquiform (referência 108 da Labtest)	Fígado
Proteínas Totais	Kit Liquiform (referência 99 da Labtest)	Fígado

4.12 Aferição dos Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram mensurados por processo automático de leitura de luz e impedância elétrica por meio de automação com o aparelho Pentra 60 da marca Horiba

ABX. Foram avaliados os parâmetros da série vermelha (hemograma): hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), contagem de eritrócitos, RDW (*Red Cell Distribution Width*), índices referentes à concentração de hemoglobina e análise microscópica do esfregaço sanguíneo para observação de alterações de forma e cor dos eritrócitos. Também foi avaliado o leucograma (número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) e a quantidade total de plaquetas.

4.13 Aferição dos Parâmetros de Estresse Oxidativo

4.14 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

TBARS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. (1979). A metodologia de TBARS mensura o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. Os tecidos homogeneizados e o plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidos num banho de água fervente durante 60 minutos. TBA-RS foram determinadas pela absorvância a 535nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados estão expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

4.15 Conteúdo total de sulfidrilas (SH)

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), que se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado foi adicionado a 1mL de tampão (PB²⁺) pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µL de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

4.16 Conteúdo de Proteínas Carboniladas (PC)

O teor de carbonilas foi mensurado através do método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370nm. Resumidamente, 200uL de homogeneizado foram adicionados a tubos de plástico contendo 400uL de dinitrofenilhidrazina 10mM (preparado em HCl 2M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500uL de ácido tricloroacético a 20% foram adicionados a cada tubo. A mistura foi submetida a vórtex e centrifugada a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido, descartado. O sedimento foi lavado com 1mL de etanol/acetato de etila (1: 1 v/v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min.

O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em 600μL de guanidina 6M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60 °C durante 15 min.

As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3min e o sobrenadante foi usado para medir a absorvância a 370nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol/mg de proteína).

4.17 Atividade da Catalase (CAT)

Esse parâmetro foi mensurado pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotometro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H₂O₂ a 240nm num meio de reação contendo 20mM de H₂O₂, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, e proteína 0,1-0,3mg/mL. Uma unidade é definida como CAT 1μmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

4.18 Atividade da Superoxido Dismutase (SOD)

Esse parâmetro foi determinado pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido (O₂•⁻), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15μL de cada amostra, 215μL de uma mistura

contendo 50 mL de tampão Tris, pH 8,2 foram adicionados à 1 μ M de EDTA e 30 μ M de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20 μ L de pirogalol e a absorvância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420nm usando um espectrofotometro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorreu na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica foi relatada como unidades/mg de proteína SOD.

4.19 Atividade da Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

Esse parâmetro foi mensurado pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340nm por 4 minutos (espectrofotômetro Shimadzu UV-visível). O meio contém 2mM de GSH, 0,15U/ml GSH redutase, 0,4mM de azida, 0,5mM de tertbutil-hidroperóxido e 0,1mM de NADPH. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1 μ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px / mg de proteína.

4.20 Proteínas

O teor de proteínas totais foi realizado pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

4.21 Descarte de resíduos

Remanescentes (escamas, espinho, vísceras e cabeça) dos peixes capturados foram colocados em embalagem própria do peixe e o descarte foi realizado em conformidade com as normas definidas pelo laboratório de toxicologia da UNIVILLE, conforme a normativa 10004 de 1987 e a RDC N° 222, de 28 de março de 2018 (BRASIL, 2018). As embalagens foram recolhidas pela Engepasa Ambiental e seu conteúdo, incinerado.

4.22 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão, foram tabulados e analisados utilizando o programa GraphPad Prism 6.0. Análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Kruskal-Wallis ou de Tukey, para comparação entre os grupos foi conduzida, sendo valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

5. FINANCIAMENTO

Este trabalho recebeu subsídio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e do Fundo de Apoio a Pesquisa da Univille – FAP.

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ARTIGO 1: EXPOSIÇÃO DE 1 MÊS



Preclinical Toxicological Evaluation of the Consumption of Fish from the Cachoeira River Hydrographic Basin in Rats

Sônia dos Santos Toriani¹, Larissa Delmônego², Heloiza Fiamoncini³, Maria Helena Packer⁴, Aline Scheller Coan⁵, Paula Roberta Perondi Furtado⁶, Eduardo Manoel Pereira⁷, Débora Delwing-Dal Magro⁸, Daniela Delwing-de Lima⁹, Therezinha Maria Novais de Oliveira¹⁰

¹Postgraduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: soniatoriani.nutri@gmail.com

²Postgraduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: laridelmonego@gmail.com

³Department of Medicine, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: fiamoncini.helo@gmail.com

⁴Department of Medicine, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: mariakpacker@gmail.com

⁵Analytical Chemistry Research Department, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: alinescheller@univille.br

⁶Analytical Chemistry Research Department, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: analiseinstrumental@univille.br

⁷Department of Pharmacy, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: eduardo_manoel@yahoo.com.br

⁸Department of Natural Sciences, Center for Exact and Natural Sciences, Blumenau Regional University – Brazil.

E-mail: deboradelwing@furb.br

⁹Postgraduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: danidelwing@hotmail.com

¹⁰Postgraduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Brazil.

E-mail: therezinha.novais@univille.br

Received: 27 May 2022,

Received in revised form: 17 Jun 2022,

Accepted: 22 Jun 2022,

Available online: 30 Jun 2022

©2022 The Author(s). Published by AI Publication. This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords — diet, food and nutrition, sustainable development, environmental monitoring, fish, food safety, toxicology.

Abstract— Fish is one of the healthiest food sources once it has proteins, vitamins, minerals and the omega-3 polyunsaturated lipids. Nevertheless, to be healthy, the protein in fish meat must not have contaminants further than allowed. This study aimed to investigate the preclinical toxicologic effects of consumption of fish meat from Cachoeira river (Joinville, Santa Catarina, Brazil). Groups of rats were divided and received for a month: standard ration, farmed fish meat and fish meat from Cachoeira river twice a week. One day after the last exposition, animals were euthanized and blood, spleen, heart, liver, kidney, cerebellum, and cerebral cortex were collected to measure oxidative stress, biochemical and hematological parameters. Metals levels were also analyzed in fish meat by atomic emission spectrometry. Significant elevation of carbonylated proteins were observed in heart and liver and thiobarbituric acid reactive substances in liver, plasma and cerebellum were observed. Total

sulfhydryl content decreased significantly in cerebellum, liver and heart, and decreased catalase activity in the liver and superoxide dismutase activity in the kidneys were also present among rats who consumed fish meat from Cachoeira river. No modification of hematological parameters was observed, and only significant decrease of HDL occurred among biochemical parameters. Analysis of metals in river fish meat showed a fivefold increase in zinc and aluminum compared to farmed fish meat. Short-term exposure to fish meat from the Cachoeira River resulted in increased oxidative stress, liable to be transferred through the food chain, possibly associated with the increased presence of heavy metals.

I. INTRODUCTION

Food is a basic need to ensure survival and to improve the quality of life of the human being, as long as adequate nutrients are consumed for the maintenance of health. The nutrients are divided according to their function in the body into macro and micronutrients and the quantity consumed is defined according to the energy needs of each person and in each phase of life (Ribeiro et al., 2017).

Proteins can be divided into vegetable and animal (from meat, eggs, and fish). Proteins from fish meat are extremely important for health and must be part of routine meals, and its consumption is recommended at least twice a week. Furthermore, fish meat provides vitamins A, E, D, B1, B2, B5, B6, B9, in addition to the minerals calcium and phosphorus, sodium, potassium, manganese, copper and cobalt, zinc, iron and iodine, and also contains all essential amino acids in balance (Food and Agriculture Organization – FAO - 2014). Fish meat is also a source of omega 3, a polyunsaturated lipid with direct action in the prevention of cardiovascular diseases, non-transmissible chronic diseases, and takes part in the neurological

development of the fetus and in early childhood (Santos et al., 2013).

To ensure that fish meat is offered and consumed within food safety standards, the place where fish grow and reproduce must be free of contaminations, since they can be transferred to the human body after ingestion in varied degrees, depending on the quantity, length of consumption and level of contamination of the food, and can cause serious health problems, such as predisposition to cancer, cardiovascular diseases and neurotoxicity (Silva & Santos, 2016). The determinant for ensuring the integrity of this source of protein depends on where these fish come from and how this water resource is constituted and whether there is eutrophication that will modify its characteristics (Macedo & Sipauba-Tavares, 2018).

The problem faced in Brazil and in developing countries is related to most of the raw sewage released without any prior treatment in water courses, containing various types of contaminants, which negatively affect the

aquatic environment, which reflects directly on people's health, becoming increasingly necessary the adoption of a practice focused on sustainable development aiming to maintain and preserve natural resources (Campos & Kulin, 2021; Vincze et al., 2015).

Hence, fish coming from a river with contaminated water can cause damage to the health of the consumers in the long term, due to the exposure to contaminants such as: domestic and industrial effluents, chemical substances from pesticides and fungicides used in agriculture, and heavy metals deposited in the water and which can concentrate in the fish muscle: cadmium (Cd^{2+}), lead (Pb^{2+}), chromium (Cr^{6+}) and mercury (Hg^{2+}) (Lima et al., 2015). The hydrographic basin of the Cachoeira river is located in the central region of the city of Joinville, covers 83.12 Km^2 in area and represents 7.3% of the city area. Its 100 source is located in the Costa e Silva neighborhood, 40 meters above sea level and its mouth is characterized by an estuary under the influence of tides and where areas with mangrove remnants can be found (Ribeiro & Oliveira, 2014).

In view of the perception of the local social reality of consumption of fish meat from the Cachoeira river, which receives effluents from several origins, including chemical industry, the concern with the long-term exposure of the population to possible contaminants received by the river that may be bioaccumulated in the fish meat arose. Hence, the present study aims to investigate the pre-clinical toxicological effects in rats exposed to the consumption of fish meat from the Cachoeira river basin, which may pose health risks to consumers due to the routing of residential and industrial sewage causing pollution of the river, confirmed by the spatial and temporal variation of water quality index (Oliveira et al., 2013).

II. METHODS

Pre-clinical experimental study, carried out at the University of Joinville Region (UNIVILLE), conducted in the sectorial bioterium and in the laboratories of

pharmaceutical practices and instrumental analysis. The experiments were conducted after approval of the research project by the UNIVILLE's Ethics and Research Committee on Animal Use (Opinion 01/2019).

2.1. Experimental Protocol in vivo

Wistar female albino *Rattus norvegicus*, with an

average initial weight of 80-100g, 122 from the Bioterium of the Blumenau Regional University Foundation were used (FURB 123 – SC – Brazil). The animals were received at the age of 21 days, housed (4 per cage) and acclimated for 7 days in the sectorial bioterium of the University of the Joinville Region for adaptation. The animal holding rooms were kept on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 am and off at 7:00 pm), temperature between 22 ± 2 °C and humidity between $50 \pm 5\%$, with an air exhaust system. The animals had free access to feed and water. The 128 experiments were carried out according to the provisions of Law No. 11,794 (Brasil, 2008), and other regulations applicable to the use of animals in teaching and/or research, especially the Normative Resolutions of the National Council for the Control of Animal Experimentation (Marques et al., 2009) and the recommendations required by "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Clark et al., 1996)". After acclimatization, the animals were divided into groups that were exposed for one month to fish meat from farmed fish or from the Cachoeira River, as shown in Table 1:

Table 1. Division of the experimental groups for 1 month exposition to standard ration, farmed fish and Cachoeira

river fish meat.				
Day of the week	Control group	Farmed fish group	Cachoeira river fish group	Animals per group
Monday	Feed	Feed	Feed	8
Tuesday	8h fasting	8h fasting	8h fasting	8
Wednesday	Feed	Fish	Fish	8
Thursday	Feed	Feed	Feed	8
Friday	8h fasting	8h fasting	8h fasting	8
Saturday	Feed	Fish	Fish	8
Sunday	Feed	Feed	Feed	8

Source: the authors (2022).

The animals in the control group received standard feed (Nuvilab®) and the 139 animals in the experimental groups received 2 servings per week of fish meat. Eight hours before the supply of fish meat, the feed was removed

from the boxes of all groups, including the control group. The animals were exposed to fish meat for a period of one month. In order to define the serving of fish offered to each rat, we used the World Health Organization (WHO) recommendation (2014) of consumption of 12 kg of fish per year for an adult of 70 kg (a serving of 125 g/70 kg twice a week).

This proportion was converted according to the body mass of each animal, which was weighed fortnightly, resulting in the following calculation for how much fish would be offered to each animal: $125 \text{ g} / 70 \text{ Kg} = 0.001785 \text{ g/kg}$. $0.001785 \text{ g/kg} \times \text{body mass of each rat (g)} = \text{amount of fish meat offered}$. One day after the end of each exposure period, the animals were euthanized by decapitation for collection of whole blood, and the spleen, heart, liver, right kidney, heart, cerebral cortex, and cerebellum were excised.

2.2. Sample preparation

2.2.1. Blood

Whole blood for the analysis of hematological parameters was obtained from blood of the rats by decapitation and conditioned in tubes with and without ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium (EDTA K3). The blood was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 minutes to separate plasma and serum, which were kept in a freezer. The freshly collected blood was used for analysis of hematological parameters and preparation of a slide for differential blood cell count.

Red cells were washed 3 times with ice-cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride) and lysates were prepared by adding 1 mL of distilled water to 100 μL of washed and frozen red cells. For determination of antioxidant enzyme activity, the red cells were frozen and thawed 3 times and centrifuged at $13,500 \times g$ for 10 min. The supernatant was diluted to contain approximately 0.5 mg/mL protein.

2.2.2. Tissue preparation

Liver, kidney, heart, spleen, and brain structures (cortex and cerebellum) were removed, decapsulated and kept on ice in saline buffer (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5). The homogenate (15%) (w/v) was prepared in appropriate buffer 175 according to the methodology to be employed, using Potter-Elvehjem homogenizer (5 pulses). The homogenate was centrifuged at $\times 3,000 \text{ g}$ at 4 °C for 15 minutes to remove cellular debris and the supernatant was stored in aliquots and stored at -80 °C for later determination of the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and oxidative stress: thiobarbituric acid reactive substances

(TBARS), total sulfhydryl (SH) and carbonylated 181 protein (CP) content.

2.3. Measurement of oxidative stress parameters

2.3.1. TBARS

TBARS were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). The TBARS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, caused mainly by hydroxyl free radicals. Homogenized tissues and plasma were mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBARS were determined by absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the precursor of MDA and each point of the curve was

absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. The results were reported as total carbonyl content (nmol / mg protein).

2.3.4. CAT activity

This parameter was measured by the method of Aebi (1984) using a Shimadzu UV-visible spectrophotometer. The method used is based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm in a reaction medium containing 25 μ L of sample and 600 μ L of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 20 mM H_2O_2 . The absorbance was measured every 10 seconds for 1 minute 40 seconds. One unit is defined as 1 μ mol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as units of CAT / mg protein.

2.3.5. SOD activity

This parameter was determined by the pyrogallol auto-oxidation method as described by Marklund (1985), a highly superoxide ($O_2^{\bullet-}$)-dependent process, which is a substrate for SOD. Briefly, 15 μ L of each sample were added to 215 μ L of a mixture containing 50 μ M of Tris buffer, 1 μ M of EDTA, pH 8.2, and 30 μ M of CAT. Thereafter, 20 μ L of pyrogallol were added and the absorbance was recorded immediately every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a Shimadzu UV-visible spectrophotometer. The inhibition of pyrogallol autoxidation occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly tested spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as reference, to calculate the activity of SOD present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD required to inhibit 50% of the pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as units/mg of SOD protein.

subjected to the same treatment as that of the supernatants. The results are expressed as nmol of MDA per mg of protein.

2.3.2. Total SH content

Total sulfhydryl content was determined according to the method described by Aksenov & Markesbery (2001), which is based on the reduction of dithionitrobenzoic acid (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative, thionitrobenzoic acid (TNB), which is measured spectrophotometrically at 412nm. Briefly, 50 μ L of homogenate was added to 1 mL of buffer (PBS) pH 7.4 containing 1mM EDTA. The reaction was started by adding 30 μ L of 10.0mM DTNB and incubated for 30 minutes at room temperature in a dark place. The results are expressed as nmol TNB/mg protein.

2.3.3. CP Content

Carbonyl content was measured using the method

described by Reznick & Packer (1994), based on the reaction of protein carbonylation with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200 μ L of homogenate or plasma were added to plastic tubes containing 400 μ L of 10 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2 M HCl). The samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 μ L of trichloroacetic acid 20% will be added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 x g for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The sediment was washed with 1 mL ethanol / ethyl acetate (1: 1 v/v), shaken and centrifuged at 14000 x g for 3 min. The supernatant was discarded and the sediment resuspended in 600 μ L of 6M guanidine (prepared in a 20 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubation at 60 °C for 15 min. The samples were then centrifuged at 14,000 x g for 3 min and the supernatant used to measure

2.3.6. GSH-Px activity

The measurement of this parameter was performed by the Wendel method (1981), using tert-butyl hydroperoxide as substrate. The decomposition of NADPH was monitored in a spectrophotometer at 340 nm for 3 minutes and 30 seconds (Shimadzu UV-visible spectrophotometer). The medium contains 90 μ L of the sample and 800 μ L of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4; 20 μ L of 2 mM GSH, 30 μ L of 0.15 U/mL GSH reductase, 10 μ L of 0.4 mM azide, and 10 μ L of 0.1 mM NADPH. The absorbance was measured every 10 seconds for 1 minute and 30 seconds. Then, 50 μ L of 0.5 mM tertbutyl hydroperoxide was added and the absorbance read for another 2 minutes. One unit of GSH-Px is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units / mg of protein.

2.3.7. Protein dosage

The determination of proteins was performed by the Lowry method (1951), using bovine serum albumin as standard.

2.4. Measurement of biochemical parameters

The biochemical parameters glutamic oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT), thyroid-stimulating hormone (TSH), free thyroxine (FT4) and triiodothyronine (T3) and creatinine were measured by an automatic process in the Siemens Advia Centaur Immunassay System (Santa Helena Laboratory in Jaraguá do Sul – SC - Brazil). The measurement of total protein, albumin, uric acid, urea, total cholesterol (TC), HDL cholesterol and triglycerides (TG) were measured by spectrophotometry in the laboratory of Pharmaceutical Practices at UNIVILLE using Labtest kits. Blood levels of VLDL and LDL cholesterol were deduced using the Friedewald equation.

2.5. Measurement of hematological parameters

The hematological parameters were measured by an automatic process of light absorption and electrical impedance reading through automation with the Horiba

ABX Pentra 60 analyzer. The parameters of the red series (hemogram) were evaluated: hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), cellular hemoglobin concentration mean (CHCM), erythrocyte count, RDW (Red Cell Distribution Width), indexes related to hemoglobin concentration and microscopic analysis of the blood smear to observe changes in shape and color of the erythrocytes. The leukogram (total number of leukocytes, neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes, and basophils) and the total number of platelets were also evaluated.

2.6. Collecting the fish

Tilapia was selected for this study because it is a widely consumed fish among Brazilians, has a great cost-benefit relation for consumers, and its meat is considered a protein of high biological value and firm texture. This fish can also grow in adverse environments, has omnivorous

are within the ideal for tilapiculture. The feed offered to the omnivorous fish has 30% crude protein (Nicoluzzi brand).

The fish were captured with nets, stored in thermal boxes, and immediately delivered to the researcher for cleaning and freezing until the moment of preparation. The fish from the Cachoeira River were collected following the methodology of Lima et al. (2015), with nets, and 3 fish of the same species were captured, stored in Styrofoam boxes with ice until arrival at the UNIVILLE toxicology laboratory, where they were measured and weighed. The fish were collected at most every 3 months, a safe period for storage and maintenance of the quality of the meat for consumption. New collections of fish from the Cachoeira river always occurred 15 days before all available frozen servings were consumed, thus maintaining the collection and consumption period within the 3-month period. The collection of fish was performed during the day, always considering the condition of no rainfall for at least two days before the collections and taking into account the ease of access and the presence of the target species (Pinheiro et al., 2015). The tilapia was collected in

the same stretch of the Cachoeira River (coordinates 26°16'08.4"S 048°51'88.0" W), in the Costa e Silva neighborhood, in Joinville (SC). The fish were collected using 4-cm mesh cast nets and 8-meter long 1-meter wide 6-cm mesh gillnets.

After being captured, the individuals were identified to the lowest taxonomic level possible to confirm that it was the target species, placed in plastic bags, weighed, labeled, sealed, and stored in a thermal box with ice. Nineteen individuals were collected, totaling 5100 g of tilapia. The collection procedures were conducted after permission from the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) No. 10476-3 by the biologists Diogo Augusto Moreira (Regional Council of Biology - CrBio - 81154) and Johnatas Adelar-Alves (Regional Council of Biology - CrBio - 053967).

feeding habits, and feeds on all kinds of organic material available in the water, mollusks, seeds, vegetables of any species, crustaceans, among others (Bemvenuti, Fischer, 2010).

The farmed fish selected were *Oreochromis Nile* tilapia from a monoculture of tilapia in an excavated and breeding farm located on Quiriri Road in the city of Joinville (SC). The place of culture is regularly attended by the team of the fish farming sector of the rural development unit of the Secretary of Agriculture and Environment, which regularly analyzes the culture water and confirmed that the discriminated culture parameters

2.7. Preparation of the fish meat

The selection and preparation of the fish meat for consumption by the rats followed the food safety standards of the Collegiate Directorate Resolution (CDR) No. 216, of September 15, 2004, which provides on the Technical Regulation of Good Practices for Food Services (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - 2004). Soon after the fish was caught, it was cleaned, gutted, and its scales and head were removed. The flesh of the farmed fish and of the Cachoeira river was separated from the bones and only the raw, filleted meat was packed individually or a maximum of two fillets in transparent

plastic bags selected according to CDR standard No. 259/2002 (Brasil, 2002), kept at a temperature between 0°C and -2°C until the moment of thawing and cooking of the meat. The thawing of the meat occurred under refrigeration conditions at a temperature below 5 °C, to prevent the surface areas of this food from remaining in conditions favorable for microbial multiplication.

The cooking was carried out in a glass container, only in drinking water without any added seasoning, at a temperature of 150 °C for 10 minutes (Brasil, 2004). After cooking, the fish meat was cooled, separated into servings and then frozen at -5 °C, packed in plastic bags according to the CDR No. 259/2002 to ensure the nutritional safety of this food and minimize the risk of cross contamination. The meat was thawed in a microwave oven for 2 minutes before being offered to each animal. Next, it was packaged in a thermal bag for transport to the bioterium, where each serving was weighed on precision scales (Brasil, 2018; Cribb et al., 2018). The fish meat was offered to the animals twice a week, after an 8-hour fasting period. Each animal was placed individually in a cage to ensure that each one consumed its serving, and after verification of total consumption of the serving, they were placed back in the larger box together with the other animals in their group and unlimited feed was made available again. Leftovers of the thawed fish meat after consumption by the rats were not reused.

2.8. Heavy metals in fish meat quantification

The analyses of heavy metals concentration in fish meat were conducted in triplicate by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) in an Avio 200-Perkin Elmer instrument, adapted from the methodologies of Sanches Filho et al. (2013) and Uysal et al. (2008). 5 g of each sample of farmed fish meat and from the Cachoeira River were weighed and placed in a lyophilizer for 24 hours. After drying, 3.40 g of the farmed fish meat sample and 3.22 g of the fish meat sample from the Cachoeira river were left. To each sample 10 mL HCl (20%) + 4mL HNO₃ (50%) were added, and they were placed on the heater plate at 90°C and left for 30 minutes in reflux. The samples were then filtered into a 100 mL flask and volumized with Milli-Q water. All the material used in the sample preparation was washed with a solution of Extran and water and then placed in 10% (v/v) nitric acid for at least 24 hours. After immersion in the acid, the material was washed seven times in Milli-Q water. The results of the metal analysis are expressed in ppm.

2.9. Statistical Analysis

iation
error
ogical

parameters), were tabulated and analyzed using GraphPad Prism 6.0 software. Analysis of variance (ANOVA), followed by Kruskal-Wallis post-test (non-parametric data) or Tukey's test (parametric data), for comparison among groups was conducted, with values of $p < 0.05$ considered significant.

III. RESULTS

No statistically significant differences were observed for oxidative stress parameters and antioxidant enzymes in the spleen and cerebral cortex among the groups (Table 2) and there were no relevant differences between animals fed with feed and farmed fish. In the cerebellum a significant elevation of TBARS (24.0%) and a relevant decrease of SH (30.8%) were observed in the animals fed with the fish from the polluted river, and although there was a decrease in GSH-Px activity, no statistical relevance was reached ($p = 0.104$) and no changes in the activity of the other antioxidant enzymes were found. In the heart, there was a significant decrease of SH (15.9%) and a relevant increase of the total content of CP (56.2%), but there were no relevant changes in the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in this organ. A significant elevation of TBARS (15.9%) and CP (50.0%) was observed in the liver, as well as a relevant reduction of SH (14.8%) in animals that received fish from the Cachoeira River.

Moreover, the enzymatic activity of SOD suffered a significant reduction in the liver (11.0%) of the animals that received the fish meat from the polluted river. In the kidney, the elevation in total CP content did not reach statistical relevance ($p = 0.07$), however it is not insignificant considering that it is only one month of exposure to the food. Among the antioxidant enzymes, a significant reduction (25.5%) in CAT activity was found in this organ in the animals fed with the fish meat from the polluted river. In plasma, a 79.4% elevation of TBARS was found in the group of animals that consumed the fish meat from the polluted river compared to the other groups. There was no significant modification of the other parameters or in the activity of antioxidant enzymes in erythrocytes (Table 3).

Table 2 - Oxidative stress parameters after one month of exposure to standard ration, farmed fish, and fish meat from the Cachoeira river.

Organ (Group)	TBARS (nmol/mg of protein)	SH (nmol/mg of protein)	CP (nmol/mg of protein)
Spleen (Feed)	3.1 ± 0.1	33.2 ± 1.5	7.2 ± 0.1

Spleen (Farmed)	3.1 ± 0.1	34.4 ± 1.3	6.7 ± 0.2
Spleen (Cachoeira)	3.1 ± 0.1	31.1 ± 1.9	7.3 ± 0.2
Cerebellum (Feed)	4.3 ± 0.1	25.1 ± 1.6	5.2 ± 0.1
Cerebellum (Farmed)	4.2 ± 0.2	22.2 ± 1.3	5.1 ± 0.1
Cerebellum (Cachoeira)	5.42 ± 0.3*	17.39 ± 1.1*	5.27 ± 0.1

Cortex (Feed)	3.1 ± 0.2	22.2 ± 0.7	5.1 ± 0.1
Cortex (Farmed)	2.8 ± 0.1	22.5 ± 0.6	5.1 ± 0.1
Cortex (Cachoeira)	3.2 ± 0.2	21.8 ± 0.7	5.2 ± 0.1
Heart (Feed)	4.0 ± 0.1	36.3 ± 1.8	5.5 ± 0.1
Heart (Farmed)	4.1 ± 0.1	35.3 ± 1.2	5.26 ± 0.2
Heart (Cachoeira)	4.2 ± 0.1	30.5 ± 1.3*	8.61 ± 0.2***
Liver (Feed)	2.5 ± 0.1	89.6 ± 5.2	4.1 ± 0.2

Liver (Farmed)	2.5 ± 0.1	97.4 ± 2.5	4.6 ± 0.1
Liver (Cachoeira)	2.9 ± 0.1*	76.2 ± 3.9**	6.1 ± 0.2***
Kidney (Feed)	2.5 ± 0.1	31.7 ± 1.4	3.4 ± 0.2
Kidney (Farmed)	2.6 ± 0.1	30.3 ± 1.0	3.3 ± 0.2
Kidney (Cachoeira)	2.6 ± 0.1	31.4 ± 0.6	4.0 ± 0.1
Plasma (Feed)	3.48 ± 0.21	31.04 ± 0.98	Not measured
Plasma (Farmed)	3.43 ± 0.16	29.20 ± 1.06	Not measured

Plasma (Cachoeira)	6.10 ± 0.26***	28.62 ± 0.71	Not measured
--------------------	-----------------------	--------------	--------------

Source - the authors (2022).

* Statistically significant difference between feed and farmed fish groups ($p < 0.05$).

** Statistically significant difference between feed and farmed fish groups ($p < 0.01$).

*** Statistically significant difference between feed and farmed fish groups ($p < 0.001$).

Table 3 – Antioxidant enzymes activity after one month of exposure to standard ration, farmed fish, and fish meat from the Cachoeira river.

Organ (Group)	CAT (U/mg of protein)	SOD (U/mg of protein)	GSH-Px (U/mg of protein)
Spleen (Feed)	10.2 ± 0.8	9.8 ± 0.2	37.7 ± 1.6
Spleen (Farmed)	9.9 ± 0.6	9.7 ± 0.2	37.5 ± 1.6
Spleen (Cachoeira)	12.0 ± 0.7	9.5 ± 0.1	36.0 ± 1.9
Cerebellum (Feed)	6.8 ± 0.1	5.1 ± 0.1	26.4 ± 0.7
Cerebellum (Farmed)	6.95 ± 0.1	4.72 ± 0.1	29.4 ± 2.0
Cerebellum (Cachoeira)	7.09 ± 0.1	4.69 ± 0.1	25.0 ± 1.8

Cortex (Feed)	7.0 ± 0.1	6.4 ± 0.3	28.8 ± 1.8
Cortex (Farmed)	6.9 ± 0.2	6.4 ± 0.3	28.0 ± 1.3
Cortex (Cachoeira)	7.0 ± 0.1	7.3 ± 0.4	29.6 ± 1.3
Heart (Feed)	9.3 ± 0.5	5.7 ± 0.1	60.3 ± 3.1
Heart (Farmed)	9.1 ± 0.3	5.8 ± 0.1	61.7 ± 2.0
Heart (Cachoeira)	8.4 ± 0.3	5.7 ± 0.1	60.5 ± 1.1
Liver (Feed)	15.2 ± 0.6	6.3 ± 0.2	64.5 ± 2.4
Liver (Farmed)	15.1 ± 0.5	6.0 ± 0.1	59.0 ± 1.5

Liver (Cachoeira)	15.5 ± 0.5	5.6 ± 0.1*	58.5 ± 3.5
Kidney (Feed)	15.4 ± 0.6	6.3 ± 0.1	32.6 ± 1.3
Kidney (Farmed)	15.6 ± 0.5	6.4 ± 0.1	32.4 ± 1.8
Kidney (Cachoeira)	11.5 ± 0.5*	6.8 ± 0.1	33.8 ± 1.6
Erythrocytes (Feed)	2.75 ± 0.16	5.93 ± 0.08	25.10 ± 1.29
Erythrocytes (Farmed)	2.70 ± 0.10	6.30 ± 0.12	25.40 ± 1.52
Erythrocytes (Cachoeira)	2.62 ± 0.08	5.98 ± 0.16	23.76 ± 1.27

Source - the authors (2022).

* Statistically significant difference between feed and farmed fish groups ($p < 0.05$).

The thyroid and kidney functions of the animals were not significantly modified in any of the groups (Table 4). The lipidogram showed a significant reduction in HDL cholesterol for the consumption of both farmed fish and fish from the polluted river. There was a tendency of alteration in the hepatic function, verified through the increase of GTP, but it did not reach statistical significance ($p = 0.07$).

Table 4 – Biochemical parameters after one month of exposure to standard ration, farmed fish, and fish meat from the Cachoeira river.

Parameter	Feed (n = 8)	Farmed Fish (n = 8)	Fish from Cachoeira (n = 8)
TSH ($\mu\text{U/mL}$)	0.012 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.012 ± 0.001
FT4 (ng/dL)	1.442 ± 0.032	1.548 ± 0.007	1.538 ± 0.005
T3 (ng/mL)	0.462 ± 0.011	0.491 ± 0.003	0.500 ± 0.002
GOT (U/L)	245.40 ± 26.76	280.25 ± 28.01	237.00 ± 30.75
GPT (U/L)	67.00 ± 16.04	80.50 ± 15.66	102.66 ± 9.22
Total Proteins (g/dL)	5.91 ± 0.07	5.71 ± 0.19	6.04 ± 0.19

Albumin (g/dL)	2.31 ± 0.19	2.68 ± 0.09	2.64 ± 0.03
Urea (mg/dL)	49.87 ± 4.86	55.84 ± 4.56	53.87 ± 3.22
Creatinine (mg/dL)	0.73 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.68 ± 0.01
Uric acid (mg/dL)	1.62 ± 0.24	2.08 ± 0.26	2.00 ± 0.31
Total Cholesterol (mg/dL)	222.20 ± 12.89	207.80 ± 7.59	183.30 ± 7.01
C-HDL (mg/dL)	55.00 ± 5.99	31.60 ± 2.11*	26.83 ± 0.70*
TG (mg/dL)	171.60 ± 7.43	188.80 ± 5.11	189.40 ± 8.75
C-LDL	132.90 ± 15.89	136.00 ± 7.72	115.50 ± 7.26
C-VLDL	34.32 ± 1.48	37.77 ± 1.02	37.89 ± 1.75

Source - the authors (2022).

* Statistically significant difference compared to the feed group ($p < 0.05$).

No statistically significant differences were found between the groups for the total erythrocyte, leukocyte, or platelet count, as well as for the differential leukocyte count and other erythrogram parameters (Table 5).

While farmed fish meat samples showed no relevant modification of heavy metals content, fish meat from the Cachoeira River showed an average five-fold significant increase of Al^{+3} and Zn^{+2} . The increase in Cr^{+6} and Cd^{+2} in the meat from the Cachoeira River compared to the farmed fish did not reach statistical significance, but this does not exclude the possibility of bioaccumulation due to chronic exposure over longer periods of exposure. There was no significant difference in the amounts of Ni^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} and Hg^{+2} among the samples (Table 6).

Table 5 – Hematologic parameters after one month of exposure to standard ration, farmed fish, and fish meat from the Cachoeira river.

Parameter	Feed (n = 8)	Farmed fish (n = 8)	Fish from Cachoeira (n = 8)
Total leukocytes ($\times 1000/\mu\text{L}$)	4.76 ± 0.60	4.26 ± 0.26	4.10 ± 0.76

Segmented (%)	17.80 ± 2.17	22.00 ± 1.67	17.12 ± 1.00
Rod Cells (%)	0	0	0
Lymphocytes (%)	70.60 ± 2.15	66.16 ± 1.49	64.87 ± 1.14
Monocytes (%)	9.60 ± 0.67	9.33 ± 0.61	12.50 ± 1.06
Eosinophils (%)	2.00 ± 0.54	1.83 ± 0.83	3.25 ± 0.36
Basophils (%)	0	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.26
Total erythrocytes (million/mm ³)	7.10 ± 0.14	7.03 ± 0.10	6.99 ± 0.09
Hemoglobin (g/dL)	14.84 ± 0.22	14.31 ± 0.43	14.52 ± 0.19
Hematocrit (%)	39.50 ± 0.51	38.61 ± 1.21	38.83 ± 0.48
MCV (fL)	55.80 ± 0.66	55.50 ± 0.61	55.50 ± 0.32
MCH (ng)	20.86 ± 0.44	20.66 ± 0.31	20.80 ± 0.19
CHCM (g/dL)	37.54 ± 0.31	37.15 ± 0.25	37.42 ± 0.20
RDW (%)	10.94 ± 0.25	10.80 ± 0.23	11.07 ± 0.12
Total platelets (x 1000/ μ L)	634.50 ± 54.43	639.00 ± 102.2	746.9 ± 31.82

Source - the authors (2022).

Table 6 – Quantity of heavy metals in fish meat from farmed fish and from the Cachoeira river

Metal (ppm)	White	Farmed Fish	Fish from Cachoeira
Al ³⁺	16.600 ± 0.008	10.580 ± 0.073	56.520 ± 0.018*
Cr ⁶⁺	0	1.170 ± 0.029	4.35 ± 0.007
Zn ²⁺	0.155 ± 0.006	59.700 ± 0.002	381.900 ± 0.003***
Ni ²⁺	0	0	0
Pb ²⁺	0	0	0

Cu ²⁺	0.014 ± 0.028	2.940 ± 0.006	3.720 ± 0.019
Cd ²⁺	0	0	0.930 ± 0.056
Hg ²⁺	0	0	0

Source - the authors (2022).

IV. DISCUSSION

In the present study, among the animals that consumed fish meat from the Cachoeira river, a significant increase in lipid peroxidation was observed in the cerebellum, liver, and plasma, and also an increase in CP in the heart and liver. A relevant reduction of SH occurred in the heart and liver. These data highlight the increased oxidative stress to which the animals were exposed by consuming fish meat with significantly higher levels of Al³⁺ and Zn²⁺ compared to farmed fish meat. Still, there was a decrease of SOD activity in the liver and CAT activity in the kidneys. The hepatic toxicity is remarkable, which, if considered associated with the elevation of GPT (even though it did not reach statistical significance), is not negligible considering that the exposure period was only one month.

IBARS are biomarkers of lipoperoxidation derived from the reaction of malondialdehyde with thiobarbituric acid (Keshari et al., 2015). SH groups are the largest and most frequent antioxidants in plasma and the erythrocyte membrane contains high concentration of these groups, which can be converted by oxidizing agents into disulfide agents and cause denaturation of membrane proteins, and intracellular damage can also occur, such as oxidation of hemoglobin into methemoglobin (Van Dijk et al., 2020).

CPs are formed by structural oxidative cleavage of proteins, by deamination of amino acids, such as lysine and glutamic acid, and their increase is present in conditions such as: aging, neurodegenerative diseases,

obesity, diabetes, age-related macular degeneration, anemia, hepatocellular carcinoma, acquired immunodeficiency syndrome (Frijhoff et al., 2015). Due to the widespread potential for cellular damage caused by the imbalance between ROS production and antioxidant defense, the protective elements include endogenous enzymatic and non-enzymatic systems. The former includes the enzymes: SOD, which performs the dismutation of superoxide ions by accelerating their conversion to hydrogen peroxide in the mitochondria and cytosol; CAT, which converts hydrogen peroxide to water and oxygen; and GSH-Px, which is the most important H₂O₂ scavenging enzyme using glutathione as a cofactor, and the non-enzymatic systems include ROS scavengers such as vitamins A, C, and E (Keshari et al., 2015).

Al^{+3} is the third most common element in the earth's crust, has a wide variety of uses, and its concentration in beverages and food has increased because of soil acidification, which allows greater transfer of this metal to the aquatic medium, and anthropogenic activities, such as mining and industry. Diet is the main form of exposure to metals, and Al^{+3} is found in water, where it is added as a flocculant ($Al_2(SO_4)_3$), processed foods, packaging, and in fresh foods (vegetables and fruit) due to its presence in the soil. Also, utensils containing Al^{+3} are responsible for its increased presence in the diet. However, it has no function in the human and animal organism and tends to accumulate in the brain, bones, liver and kidneys, so that chronic exposure can cause relevant toxicity, since Al^{+3} can: interfere with the function of calcium and replace it in bone mineralization and cell growth, as well as increase the stability of iron regulatory protein 2 (cytosolic protein that helps maintain iron level), trigger the development of Alzheimer's disease and other neurological and cognitive disorders (Hardison et al., 2017).

The pathophysiological mechanisms surrounding Al^{+3} toxicity include very basic cellular functions, such as enhancement of oxidative stress damage, which results in oxidation of proteins and lipids by free radicals (Igbokwe et al., 2019) and decreased activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px (Slaninova et al., 2014), in addition to disrupting calcium-mediated intracellular signaling, which will systematically lower cellular defenses, inhibit enzyme action, and impair mitochondrial function, thus making it a great villain of the tissues in which it accumulates, and can cause anything from anemia and hepatic or renal toxicity to neurodegenerative and reproductive diseases (Exley, 2014).

Yuan et al. (2012) found significant accumulation of $AlCl_3$ in newborn rats exposed for 14 days intraperitoneally once a day (doses of 0.7 and 35 mg/Kg of $AlCl_3$) in the cerebellum, hippocampus, and diencephalon of the animals, in addition to significant increase of TBARS and decrease of SOD activity but increase of GSH-Px activity in these regions. The authors explain that brain tissue is more susceptible to oxidative damage because it consumes more oxygen, has more

polyunsaturated fatty acids in cell membranes, high iron content, and low activity of antioxidant enzymes. Al^{+3} can cause oxidative damage to the brain by binding to negatively charged phospholipids, which contain polyunsaturated fatty acids that are easy targets for ROS, stimulating iron-induced lipid peroxidation (Fenton reaction), and directly forming $Al-O_2^{\cdot-}$ from the reaction of Al^{+3} with superoxide anion, which elevates the oxidative capacity of $O_2^{\cdot-}$.

Labbar et al. (2021) observed significant drop in CAT and SOD activity in astrocyte culture incubated with $AlCl_3$. In rats exposed for only three days to different doses (25, 50 and 100 mg/Kg, intraperitoneally) of $AlCl_3$, there was significant astrogliosis in the motor cortex and hippocampus of the animals.

Nathya & Nandhini (2014) evidenced the toxicity on the antioxidant system of $AlCl_3$ (300 mg/Kg, orally, once a day, for 31 days) in several organs: they observed significant increase of TBARS in liver, kidney, heart, and lungs of rats, as well as drop of CAT, SOD and GSH-Px activity. Hawas et al. (2020) found that exposure to $AlCl_3$ 100 mg/Kg, orally, for 21 days (once daily) caused edema, disorganization of myofibrils and destruction of cardiac striated muscles. Liu et al. (2016) found in 5-week-old rats that $AlCl_3$ included in the water ingested by the animals, at all doses (0.4; 0.8 and 1.6 g/L) significantly lowered GSH-Px activity, that the higher dose reduced SOD activity, and that doses of 0.8 and 1.6 g/L significantly increased the level of TBARS.

Othman et al. (2017) reaffirmed the preclinical hepatic and renal toxicity in rats (ten weeks old) that received $AlCl_3$ (34 mg/Kg, orally) for eight weeks and resulted in significant increase in TBARS and reduced activity of CAT, SOD and GSH-Px, in addition to increasing the level of inflammatory cytokines in these organs (interleukin 1beta and tumor necrosis factor alpha). Degeneration, vacuolization, and cellular necrosis were found in the hepatocytes and apoptosis and glomeruli collapse in the kidneys, and also increased blood activity of GOT, GPT, and bilirubin concentration (biomarkers of liver function) and urea and creatinine (biomarkers of kidney function). Chary et al. (2017) observed significant drop in blood level of HDL, VLDL, and triglycerides in rats that received aqueous $AlCl_3$ solution (50 and 100 mg/Kg, orally, once daily) for 28 days. Histological toxicity was also observed which may have contributed to lower hepatic synthesis of lipoproteins. Gaballa et al. (2013) also found significant reduction in blood HDL level in humans occupationally exposed in a factory to Al^{+3} dust between 0.33-3.4 mg/m³ in air (which was still within the acceptable limit - 5 mg/m³).

The accumulation of Al^{+3} in hepatocytes may affect protein secretion and vacuolization promoting hepatosteatosis, which is the accumulation of lipids in cytoplasmic vesicles (Belaïd-Nouira et al., 2013), motivating dyslipidemia mediated by Al^{+3} toxicity in hepatocytes. In animals that consumed farmed fish meat, the drop in HDL found may be due to contaminants other than heavy metals.

Zn^{+2} is an essential mineral for humans, since it acts as a cofactor for more than 300 enzymes and 200 transcription factors, besides being an important mediator of cell signaling. In the antioxidant system, Zn^{+2} protects cells against oxidative stress because it acts as a membrane stabilizer, is a cofactor for SOD and GSH-Px, inhibits the pro-oxidant enzyme, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, and promotes the synthesis of metallothionein, which catalyzes the reduction of hydroxyl radicals and sequesters ROS. Further, Zn^{+2} competes with iron and Cu^{+2} for binding sites on the cell membrane, preventing lipid peroxidation caused by them, since it is catalytically inert (Marreiro et al., 2017). Zn^{+2} also interacts with thiol or SH groups on proteins and peptides, reducing their susceptibility to oxidation (Choi et al., 2018).

Zn^{+2} is neither cytotoxic, carcinogenic, mutagenic, nor teratogenic, and intoxications with this metal are rare and primarily related to Cu^{+2} deficiency. On the other hand, Zn^{+2} deficiency presents a risk for the health of individuals, since, after iron, it is the second most prevalent trace element in the human body, and its lack is related to: growth retardation, drop in immunity, increased oxidative stress and synthesis of inflammatory cytokines, mental lethargy, cognitive impairment, symptoms of depression, and Alzheimer's disease (Jarosz et al., 2017). Still, the protective effect on rat brain oxidative stress mediated by Al^{+3} and Cd^{+2} ($ZnCl_2$ 30 and 60 mg/L in water for 60 days) and also on liver and kidneys of diabetic rats ($ZnSO_4$ mg/Kg for 21 days) for therapeutic exposure to Zn^{+2} was described by Brzóska et al. (2021), corroborating its protective potential. However, at the intracellular level, excess free Zn^{+2} promotes the activation of protein kinase C, which leads to the production of ROS via NADPH oxidase. Mitochondria and lysosomes are Zn^{+2} -storing organelles that, when having Zn^{+2} in excess, suffer membrane permeabilization, and the release of their contents may trigger cell death, as well as the activation of the caspase-3 pathway. Hence, in excess, Zn^{+2} can become cytotoxic (Kim et al., 2020).

Singh et al. (2012) exposed rats to diet with 20, 40 and 80 mg/Kg of Zn^{+2} for 6 months and observed in blood increased TBARS, increased activity of CAT, SOD and GSH-Px enzymes, increased blood level of triglycerides, LDL, VLDL and decreased HDL for the two highest doses. These data were associated with higher concentration of Zn^{+2} and lower concentration of Cu^{+2} , Mg^{+2} and Mn^{+2} in liver and kidney of the animals, suggesting that excess of chronic Zn^{+2} may result in change of oxidative stress by altering the level of other minerals. Taken together, these studies suggest that Zn^{+2}

does not have a solely antioxidant function but may also be pro-oxidant.

Accordingly, the findings of the present study are understood, which were parallel to the toxicity mechanisms in the sites where the accumulation of Al^{+3} was sufficient to evoke increased oxidative stress (cerebellum, heart, liver, and plasma) and decreased activity of antioxidant enzymes (liver and kidney). Nonetheless, it is important to emphasize that in the present study the exposure was related to alterations linked to the consumption of fish meat in nutritionally recommended amounts and that it occurred in the second trophic level of the food chain, suggesting that oxidative stress and relevant toxicity may arise from chronic ingestion of food contaminated with heavy metals.

Reduced synthesis and secretion of erythropoietin, of heme group and globulins, inhibition of intestinal iron absorption and increased hemolysis are mechanisms that attribute anemia to Al^{+3} (Ige & Aiyeola, 2017). Nevertheless, no hematological parameters were changed in the present study, possibly due to the low exposure time. As a result of acidification of soils, soluble Al^{+3} can reach the aquatic environment easily, hence seafood is the greatest accumulator of this metal, with an average concentration of 204.6 mg/Kg having been found in sea squirts from South Korea (Choi et al., 2014), which filter water and thus accumulate more metals. Al^{+3} content is higher in algae than in fish, the former being indicators of contamination as a biomarker to monitor environmental pollution. The presence of five-fold Al^{+3} and Zn^{+2} higher in the fish meat from the Cachoeira river than in farmed fish can be attributed to the different degree of environmental pollution (the Cachoeira river receives effluents from domestic and industrial waste and factors linked to fish (species, sex, age). However, considering WHO (2011) weekly intake recommendations of 2 mg/Kg of this metal, it is noticeable that the amount contained in the fish from Cachoeira river exceeds this recommendation, making chronic exposure dangerous for children, the elderly, and renal disease patients (since the main route of elimination of Al^{+3} is urinary).

In the study by Abdelazim et al. (2018), exposure of tilapia to ZnO nanoparticles (1 and 2 mg/L) for two weeks resulted in several changes in the muscles of the fish at the oxidative stress level: the activity of the enzymes CAT, SOD, and GSH-Px was significantly decreased, as well as the expression of genes for those. There was also elevation of lipid peroxidation, and since these changes were prevented by vitamins C and E, the authors attributed the findings of increased oxidative stress to ZnO nanoparticles. In the study by Tawell et al. (2012), between 11-16 ppm Zn^{+2} was found in tilapia muscle, an

acceptable amount for human consumption. Dwivedi et al. (2015), on the other hand, found low level of Zn^{+2} contamination in tilapia muscle, but which slightly exceeded the limit for consumption. In both studies, Zn^{+2} was the most found metal in fish muscle, which converges with the findings of the present study. However, considering the maximum allowable limit for Zn^{+2} established by FAO/WHO (2006), which is 100 mg/Kg (ppm), it can be noticed that the muscle of tilapia from Cachoeira river exceeds it by more than three times.

Therefore, the fact that the changes were associated with the consumption of cooked fish meat in the present study supports the hypothesis of concern for the risk of chronic problems linked to toxicity along the food chain, which is the most important differentiator of the present study because it comes closest to the actual exposure to which the organisms are subjected.

Despite the initial toxicity being at the cellular level, in the long term, as the consumption of contaminated fish meat becomes more chronic, it is possible that it reaches systemic levels and thus incurs a greater insidious threat to public health, since the citizens of the municipality have already adopted the practice of fishing and consuming fish meat from the Cachoeira river. However, among the studies conducted on the toxicity of heavy metals in humans, these refer to occupational toxicity. As such, although the predictive power (in terms of extrapolation of pre-clinical findings to the risk to humans) is limited, the evidence that consuming meat from a polluted river may incur significant disruption of the oxidative system that may accumulate along the food chain must receive attention from the authorities in terms of strategic planning to sensitize the population to the existence of the risk, in addition to the adoption of measures to improve the quality of the water of the river.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Brazilian Superior Level Personal Improvement Coordination (CAPES) and the Support Research Funding (FAP) from UNIVILLE.

REFERENCES

- [1] Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* (ISSN: 1557-7988 (P) | 0076-6879 (O)), 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- [2] Abdelazim, A. M., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A.-A., Affi, M. M., & Alkaladi, A. (2018). Oxidative stress in the muscles of the fish Nile tilapia caused by zinc oxide nanoparticles and its modulation by vitamins C and E. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (ISSN: 1942-0900 (P) | 1942-0994 (O)), 2018, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/6926712>
- [3] Aksenov, M. Y., & Markesbery, W. R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* (ISSN: 0304-3940 (P) | 1872-7972 (O)), 302(2-3), 141-145. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6)
- [4] Belaid-Nouira, Y., Bakhta, I., Haouas, Z., Flehi-Slim, I., Neffati, F., Najjar, M. F., Cheikh, H. B. (2013). Fenugreek seeds, a hepatoprotector forage crop against chronic $AlCl_3$ toxicity. *BMC Veterinary Research* (ISSN: 1746-6148 (O)), 9(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-22>
- [5] Bemvenuti, M. A. Fischer, L. C. (2010). Peixes: morfologia e adaptações. *Caderno de Ecologia Aquática*, 5, 31-54.
- [6] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. CDR nº 259, 20 September 2002. [Online]. Retrieved from https://brs.ms.saude.gov.br/brs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0259_20_09_2002.html.
- [7] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CDR nº 216, 15 September 2004. [Online]. Retrieved from https://brs.ms.saude.gov.br/brs/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html.
- [8] Brasil. Law nº 11.794, 8 October 2008. [Online]. Retrieved from http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm.

V. CONCLUSION

Consumption of cooked tilapia meat from the Cachoeira river for one month promoted a significant increase of ROS in the heart, cerebellum, liver, and plasma and a significant reduction of CAT activity in the liver and SOD activity in the kidney of the animals; and these changes may be related to the higher amount of Al^{+3} and Zn^{+2} present in the fish meat from the polluted river. These data suggest that chronic consumption of fish meat contaminated by environmental pollution with heavy metals has the potential for long-term health endangering toxicity that may result in clinical presentation of pathologies, as oxidative stress causes chronic and cumulative cellular damage.

- (ISSN 2318-2881(O)), 14(3), 96-102. <https://doi.org/10.6008/ebpc2318-2881.2021.003.0008>
- [12] Chary, R. P., Eerike, M., Konda, V. R., Arumachalam, R., Yeddula, V. R., Meti, V., Devi, T. S. Effect of aluminum chloride on blood glucose level and lipid profile in normal, diabetic and treated diabetic rats. (2017). *Indian Journal of Pharmacology* (ISSN: 0253-7613 (P)), 49(5), 357-365, 2017. DOI: 10.4103/ijp.IJP_786_16.
- [13] Choi, J. Y., Habte, G., Khan, N., Nho, E. Y., Hong, J. H., Choi, H., Park, K. S., & Kim, K. S. (2014). Determination of toxic heavy metals in Echinodermata and Chordata species from South Korea. *Food Additives & Contaminants: Part B* (ISSN: 1939-3210 (P) | 1939-3229 (O)), 7(4), 295-301. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.932311>
- [14] Choi, S., Liu, X., & Pan, Z. (2018). Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica* (ISSN: 1671-4083 (P) | 1745-7254 (O)), 39(7), 1120-1132. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.25>
- [15] Clark, J. D., Gebhart, G. F., Gonder, J. C., Keeling, M. E., Kohn, D. F. (1996) The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animal. *ILAR Journal* (ISSN: 1084-2020 (P) | 1930-6180 (O)), 38(1), 41-48.
- [16] Dwivedi, A. C., Tiwari, A., Mayank, P. (2015). Seasonal determination of heavy metals in muscle, gills and liver tissues of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from the tributary of the Ganga River, India. *Zoology and Ecology* (ISSN: 2165-8005 (P) | 2165-8013 (O)), 25(2), 166-171. <https://doi.org/10.1080/21658005.2015.1020012>.
- [17] Exley, C. Why industry propaganda and political interference cannot disguise the inevitable role played by brain damage by Y-radiation or aluminum chloride in female rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology* (ISSN: 1516-8913 (P) | 1678-4324 (O)), 63, e20180687. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-7612020180687>
- [24] Igbokwe, O. I., Igwenagu, E., Igbokwe, N. A. (2019). Aluminum toxicosis: review of toxic actions and effects. *Interdisciplinary Toxicology* (ISSN: 1337-9659 (O)), 12(2), 45-70. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0007>
- [25] Ige, S. F., Aiyoola, A. (2017). Effect of aqueous *Allium cepa* extract from red onion on aluminum chloride-induced anemia in female rats. *Journal of Applied Science and Environmental Management* (ISSN: 1119-8632 (P) | 2659-1502 (O)), 21(7), 1286-1290. <https://doi.org/10.4314/jasem.v21i7.11>
- [26] Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Mlyniec, K., Librowski, T. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology* (ISSN: 0925-4692 (P) | 1568-5608 (O)), 25(1), 11-24. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0309-4>.
- [27] Keshari, A. K., Verma, A. K.; Kumar, T., Srivastava, R. (2015). Oxidative stress: a review. *International Journal of Science and Technology* (ISSN: 0891-5083 (O)), 3(7), 155-162.
- [28] Kim, Y., Eom, J., Koh, J. Mechanism of zinc excitotoxicity: A focus on AMPK. (2020). *Frontiers in Neuroscience* (ISSN: 1662-4548 (P) | 1662-453X (O)), 14, 577958. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.577958>
- [29] Laabbar, W., Abbaoui, A., Elgot, A., Mokni, M., Amri, M., Masmoudi-Kouki, O. et al. (2021). Aluminum induced oxidative stress, astrogliosis and cell death in rat astrocytes, 2010/2008/lei/111794.htm.
- [9] Brasil. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CDR N° 222, 28 March 2018. [Online]. Retrieved from <http://www.biosseguranca.uff.br/?q=content/resolu%C3%A7%C3%A3o-rdc-n%C2%BA-222-de-28-de-mar%C3%A7o-de-2018>
- [10] Brzóska, M. M., Kozłowska, M., Rogalska, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., Roszczenko, A., & Smereczński, N. M. (2021). Enhanced zinc intake protects against oxidative stress and its consequences in the brain: a study in an in vivo rat model of cadmium exposure. *Nutrients*, (ISSN: 2072-6643 (O)), 13(2), 478. <https://doi.org/10.3390/nu13020478>
- [11] Campos, R. F. F. de, & Kuhn, D. C. (2021). Análise da interação de uma fonte pontual de lançamento de esgoto sanitário com a qualidade da água de um sistema lótico, Rio do Peixe, Santa Catarina, Brasil. *Nature and Conservation*

- mitochondrial calcium regulates the mechanism role played by human exposure to aluminum in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. (2014). *Frontiers in Neurology* (ISSN: 1664-2295 (O)), 5, 15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00212>
- [18] FAO/WHO. (2006). Evaluation of certain food additives and the contaminants mercury, lead and cadmium. WHO Technical Report, Series N. 505. Geneva: WHO Press.
- [19] FAO. (2014). The State of World Fish and Aquaculture: Opportunities and Challenges. [Online]. Retrieved from <https://www.fao.org/3/i3720e/i3720e.pdf>
- [20] Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A., Taylor, E. L. et al. (2015) Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* (ISSN: 1523-0864 (P) | 1557-7716 (O)), 2020, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/7187946>
- [21] Gaballa, I. F., Helal, S. F., Rashed, L. A., Abdelsamea, A. A. (2013). Dyslipidemia and disruption of l-carnitine in aluminum exposed workers. *Egyptian Journal of Occupational Medicine* (ISSN: 1110-1881 (P) | 2357-058X (O)), 37(1), 33-46. <https://doi.org/10.21608/ejom.2013>
- [22] Hardison, A., Revert, C., González-Weller, D. (2017). Aluminum exposure through the diet. *Journal of Food and Science Nutrition* (ISSN 2470-1076 (O)), 3(1), 100019. https://doi.org/10.24966/FSN_757_0176/100019
- [23] Hawas, A. M. M., Rashed, L. A., Mohamed, M. A. H. (2020). Evaluation of glucosamine effect against heart and
- vascular disease, ameliorated with low sodium intake. *Journal of Chemical Neuroanatomy* (ISSN: 0891-0618 (P) | 1873-6300 (O)), 112, 101915. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101915>
- [30] Lima, D. P. S., Silva, R. S., Yoshioka, E. T. O., Bezerra, R. M. (2015). Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. *Revista Acta Amazonica*, 45(4), 405-414. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201403995>
- [31] Liu, J., Wang, Q., Sun, X., Yang, X., Zhuang, C., Xu, F. et al. (2016). The toxicity of aluminum chloride on kidney of rats. *Biological Trace Element Research* (ISSN: 0163-4984 (O)), 173(2), 339-344. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0648-9>
- [32] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* (ISSN: 1083-351X (O)), 193(1), 265-275.
- [33] Macedo, C. F., Sipaúba-Tavares, L. H. (2018). Eutrophication and water quality in pisciculture: consequences and recommendations. *Boletim do Instituto de Pesca* (ISSN: 0046-9939 (P) | 1678-2305(O)), 36(2), 149 – 163.
- [34] Marques, R. G., Morales, M. M., Petroianu, A. (2009). Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cirurgica Brasileira* (ISSN: 0102-8650 (P) | 1678-2674 (O)), 24 (1), 69-74. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000100015>

- [35] Marreiro, D. N., Cruz, K. J. C., Morais, J. B. S., Beserra, J. B., Severo, J. S., Oliveira, A. R. S. (2017). Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants* (ISSN: 2076-3921 (O)), 6(24), 1-9. <https://doi.org/10.3390/antiox6020024>. 803
- [36] Marklund, S. F. (1985). Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Letters* (ISSN: 0014-5793 (P) | 1873-3468 (O)), 184(2), 237-239. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80613-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80613-x)
- [37] Nathiya, S., Nandhini, A. (2014). Evaluation of antioxidant effect of Salacia oblonga against aluminum chloride induced visceral toxicity in albino rats. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology* (ISSN: 2319-2003 (P) | 2279-0780 (O)), 3(2), 315-319. <https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp20140412>. 808
- [38] Oliveira, J. C. M. (2013). O peixe e a saúde: das recomendações para o consumo às possibilidades ambientais de atendê-lo. *Segurança Alimentar e Nutricional* (ISSN: 1808-8023 (P) | 2316-297X (O)), 20, 141-146. <https://doi.org/10.20396/san.v20i1supl.8634592>
- [39] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* (ISSN: 0003-2697 (P) | 1096-0309 (O)), 95, 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- [40] Othman, M. S., Fareid, M. A., Hameed, R. S. A., Moneim, A. E. A. (2017). The protective effects of melatonin on aluminum-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity 816 in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (ISSN: 1043-4364 (P) | 1043-4364 (O)), 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/10434364.2017.1318161>
- Arquivos Brasileiros de Cardiologia* (ISSN: 0066-782X (P) | 1678-4170 (O)), 100(1), p. 1-40. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2013000900001>
- [47] Silva, C. A., Santos, S. O. (2016). Avaliação do potencial risco à saúde humana de metais pesados em peixes marinhos consumidos em Aracaju, Maceió e Salvador, Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 22 p.
- [48] Singh, K. B. (2012). Long term excessive zinc supplementation induced oxidative stress in wistar rats fed on semi-synthetic diet. *Food and Nutrition* (ISSN: 0046-4384 | 2169-8279 (O)), 3(6), 724-731. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.36098>
- [49] Slaninova, A., Machova, J., Svobodova, A. (2014). Fish kill caused by aluminum and iron contamination in a natural pond used for fish rearing: a case report. *Vetmed* (ISSN: 2663-1814 | 2663-1822 (O)), 9(11), 573-581. <https://doi.org/10.17221/7821>
- [50] Tawell, A. K. A.; Shuhaimi-Othman, M.; Ahmad, A. K. (2012). Analysis of heavy metal concentrations in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from four selected markets in Selangor, peninsular Malaysia. *Journal of Biological Sciences*, 12(3), 138-145. <https://doi.org/10.3923/jbs.2012.138.145>
- [51] Uysal, K., Emre, Y., KÖSE, E. (2008). The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). *Microchemistry Journal*, 90(1), 67-70. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.03.005>. 852

- 1942-0900 (P) | 1942-0994 (O)), 2020, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2020/7375136>
- [41] Pinheiro, H. T., Mazzei, E., Moura, R. L., Amado-Filho, G. M., Braga, A. C., Costa, P. A. S. et al. (2015). Fish biodiversity of the Vitória-Trindade Seamount Chain, southwestern Atlantic: an updated outbase. *PLoS ONE* (ISSN: 1932-6203(O)), 10(3), e0118180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118180>
- [42] Reznick, A. Z., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* (ISSN: 1557-7988 (P) | 0076-6879 (O)), 233, 357-363. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33041-7)
- [43] Ribeiro, J. M. G., Oliveira, T. M. N. (2014). Cartilha Geográfica Bacias hidrográficas dos rios Cubatão (norte) e cachoeira Joinville. 1. Ed. Joinville: Mercado de Comunicação, 40 p.
- [44] Ribeiro, H.; Jaime, P. C.; Ventura, D. (2017). Alimentação e sustentabilidade. *Estudos Avançados* (ISSN: 0103-4014 (P) | 1806-9592 (O)), 31(89), 185-198. <https://doi.org/10.1590/s0103-40142017.31890016>
- [45] Sanches Filho, P. J., Fonseca, V. K., Holbig, L. (2013). Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. *Ecotoxicology and Environmental Contaminants*, 8(1), 105-111. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.01.015>
- [46] Santos, R. D., Gagliardi, A. C. M., Xavier, H. T., Magnoni, C. D., Cassani, R., Lottenberg, A. M. P. (2013). I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular.
- [52] Van Dijk, P. R., Pasch, A., Vanockenburg-Brumet, S. L., Waanders, F., Abdulle, A. E., Muis, M. J. et al. (2020). Thiols as markers of redox status in type 1 diabetes mellitus. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* (ISSN: 2042-0188 (P) | 2042-0196 (O)), 6(47), 3246-3251. <https://doi.org/10.1177/2042018820903641>
- [53] Vincze, K., Scheil, V., Kuch, B., Köhler, H. R., Triebelskom, R. (2015). Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research* (ISSN: 0944-1344 (P) | 1614-7499 (O)), 22, 11822-11839. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4398-6>
- [54] Yuan, C., Lee, Y., Hsu, G. W. (2012). Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *Journal of Biomedical Science* (ISSN: 1021-7770 (P) | 1423-0127 (O)), 19(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-51>
- [55] Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* (ISSN: 1557-7988 (P) | 0076-6879 (O)), 77, 325-33. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77046-0)
- [56] World Health Organization. (2011). FAO/WHO expert committee report on food additives: 47rd report. WHO Technical Report Series. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

6.2 ARTIGO 2: EXPOSIÇÃO DE 3 E 6 MESES

AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO CRÔNICO DE CARNE DE PEIXE DO RIO CACHOEIRA EM RATOS

Sônia dos Santos Toriani¹, Alessandra Betina Gastaldi¹, Maria Helena Packer², Giovanna Lovato², Júlia de Oliveira Weinfurter², Gabriela Kunz Elias², Maria Augusta Schramm do Nascimento³, Luana Carla Pscheidt³, Eduardo Manoel Pereira¹⁻², Daniela Delwing-de Lima¹⁻², Therezinha Maria Novais de Oliveira^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

²Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

³Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, ¹Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461-9152, E-mail: therezinha.novais@univille.br

RESUMO

A contaminação dos peixes por poluentes ambientais oriundos de efluentes industriais, domiciliares e esgoto pode comprometer a qualidade dessa fonte de alimento e tornar-se prejudicial. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade pré-clínica do consumo de carne de peixe do rio Cachoeira por três e seis meses. Grupos de ratas foram divididas para receber ração, carne de peixe de cultivo ou do rio Cachoeira. Um dia após o término da exposição, os animais foram eutanasiados e coletados sangue, baço, cerebelo, córtex cerebral, coração, fígado, rim e aferidos parâmetros de estresse oxidativo, bioquímicos e hematológicos. Nos animais que

consumiram carne de peixe do rio Cachoeira, após 3 e 6 meses aumentou a peroxidação lipídica no cerebelo, córtex, coração, fígado, rim e plasma. Conteúdo total de Sulfidrilas reduziu no baço, cerebelo, coração e fígado após 3 e 6 meses, enquanto carbonilação proteica aumentou no coração, córtex, fígado e plasma após 3 e 6 meses. A atividade da catalase diminuiu no cerebelo, coração e rim após 3 meses e 6 meses; a atividade da superóxido dismutase reduziu no cerebelo e fígado após 3 e 6 meses. A atividade da glutathione peroxidase reduziu no cerebelo, coração, fígado e rim após 6 meses. Após 3 meses, houve diminuição de tiroxina, HDL colesterol e de transaminase oxalacética glutâmica, aumento de triglicérides e VLDL. Após 6 meses, houve aumento de tiroxina, transaminase glutâmica pirúvica, ureia e triglicérides. Parâmetros hematológicos não foram modificados. Essas alterações podem estar correlacionadas com a maior presença de metais pesados na carne de peixe do rio Cachoeira.

Palavras-chave: alimentos, dieta e nutrição, desenvolvimento sustentável, monitoramento ambiental, peixe, segurança alimentar, toxicologia.

ABSTRACT

Fish contamination by environmental pollutants from industrial, domestic and sewer effluents compromise this food quality and turn them harmful. This study aimed to evaluate the preclinical toxicity of fish food from Cachoeira river for three and six months. Different rat groups received standard ration, farmed fish meat or from the Cachoeira river. One day after finishing the exposition, animals were euthanized and whole blood, spleen, cerebellum, brain cortex, heart, liver and kidney were collected to measure oxidative stress, biochemical and hematologic parameters. Among rats who consumed Cachoeira river meat, after 3 and 6 months lipid peroxidation increased in cerebellum, Sulfhydryls decreased in spleen, cerebellum, heart and liver after 3 and 6 months, while carbonylated proteins increased in heart, córtex, liver and plasma after 3 and 6 months. Catalase activity decreased in cerebellum, heart and kidney after 3 and 6 months; superoxide dismutase activity decreased in cerebellum and liver after 3 and 6 months and glutathione peroxidase activity decreased in cerebellum, heart, liver and kidney after 6 months. After 3 months, there was tiroxin, HDL and oxalacetic glutamic transaminase reduction and increase in tryglicerides and VLDL. After 6 months, increase in tiroxin, piruvic

glutamic transaminase, urea and tryglicerides. Hematologic parameters were not modified. These changes may be related to higher level of heavy metals in Cachoeira river fish meat.

Keywords: diet, food and nutrition, sustainable development, environmental monitoring, fish, food safety, toxicology.

INTRODUÇÃO

Segundo a Food and Agricultural Organization (FAO, 2010), todas as pessoas têm direito à alimentação saudável e adequada em cada fase da vida, respeitando as diferenças sociais e culturais de cada povo. Assim, é fundamental um equilíbrio energético que contenha os principais nutrientes de uma alimentação rica em macro e micronutrientes, sendo destacado o peixe como fonte de proteínas, vitaminas e minerais e especial fonte de ômega 3 (FAO, 2016).

O peixe é um alimento que está presente na mesa de muitas pessoas do planeta, é uma fonte de proteína de alto valor biológico, cujo consumo vem crescendo devido à mudança de padrões alimentares, focados na busca de um estilo de vida mais saudável, em face dos nutrientes possuírem ações protetoras sobre o sistema neurológico e cardiovascular, e anti-inflamatória (FAO, 2018; LASSALE *et al.*, 2018).

Entretanto, os peixes para consumo devem seguir as normas de segurança alimentar, que consideram um alimento próprio para o consumo quando seguidos os cuidados específicos quanto a sua procedência, forma de produção e reprodução, cultivo, coleta, armazenamento e preparo. A primeira preocupação é com o local de cultivo, cuja água deve estar isenta de contaminantes nocivos à saúde tanto do peixe como de quem vai consumi-lo (EMBRAPA 2013).

Os metais pesados, pesticidas e demais resíduos químicos oriundos da indústria ou despejos domésticos são os principais responsáveis por tornar o ambiente aquático rico em compostos químicos capazes de trazer riscos à saúde. Vários tipos de resíduos podem acumular na carne do peixe, tornando-a fora dos padrões estabelecidos para o consumo e para o surgimento de muitas doenças (CASTRO *et al.*, 2017; AMARAL *et al.*, 2017), por exemplo, por meio da bioacumulação e biomagnificação dos metais pesados e demais resíduos químicos,

tornando a ingestão desta fonte de proteína na dieta, conforme quantidade e período, deletérios para o organismo (FERRON *et al.*, 2020; PEIXOTO).

Os metais podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de perturbar a homeostasia do metabolismo, alterando o funcionamento das enzimas antioxidantes e gerando peroxidação lipídica, podendo causar efeitos significativamente danosos para o metabolismo, culminando em diversas patologias (AMATO, 2019).

No Brasil, a tilápia é um dos peixes mais consumidos, tendo atingido a produção de 486.155 toneladas no ano de 2020 (ANUARIO DO PEIXE, 2021). Considerando que a carne de peixe deve possuir qualidade suficiente para não promover dano à saúde, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade pré-clínica do consumo por três e seis meses de carne de tilápia cozida pescada na bacia hidrográfica do rio Cachoeira em ratos.

METODOLOGIA

Estudo pré-clínico experimental, realizado na Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), conduzido no biotério e nos laboratórios de práticas farmacêuticas e de análise instrumental. Os experimentos foram conduzidos unicamente após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVILLE (Parecer 01/2019).

Protocolo experimental in vivo

Foram utilizados *Rattus norvegicus* albinos da raça *Wistar*, fêmeas, com peso médio inicial de 100g, provenientes do Biotério da Universitária Regional de Blumenau (FURB – SC). Os animais foram recebidos com 21 dias de idade, acomodados (4 por gaiola) e aclimatados por 7 dias no biotério setorial da Universidade da Região de Joinville, para adaptação. As salas de manutenção dos animais foram mantidas em ciclo de 12h claro/escuro (luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), temperatura entre 22 ± 2 °C e umidade entre $50 \pm 5\%$, com sistema de exaustão de ar. Os animais tiveram livre acesso à ração e água durante período de aclimação. Os experimentos foram realizados conforme o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2012) e as recomendações exigidas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, (1996)”.

Após a aclimação, os animais foram divididos em grupos que foram expostos por três e seis meses, sendo o grupo controle a ração e grupos experimentais a carne de peixe de cultivo ou do rio Cachoeira, conforme o quadro 1 abaixo:

Quadro 1. Divisão dos grupos experimentais.

Período de exposição dos grupos	Dias da semana	Grupo controle	Grupo peixe de cultivo	Grupo peixe do rio Cachoeira	Total de animais por grupo
3 e 6 meses	Segunda	Ração	Ração	Ração	8
	Terça	Jejum 8h	Jejum 8h	Jejum 8h	8
	Quarta	Ração	Peixe	Peixe	8
	Quinta	Ração	Ração	Ração	8
	Sexta	Jejum 8h	Jejum 8h	Jejum 8h	8
	Sábado	Ração	Peixe	Peixe	8
	Domingo	Ração	Ração	Ração	8

Os animais do grupo controle receberam ração padrão (Nuvilab®) e os animais dos grupos experimentais receberam 2 porções por semana de carne de peixe. Oito horas antes do fornecimento da carne de peixe foi retirada a ração das caixas de todos os grupos, inclusive o controle. Os animais foram expostos a carne de peixe pelos períodos de três e seis meses.

Para definição da porção de peixe ofertada a cada 15 dias para cada rata, utilizou-se a recomendação da OMS (2014) de consumo de 12kg de peixe ano para um adulto de 70Kg (uma porção de 125g/70 Kg duas vezes por semana). Essa proporção foi convertida conforme a massa corporal de cada animal, que foi pesado quinzenalmente.

Um dia após o término de cada período de exposição, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue total, e excisados o baço, coração, fígado, rim direito, coração, córtex cerebral e cerebelo.

Preparo das amostras

Sangue Total

O sangue total para análise dos parâmetros hematológicos foi obtido de sangue dos ratos por meio de decapitação e acondicionados em tubos com e sem ácido etilenodiamonotetracético tripotássio (EDTA K3). O sangue foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos para separação

de plasma e soro, que foram mantidos em freezer. O sangue recém coletado foi utilizado para análise de parâmetros hematológicos e confecção de lâmina para contagem diferencial de células sanguíneas.

Eritrócitos

Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio) e os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 μ L de eritrócitos lavados e congelados.

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a $13,500 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5mg/mL de proteína.

Tecidos

O fígado, rim, coração, baço e estruturas cerebrais (córtex e cerebelo) foram removidos, decapsulados e mantidos em gelo com tampão salina (154mM NaCl, 5mM Tris-HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão adequado, conforme metodologia a ser empregada, usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a $\times 3.000 g$ a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) e de estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas (SH) e conteúdo total de proteínas carboniladas (PC).

Aferição dos parâmetros de estresse oxidativo

TBA-RS

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A metodologia de TBA-RS, mensura o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. Os tecidos homogeneizados e o plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidos num banho de água fervente durante 60min. TBA-RS foi determinado pela absorbância a 535nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados estão expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

Conteúdo total de SH

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), que se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado ou plasma foi adicionado a 1mL de tampão (PBS) pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µL de DTNB 10mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

Conteúdo total de PC

O teor de carbonilas foi mensurado através do método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370nm. Resumidamente, 200uL de homogeneizado ou plasma foram adicionados a tubos de plástico contendo 400uL de dinitrofenilhidrazina 10mM (preparado em HCl₂M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1 h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500uL de ácido tricloroacético a 20% foram adicionados a cada tubo. A mistura foi submetida a vórtex e centrifugada a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido, descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol/acetato de etila (1: 1 v/v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspense em 600µL de guanidina 6M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60 °C durante 15 min. As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante usado para medir a absorbância a 370nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol/mg de proteína).

Atividade da CAT

Esse parâmetro foi mensurado pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H₂O₂ a 240nm num meio de reação contendo 25µL de amostra e 600µL tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 20 mM de H₂O₂. A absorbância foi mensurada a cada 10 segundos por 1 minuto e 40 segundos. Uma unidade é definida como 1µmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

Atividade da SOD

Esse parâmetro foi determinado pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15 μ L de cada amostra foram adicionados a 215 μ L de uma mistura contendo 50 uM de tampão Tris, 1 μ M de EDTA, pH 8,2 e 30uM de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20uL de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatado como unidades de SOD/mg de proteína.

Atividade da GSH-Px

A aferição desse parâmetro foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340nm por 3 minutos e 30 segundos (espectrofotômetro Shimadzu UV-visível). O meio contém 90 μ L de amostra e 800 μ L de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4; 20 μ L de GSH 2 mM, 30 μ L de GSH redutase 0,15U/mL, 10 μ L de azida 0,4mM e 10 μ L de NADPH 0,1 mM. A absorbância foi mensurada a cada 10 segundos por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, 50 μ L de tertbutil-hidroperóxido 0,5mM foram adicionados e a absorbância lida por mais 2 minutos. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1 μ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px / mg de proteína.

Dosagem de proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

Aferição dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP), hormônio tireo-estimulante (TSH), tiroxina livre (T4L) e triiodotironina (T3) e creatinina foram mensurados por processo automático no aparelho Advia Centaur Immunassay System da Siemens (laboratório Santa Helena de Jaraguá do Sul - SC). A

mensuração de proteínas totais, albumina, ácido úrico, ureia, colesterol total (CT), colesterol HDL e triglicerídeos (TG) foram mensurados por espectrofotometria no laboratório de Práticas Farmacêuticas da UNIVILLE utilizando kits da Labtest. Níveis sanguíneos de colesterol VLDL e LDL foram deduzidos utilizando a equação de Friedewald.

Aferição dos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram mensurados por processo automático de leitura de luz e impedância elétrica por meio de automação com o aparelho Pentra 60 da marca Horiba ABX. Foram avaliados os parâmetros da série vermelha (hemograma): hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), contagem de eritrócitos, RDW (Red Cell Distribution Width), índices referentes à concentração de hemoglobina e análise microscópica do esfregaço sanguíneo para observação de alterações de forma e cor dos eritrócitos. Também foi avaliado o leucograma (número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) e a quantidade total de plaquetas.

Coleta dos peixes

Foi selecionada a tilápia para este estudo por ser um peixe bastante consumido entre os brasileiros, ter uma ótima relação custo/benefício para os consumidores, devido a sua carne ser considerada uma proteína de alto valor biológico e textura firme. Este peixe também pode se desenvolver em ambientes adversos, tem hábito alimentar onívoro, alimenta-se de todo tipo de material orgânico disponível na água, moluscos, sementes, vegetais de qualquer espécie, crustáceos, entre outros (BEMVENUTI, FISCHER, 2010).

Os peixes de cultivo selecionados foram tilápias do Nilo *Oreochromis*, provenientes de cultivo em monocultura de tilápias em viveiro escavado arraçoado, localizado na Estrada Quiriri na cidade de Joinville (SC). O local de cultivo é assistido regularmente pela equipe do setor de piscicultura da unidade de desenvolvimento rural da Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente que faz regularmente a análise da água de cultivo e confirmou que os parâmetros de cultivo discriminados estão dentro do ideal para a tilapicultura. A ração ofertada aos peixes omnívoros possui 30% de proteína bruta (marca Nicoluzzi). Os peixes foram capturados com auxílio de redes, armazenados em caixa térmica e imediatamente entregues para a pesquisadora para posterior limpeza e congelamento até a hora do preparo. A coleta ocorreu na mesma data e com a mesma frequência que dos peixes do rio Cachoeira.

Os peixes do rio Cachoeira foram coletados seguindo a metodologia de Lima *et al.* (2013), com o auxílio de redes, sendo capturados 3 peixes da mesma espécie, armazenados em isopor com gelo até a chegada ao laboratório de toxicologia da UNIVILLE, onde foram medidos e pesados. A coleta do peixe ocorreu no máximo a cada 6 meses, período seguro para armazenamento e manutenção da qualidade da carne para consumo. Novas coletas de peixe do rio Cachoeira ocorreram sempre 15 dias antes de serem consumidas todas as porções congeladas disponíveis.

A coleta dos peixes foi realizada durante o dia, sempre considerando a condição de ausência de chuvas de, no mínimo, dois dias antes das coletas e levando-se em conta a facilidade de acesso e a presença da espécie alvo (PINHEIRO *et al.*, 2017). As tilápias foram coletadas em um mesmo trecho do rio Cachoeira (coordenadas 26°16'084"S 048°51.880' W), no bairro Costa e Silva, em Joinville (SC). E coordenadas (26°16'01"S - 48°51'40"W), próximo a escola Geovani Pascoalini Franco, no bairro Costa e Silva, em Joinville.

Os peixes foram coletados utilizando tarrafas de malha entre nós de 4cm e redes de emalhe, com 8 metros de comprimento e 1 metro de largura, com malha entre nós de 6cm. Após a captura, os indivíduos eram identificados ao menor nível taxonômico possível para confirmar que se tratava da espécie alvo, colocados em sacos plásticos, pesados, etiquetados, lacrados e acondicionados em caixa térmica com gelo. Foram coletados 19 indivíduos, totalizando 5100 g de tilápias. Os procedimentos de coleta foram conduzidos após permissão do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 10476-3 pelos biólogos Diogo Augusto Moreira (CrBio 81154) e Johnatas Adelir-Alves (CrBio 053967).

Preparo da carne de peixe

A seleção e preparação da carne dos peixes para o consumo das ratas seguiu as normas de segurança alimentar da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação (ANVISA, 2004, 2009). Logo após o peixe ser pescado, foi limpo, eviscerado e suas escamas e cabeça retiradas. A carne dos peixes de cultivo e do rio Cachoeira foi separada dos espinhos e apenas a carne crua, em forma de filé foi embalada individualmente ou no máximo dois filés em sacos plásticos, transparentes, selecionados de acordo com a norma RDC nº 259/2002 (ANVISA, 2002), mantida em temperatura entre -18°C e -20°C até o momento do descongelamento e cocção da carne.

O descongelamento da carne ocorreu em condições de refrigeração à temperatura inferior a 5°C, para evitar que as áreas superficiais deste alimento se mantivessem em condições favoráveis à multiplicação microbiana. A cocção foi realizada em recipiente de vidro, apenas em água potável sem adição de tempero, em temperatura de 150 °C por 10 minutos (BRASIL, 2004).

Após o cozimento, a carne do peixe foi resfriada, separada em porções e em seguida congelada a -5 °C, embalada em sacos plásticos conforme a RDC nº 259/2002 para garantir a segurança nutricional deste alimento e minimizar o risco de contaminação cruzada. A carne foi descongelada em forno de micro-ondas por 2 minutos antes de ser oferecida a cada animal. Em seguida, foi acondicionada em bolsa térmica para transporte até o biotério, onde pesou-se cada porção em balança de precisão (BRASIL, 2018; CRIBB *et al.*, 2018).

A carne de peixe foi ofertada aos animais duas vezes por semana, após um período de 8 horas de jejum. Cada animal foi colocado individualmente em uma gaiola, para garantir que cada um consumisse sua porção, e após verificação do consumo total da porção, eles foram recolocados na caixa maior junto com os demais animais do seu grupo e ração à vontade foi disponibilizada novamente.

Mensuração da quantidade de metais na carne de peixe

As análises de concentração de metais pesados Cádmio (Cd^{+2}), chumbo (Pb^{+2}), Cromo (Cr^{+6}) e mercúrio (Hg^{+2}) Alumínio (Al^{+2}) e Zinco (Zn^{+2}) na carne de peixe foram conduzidas em triplicata por espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) em aparelho Avio 200-Perkin Elmer, adaptadas das metodologias de Sanches Filho, Fonseca e Holbig (2013) e de Uysal, Emre e Köse (2008).

Foram pesadas 5g de cada amostra de carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira, que foram colocadas em liofilizador por 24 horas. Após secagem, restaram 3,40g da amostra da carne de peixe de cultivo e 3,22 g da amostra de carne de peixe do rio Cachoeira. A cada amostra foram adicionados 10mL HCl (20%) + 4mL de HNO_3 (50%), colocadas na chapa de aquecimento a 90°C e deixadas por 30 minutos em refluxo. Em seguida as amostras foram filtradas para um balão de 100 mL e avolumadas com água Milli-Q (LIMA, 2013).

Todo o material utilizado no preparo da amostra foi lavado com uma solução de Extran e água e, após, colocado em ácido nítrico a 10% (v/v) durante pelo menos 24 horas. Após imersão

no ácido, o material foi lavado sete vezes na água Milli-Q. Os resultados da análise de metais estão expressos em ppm.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (mensuração do nível de metais) ou média $\pm$ erro padrão (parâmetros de estresse oxidativo, bioquímicos e hematológicos), foram tabulados e analisados utilizando o programa GraphPad Prism 6.0. Análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) ou de Tukey (dados paramétricos), para comparação entre os grupos foi conduzida, sendo valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

RESULTADOS

Parâmetros de estresse oxidativo - exposição de três meses

Nenhum parâmetro de estresse oxidativo foi alterado significativamente no baço. No cerebelo houve elevação dos níveis de TBA-RS (29,25%) e queda significativa de SH (34,43%) e da atividade da CAT (10,3%) no grupo de animais que consumiu carne de peixe do rio Cachoeira em relação aos que consumiram peixe do cultivo e grupo controle que consumiu só ração. No córtex, não houve modificação relevante de EROs, porém observou-se aumento significativo da atividade da CAT (16,16%) e da SOD (18,45%).

No coração foram observados, respectivamente, queda e aumento significativos de SH (29,91%) e de carbonilas (31,85%), além de redução relevante da atividade da CAT (25,21%). No fígado foram verificados, respectivamente, elevação e queda significativa de TBA-RS (44,25%) e de SH (38,35%). Também houve aumento estatisticamente relevante da atividade da CAT (68,76%). Nos rins, observou-se elevação de TBA-RS (37,32%) e redução significativa da atividade da CAT (17,36%) e da GSH-Px (10,99%).

No plasma, percebeu-se elevação intensa dos níveis de TBA-RS (121,52%) e de PC (59,44%), enquanto nos eritrócitos houve aumento relevante apenas da atividade da GSH-Px (30,39%). Esses dados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de estresse oxidativo após três meses de exposição à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

Órgão (Grupo)	TBA-RS (nmol/mg de proteína)	SH (nmol/mg de proteína)	PC (nmol/mg de proteína)	CAT (U/mg de proteína)	SOD (U/mg de proteína)	GSH-Px (U/mg de proteína)
Baço (Ração)	3,00 ± 0,10	38,03 ± 2,51	7,02 ± 0,16	11,93 ± 0,25	9,50 ± 0,46	42,05 ± 2,07
Baço (Cultivo)	3,00 ± 0,10	37,64 ± 2,24	6,88 ± 0,21	11,04 ± 0,37	9,62 ± 0,28	39,48 ± 1,80
Baço (Cachoeira)	3,08 ± 0,11	33,70 ± 1,78	7,13 ± 0,13	11,56 ± 0,26	9,31 ± 0,20	35,16 ± 1,89
Cerebelo (Ração)	4,00 ± 0,16	23,03 ± 1,01	5,07 ± 0,13	7,05 ± 0,19	5,22 ± 0,12	26,98 ± 2,84
Cerebelo (Cultivo)	3,86 ± 0,09	21,32 ± 0,53	5,02 ± 0,08	6,96 ± 0,22	5,08 ± 0,16	29,04 ± 0,13
Cerebelo (Cachoeira)	5,17 ± 0,13***	15,10 ± 0,54***	5,10 ± 0,12	6,73 ± 0,08	4,68 ± 0,07*	22,57 ± 1,96
Córtex (Ração)	2,95 ± 0,10	5,05 ± 0,17	28,28 ± 1,24	7,67 ± 0,35	7,37 ± 0,41	25,85 ± 1,07
Córtex (Cultivo)	3,06 ± 0,12	4,94 ± 0,15	27,98 ± 0,42	7,56 ± 0,24	7,54 ± 0,21	24,80 ± 1,33
Córtex (Cachoeira)	3,08 ± 0,09	5,53 ± 0,12	26,80 ± 0,66	8,91 ± 0,04*	8,73 ± 0,24**	21,60 ± 1,16
Coração (Ração)	4,17 ± 0,14	29,95 ± 1,54	5,62 ± 0,21	11,58 ± 1,25	5,50 ± 0,14	102,50 ± 8,30
Coração (Cultivo)	4,24 ± 0,14	29,02 ± 1,25	5,46 ± 0,15	11,78 ± 1,02	5,56 ± 0,16	101,10 ± 10,48
Coração (Cachoeira)	4,36 ± 0,11	20,99 ± 0,62***	7,41 ± 0,32***	8,60 ± 0,50**	5,46 ± 0,14	98,53 ± 11,35
Fígado (Ração)	2,87 ± 0,08	68,03 ± 4,75	4,50 ± 0,17	10,98 ± 0,46	5,40 ± 0,10	94,25 ± 6,70
Fígado (Cultivo)	2,65 ± 0,17	69,30 ± 2,01	4,86 ± 0,14	11,74 ± 0,82	5,38 ± 0,29	102,00 ± 3,17
Fígado (Cachoeira)	4,14 ± 0,14***	41,94 ± 1,09***	5,15 ± 0,14	18,53 ± 0,09***	5,26 ± 0,18	89,65 ± 6,91
Rins (Ração)	2,17 ± 0,20	30,65 ± 1,18	5,62 ± 0,44	17,68 ± 1,00	5,17 ± 0,27	42,85 ± 0,51
Rins (Cultivo)	2,26 ± 0,21	30,70 ± 0,98	5,40 ± 0,14	17,84 ± 0,67	5,14 ± 0,22	43,12 ± 2,01
Rins (Cachoeira)	2,98 ± 0,21*	29,58 ± 0,87	5,52 ± 0,27	14,61 ± 0,40***	5,48 ± 0,09	38,14 ± 1,03*

<i>Plasma (Ração)</i>	3,67 ± 0,08	33,10 ± 1,95	5,77 ± 0,26
<i>Plasma (Cultivo)</i>	4,62 ± 0,12	30,30 ± 2,14	6,24 ± 0,24
<i>Plasma (Cachoeira)</i>	8,13 ± 0,31***	30,28 ± 0,71	9,20 ± 0,46***
<i>Eritrócitos (Ração)</i>		6,82 ± 0,14	5,95 ± 0,06
<i>Eritrócitos (Cultivo)</i>		6,98 ± 0,12	5,98 ± 0,10
<i>Eritrócitos (Cachoeira)</i>		7,63 ± 0,29	5,91 ± 0,14
			28,23 ± 0,44
			29,38 ± 1,07
			36,81 ± 1,91**

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,01$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

Parâmetros de estresse oxidativo - exposição de seis meses

A elevação de TBA-RS no baço foi expressiva, mas não atingiu significância estatística ($p = 0,06$), porém a queda de SH (17,32%) e o aumento da atividade da GSH-Px (20,14%) foram significativos.

No cerebelo houve aumento significativo de TBA-RS (63,28%) e queda relevante de SH (25,51%), da atividade da CAT (6,08%), da SOD (12,21%) e da GSH-Px (34,83%), enquanto no córtex foram encontrados elevação significativa de TBA-RS (20,59%), PC (14,57%) e da atividade da CAT (38,83%). A elevação da atividade da SOD e queda da atividade da GSH-Px não atingiram significância estatísticas no córtex ($p = 0,07$ e $p = 0,08$, respectivamente).

No coração, à exceção da atividade da SOD, todos os outros parâmetros de estresse oxidativo foram significativamente alterados: houve aumento de TBA-RS (13,69%), de PC (25,58%) e queda de SH (11,31%), da atividade da CAT (24,54%) e da GSH-Px (8,00%).

No fígado, todos os parâmetros de estresse oxidativo foram significativamente alterados: houve elevação de TBA-RS (46,06%) e de carbonilas (11,74%) e da atividade da

CAT (41,88) e redução de SH (10,3%) e da atividade da SOD (15,04%) e da GSH-Px (19,10%). Nos rins, foram observados aumento significativo de TBA-RS (27,15%) , da atividade da CAT (33,19%) e da SOD (7,25%) e redução da atividade da GSH-Px (16,50%).

Foram observados aumento significativo de TBA-RS (60,31%) e de carbonilas (36,81%) no plasma, além de queda relevante de SH (10,53%). Nos eritrócitos, foi encontrado aumento significativo da atividade da CAT (8,54%), da SOD (20,99%) e da GSH-Px (67,34%). Esses dados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de estresse oxidativo após seis meses de exposição à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

Órgão (Grupo)	TBA-RS (nmol/mg de proteína)	SH (nmol/mg de proteína)	Proteínas carboniladas (nmol/mg de proteína)	CAT (U/mg de proteína)	SOD (U/mg de proteína)	GSH-Px (U/mg de proteína)
Baço (Ração)	2,82 ± 0,12	39,53 ± 1,55	6,87 ± 0,13	10,38 ± 0,31	9,62 ± 0,23	41,60 ± 1,10
Baço (Cultivo)	2,80 ± 0,09	40,06 ± 0,75	6,86 ± 0,10	10,88 ± 0,66	9,68 ± 0,14	42,68 ± 1,13
Baço (Cachoeira)	3,15 ± 0,09	32,68 ± 1,04***	7,20 ± 0,10	10,05 ± 0,23	9,25 ± 0,11	49,98 ± 1,12***
Cerebelo (Ração)	3,65 ± 0,15	23,08 ± 1,01	5,15 ± 0,15	6,57 ± 0,11	5,32 ± 0,13	23,68 ± 1,20
Cerebelo (Cultivo)	3,78 ± 0,11	25,70 ± 1,40	4,96 ± 0,16	6,64 ± 0,11	5,16 ± 0,10	21,98 ± 0,56
Cerebelo (Cachoeira)	5,96 ± 0,10***	17,19 ± 1,78***	5,10 ± 0,13	6,17 ± 0,11*	4,67 ± 0,13*	15,43 ± 0,73***
Córtex (Ração)	2,67 ± 0,15	27,48 ± 0,88	4,87 ± 0,13	6,85 ± 0,14	7,05 ± 0,10	23,00 ± 1,20
Córtex (Cultivo)	2,76 ± 0,08	27,70 ± 0,94	4,94 ± 0,16	6,74 ± 0,21	6,96 ± 0,14	23,08 ± 1,00
Córtex (Cachoeira)	3,22 ± 0,08**	26,56 ± 0,83	5,58 ± 0,10**	9,51 ± 0,23***	7,42 ± 0,13	20,49 ± 0,56
Coração (Ração)	3,87 ± 0,14	28,28 ± 1,46	5,55 ± 0,15	11,08 ± 0,40	5,42 ± 0,20	83,73 ± 2,17

<i>Coração</i> (Cultivo)	3,97 ± 0,17	29,54 ± 0,68	5,32 ± 0,12	11,36 ± 0,62	5,62 ± 0,15	86,16 ± 1,52
<i>Coração</i> (Cachoeira)	4,40 ± 0,12*	25,08 ± 0,58**	6,97 ± 0,17***	8,36 ± 0,13***	5,55 ± 0,09	77,03 ± 1,35**
<i>Fígado</i> (Ração)	2,67 ± 0,06	66,48 ± 1,88	4,77 ± 0,12	9,12 ± 0,13	5,25 ± 0,10	91,03 ± 1,28
<i>Fígado</i> (Cultivo)	2,58 ± 0,12	65,02 ± 1,347	4,90 ± 0,07	9,22 ± 0,15	5,14 ± 0,12	88,90 ± 0,84
<i>Fígado</i> (Cachoeira)	3,90 ± 0,10***	59,61 ± 1,09**	5,33 ± 0,13*	12,94 ± 0,59***	4,46 ± 0,10***	73,64 ± 1,43***
<i>Rins</i> (Ração)	2,32 ± 0,08	27,93 ± 1,12	5,47 ± 0,16	16,45 ± 0,79	5,10 ± 0,09	41,43 ± 1,24
<i>Rins</i> (Cultivo)	2,56 ± 0,05	27,12 ± 0,93	5,20 ± 0,15	16,28 ± 1,00	5,14 ± 0,09	42,84 ± 0,79
<i>Rins</i> (Cachoeira)	2,95 ± 0,11**	26,39 ± 1,20	5,45 ± 0,14	21,91 ± 0,90***	5,47 ± 0,09*	34,59 ± 0,60***
<i>Plasma</i> (Ração)	3,20 ± 0,10	27,25 ± 1,35	5,27 ± 0,13			
<i>Plasma</i> (Cultivo)	3,74 ± 0,08	27,75 ± 1,37	5,54 ± 0,16			
<i>Plasma</i> (Cachoeira)	5,13 ± 0,12***	24,38 ± 0,92*	7,21 ± 0,21***			
<i>Eritrócitos</i> (Ração)				6,32 ± 0,16	5,62 ± 0,13	24,50 ± 1,44
<i>Eritrócitos</i> (Cultivo)				6,28 ± 0,17	5,60 ± 0,11	27,40 ± 1,20
<i>Eritrócitos</i> (Cachoeira)				6,86 ± 0,08*	6,80 ± 0,09*	41,00 ± 1,50***

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,01$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

Parâmetros bioquímicos

Após a exposição por três meses, foram observadas reduções significativas do nível sanguíneo de T4 livre (22,12%), de TGO (18,01%) e de C-HDL (41,1%) no grupo de animais que consumiu a carne de peixe do rio Cachoeira em relação aos demais grupos e elevação relevante de triglicerídeos (26,00%) e de VLDL (26,28%).

Após seis meses de exposição, foi observada elevação estatisticamente significativa do nível sanguíneo de T4 livre (159,55% e 135,95%), e triglicerídeos (50,32% e 44,83%) nos animais que consumiram tanto a carne de peixe de cultivo como a do rio Cachoeira em relação aos que consumiram ração. Contudo, a elevação da TGP (22,29%) e de ureia (44,01%) foram restritas aos animais que consumiram carne de peixe do rio Cachoeira (tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos após três e seis meses de exposição à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

TRÊS MESES	Ração (n= 6)	Peixe de cultivo (n = 8)	Peixe do Cachoeira (n = 8)
<i>TSH (μU/mL)</i>	0,013 ± 0,003	0,016 ± 0,004	0,013 ± 0,002
<i>T4 livre (ng/dL)</i>	1,13 ± 0,006	1,08 ± 0,006	0,88 ± 0,008***
<i>T3 (ng/mL)</i>	0,44 ± 0,008	0,51 ± 0,006	0,41 ± 0,008
<i>TGO (U/L)</i>	262,0 ± 5,00	249,5 ± 9,50	214,8 ± 11,00**
<i>TGP (U/L)</i>	124,30 ± 18,10	138,80 ± 24,34	159,4 ± 23,03
<i>Proteínas totais (g/dL)</i>	7,17 ± 0,19	7,22 ± 0,13	7,11 ± 0,12
<i>Albumina (g/dL)</i>	2,87 ± 0,06	2,66 ± 0,05	2,70 ± 0,05
<i>Ureia (mg/dL)</i>	45,95 ± 3,11	54,90 ± 2,48	57,68 ± 3,49
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	0,77 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,81 ± 0,03
<i>Ácido úrico (mg/dL)</i>	1,32 ± 0,16	1,30 ± 0,15	1,30 ± 0,12
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	123,50 ± 4,55	124,80 ± 2,92	123,20 ± 5,05
<i>C-HDL (mg/dL)</i>	49,00 ± 1,95	39,25 ± 1,88	28,83 ± 1,11***
<i>Triglicerídeos (mg/dL)</i>	91,03 ± 6,99	82,43 ± 8,14	114,7 ± 8,40*
<i>C-LDL</i>	56,30 ± 4,86	65,63 ± 3,46	72,02 ± 5,52
<i>C-VLDL</i>	18,15 ± 1,81	16,45 ± 1,62	22,92 ± 1,69*
SEIS MESES	Ração (n= 6)	Peixe de cultivo (n = 8)	Peixe do Cachoeira (n = 8)
<i>TSH (μU/mL)</i>	0,015 ± 0,002	0,028 ± 0,008	0,018 ± 0,003
<i>T4 livre (ng/dL)</i>	0,89 ± 0,11	2,31 ± 0,24***	2,10 ± 0,05***
<i>T3 (ng/mL)</i>	0,46 ± 0,01	0,59 ± 0,05	0,45 ± 0,01
<i>TGO (U/L)</i>	191,00 ± 16,46	214,70 ± 9,95	199,00 ± 9,58
<i>TGP (U/L)</i>	275,00 ± 8,62	307,70 ± 14,19	336,30 ± 22,99*
<i>Proteínas totais (g/dL)</i>	5,75 ± 0,21	5,54 ± 0,08	5,42 ± 0,07
<i>Albumina (g/dL)</i>	3,02 ± 0,08	3,02 ± 0,10	3,03 ± 0,05

<i>Ureia (mg/dL)</i>	54,25 ± 5,83	58,00 ± 1,37	78,13 ± 4,93***
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	0,64 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,79 ± 0,07
<i>Ácido úrico (mg/dL)</i>	3,38 ± 0,40	3,88 ± 0,34	3,92 ± 0,41
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	58,75 ± 7,28	72,25 ± 7,29	72,33 ± 4,44
<i>C-HDL (mg/dL)</i>	99,00 ± 7,56	87,60 ± 5,06	96,25 ± 5,90
<i>Triglicerídeos (mg/dL)</i>	124,00 ± 17,10	186,40 ± 11,85*	179,60 ± 9,98*
<i>C-LDL (mg/dL)</i>	55,40 ± 9,98	47,48 ± 10,01	54,32 ± 6,24
<i>C-VLDL (mg/dL)</i>	30,70 ± 7,00	37,28 ± 2,37	35,93 ± 1,99

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,01$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

Parâmetros hematológicos

Não foram observadas alterações significativas nos eritrócitos, leucócitos ou plaquetas em nenhum dos grupos experimentais após três ou seis meses de exposição (tabela 4).

Tabela 4. Hemograma dos animais expostos por três ou seis meses à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

TRÊS MESES	<i>Ração (n = 6)</i>	<i>Peixe de cultivo (n = 8)</i>	<i>Peixe do Cachoeira (n = 8)</i>
<i>Total de leucócitos (x1000/μL)</i>	2,50 ± 0,20	2,82 ± 0,58	3,05 ± 0,64
<i>Segmentados (%)</i>	38,00 ± 1,47	33,25 ± 2,75	33,54 ± 5,84
<i>Bastonetes (%)</i>	0,50 ± 0,50	0,25 ± 0,25	0,24 ± 0,24
<i>Linfócitos (%)</i>	50,05 ± 7,35	64,15 ± 3,69	67,28 ± 4,26
<i>Monócitos (%)</i>	4,35 ± 1,25	4,65 ± 0,63	4,41 ± 0,50
<i>Eosinófilos (%)</i>	4,05 ± 1,55	5,04 ± 2,09	3,94 ± 1,26
<i>Basófilos (%)</i>	4,25 ± 1,55	3,63 ± 0,38	3,27 ± 1,02
<i>Total de eritrócitos (milhões/mm³)</i>	5,85 ± 0,68	6,72 ± 0,39	6,75 ± 0,44
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	12,45 ± 0,75	13,90 ± 0,82	14,19 ± 0,97

<i>Hematócrito (%)</i>	33,35 ± 3,45	35,88 ± 2,55	37,06 ± 2,47
<i>VCM (fL)</i>	53,50 ± 0,50	53,50 ± 0,64	54,57 ± 0,48
<i>HCM (ng)</i>	21,50 ± 1,20	20,70 ± 0,20	21,06 ± 0,22
<i>CHCM (g/dL)</i>	40,10 ± 2,10	38,83 ± 0,21	38,41 ± 0,45
<i>RDW (%)</i>	11,55 ± 0,25	12,15 ± 0,36	11,53 ± 0,12
<i>Total de plaquetas (x 1000/μL)</i>	304,50 ± 23,5	324,00 ± 28,61	338,20 ± 26,49
SEIS MESES			
	Ração (n= 6)	Peixe de cultivo (n = 8)	Peixe do Cachoeira (n = 8)
<i>Total de leucócitos (x1000/μL)</i>	5,17 ± 0,90	5,45 ± 0,58	5,01 ± 0,55
<i>Segmentados (%)</i>	19,75 ± 0,85	22,75 ± 1,25	24,50 ± 1,90
<i>Bastonetes (%)</i>	0,25 ± 0,25	0,40 ± 0,24	0,28 ± 0,18
<i>Linfócitos (%)</i>	66,00 ± 1,00	58,00 ± 3,58	59,33 ± 4,92
<i>Monócitos (%)</i>	7,75 ± 0,94	8,00 ± 0,40	7,85 ± 1,55
<i>Eosinófilos (%)</i>	5,50 ± 0,86	8,75 ± 2,28	6,75 ± 2,25
<i>Basófilos (%)</i>	2,00 ± 1,08	1,60 ± 0,24	2,48 ± 0,98
<i>Total de eritrócitos (milhões/mm³)</i>	7,54 ± 0,01	7,74 ± 0,13	7,35 ± 0,14
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	15,08 ± 0,16	16,06 ± 0,25	15,50 ± 0,14
<i>Hematócrito (%)</i>	40,73 ± 0,40	42,81 ± 0,61	41,30 ± 0,69
<i>VCM (fL)</i>	54,25 ± 0,47	55,40 ± 0,81	56,00 ± 0,37
<i>HCM (ng)</i>	19,95 ± 0,22	20,74 ± 0,37	22,30 ± 1,31
<i>CHCM (g/dL)</i>	36,78 ± 0,21	37,48 ± 0,28	36,86 ± 0,30
<i>RDW (%)</i>	11,85 ± 0,29	11,64 ± 0,18	11,57 ± 0,13
<i>Total de plaquetas (x 1000/μL)</i>	884,50 ± 34,50	868,50 ± 24,72	865,30 ± 30,88

Quantidade de metais na carne de peixe

A análise das amostras de carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira evidenciaram quantidade média cinco vezes maior de Al^{+3} e de Zn^{+2} que foram estatisticamente significativas. A elevação de Cr^{+6} e de Cd^{+2} na carne do rio Cachoeira em relação a do peixe de cultivo não atingiram significância estatística, porém não é improvável que possam ter contribuído para toxicidade em face da exposição cumulativa ou por entrarem em sinergismo com Al^{+3} e Zn^{+2} . Não houve diferença significativa de quantidade de Ni^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} e Hg^{+2} entre as amostras (tabela 5).

Tabela 5. Mensuração da quantidade de metais na carne de peixe de cultivo e do Cachoeira

	<i>Branco</i>	<i>Peixe de cultivo</i>	<i>Peixe do Cachoeira</i>
Al^{+3} (ppm)	16,600 $\pm$ 0,008	10,580 $\pm$ 0,073	56,520 $\pm$ 0,018*
Cr^{+6} (ppm)	0	1,170 $\pm$ 0,029	4,35 $\pm$ 0,007
Zn^{+2} (ppm)	0,155 $\pm$ 0,006	59,700 $\pm$ 0,002	381,900 $\pm$ 0,003***
Ni^{+2} (ppm)	0	0	0
Pb^{+2} (ppm)	0	0	0
Cu^{+2} (ppm)	0,014 $\pm$ 0,028	2,940 $\pm$ 0,006	3,720 $\pm$ 0,019
Cd^{+2} (ppm)	0	0	0,930 $\pm$ 0,056
Hg^{+2} (ppm)	0	0	0

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,05$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Parâmetros de estresse oxidativo

No presente estudo, observou-se aumento significativo do estresse oxidativo e queda relevante da atividade das enzimas antioxidantes de modo crescente no cerebelo no período de 3 para 6 meses. No córtex cerebral, houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes aos 3 e 6 meses, porém os parâmetros de estresse oxidativo elevaram apenas após 6 meses de exposição.

A continuidade da exposição e consequente toxicidade cumulativa provocou aumento significativo de estresse oxidativo no baço e elevação da atividade da GSH-Px apenas após 6 meses de exposição. O coração foi significativamente atingido, apresentando aumento significativo de estresse oxidativo aos 3 e 6 meses e queda da atividade apenas da CAT. Porém, após 6 meses, o estresse oxidativo manteve-se e a atividade das três enzimas antioxidantes mostrou-se significativamente diminuída, novamente apontando para intensificação do estresse oxidativo conforme a exposição foi mais longa.

O fígado foi o órgão mais atingido, de modo que o estresse oxidativo foi intensificado entre o período de 3 para 6 meses e, apesar de ter ocorrido aumento da atividade da CAT inicialmente, após 6 meses de exposição, as enzimas SOD e GSH-Px sofreram redução significativa de atividade. Nos rins, a peroxidação lipídica aumentou significativamente, porém aos 3 meses de exposição houve de modo concomitante a queda da atividade da CAT e da GSH-

Px. Contudo, aos 6 meses, apesar da manutenção da peroxidação lipídica, ocorreu aumento da atividade da CAT e da SOD.

No plasma, o estresse oxidativo esteve significativamente aumentado aos 3 meses, porém passou por intensificação aos 6 meses de exposição. Nos eritrócitos, houve apenas aumento da atividade da GSH-Px aos 3 meses, mas que passou a abranger as três enzimas antioxidantes após 6 meses de exposição. O Al^{+3} pode acumular em todos os tecidos dos animais, preferencialmente nos rins, fígado, coração, ossos e cérebro. A ligação do Al^{+3} aos eritrócitos apresenta-se muito mais forte do que às proteínas séricas (CHENG *et al.*, 2017) e a contribuição desse metal para o estresse oxidativo pode ter motivado o acréscimo da atividade da CAT após 3 meses de exposição e também da SOD e da GSH-Px aos 6 meses, no sentido de limitar o dano oxidativo sobre os eritrócitos, devido a formação excessiva de EROs como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, o qual não possui enzima antioxidante para sua remoção.

O Al^{+3} pode alterar significativamente o estresse oxidativo, por meio de aumento da peroxidação lipídica (particularmente cerebral), reduzir a atividade da Mn-SOD mitocondrial e causar disfunções desta (ALI *et al.*, 2014; GHORBEL *et al.*, 2016; KUMAR, 2014). Rahimzade *et al.* (2022) também apontam a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, da síntese de proteínas, alterações da funcionalidade de ácidos nucleicos, alterações da homeostase celular do ferro e da permeabilidade da membrana, aumento da produção de EROs e até apoptose celular desencadeada por excesso de Al^{+3} .

Ratos Wistar machos com três meses de idade foram divididos em dois grupos de exposição no estudo de Martinez *et al.* (2016) para receber Al^{+3} em níveis dietéticos para seres humanos: baixo nível de alumínio (1,5mg/Kg e 8,3mg/Kg, via oral) durante 60 dias e alto nível (100 mg/Kg, via oral) por 42 dias. Água potável ultrapura foi ofertada como controle. Todas as doses de Al^{+3} promoveram prejuízo de memória, aumentaram EROs e a peroxidação lipídica e baixaram a capacidade antioxidante no hipocampo. Apesar de ter sido realizada exposição com doses diferentes e por menor prazo do que no presente trabalho, esses achados são convergentes particularmente para o cerebelo, no qual houve queda da atividade das três enzimas antioxidantes avaliadas, aumento de TBA-RS e queda de SH, ilustrando a neurotoxicidade do Al^{+3} .

No estudo de Novaes *et al.* (2018), grupos de ratos Wistar machos com 70 dias de idade foram randomizados para receber água destilada, 0,02, 0,1, 50 e 200 mg/kg de solução de alumínio por gavagem por 120 dias. Essa exposição causou bioacumulação dose-dependente no coração dos animais, desequilíbrio micromineral, oxidação do DNA genômico, anormalidades estruturais do tecido cardíaco, de modo que os animais tratados com as três doses mais altas de Al^{+3} apresentaram toxicidade mais intensa. Esses dados convergem com os achados do presente estudo, porém ressalta-se que no presente estudo, a exposição foi da carne de peixe cozida e não intencionalmente tóxica, posto que partiu da recomendação de consumo de peixe dieteticamente adequada.

No estudo de ReddY *et al.* (2015), ratas com idades entre 8 e 10 semanas, receberam água de rio contaminado por 28 dias e foi encontrado acúmulo de metais nos órgãos e presença da peroxidação lipídica mais intensa no fígado, rim e cérebro de ratos. Apesar da forma e prazo de exposição serem diferentes do presente estudo, corroboram com o padrão de aumento de estresse oxidativo encontrado aos 3 e 6 meses, que, ou manteve-se na mesma intensidade ou aumentou ou disseminou para cada vez mais órgãos.

Veiga *et al.* (2014) avaliaram o efeito da administração de 0,12 mg/Kg/dia de AlCl_3 por via intraperitoneal por 10 dias em ratos recém-nascidos. Ratos com 2 e 4 meses de idade receberam dose de 24,8 mg/kg/dia pela mesma via e período. Observou-se acúmulo significativo de Al^{+3} no fígado e na musculatura nos animais que receberam a menor dose e foram os que mais acumularam o metal, porém o conteúdo tecidual decresceu em torno de 50% após 40 dias. Nos animais mais velhos tratados com a dose maior, todos os tecidos analisados (coração, rim, hipocampo, córtex cerebral) acumularam Al^{+3} , porém o conteúdo tecidual permaneceu constante ou aumentou. Isso tem implicações no que refere à bioacumulação do metal, que tendeu a ser menos eliminado conforme a idade. Apesar das diferenças de via de exposição, dose e tempo, esses dados vão ao encontro do presente estudo porque refletem que a longevidade da exposição está relacionada com maior acúmulo e interferência do Al^{+3} sobre as funções de diferentes sistemas.

A toxicidade atingiu nível de expressão gênica, havendo queda da expressão do fator de transcrição mitocondrial hepático A e de seu regulador, o coativador 1 α acionado por proliferadores de peroxissomas (regulador principal da biogênese mitocondrial). Essa toxicidade deu-se tanto para a administração isolada das nanopartículas de cada metal e foi mais intensa quando da exposição a ambos. Padrões similares de fragmentação do DNA foi

encontrada para as nanopartículas, além de elevação de marcadores de inflamação, como o fator de necrose tumoral- α . A nanoparticulação possui potencial para maior amplitude de penetração intracelular dos metais associados, aumentando significativamente a exposição a eles.

No estudo de Piavchenko et al. (2020), verificou-se o efeito cumulativo do zinco na administração intragástrica de dose única de 100 mg/kg de succinato de Zn^{+2} na estrutura e função de órgãos e tecidos em ratos de um mês de idade. Após o tratamento, foram encontradas alterações tóxicas e distróficas no córtex cerebral, coração (fragmentação de cardiomiócitos, edema intersticial), pulmões (bronquite crônica, pneumonia intersticial focal, áreas enfisematosas) e fígado (necrose focal, infiltração periportal linfo-histiocitária).

Zn^{+2} é armazenado no meio intracelular por metalotioneínas, que se ligam em até sete íons de Zn^{+2} em suas cadeias laterais de tiol e a liberação do Zn^{+2} das metalotioneínas por oxidantes eleva seu nível intracelular e conduz à disfunção mitocondrial e geração de EROs, como o ânion superóxido, por inibir a cadeia de transporte de elétrons, reduzindo o potencial de membrana mitocondrial, o que aumenta a produção de EROs. Porém, o Zn^{+2} em nível intracelular elevado também pode mediar a produção de EROs por formação de peroxinitrito e de ânion superóxido a partir da enzima 12-lipoxigenase (McCord, Aizenman, 2014). O Zn^{+2} também pode ativar a proteína quinase C, que recruta a NADPH oxidase-1 e a óxido nítrico sintase, resultando em geração de óxido nítrico, peroxinitrito e ânion superóxido (O_2^-) (Lee, 2014). Esses mecanismos ilustram o potencial pró-oxidante desse metal quando em excesso. Ainda, a atividade da SOD pode ser reduzida quando do excesso de Zn^{+2} , que pode causar deficiência de Cu^{+2} , sendo que a SOD utiliza ambos como cofatores (Hübner, Haase, 2021).

Hachisuka et al. (2014) alimentaram ratos de 5 semanas de idade por 6 semanas com uma dieta contendo 0,005% e 0,2% (peso/peso) de ZnCO_3 e observaram aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos, além de anemia microcítica hipocrômica, queda da atividade da SOD e aumento de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (marcador de estresse oxidativo) no grupo que recebeu a maior dose. Os autores atribuíram as alterações à queda da disponibilidade de ferro devido à sobrecarga de Zn^{+2} .

A exposição de ratos a dieta com 20, 40 e 80 mg/Kg de ZnSO_4 por 6 meses resultou em aumento de TBA-RS, da atividade das enzimas CAT, SOD e GSH-Px, para as duas maiores doses, evidenciando o potencial pró-oxidante do Zn^{+2} (Singh, 2012). Os autores consideram

que as doses maiores de Zn^{+2} puderam baixar a disponibilidade de Cu^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} no fígado e nos rins dos animais, aventando a hipótese de que o excesso de Zn^{+2} possa modificar os parâmetros estudados por diminuir o nível de outros metais.

Os mecanismos descritos para o envolvimento de Al^{+3} e Zn^{+2} na produção de EROs e modulação da função das enzimas antioxidantes convergem para que o excesso destes resultem em maior propensão a dano celular por estresse oxidativo, devido intensificação do dano proteico e lipoperoxidação, que em longo prazo, causam alterações estruturais e funcionais relevantes.

Parâmetros bioquímicos

Mekkey (2021) observou que a exposição a AlCl_3 (80, 160, 240 mg/kg/dia, via oral) por 45 dias resultou em queda do nível sanguíneo de T4 nas doses maiores e que houve degeneração das células epiteliais que envolvem os folículos tireoidianos e infiltração inflamatória no interior dos folículos atribuída ao aumento de estresse oxidativo, o que possivelmente prejudicou a produção de T4. Esse mecanismo poderia guardar relação com a redução de T4 observada após 3 meses de consumo da carne de peixe do rio poluído.

Contudo, de acordo com Igbokwe, Igwenagu e Igbokwe (2019), a secreção de hormônios tireoidianos pode aumentar quando íons de Al^{+3} são estimulatórios para a glândula ou porque os órgãos alvo estão menos sensíveis ao hormônio por depleção da expressão de receptores nas membranas celulares. O aumento de T4L que foi observado após 6 meses de consumo de carne de peixe do rio Cachoeira pode guardar relação com o mecanismo descrito, enquanto o aumento de T4L nos animais que consumiram carne de peixe de cultivo pode ser atribuído aos altos níveis de iodo que contribuíram para maior síntese de T4.

O Zn^{+2} possui papel chave no metabolismo de hormônios tireoidianos: regulando a atividade das enzimas deiodinases, síntese dos hormônios tireoestimulante e liberador de tireotrofina, assim como modula a estrutura de fatores de transcrição envolvidos na síntese dos hormônios tireoidianos. Transportadores específicos para Zn^{+2} estão presentes no hipotálamo, na hipófise e tireoide, porém suas funções são pouco esclarecidas (SEVERO *et al.*, 2019). Logo, o Zn^{+2} pode afetar diretamente a síntese de hormônios tireoidianos, de modo que sua deficiência foi associada com atrofia e degeneração tireoidiana, além desse metal poder prevenir estresse oxidativo sobre a glândula. Zn^{+2} também é necessário para a atividade dos receptores para hormônios tireoidianos (principalmente do T3) e pode afetar o nível sanguíneo de T4 por

aumentar a produção de sua proteína ligadora plasmática (BALTACI, MOGULKOC, BALTACI, 2019). Dada a participação disseminada na regulação da síntese, secreção e transdução de sinal dos hormônios tireoidianos pelo Zn^{+2} , possivelmente a exposição excessiva tem potencial para estimular a produção de mais hormônios tireoidianos e, conforme o aumento desses hormônios retroalimenta negativamente a secreção hipotalâmica e hipofisária dos hormônios que estimulam a função tireoidiana, resultar em menor produção de T3 e T4. O estudo de Sakr e Steenkamp (2021) corrobora com o potencial do Zn^{+2} em excesso reduzir o nível sanguíneo de T3, T4 e de hormônio tireoestimulante em ratos, mas em condição de exposição a nanopartículas de ZnO (200 mg/Kg, via oral, por 30 dias), que permitem maior acúmulo do que a exposição realizada a partir do consumo de carne de peixe.

A elevação das transaminases tem relação com necrose dos hepatócitos e consequente liberação das enzimas hepáticas para o sangue, constituindo marcador importante de hepatotoxicidade clinicamente importante (ABDOU, HASSAN, 2014). Esse resultado é convergente com o aumento de estresse oxidativo hepático descrito anteriormente e com a queda da atividade das enzimas antioxidantes, que deixaram o órgão mais indefeso a ponto da toxicidade atingir relevância clínica.

A toxicidade do Al^{+3} sobre o fígado é bem conhecida, de modo que o estresse oxidativo provocado por $AlCl_3$ (100 mg/Kg, via oral, uma vez por dia por 7 dias) é utilizado até mesmo como modelo de estudo de substâncias que previnam hepatotoxicidade, posto que resulta em elevação de TGO, TGP, bilirrubina e de TBA-RS, passíveis de redução por compostos em teste (YAKUBU, 2016). Zakaria *et al.* (2020) utilizaram 34 mg/Kg por dia de $AlCl_3$ da sétima à décima oitava semana de vida de ratos e observaram aumento das transaminases hepáticas, de bilirrubina, do tempo de protrombina e queda do nível sanguíneo de albumina. Estresse oxidativo, perturbação do sistema redox intracelular e peroxidação lipídica foram reconhecidamente arrolados como mecanismos principais da toxicidade hepática atingida.

Apesar dos estudos anteriores convergirem no sentido de encontrar hepatotoxicidade relevante, as doses utilizadas de Al^{+3} eram intencionalmente altas, enquanto que, no presente estudo, a toxicidade hepática observada aos 6 meses é proveniente da exposição ao conteúdo de metais pesados da carne de peixe do rio poluído por meio de ingestão de quantidade nutricionalmente recomendada. Dado o papel protetor sobre o estresse oxidativo do Zn^{+2} em estudos que utilizaram doses terapêuticas, esse metal reduziu a hepatotoxicidade causada, por

exemplo, por Cd^{+2} , CCl_4 , etanol (KOUADRIA, DJEMLI, TAHRAOUI, 2020; AFTAB, 2016; ZHONG et al., 2013).

A queda de TGO hepática observada após 3 meses de exposição associada com o aumento de estresse oxidativo e queda de atividade de enzimas antioxidantes aponta para toxicidade hepática, porém a TGO também está presente em outros tecidos, como rins, coração e músculo, sendo sua alteração isolada menos específica do que a elevação de TGP (ABDOU, HASSAN, 2014).

A elevação de ureia atingiu significância clínica após seis meses de exposição à carne do rio poluído, porém não houve mudança no nível sanguíneo de creatinina. São biomarcadores de avaliação da função renal, a concentração de creatinina sérica e a ureia. A creatinina é um produto de degradação das células musculares e representa um indicador da eficiência da filtração glomerular (TONOMURA, MATSUBARA, KAZAMA, 2015). A ureia é produto de metabolismo do nitrogênio e, embora seja livremente filtrada pelos glomérulos e não secretada ou reabsorvida, trata-se de um preditor fraco da taxa de filtração glomerular porque de 40 a 70% retornam ao plasma por difusão passiva, logo, estase urinária leva a retorno ainda maior da ureia presente nos túbulos renais, de modo que a taxa de filtração fica superestimada a partir da depuração de ureia (BAZZANO *et al.*, 2015).

A exposição de ratos a AlCl_3 pode causar nefrotoxicidade relevante (20 mg/Kg, via oral, uma vez ao dia por 40 dias), marcada por elevação significativa de ureia, creatinina e de TBA-RS, além de queda do volume urinário e da atividade da SOD e da GSH-Px (Al DERA, 2016). Contudo, no presente estudo, a elevação isolada de ureia associada ao dano oxidativo ainda não permite inferir nefrotoxicidade clinicamente relevante.

Após 3 meses de consumo de carne do rio poluído, houve queda significativa de HDL-C e aumento de TG e VLDL, caracterizando dislipidemia e maior risco para aterosclerose nos animais. John et al. (2014) observaram que a administração crônica de AlCl_3 por 60 dias em ratos (175 mg/Kg, via oral) de 3 meses de idade causou redução significativa da concentração sérica de HDL-C, ao mesmo tempo que aumentou TG e LDL-C, e essas mudanças foram atribuídas ao fato do Al^{+3} , além de causar dano celular por aumento de estresse oxidativo, pode reduzir a síntese de RNA e DNA, posto que tem alta afinidade por grupos negativamente carregados, o que permite sua interação com grupos fosfato dos ácidos nucleicos e proteínas fosforiladas.

Okail, Ibrahim e Badr (2020) administraram AlCl_3 (40 mg/Kg, via oral) em ratos de um mês de idade por dois meses e observaram elevação significativa de TGO, TGP, colesterol total e TG, além de vacuolização severa com aumento de infiltração inflamatória e necrose dos hepatócitos. Foi atribuído aumento de colesterol total e TG à perda de integridade da membrana dos hepatócitos e à queda de atividade da lipase lipoproteica, que catalisa a hidrólise de TG da VLDL.

Dass e Ramoji (2017) também encontraram alterações significativas no lipidograma de ratos de 2 meses de idade que receberam dose única de AlCl_3 por via oral (100 mg/Kg), havendo elevação de LDL-C e TG, que pode estar relacionada com dano oxidativo de biomoléculas e a distrofia lipídica, conforme a intensidade, pode ser ou não lipotóxica e patogênica ou contribuir para a progressão de várias outras doenças. Percebe-se que o Al^{+3} pode alterar o lipidograma por meio de sua hepatotoxicidade em diferentes quantidades e prazos de exposição.

Zn^{+2} é um dos micronutrientes mais metabolicamente ativos no sistema endócrino, sendo necessário para o controle da glicemia e do metabolismo de lipídios. Assim, sua suplementação (5-10 mg/Kg) tende a corrigir o lipidograma em situação de deficiência ou de patologias, como diabetes (RYADINENCY, HADISAPUTRO, RACHMAWATI, 2018). Zn^{+2} e os fatores de transcrição regulados por ele modulam as vias metabólicas de lipídios e glicose, logo a deficiência ou o excesso deste pode perturbar o metabolismo de lipídios. Essas interações entre Zn^{+2} , leptina e metabolismo de ácidos graxos são complexas e envolvem vários transportadores desse íon e vias de sinalização intracelulares, por isso os estudos são conflitantes em termos de resultados acerca da deficiência e do excesso de Zn^{+2} sobre o lipidograma (KOSTARA *et al.*, 2018). Inclusive, estudos em seres humanos sugeriram que a suplementação de Zn^{+2} tende a reduzir o colesterol total, LDL-C e TG e aumentar HDL-C no sangue, porém, esses resultados são contraditos por outros estudos de acordo com a metanálise de Ranasinghe *et al.* (2015).

Porém, no presente estudo, é importante ressaltar que os animais estavam expostos tanto a excesso de Zn^{+2} como de Al^{+3} , de modo que o último possui potencial hepatotóxico suficiente para causar alteração clinicamente relevante da função hepática e da síntese de lipoproteínas, conforme descrito anteriormente.

Após 6 meses, foi encontrado aumento de TG no sangue dos animais que consumiram carne de peixe do rio Cachoeira, inclusive maior do que após 3 meses. Porém, também foi

encontrada elevação de TG no sangue de animais que consumiram peixe de cultivo. É possível que essa alteração guarde relação com o fato de que TG circulantes, estão presentes nos quilomícrons e VLDL, sendo os primeiros liberados após a alimentação e os segundos, em estado de jejum (VIKOREN *et al.*, 2017). Como as coletas foram realizadas 24 horas após a última exposição, os TG estariam mais incorporados às partículas de VLDL-C, refletindo maior secreção de TG pelo fígado. Menor depuração de quilomícrons também poderia explicar o aumento de TG encontrado nos animais que consumiram a carne de peixe de cultivo. Portanto o aumento do VLDL e TG com a diminuição do HDL, podem desencadear problemas relacionados ao sistema cardiovascular.

Mensuração da quantidade de metais

Al^{+3} e Zn^{+2} foram os metais aumentados significativamente na carne de peixe do rio Cachoeira em relação ao peixe de cultivo e, conforme os mecanismos descritos, podem ser responsáveis pela toxicidade encontrada em vários sítios dos ratos que consumiram a carne de peixe, isto é, os metais podem ser transferidos ao longo da cadeia alimentar.

A exposição crônica a metais pode contribuir para o desenvolvimento de condições patológicas, tais como: câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, aterosclerose, distúrbios neurológicos, inflamação crônica. Parte da fisiopatologia dessas doenças pode ser atribuída ao aumento de estresse oxidativo e redução da atividade das enzimas antioxidantes, que instalam um desequilíbrio que favorece o dano celular que, conforme intensidade e prazo de duração da exposição aos estressores, pode causar toxicidade em nível clínico (MARKIEWICZGÓRKA *et al.*, 2015; LAN *et al.*, 2016).

A toxicidade dos metais pode ocorrer quando ele está associado a outros elementos ou quando o nível de sua concentração está elevado (SANTOS, 2013). Os metais, quando no ambiente aquático, espalham-se por toda a água e podem se acumular em sedimentos ou consumidos pela biota e por não serem biodegradáveis, tornando-se indicadores de poluição aquática (MAKEDONSKI *et al.*, 2017).

O Al^{+3} é o elemento metálico mais abundante na natureza, é largamente utilizado na sociedade: da confecção de utensílios domésticos até construção civil e transporte; na saúde como adjuvante na confecção de vacinas e aditivos alimentares, medicamentos, como antiácidos, e cosméticos. Al^{+3} pode ser absorvido por via respiratória, cutânea ou enteral e a

exposição crônica pode permitir acúmulo que resulte em problema de saúde pública devido à sua neurotoxicidade, que pode levar a danos semelhantes aos da doença de Alzheimer e diminuição das funções de aprendizado e memória (CHANTING *et al.*, 2021; GOULLÉ e GRANGEOT-KEROS, 2020; KLOTZ *et al.*, 2017; CLARKSON, 2020).

O Al^{+3} também foi associado a esclerose múltipla e transtorno do espectro autista devido à neurotoxicidade mediada por sua capacidade pró-oxidante, pró-inflamatória, pró-apoptótica, interferindo no metabolismo de neurotransmissores e neuronal e na manutenção do citoesqueleto (TINKOV *et al.*; KLEIN, 2019; EXELEY e CLARKSON, 2020). Patologias ósseas e câncer de mama também foram associadas com exposição excessiva ao Al^{+3} (TINKOV *et al.*; KLEIN, 2019; EXELEY e CLARKSON, 2020).

Quando as pessoas são expostas a altos níveis de Al^{+3} ele não é excretado de modo proporcional à sua concentração no sangue, o que favorece seu acúmulo e consequente aumento de estresse oxidativo no cérebro, fígado e rim, além de perturbar a função de várias enzimas e alterar a síntese proteica (JAISHANKAR, 2014). No estudo de Mirza *et al.* (2017), foi observada a presença de Al^{+3} significativamente elevada tanto intra como extracelularmente em tecido cerebral no entorno de neurônios mortos ou degenerados de doze doadores diagnosticados com doença de Alzheimer familiar, sendo sugerida a relação do acúmulo deste metal com o desencadeamento dessa doença.

A bioacumulação de Zn^{+2} nos peixes é uma ferramenta importante para avaliação da poluição ambiental: Labarrère *et al.* (2012) verificaram que, de 68 peixes capturados (*Hoplias* sp., *Hypostomus* sp., *Piaractus* sp., *Pimelodus* sp. e *Prochilodus* sp.) em cinco pontos diferentes do rio São Francisco, 28 apresentaram concentração de Zn superior a 50 mg/kg (concentração máxima permitida pela legislação brasileira).

Segundo JAROSZ *et al.* (2017), o Zn^{+2} tem papel importante no metabolismo sendo terapêutico para o organismo humano, quando consumido em quantidade adequada. Ferreira *et al.* (2020) trazem a recomendação de ingestão aceitável de 8mg/dia para mulheres e de 11mg/dia para homens e os peixes são excelente fonte deste mineral. O Zn^{+2} é essencial para o funcionamento de centenas de proteínas, aumenta a defesa antioxidante e a imunidade (JAROSZ *et al.*, 2017). Entretanto, a exposição excessiva e prolongada pode gerar efeitos tóxicos, especialmente nos sistemas digestivo, respiratório, nervoso e causar câncer (RAHIMZADEH *et al.*, 2020).

A exposição crônica de mamíferos a sais de Zn^{+2} pode induzir efeitos tóxicos praticamente em todos os tecidos, especialmente no sistema nervoso central, imunológico e deficiência de outros compostos, como ferro e Cu^{+2} (ISTRATE *et al.*, 2016; SAFONOVA *et al.*, 2015). Processos industriais, poeira tecnogênica, mineração são atividades antropogênicas que permitem que o Zn^{+2} acumule na água, no solo e nas plantas. Assim, nas áreas de produção, o conteúdo de Zn^{+2} excede os níveis aceitáveis e acumula nos organismos ao longo da cadeia alimentar (SENSI *et al.*, 2011).

Assim, além de estarem presentes em quantidades maiores na carne de peixe do rio Cachoeira, os metais presentes ainda foram transferidos para o organismo dos ratos em quantidade suficiente para alterar o estresse oxidativo e os parâmetros bioquímicos descritos.

Conclusão

O consumo de carne de peixe cozida do rio Cachoeira por 3 meses aumentou significativamente o estresse oxidativo no cerebelo, coração, fígado, rim e plasma, diminuiu a atividade de enzimas antioxidantes no cerebelo, coração e rim e aumentou a atividade das enzimas no córtex cerebral, fígado e eritrócitos. Também causou queda significativa sanguínea de T4L, TGO e HDL-C.

Após o consumo de carne de peixe do rio Cachoeira por 6 meses, foi observado aumento de estresse oxidativo significativo no baço, cerebelo, córtex cerebral, coração, fígado, rim e plasma, evidenciando maior disseminação e toxicidade cumulativa. Houve decréscimo relevante da atividade de enzimas antioxidantes no coração e cerebelo, enquanto que no baço, córtex cerebral, fígado e eritrócitos foi observado aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Também ocorreu aumento significativo do nível sanguíneo de T4L, TGP, ureia e TG.

Essas alterações podem estar associadas à presença significativamente maior de Al^{+3} e Zn^{+2} na carne de peixe do rio Cachoeira. Esses dados ressaltam a preocupação com a saúde pública e a necessidade dos órgãos públicos exercerem maior controle sobre a pesca neste rio, por meio de orientações e medidas de controle, além de buscar melhorar a qualidade destas águas, no sentido de recuperar a biota característica e natural do rio.

REFERÊNCIAS

1. AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 1984.105 (13), 121-126, 984
2. AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, v. 302, p. 141-145, 2001.
3. ABDOLU, H. M.; HASSAN, M. A. Protective role of omega-3 polyunsaturated fatty acid against lead acetate-induced toxicity in liver and kidney of female rats. *Biomed Research International*, v. 2014, p. 1-11, 2014. Doi:10.1155/2014/435857
4. AFTAB, K. Hepatoprotective Role of Zinc Sulphate in Carbon Tetrachloride Induced Liver Toxicity. *J of Pharmacol & Clin Res.* 2016; 1(3): 555562. DOI: 10.19080/JPCR.2016.01.555562.
5. AMATO, A; TERZO, S; MULÈ, F. Natural compounds a beneficial antioxidant agents in neurodegenerative disorders: a focus on alzheimer's disease. *Antioxidantes*. 2019.
6. AMARAL, M. T. et al. Aplicação de tecnologias tradicionais no beneficiamento do pescado na região do Baixo Amazonas, Estado do Pará. *Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias*, v. 7, n. 1, p.3708–3721, 2017.
7. ALI H.; AFIFI M; ABDELAZIM AM; MOSLEH YY. Quercetin and omega 3 improve aluminum chloride-induced oxidative stress in the brain. *J. Mol. Neurosci*, 53 (4): 654-660. 2014.
8. ANVISA. Contaminantes são agentes biológicos, físicos ou químicos que são introduzidos no alimento de forma não intencional e que podem trazer danos à saúde da população. Ministério da Saúde, 2004. Disponível em : <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/contaminantes>. Acessado 15 fev. 2021.
9. ANVISA. RESOLUÇÃO-RDC Nº 259, DE 20 DE SETEMBRO DE 2002. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0259_20_09_2002.html. Acessado 15 fev. de 2021.
10. BALTACI, A. K.; MOGULKOC, R.; BALTACI, S. B. The role of zinc in the endocrine system. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.32, No.1, January 2019, pp.231-239.
11. BAZZANO, T.; RESTEL, T. I.; PORFIRIO, L. C.; SOUZA, A. S.; SILVA, I. S. Renal biomarkers of male and female WISTAR rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 30, n. 4, p. 277-288, 2015.

12. BENVENUTI, M. A., FISCHER, L.G. Peixe: morfologia e adaptações caderno de Ecologia Aquática. Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia 2010. Cadernos de Ecologia Aquática 5 (2):31-54, 2010.
13. CASTRO, P.L. et al. Effect of different periods of pre-slaughter stress on the quality of the Nile tilapia meat. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.37, p.52-58, 2017.
14. CHAHID, A., HILALI, M., BENLHACHIMI, A., & BOUZID, T.). Contents of cadmium, mercury and lead in fish from the Atlantic sea (Morocco) determined by atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, v. 147, p. 357-360, 2014.
15. CRIBB, A. Y.; FILHO. J. T. de S.; MELLO, S. C. R. P. Manual técnico de manipulação e conservação de pescado, editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2018. 119 p.
16. BRASIL, EMBRAPA. Boas práticas de manipulação para Entrepostos de pescados Embrapa Brasília, DF. 2013.
17. BRASIL.Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária: RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018.
18. CHANTING, H.; XIAOYAN, Z.; YANG, L.; JISHENG, N.; XIAOTING, L.; JING, S.; LINPING, W.; HUAN, L.; FANGQU, L.; YIDAN,Z.; QIAO.N. Whole-transcriptome analysis of aluminum-exposed rat hippocampus and identification of ceRNA networks to investigate neurotoxicity of Al. *Molecular Therapy*. Vol. 26, 2021, p 1401-1417.
19. CHENG, D.; ZHANG, X.; X., L.; LI, X.; HOU, L.; WANG, C. Protective and prophylactic effects of chlorogenic acid on aluminum-induced acute hepatotoxicity and hematotoxicity in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 273(), 125–132, 2017.
20. EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mercado daTilápia – 2º trimestre de 2016. Palmas: Embrapa, 2016. (Informativo Mercado da Tilápia, n. 8). Disponível em: <https://www.embrapa.br/pesca-e-aquicultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1051014/o-mercado-da-tilapia---2-trimestre-de-2016>.
21. EXLEY C, CLARKSON E. Aluminium in human brain tissue from donors without neurodegenerative disease: a comparison with Alzheimer’s disease, multiple sclerosis and autism. *Sci. 2020 Rep* 10 (1), 1-7.
22. FERRON, M. M., KUNO, R., CAMPOS, A. E. M. D., CASTRO, F. J. V. D., & GOUVEIA, N. (Cadmium, lead and mercury in the blood of workers from recyclingsorting facilities in São Paulo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2020, 36, e00072119.

23. FOOD INGREDIENTS BRASIL. Proteínas do peixe propriedades funcionais das proteínas do peixe. Nº 8 – 2009. Disponível em: https://revista-fi.com/upload_arquivos/201606/2016060768481001465581251.pdf. Acessado 12 jan 2019.
24. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO-UN). The Right to Adequate Food. Human Rights. Fact Sheet Nº 34. Office of the United Nations High Commissioner for Human Rights New York: FAO-UN; 2010.
25. FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, YEARBOOK. Fishery and Aquaculture Statistics Food balance sheets, annuaire. 2016. Rome/Roma. 104p
26. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION –FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 -Meeting the sustainable development goals. Rome:Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.
27. GOULLÉ JP, GRANGEOT-KEROS L. Aluminum and vaccines: current state of knowledge. *Med. Mal. Infectar*, 2020, 50 (1), 16–21.
28. GHORBEL I, A., KTARI N, E.; BOUDAWARA O, BOUDAWARA T, ZEGHAL N. Aluminum and acrylamide disrupt cerebellar redox states, cholinergic function, and membrane-bound ATPase in adult rats and their offspring . *Biol. Trace Elem*. 2016. Res 174 (2), 335-346.
29. HACHISUKA E, TAKAMASA KIDO, MACHI SUKA, HIROYUKI YANAGISAWA. Ingestion of Excess Zinc Augments the Osmotic Fragility of Red Blood Cells via An Increase in Oxidative Stress 2021 Volume 31 Issue 3 Pages 117-125 <https://doi.org/10.11299/brte.31.117>.
30. HÜBNER, C, HAASE, H. Interactions of zinc and redox-signaling pathways. *Redox Biology*, v. 41, p, 1-13, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101916>.
31. IGBOKWE I.O; IGWENAGU E; IGBOKWE N.A; Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. 2019 Oct;12(2):45-70. doi: 10.2478/intox-2019-0007
32. ISTRATE A.N., KOZIN S.A., ZHOKHOV S.S., MANTSYZOV A.B., KECHKO O.I., PASTORE A., Makarov A.A., Polshakov V.I. Interplay of histidine residues of the Alzheimer's disease A β peptide governs its Zn-induced oligomerization. *SCI. Rep*. 2016

33. JAISHANKAR M., TSETEN T., ANBALAGAN N., MATHEW B. B., BEEREGOWDA K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. 2014;7(2):60–72.
34. JAROSZ, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology*, v. 25, n. 1, p. 11-24, 2017.
35. KLOTZ K, WEISTENHÖFER W, NEFF F, HARTWIG A; VAN.; T. C, DREXLER H, 2017. The health effects of aluminum exposure. *Dtsch. Arztebl.* 2017, Int 114 (39), 653.
36. KOSTARA, C. E., LEKKAS, P., VEZYRAKI, P., ANGELIDIS, C., DELIGIANNIS, I.-K., BAIRAKTARI, E. T., & KALFAKAKOU, V. (2018). Lipidome of plasma lipoproteins and liver is zinc- modulated in High fat diet treated mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 268–275. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.07.007.
37. KOUADRIA, M.; DJEMLI, S.; TAHRAOUI, A. Hepatoprotective effect of zinc and magnesium against subchronic cadmium toxicity on biochemical, histopathological and neurobehavioral parameters in wistar rats. *Anim Behav Biometeorol*, vol.8, n1, p.63-73, 2020. <http://dx.doi.org/10.31893/jabb.20009J>
38. KUMAR V, G. KD. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminum neurotoxicity and its improvement: a review. *Neurotoxicology*, v. 41, p. 154-166. 2014.
39. LAN, A. P. et al. The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. *Biometals*, v. 29, n. 4, p. 665-78, 2016.
40. LABARRÈRE C R; MENEZES B D; MELO M M. Avaliação dos teores de zinco em brânquias, carcaça, fígado e musculatura de diferentes espécies de peixes capturados no rio São Francisco, MG. *Geonomos*, 20(1), 86-91, 2012.
41. LASSALE, C; BATTY, G. D.; BAGHDAGLI, A.; JACKA, F.; SÁNCHEZ-VILEGAS, A.; KIVIMAKI, M.; AKBARALY, T. Healthy dietary indices and risk of depressive outcomes: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Mol Psychiatry*. 2019; 24(7):965–986.
42. LIMA, D. P. Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do Rio Cassiporé. *Estdo do Amapá, Amazônia, Brasil, Amazonas*, 147.p 2013.
43. LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biological Chemistry*, n. 193, 265–275, 1951.
44. MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton. CRC Press. 1985.

45. MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton. CRC Press. 1985
46. MCCORD MEGHAN C., Aizenman Elias. The role of intracellular zinc release in aging, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 6, p. 1-16, 2014. DOI=10.3389/fnagi.2014.00077.
47. MARKIEWICZ-GÓRKA, I. et al. Effects of chronic exposure to lead, cadmium, and manganese mixtures on oxidative stress in rat liver and heart. *Arh Hig Rada Toksikol*, v. 66, p. 51-62, 2015.
48. MAKEDONSKI, L., PEYCHEVA, K., & STANCHEVA, M. Determination of heavy metals in selected black sea fish species. *Food Control*, 72, 313-318, 2017.
49. MARTINEZ, C. S., ALTERMAN, C. D. C., PEÇANHA, F. M., VASSALLO, D. V., MELLO-CARPES, P. B., MIGUEL, M., & WIGGERS, G. A. Aluminum Exposure at Human Dietary Levels for 60 Days Reaches a Threshold Sufficient to Promote Memory Impairment in Rats. *Neurotoxicity Research*, 2016. 31(1), 20–30.
50. MEKKEY M. A, "Histological –Physiological Study of Thyroid Gland in White Male Rats Processing with Aluminum Chloride and Treated with Oil of *Nigella sativa*", *JUBPAS*, v. 29, n. 1, p. 64–74, 2021.
51. MIRZA A.; KING A; Troakes C; Exley C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Jornal of trace Elements in Medicine and Biology*, v. 40, p. 30-36, 2017.
52. NOVAES, R. D.; MOURO, V. G.S.; GONÇALVES, R. V.; MENDONÇA, A. A.S.; SANTOS, E. C.; FIALHO, M.C.Q.; MACHADO-NEVES, M. Aluminum: A potentially toxic metal with dose-dependent effects on cardiac bioaccumulation, mineral distribution, DNA oxidation and microstructural remodeling. *Environmental Pollution*, 242, 814–826. 2018.
53. OKAIL, H.A., IBRAHIM, A.S. & BADR, A.H. The protective effect of propolis against aluminum chloride-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *JoBAZ* 81, 34 , p. 1-11, (2020). <https://doi.org/10.1186/s41936-020-00169-9>.
54. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipide peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 95, p. 351-358, 1979.
55. PIAVCHENKO, G.I; ALEKSEEV, A.; STELMASHCHUK, O.; SERYOGINA, E.; ZHEREBTSOV, E.; KUZNETSOVA, E.; DUNAEV, A.; VOLKOV, Y.;

- KUZNETSOV, S. A complex morphofunctional approach for zinc toxicity evaluation in rats. *Heliyon*, 6(4) 2020.
56. PEIXOTO, S. V., & ASMUS, C. I. R. F. O desastre de Brumadinho e os possíveis impactos na saúde. *Ciência e Cultura*, 2020, 72 (2), 43-46.
 57. RANASINGHE, P., WATHURAPATHA, W., ISHARA, M. ET AL. Effects of Zinc supplementation on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab (Lond)* 12, 26, p. 1-16. (2015). <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0023-4>.
 58. RAHIMZADEH, M R; RAHIMZADEH M R; KAZEMI S; AMIRI R J; PIRZADEH M; MOGHADAMNIA A M . Aluminum Poisoning with Emphasis on Its Mechanism and Treatment of Intoxication. *Emerg Med Int* 2022, 1480553.
 59. RAHIMZADEH M R; RAHIMZADEH M R; KAZEMI S, AKBAR MOGHADAMNIA A. Zinc Poisoning - Symptoms, Causes, Treatments. *Mini Rev Med Chem*. 2020;20(15):1489-1498.
 60. REDDY, U. A. et al. Biomarkers of oxidative stress in rat for assessing toxicological effects of heavy metal pollution in river water. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 17, p. 13453–63, 2015.
 61. REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, v.233, p.357-363, 1994.
 62. RYADINENCY, R. HADISAPUTROS, RACHMAWATI B. Effect of zinc supplementation on triglyceride and malondialdehyde levels: study on diabetic Wistar rats induced with streptozotocin Resty. Published 9 September 2018 *Medicine Medical Journal of Indonesia*. DOI:10.13181/MJI.V27I2.1417 Corpus ID: 51932370
 63. REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, v.233, p.357-363, 1994.
 64. SANCHES P.J.FILHO; FONSECA V.K. HOLBIG L. Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. Grupo de Pesquisa em Contaminantes Ambientais - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense – Campus Pelotas. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, v.8, n. 1, 2013. DOI: 10.5132/eec.2013.01.015.
 65. SANTOS, J.S dos. et al. Distribuição de Zn, Ni, Cu, Me e Fe nas frações do sedimento superficial do Rio Cachoeira na Região Sul da Bahia, Brasil. *Química Nova*, vol. 36, nº. 2, p. 230-236, 2013.

66. SAFONOVA O. A., POPOVA T.N., SLIVKIN A.I., TALMI Y. Effects of a preparation containing pantogam, succinic acid, and chitosan on activities of the glutathione system and NADPH-generating enzymes in rat tissues under conditions of cerebral ischemia/reperfusion. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015;151:221–224.
67. SAKR S, STEENKAMP V. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative estress and histopathological toxicity in the thyroidn gland and kiver of rats, *Toxicological e environmental chemistry*, v 103, n4, p 1-24. 2021. Doi: 10.1080/02772248.2021.1941021.
68. SEVERO, J. S. S.; MORAIS, J. B. S.; FREITAS, T. E. C. ET AL. the role of zinc in thyroid hormones metabolism. *vitamin and nutrition research*, V. 89, N. 1-2 P. 2019. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/A000262>.
69. SENSI S.L., PAOLETTI P., KOH J.-Y., AIZENMAN E., BUSH A.I., HERSHFINKEL M. The neurophysiology and pathology of brain zinc. *J. Neurosci.* 2011;31(45):16076–16085.
70. SING K.B. Long Term Excessive Zn Supplementation Induced Oxidative Stress in Wistar Rats Fed on Semi-Synthetic Diet. Department of Zoology, Pachhunga University College, Mizoram University, Aizawl, India, 2012. DOI: 10.4236/fns.2012.36098
71. TINKOV AA, SKALNAYA MG, AASETH J, AJSUVAKOVA OP, ASCHNER M, SKALNY AV. Aluminium levels in hair and urine are associated with overweight and obesity in a non-occupationally exposed population. *J. Trace Elem. Med. Biol* 2019, 56, 139–145.
72. TONOMURA, Y.; MATSUBARA, M.; KAZAMA, I. Biomarkers in urine and use of Creatinine. *General Methods in Biomarker Research and their Applications, Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications.* Springer, Dordrecht. 2015.
73. UYSAL, K.; YILMAZ, E.; KÖSE. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). *Microchemical Journal*. v.90, p. 67-70, 2008.
74. VEIGA, M.; BOHRER, D.; BANDERÓ, C. R.R.; OLIVEIRA, S. M.R.; DO NASCIMENTO, PAULO C.; MATTIAZZI, P; MELLO, C. F.; LENZ, QUÉLI F.; OLIVEIRA, M. S. Accumulation, elimination, and effects of parenteral exposure to aluminum in newborn and adult rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, p128(), 215–220.

75. VIKOREN LA, DROTNINGSVIK A, BERGSETH MT, MJØS SA, MOLA N, LEH S, MELLGREN G, GUDBRANDSEN OA. Effects of baked and raw salmon fillet on lipids and n-3 PUFAs in serum and tissues in Zucker fa/fa rats. *Food Nutr Res*. 2017 Jun 12;61(1):1333395. doi: 10.1080/16546628.2017.1333395.
76. YAKUBU OE (2016) Liver Function Status in Male Wister Rats Treated with Ethanol Extract of the Leaves of *Nauclea Latifolia* Owing to Aluminum Chloride-Induced Oxidative Stress. *J Anal Pharm Res* 3(6): 00072. DOI: 10.15406/japlr.2016.03.00072.
77. YOUSEF, M. I.; MUTAR, T. F.; KAMEL, M. ABD EL-NABI. Hepato-renal toxicity of oral sub-chronic exposure to aluminum oxide and/or zinc oxide nanoparticles in rats. *Toxicology Reports*, 6(), 336–346, 2019.
78. WENDEL A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*.1981, 77:325-3.
79. ZAKARIA, S.; REHAB, A.; HASAN, M. F. et al. The concurrent exposure to aluminum and fructose induces liver injury in rats: protection by monoammonium glycyrrhizinate. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 47, n. 5, p. 809-20, 2020. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13257>
80. ZHONG, W.; ZHAO, Y.; SUN, X. Dietary zinc deficiency exaggerates ethanol-induced liver injury in mice: involvement of intrahepatic and extrahepatic factors. v. 8, n. 10, e76522, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076522>

6.3 ARTIGO 3 EXPOSIÇÃO DE 9 E 12 MESES

AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO DE PEIXES DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CACHOEIRA EM RATOS POR UM ANO

Sônia dos Santos Toriani¹, Alessandra Betina Gastaldi², Gabriela Borgmann³, Katherine Plautz¹, Marina Quirino Leandro da Silva⁴, Gustavo Henrique Alves Manhaguanha⁵, Heloiza Cruz de Oliveira⁶, Gustavo Schuetzler Gomes Fernandes⁷, Eduardo Manoel Pereira⁸, Daniela Delwing-de Lima⁹, Therezinha Maria Novais de Oliveira¹⁰

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

²Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

³Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, ¹Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461-9152, E-mail: therezinha.novais@univille.br

RESUMO

A poluição ambiental aquática pode contaminar a carne dos peixes, deixando-a imprópria para consumo. Este estudo investigou a toxicidade do consumo de carne de tilápia cozida, coletada do rio Cachoeira por ratas. Os animais receberam ração, carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira duas vezes por semana por 9 e 12 meses e foram mensurados parâmetros de estresse oxidativo bioquímicos e hematológicos e a quantidade de metais pesados Cádmio (Cd^{+2}), chumbo (Pb^{+2}), Cromo (Cr^{+6}) e mercúrio (Hg^{+2}) Alumínio (Al^{+2}) e Zinco (Zn^{+2}) na carne de peixe. Após 9 e 12 meses de consumo de carne de peixe do rio Cachoeira, aumentaram significativamente substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em todos os órgãos, aumentaram significativamente proteínas carboniladas no cerebelo, córtex, coração e fígado e reduziram sulfidrilas nesses mesmos órgãos. A atividade da catalase reduziu significativamente no baço, cerebelo, córtex, coração e rim após 9 e 12 meses de exposição, enquanto a da superóxido dismutase não decresceu apenas no rim. A atividade da glutathione peroxidase aumentou no baço e nos eritrócitos, mas diminuiu nos outros órgãos após os dois períodos de exposição. Após 9 meses, observou-se aumento significativo do nível sanguíneo de tiroxina, de transaminase glutâmica pirúvica, ureia, lipoproteína de muito baixa e baixa densidade e redução de colesterol total. Após 12 meses de exposição, houve elevação significativa das transaminases glutâmica pirúvica e oxalacética no sangue. A carne de peixe do rio Cachoeira apresentou nível de alumínio e zinco, cinco e seis vezes maior que a do peixe de cultivo. O acúmulo desses metais pode contribuir para causar doenças em longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE: alimentos, dieta e nutrição, desenvolvimento sustentável, monitoramento ambiental, peixe, segurança alimentar, toxicologia.

ABSTRACT

Environmental aquatic pollution can make fish meat inappropriate for ingestion and cause diseases. This study aimed to investigate the toxicity of Cachoeira river collected and cooked tilapia fish meat ingestion in rats. Animals were fed standard ration, farmed fish meat and from the Cachoeira river twice a week for 9 and 12 months and oxidative stress in spleen, cerebellum, brain cortex, heart, liver, kidney and blood, biochemical and hematological parameters were measured. Heavy metal content in fish meat was also measured. After 9 and 12 months of Cachoeira river fish meat ingestion, significant increase of thiobarbituric reactive

substances in all organs and blood, increase of carbonylated proteins in cerebellum, cortex, heart, liver and decrease of sulfhydryls in these organs. Catalase activity was significantly reduced in spleen, cerebellum, córtex, heart and kidneys after 9 and 12 months, while superoxide dismutase activity did not reduce only in kidney. Glutathione peroxidase activity increased in spleen and blood, but decreased in all other analysed organs after both periods of exposition. After 9 months, there was significant increase of plasmatic levels of thyroxine, piruvic, glutamic transaminase, urea, very low and low density lipoproteins. After 12 months, there was significant increase of plasmatic level of liver transminases. No hematological alterations were observed. Cachoeira river fish meat presented aluminum and zinc level of, respectively, five and six times higher than farmed fish. Accumulation of these metals may contribute to the development of diseases when consumed in long term.

KEYWORDS: diet, food and nutrition, sustainable development, environmental monitoring, fish, food safety, toxicology.

INTRODUÇÃO

A carne de peixe é uma valiosa fonte de macro e micronutrientes, particularmente de ferro e zinco, vitaminas B1, B12, niacina, proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas A e D e do lipídio poli-insaturado (LASKOWSKI, GÓRSKA-WARSEWICZ, KULYKOVETS, 2018). Apesar do aumento do consumo de carne de peixe estar possivelmente associado com a menor incidência de doença cardiovascular (por causa da vitamina D e do ômega-3), deve-se contrabalancear os benefícios com a presença de vários tipos de contaminantes ambientais que podem comprometer a qualidade desse alimento (metais pesados, microrganismos, pesticidas) e contribuir para o desenvolvimento de doenças (LASKOWSKI, GÓRSKA-WARSEWICZ, KULYKOVETS, 2018; TORIANI *et al.*, 2021).

Em todo o mundo, os habitats aquáticos estão sendo expostos a uma mistura complexa de toxicantes: os rios recebem estressores químicos de origem antropogênica, incluindo matéria orgânica e inorgânica, além de micropoluentes, como pesticidas ou resíduos de produtos industriais. Os rios são utilizados para diluir e transportar resíduos tratados para longe da população humana, porém os toxicantes poluem a água e degradam o ambiente, ameaçando a diversidade da vida nesses meios (GALIB *et al.*, 2018). O intenso crescimento industrial e da

agricultura contribui para causar contaminação dos ambientes aquáticos naturais e construídos pelo homem e podem afetar não apenas a saúde dos peixes, mas também trazer problemas ligados ao consumo de carne de peixe pelo ser humano, sendo fundamental monitorar a qualidade dos meios em que os peixes vivem (NOVOSLAVISKIJ *et al.*, 2016).

Dentre os contaminantes dos meios aquáticos, metais de fontes naturais (deposição atmosférica) e antropogênicas (agricultura, resíduos de produtos industriais e residenciais) (WEBBER, 2013) e o sedimento dos rios pode imobilizar metais por processos de adsorção, floculação e coprecipitação (MORINA *et al.*, 2016), tornando-os mais acessíveis aos peixes. A exposição crônica a metais pesados pode acumular nos tecidos dos peixes e conduzir a mudanças teciduais, bioquímicas e fisiológicas (PAULINO *et al.*, 2014) nesses organismos e também permitindo biomagnificação e aumento da presença de toxicantes ao longo da cadeia alimentar, de modo que o conteúdo de metais nos peixes pode contrabalancear seus benefícios nutricionais (EL-MOSELHY *et al.*, 2014).

O município de Joinville, situado na região nordeste do Estado de Santa Catarina, é considerado o terceiro polo industrial da região Sul do Brasil. A bacia do rio Cachoeira está inserida na região central do município e, conforme dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (2014), Joinville foi citada entre as 10 piores cidades do Brasil em cobertura de esgoto. O rio passou a receber maior e crescente quantidade de resíduos domésticos e industriais na década de 1970, conforme a população e a industrialização aumentaram. Até a metade dos anos 2000, não houve incremento de coleta e tratamento de esgoto na cidade, que ficou quase três décadas com apenas 14% de cobertura (ZSCHORNAK, OLIVIERA, 2018).

Sendo observada a pesca e consumo de peixes do rio Cachoeira, que possuem potencial para contaminação relevante, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade pré-clínica da carne de tilápia cozida do rio Cachoeira em ratos expostos a ela por nove e doze meses.

METODOLOGIA

Este foi um estudo pré-clínico experimental, realizado na Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), conduzido no biotério e nos laboratórios de práticas farmacêuticas e de análise instrumental. Os experimentos foram conduzidos unicamente após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVILLE (Parecer 01/2019).

Protocolo experimental *in vivo*

Foram utilizados *Rattus norvegicus* albinos da raça *Wistar*, fêmeas, com peso médio inicial de 100g, provenientes do Biotério da Universitária Regional de Blumenau (FURB – SC). Os animais foram recebidos com 21 dias de idade, acomodados (4 por gaiola) e aclimatados por 7 dias no biotério setorial da Universidade da Região de Joinville para adaptação. As salas de manutenção dos animais foram mantidas em ciclo de 12h claro/escuro (luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), temperatura entre 22 ± 2 °C e umidade entre $50 \pm 5\%$, com sistema de exaustão de ar. Os animais tiveram livre acesso à ração e água durante o período de aclimação. Os experimentos foram realizados conforme o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2012) e as recomendações exigidas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, (1996)”.

Após a aclimação, os animais foram divididos em grupos (n =10) que foram expostos por 9 e 12 meses à ração, carne de peixe de cultivo ou do rio Cachoeira. Os animais do grupo controle receberam ração padrão (Nuvilab®) e os animais dos grupos experimentais receberam 2 porções por semana de carne de peixe. Oito horas antes do fornecimento da carne de peixe foi retirada a ração das caixas de todos os grupos, inclusive o controle.

Para definição da porção de peixe ofertada para cada rato, utilizou-se a recomendação da Word Health Organization (2010) de consumo de 12 Kg de peixe ano para um adulto de 70 Kg (uma porção de 125g/70 Kg duas vezes por semana). Essa proporção foi convertida conforme a massa corporal de cada animal, que foi pesado quinzenalmente. Um dia após o término de cada período de exposição, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue total, e excisados o baço, coração, fígado, rim direito, cerebelo, coração, córtex cerebral.

Preparo das amostras

Mensuração da quantidade de metais na carne de peixe

As análises de concentração de metais pesados na carne de peixe foram conduzidas em triplicata por espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-

OES) em aparelho Avio 200-Perkin Elmer, adaptadas das metodologias de Sanches Filho, Fonseca e Holbig (2013) e de Uysal, Emre e Köse (2008).

Foram pesadas 5 g de cada amostra de carne cozida de peixe de cultivo e do rio Cachoeira, que foram colocadas em liofilizador por 24 horas. Após secagem, restaram 3,40 g da amostra da carne de peixe de cultivo e 3,22 g da amostra de carne de peixe do rio Cachoeira. A cada amostra foram adicionados 10 mL HCl (20%) + 4mL de HNO₃ (50%), colocadas na chapa de aquecimento a 90°C e deixadas por 30 minutos em refluxo. Em seguida as amostras foram filtradas para um balão de 100 mL e avolumadas com água Milli-Q.

Todo o material utilizado no preparo da amostra foi lavado com uma solução de Extran e água e, após, colocado em ácido nítrico a 10% (v/v) durante pelo menos 24 horas. Após imersão no ácido, o material foi lavado sete vezes na água Milli-Q. Os resultados da análise de metais estão expressos em ppm.

Sangue Total

O sangue total para análise dos parâmetros hematológicos foi obtido de sangue dos ratos por meio de decapitação e acondicionados em tubos com e sem ácido etilenodiamonotetracético tripotássio (EDTA K3). O sangue foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos para separação de plasma e soro, que foram mantidos em freezer. O sangue recém coletado foi utilizado para análise de parâmetros hematológicos e confecção de lâmina para contagem diferencial de células sanguíneas.

Eritrócitos

Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio) e os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados.

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a 13,500 × g por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

Tecidos

O fígado, rim, coração, baço e estruturas cerebrais (córtex e cerebelo) foram removidos, decapsulados e mantidos em gelo com tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão adequado, conforme metodologia a ser empregada, usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi

centrifugado a $\times 3.000$ g a 4 °C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) e de estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas (SH) e proteínas carboniladas (PC).

Parâmetros de estresse oxidativo

TBA-RS

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. (1979). A metodologia de TBA-RS, mensura o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. Os tecidos homogeneizados e o plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidos num banho de água fervente durante 60 min. TBA-RS foi determinado pela absorvância a 535nm. Uma curva de calibração será obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados estão expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

Conteúdo total de SH

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), que se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado foi adicionado a 1mL de tampão (PBS) pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µL de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

Conteúdo de PC

O teor de carbonilas foi mensurado através do método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 uL de homogeneizado foram adicionados a tubos de plástico contendo 400 uL de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1 h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500 uL de ácido tricloroacético a 20% serão adicionados a cada tubo. A mistura foi submetida a vórtex e

centrifugada a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido, descartado. O sedimento foi lavado com 1mL de etanol / acetato de etila (1: 1 v / v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspense em 600µL de guanidina 6M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60 °C durante 15 min. As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante usado para medir a absorbância a 370 nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol / mg de proteína).

Atividade da CAT

Esse parâmetro foi mensurado pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotometro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H₂O₂ a 240 nm num meio de reação contendo 25µL de amostra e 600µL tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 20mM de H₂O₂. A absorbância foi mensurada a cada 10 segundos por 1 minuto e 40 segundos. Uma unidade é definida como 1µmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT / mg de proteína.

Atividade da SOD

Esse parâmetro foi determinado pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido (O₂•⁻), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15µL de cada amostra, 215µL de uma mistura contendo 50uM de tampão Tris, pH 8,2 foram adicionados à 1µM de EDTA e 30uM de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20uL de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatado como unidades SOD/mg de proteína

Atividade da GSH-Px

A aferição desse parâmetro foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340nm por 3 minutos e 30 segundos (espectrofotômetro Shimadzu UV-

visível). O meio contém 90 µL de amostra e 800µL de tampão fosfato de potássio 10mM, pH 7,4; 20 µL de GSH 2 mM, 30µL de GSH redutase 0,15 U/mL, 10 µL de azida, 0,4 mM, 0,5 mM de tertbutil- hidroperóxido e 10µL de NADPH 0,1 mM. A absorbância foi mensurada a cada 10 segundos por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, 50µL de t tertbutil-hidroperóxido foram adicionados e a absorbância lida por mais 2 minutos. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px / mg de proteína.

Dosagem de proteínas

O teor de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

Aferição dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP), hormônio tireo-estimulante (TSH), tiroxina livre (T4L) e triiodotironina (T3) e creatinina foram mensurados por processo automático no aparelho Advia Centaur Immunassay System da Siemens (laboratório Santa Helena de Jaraguá do Sul - SC). A mensuração de proteínas totais, albumina, ácido úrico, ureia, colesterol total (CT), colesterol HDL e triglicerídeos (TG) foram mensurados por espectrofotometria no laboratório de Práticas Farmacêuticas da UNIVILLE utilizando kits da Labtest. Níveis sanguíneos de colesterol VLDL e LDL foram deduzidos utilizando a equação de Friedewald.

Aferição dos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram mensurados por processo automático de leitura de luz e impedância elétrica por meio de automação com o aparelho Pentra 60 da marca Horiba ABX. Foram avaliados os parâmetros da série vermelha (hemograma): hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), contagem de eritrócitos, RDW (Red Cell Distribution Width), índices referentes à concentração de hemoglobina e análise microscópica do esfregaço sanguíneo para observação de alterações de forma e cor dos eritrócitos. Também foi avaliado o leucograma (número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) e a quantidade total de plaquetas.

Coleta dos peixes

Foi selecionada a tilápia para este estudo por ser um peixe bastante consumido entre os brasileiros, ter uma ótima relação custo/benefício para os consumidores, devido a sua carne ser

considerada uma proteína de alto valor biológico e textura firme. Este peixe também pode se desenvolver em ambientes adversos, tem hábito alimentar onívoro, alimenta-se de todo tipo de material orgânico disponível na água, moluscos, sementes, vegetais de qualquer espécie, crustáceos, entre outros (BEMVENUTI, FISCHER, 2010).

Os peixes de cultivo selecionados foram tilápias do Nilo *Oreochromis*, provenientes de cultivo em monocultura de tilápias em viveiro escavado arraçoado, localizado na Estrada Quiriri na cidade de Joinville (SC). O local de cultivo é assistido regularmente pela equipe do setor de piscicultura da unidade de desenvolvimento rural da Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente que faz regularmente a análise da água de cultivo e confirmou que os parâmetros de cultivo discriminados estão dentro do ideal para a tilapicultura. A ração ofertada aos peixes omnívoros possui 30% de proteína bruta (Nicoluzzi®). Os peixes foram capturados com auxílio de redes, armazenados em caixa térmica e imediatamente entregues para a pesquisadora para posterior limpeza e congelamento entre -18°C a -20°C até a hora do preparo. A coleta iniciou na mesma data que dos peixes do rio Cachoeira e na mesma frequência.

Os peixes do rio Cachoeira foram coletados seguindo a metodologia de Lima et al. (2013), com o auxílio de redes, sendo capturados 3 peixes da mesma espécie, armazenados em isopor com gelo até a chegada ao laboratório de toxicologia da UNIVILLE, onde foram medidos e pesados. A coleta do peixe ocorreu em dois períodos seguros para armazenamento e manutenção da qualidade da carne para consumo. Novas coletas de peixe do rio Cachoeira ocorreram sempre 15 dias antes de serem consumidas todas as porções congeladas disponíveis, mantendo assim período de coleta e consumo dentro do prazo de 6 meses.

A coleta dos peixes foi realizada durante o dia, sempre considerando a condição de ausência de chuvas de, no mínimo, dois dias antes das coletas e levando-se em conta a facilidade de acesso e a presença da espécie alvo (PINHEIRO *et al.*, 2017). As tilápias foram coletadas em dois períodos em um mesmo trecho do rio Cachoeira (coordenadas 26°16'08.4" S 048°51.880' W), no bairro Costa e Silva, em Joinville (SC) e coordenadas (26°16'01.1" S - 48°51'40.1" W), próximo a escola Geovani Pascoalini Franco, no bairro Costa e Silva, em Joinville, Santa Catarina.

Os peixes foram coletados utilizando tarrafas de malha entre nós de 4cm e redes de emalhe, com 8 metros de comprimento e 1 metro de largura, com malha entre nós de 6cm. Após a captura, os indivíduos eram identificados ao menor nível taxonômico possível para confirmar

que se tratava da espécie alvo, colocados em sacos plásticos, pesados, etiquetados, lacrados e acondicionados em caixa térmica com gelo. Foram coletados 19 indivíduos, totalizando 5100 g de tilápias. Os procedimentos de coleta foram conduzidos após permissão do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 10476-3 pelos biólogos Diogo Augusto Moreira (CrBio 81154) e Johnatas Adelir-Alves (CrBio 053967).

Preparo da carne de peixe

A seleção e preparação da carne dos peixes para o consumo dos ratos seguiu as normas de segurança alimentar da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação (ANVISA, 2004). Logo após o peixe ser pescado, foi limpo, eviscerado e suas escamas e cabeça retiradas. A carne dos peixes de cultivo e do rio Cachoeira foi separada dos espinhos e apenas a carne crua, em forma de filé foi embalada individualmente ou no máximo dois filés em sacos plásticos, transparentes, selecionados de acordo com a norma RDC nº 259/2002 (ANVISA, 2002), mantida em temperatura entre -18°C -20°C até o momento do descongelamento e cocção da carne.

O descongelamento da carne ocorreu em condições de refrigeração à temperatura inferior a 5°C, para evitar que as áreas superficiais deste alimento se mantivessem em condições favoráveis à multiplicação microbiana. A cocção foi realizada em recipiente de vidro, apenas em água potável sem adição de tempero, em temperatura de 150 °C por 10 minutos (BRASIL, 2004).

Após o cozimento, a carne do peixe foi resfriada, separada em porções e em seguida congelada a -18°C e 20°C, embalada em sacos plásticos conforme a RDC nº 259/2002 para garantir a segurança nutricional deste alimento e minimizar o risco de contaminação cruzada. A carne foi descongelada em forno de micro-ondas por 2 minutos antes de ser oferecida a cada animal. Em seguida, foi acondicionada em bolsa térmica para transporte até o biotério, onde pesou-se cada porção em balança de precisão (BRASIL, 2018)

A carne de peixe foi ofertada aos animais duas vezes por semana, após um período de 8 horas de jejum. Cada animal foi colocado individualmente em uma gaiola, para garantir que cada um consumisse sua porção, e após verificação do consumo total da porção, eles foram recolocados na caixa maior junto com os demais animais do seu grupo e ração à vontade foi disponibilizada novamente.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (mensuração do nível de metais) ou média $\pm$ erro padrão (parâmetros de estresse oxidativo, bioquímicos e hematológicos), foram tabulados e analisados utilizando o programa GraphPad Prism 6.0. Análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) ou de Tukey (dados paramétricos), para comparação entre os grupos foi conduzida, sendo valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

RESULTADOS

Parâmetros de estresse oxidativo – 9 meses de exposição

Houve elevação significativa de TBARS em todos os órgãos analisados e no plasma, com intensidade maior no coração (41,81%), seguido do rim (35,57%), plasma (35,81%) e fígado (34,10%). O aumento de TBARS no baço, cerebelo e córtex foi de, respectivamente, 22,19%, 20,23% e 19,48%. Queda de SH significativa foi observada no baço (31,9%), cerebelo (29,9%), córtex (12,3%), fígado (13,6%) e plasma (9,6%). Não houve alteração relevante desse parâmetro no coração e nos rins. O aumento de proteínas carboniladas foi estatisticamente significativo no cerebelo (15,35%), córtex (18,23%), coração (28,17%), plasma (25,40%), fígado (15,52%) e baço (13,81%) e não sofreu modificação significativa nos rins.

A atividade da CAT aumentou significativamente no fígado (37,11%), no córtex (13,3%) e nos eritrócitos (24,46%), porém decresceu em intensidade estatisticamente no baço (21,61%), coração (24,10%) e rim (19,33%). Observou-se decréscimo significativo da atividade da SOD no fígado (17,72%), cerebelo (14,01%), baço (12,85%) e córtex (10,77%), porém aumento de 21,53% de sua atividade nos eritrócitos. A atividade da GSH-Px modificou-se em intensidade relevante e em dois sentidos: aumentou, respectivamente, no baço, no fígado e nos eritrócitos em 44,13%, 9,91% e 53,78%. Em contrapartida, no cerebelo, no córtex e no coração, houve decréscimo significativo de sua atividade de, respectivamente, 37,42%, 30,61% e 14,85%. Esses dados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de estresse oxidativo após 9 meses de exposição à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

<i>Órgão (Grupo)</i>	<i>TBA-RS (nmol/mg)</i>	<i>SH (nmol/mg)</i>	<i>Proteínas carboniladas</i>	<i>CAT (U/mg de proteína)</i>	<i>SOD (U/mg de proteína)</i>	<i>GSH-Px (U/mg de proteína)</i>
--------------------------	-----------------------------	-------------------------	-----------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	--

	de proteína)	de proteína)	(nmol/mg de proteína)			
Baço (Ração)	2,30 ± 0,11	37,45 ± 1,01	6,00 ± 0,05	10,27 ± 0,12	9,30 ± 0,11	23,80 ± 0,76
Baço (Cultivo)	2,20 ± 0,09	37,42 ± 1,20	5,73 ± 0,13	10,65 ± 0,19	9,45 ± 0,14	26,2 ± 0,57
Baço (Cachoeira)	2,81 ± 0,04***	25,50 ± 1,23***	6,83 ± 0,13***	8,05 ± 0,13***	8,11 ± 0,11***	34,31 ± 0,97***
Cerebelo (Ração)	3,22 ±0,11	20,65 ± 0,78	4,95 ± 0,10	5,97 ± 0,15	5,12 ± 0,13	25,03 ± 1,02
Cerebelo (Cultivo)	3,24 ± 0,10	23,18 ± 1,05	4,8 ± 0,18	6,02 ± 0,09	5,24 ± 0,10	25,14 ± 0,81
Cerebelo (Cachoeira)	3,87 ± 0,08***	14,47 ± 0,69***	5,71 ± 0,12**	5,74 ± 0,08	4,40 ± 0,14***	15,64 ± 0,68***
Córtex (Ração)	2,57 ± 0,08	25,20 ± 1,66	4,77 ± 0,11	6,00 ± 0,11	7,17 ± 0,11	24,60 ± 0,64
Córtex (Cultivo)	2,40 ± 0,12	26,94 ± 0,97	4,62 ± 0,18	6,02 ± 0,09	7,26 ± 0,15	23,88 ± 1,11
Córtex (Cachoeira)	3,07 ± 0,06***	22,08 ± 0,56**	5,64 ± 0,10***	6,80 ± 0,11***	6,40 ± 0,11***	17,07 ± 0,64**
Coração (Ração)	3,06 ± 0,12	23,13 ± 1,15	5,27 ± 0,12	10,90 ± 0,50	5,25 ± 0,10	80,93 ± 0,76
Coração (Cultivo)	2,90 ± 0,12	25,44 ± 0,90	5,42 ± 0,13	11,30 ± 0,36	5,30 ± 0,15	82,56 ± 1,33
Coração (Cachoeira)	4,34 ± 0,10***	22,21 ± 0,86	6,78 ± 0,20***	8,27 ± 0,15***	5,06 ± 0,09	69,53 ± 1,00***
Fígado (Ração)	2,67 ± 0,12	60,00 ± 0,57	4,96 ± 0,08	8,92 ± 0,14	5,13 ± 0,08	87,87 ± 1,08
Fígado (Cultivo)	2,65 ± 0,08	60,50 ± 1,04	4,92 ± 0,11	8,94 ± 0,23	5,35 ± 0,11	88,00 ± 1,22
Fígado (Cachoeira)	3,58 ± 0,13**	51,86 ± 0,91***	5,73 ± 0,09**	12,23 ± 0,26***	4,22 ± 0,10***	96,56 ± 1,60**
Rim (Ração)	2,25 ± 0,15	24,20 ± 0,75	5,40 ± 0,09	13,03 ± 0,35	5,20 ± 0,12	29,88 ± 1,55
Rim (Cultivo)	2,33 ± 0,12	24,58 ± 1,37	5,34 ± 0,15	13,06 ± 0,45	5,20 ± 0,14	31,20 ± 1,14
Rim (Cachoeira)	3,05 ± 0,07**	23,66 ± 0,94	5,35 ± 0,08	10,52 ± 0,23***	5,35 ± 0,11	20,16 ± 0,76***
Plasma (Ração)	3,10 ± 0,09	26,25 ± 1,04	5,20 ± 0,16			
Plasma (Cultivo)	3,04 ± 0,13	27,50 ± 1,01	5,18 ± 0,19			

<i>Plasma</i> (<i>Cachoeira</i>)	4,21 ± 0,11***	23,74 ± 0,45**	6,52 ± 0,18***
<i>Eritrócitos</i> (<i>Ração</i>)		5,87 ± 0,14	5,30 ± 0,10
<i>Eritrócitos</i> (<i>Cultivo</i>)		6,12 ± 0,07	20,08 ± 0,54
<i>Eritrócitos</i> (<i>Cachoeira</i>)		5,52 ± 0,14	21,38 ± 0,71
	7,30 ± 0,15***	6,44 ± 0,10***	30,86 ± 0,87***

Fonte – os autores (2022).

** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,01$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

Parâmetros de estresse oxidativo – 12 meses de exposição

Houve aumento significativo de TBA-RS no baço (16,80%), cerebelo (36,48%), córtex (32,58%), coração (29,20%), fígado (29,62%), rim (12,70%) e plasma (29,20%), acompanhados de aumento de PC no cerebelo (15,35%), córtex (18,23%), coração (24,70) e fígado (18,35%). Redução significativa de SH foi observada no baço (34,64%), cerebelo (24,21%), córtex (11,57%), fígado (14,08%) e plasma (21,20%).

A atividade da CAT diminuiu significativamente no baço (15,65%), cerebelo (7,15%), córtex (18,13%), coração (15,55%) e rim (24,68%) e aumentou no fígado (44,94%) e eritrócitos (23,69%). A atividade da SOD diminuiu significativamente no baço (15,63%), cerebelo (17,05%), córtex (24,36%), fígado (16,70%) e eritrócitos (10,37%) e aumentou no rim (16,32%). Foi observada redução estatisticamente significativa da atividade da GSH-Px no cerebelo (33,08%), córtex (37,48%), coração (17,02%), fígado (21,17%) e rim (29,33%) e aumento da atividade dessa enzima no baço (48,37%) e nos eritrócitos (24,33%). Esses dados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de estresse oxidativo após 12 meses de exposição à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

<i>Órgão</i> (<i>Grupo</i>)	<i>TBA-RS</i> (<i>nmol/mg</i> <i>de</i> <i>proteína</i>)	<i>SH</i> (<i>nmol/mg</i> <i>de</i> <i>proteína</i>)	<i>Proteínas</i> <i>carboniladas</i> (<i>nmol/mg de</i> <i>proteína</i>)	<i>CAT</i> (<i>U/mg de</i> <i>proteína</i>)	<i>SOD</i> (<i>U/mg de</i> <i>proteína</i>)	<i>GSH-Px</i> (<i>U/mg de</i> <i>proteína</i>)
<i>Baço</i> (<i>Ração</i>)	2,50 ± 0,10	28,00 ± 0,40	5,70 ± 0,02	9,20 ± 0,30	8,25 ± 0,25	19,95 ± 0,15

<i>Baço</i> (Cultivo)	2,40 ± 0,08	28,28 ± 1,05	5,51 ± 0,12	10,33 ± 0,34	8,20 ± 0,20	20,97 ± 0,35
<i>Baço</i> (Cachoeira)	2,92 ± 0,05**	18,30 ± 0,86**	6,20 ± 0,14	7,76 ± 0,20***	6,96 ± 0,25**	29,60 ± 0,73***
<i>Cerebelo</i> (Ração)	3,70 ± 0,20	21,35 ± 0,95	5,10 ± 0,20	5,45 ± 0,50	5,10 ± 0,20	22,65 ± 0,75
<i>Cerebelo</i> (Cultivo)	3,74 ± 0,16	22,17 ± 0,58	4,80 ± 0,14	5,50 ± 0,15	5,18 ± 0,16	24,08 ± 0,63
<i>Cerebelo</i> (Cachoeira)	5,05 ± 0,11**	16,18 ± 0,62**	5,88 ± 0,12**	5,06 ± 0,12*	4,23 ± 0,17**	15,16 ± 0,76**
<i>Córtex</i> (Ração)	3,10 ± 0,20	19,95 ± 0,15	4,70 ± 0,20	5,90 ± 0,10	6,65 ± 0,15	23,90 ± 0,20
<i>Córtex</i> (Cultivo)	3,26 ± 0,13	22,65 ± 1,05	4,63 ± 0,13	5,98 ± 0,13	6,26 ± 0,14	24,32 ± 0,68
<i>Córtex</i> (Cachoeira)	4,11 ± 0,11***	17,64 ± 0,69*	5,70 ± 0,21**	4,83 ± 0,10**	5,03 ± 0,12***	14,94 ± 0,31***
<i>Coração</i> (Ração)	3,25 ± 0,15	20,50 ± 0,09	5,05 ± 0,05	9,90 ± 0,60	5,10 ± 0,10	66,65 ± 1,35
<i>Coração</i> (Cultivo)	3,32 ± 0,08	20,17 ± 1,27	5,26 ± 0,08	10,50 ± 0,23	5,16 ± 0,10	68,30 ± 1,41
<i>Coração</i> (Cachoeira)	4,20 ± 0,09**	18,68 ± 0,15	6,30 ± 0,16***	8,36 ± 0,23**	4,85 ± 0,09	55,30 ± 1,17**
<i>Fígado</i> (Ração)	2,70 ± 0,20	49,05 ± 0,35	4,85 ± 0,25	8,90 ± 0,20	5,20 ± 0,30	80,35 ± 0,95
<i>Fígado</i> (Cultivo)	2,56 ± 0,09	49,53 ± 0,62	4,93 ± 0,11	9,00 ± 0,16	5,06 ± 0,12	81,55 ± 0,50
<i>Fígado</i> (Cachoeira)	3,50 ± 0,13**	42,14 ± 0,80**	5,74 ± 0,11**	12,90 ± 0,29**	4,33 ± 0,12**	63,34 ± 1,68***
<i>Rim</i> (Ração)	2,45 ± 0,15	19,25 ± 0,75	5,40 ± 0,10	13,65 ± 0,45	4,90 ± 0,10	24,90 ± 0,40
<i>Rim</i> (Cultivo)	2,38 ± 0,10	21,08 ± 1,37	5,30 ± 0,09	12,65 ± 0,19	5,00 ± 0,11	24,60 ± 0,97
<i>Rim</i> (Cachoeira)	3,10 ± 0,13**	20,04 ± 1,47	5,62 ± 0,11	10,28 ± 0,15**	5,70 ± 0,09**	16,96 ± 0,80**
<i>Plasma</i> (Ração)	2,75 ± 0,25	28,10 ± 1,30	Não mensurado			
<i>Plasma</i> (Cultivo)	2,76 ± 0,12	27,27 ± 1,20	Não mensurado			
<i>Plasma</i> (Cachoeira)	4,32 ± 0,18**	22,14 ± 0,92**	Não mensurado			
<i>Eritrócitos</i> (Ração)				5,95 ± 0,25	5,40 ± 0,10	21,20 ± 0,30

<i>Eritrócitos</i> (Cultivo)	6,08 ± 0,13	5,65 ± 0,12	21,25 ± 0,38
<i>Eritrócitos</i> (Cachoeira)	7,36 ± 0,14**	4,84 ± 0,12**	26,36 ± 0,41**

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,01$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

Parâmetros bioquímicos – exposição de 9 e 12 meses

Após 9 meses de exposição, foi observada elevação significativa do nível sanguíneo de T4L dos animais que consumiram peixe de cultivo (165,51%) ou do rio Cachoeira (125,28%). Entretanto, o decréscimo significativo de TGO (64,90%) e a elevação de TGP (30,53%) e ureia (31,00%) foram restritos aos animais que consumiram o peixe do rio Cachoeira. Acerca do lipidograma, houve aumento de C-LDL (64,24%) e C-VLDL (31,61%) apenas nos animais expostos à carne de peixe do rio Cachoeira. A queda de TG é perceptível, mas não atingiu significância estatística (tabela 3).

Após 12 meses de exposição, houve aumento estatisticamente significativo do nível sanguíneo de TGO (268,09%), TGP (144,68%), caracterizando a hepatotoxicidade, e de ureia (54,17%), sugerindo nefrotoxicidade mais intensa do que após seis e nove meses de exposição. Demais parâmetros não sofreram modificações relevantes (tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos após 9 e 12 meses de exposição à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

NOVE MESES	<i>Ração</i>	<i>Peixe de cultivo</i>	<i>Peixe do Cachoeira</i>
<i>TSH (μU/mL)</i>	0,02 ± 0,004	0,02 ± 0,008	0,017 ± 0,003
<i>T4 livre (ng/dL)</i>	0,87 ± 0,08	2,31 ± 0,18[#]	1,96 ± 0,02[#]
<i>T3 (ng/mL)</i>	0,48 ± 0,01	0,56 ± 0,06	0,47 ± 0,02
<i>TGO (U/L)</i>	160,80 ± 8,60	117,50 ± 10,54	56,43 ± 1,82***
<i>TGP (U/L)</i>	245,00 ± 11,59	287,70 ± 14,19	319,80 ± 11,22*

<i>Proteínas totais</i> (g/dL)	7,95 ± 0,56	8,70 ± 0,15	8,55 ± 0,25
<i>Albumina</i> (g/dL)	2,85 ± 0,15	3,10 ± 0,16	3,16 ± 0,15
<i>Ureia</i> (mg/dL)	47,00 ± 3,89	57,40 ± 2,65	61,57 ± 2,25*
<i>Creatinina</i> (mg/dL)	0,68 ± 0,04	0,59 ± 0,03	0,61 ± 0,04
<i>Ácido úrico</i> (mg/dL)	2,70 ± 0,28	3,14 ± 0,18	3,54 ± 0,20
<i>Colesterol total</i> (mg/dL)	77,50 ± 7,67	69,40 ± 4,44	71,71 ± 5,69
<i>C-HDL</i> (mg/dL)	64,50 ± 3,92	75,00 ± 8,88	72,67 ± 6,52
<i>TG</i> (mg/dL)	109,5 ± 14,86	83,80 ± 6,16	71,50 ± 7,71
<i>C-LDL</i> (mg/dL)	27,50 ± 1,07	26,12 ± 3,09	44,84 ± 4,87***
<i>C-VLDL</i> (mg/dL)	27,30 ± 2,93	31,28 ± 1,91	35,93 ± 1,99*
DOZE MESES	Ração	Peixe de cultivo	Peixe do Cachoeira
<i>TSH</i> (μU/mL)	0,010 ± 0,010	0,020 ± 0,008	0,016 ± 0,004
<i>T4 livre</i> (ng/dL)	1,60 ± 0,24	1,92 ± 0,11	1,66 ± 0,10
<i>T3</i> (ng/mL)	0,60 ± 0,10	0,53 ± 0,03	0,52 ± 0,06
<i>TGO</i> (U/L)	163,00 ± 11,27	147,3 ± 18,55	437,00 ± 30,93***
<i>TGP</i> (U/L)	273,00 ± 9,00	276,70 ± 38,80	395,80 ± 17,59*
<i>Proteínas totais</i> (g/dL)	7,90 ± 0,10	8,43 ± 0,20	7,60 ± 0,31
<i>Albumina</i> (g/dL)	2,50 ± 0,12	2,80 ± 0,04	2,58 ± 0,19
<i>Ureia</i> (mg/dL)	60,50 ± 0,50	57,15 ± 3,90	92,67 ± 5,87*
<i>Creatinina</i> (mg/dL)	0,47 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,54 ± 0,01
<i>Ácido úrico</i> (mg/dL)	3,45 ± 0,05	3,10 ± 0,51	3,16 ± 0,20
<i>Colesterol total</i> (mg/dL)	97,50 ± 2,50	93,25 ± 7,44	96,20 ± 11,44
<i>C-HDL</i> (mg/dL)	42,00 ± 3,00	47,00 ± 14,00	57,75 ± 10,38
<i>TG</i> (mg/dL)	93,5 ± 6,50	95,60 ± 16,52	85,50 ± 11,03
<i>C-LDL</i> (mg/dL)	36,80 ± 1,80	31,77 ± 2,12	29,30 ± 4,89

C-VLDL (mg/dL) | 18,70 ± 1,33 19,12 ± 3,31 17,10 ± 2,20

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,01$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ração ($p < 0,001$).

Parâmetros hematológicos – exposição de 9 e 12 meses

Não foram observadas alterações significativas nos eritrócitos, leucócitos ou plaquetas em nenhum dos grupos experimentais após 9 e 12 meses de exposição (tabela 4).

Tabela 4. Hemograma dos animais expostos por 9 e 12 meses à ração, à carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

NOVE MESES	<i>Ração</i>	<i>Peixe de cultivo</i>	<i>Peixe do Cachoeira</i>
<i>Total de leucócitos</i> ($\times 1000/\mu\text{L}$)	5,86 ± 0,90	5,45 ± 0,58	5,54 ± 0,42
<i>Segmentados (%)</i>	18,75 ± 0,85	22,75 ± 1,25	24,50 ± 1,93
<i>Bastonetes (%)</i>	0,25 ± 0,25	0,40 ± 0,24	0,28 ± 0,18
<i>Linfócitos (%)</i>	66,00 ± 1,00	58,00 ± 3,58	56,25 ± 4,02
<i>Monócitos (%)</i>	7,75 ± 0,94	9,20 ± 1,20	7,85 ± 1,55
<i>Eosinófilos (%)</i>	4,50 ± 0,86	7,00 ± 1,09	6,00 ± 1,17
<i>Basófilos (%)</i>	2,00 ± 0,68	0,60 ± 0,24	3,00 ± 1,02
<i>Total de eritrócitos</i> (milhões/mm ³)	7,54 ± 0,01	7,74 ± 0,13	7,35 ± 0,14
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	15,08 ± 0,16	16,06 ± 0,25	15,50 ± 0,14
<i>Hematócrito (%)</i>	40,73 ± 0,40	42,86 ± 0,61	41,30 ± 0,69
<i>VCM (fL)</i>	54,25 ± 0,47	55,40 ± 0,81	56,00 ± 0,37
<i>HCM (ng)</i>	19,95 ± 0,22	20,74 ± 0,37	22,30 ± 1,31
<i>CHCM (g/dL)</i>	36,78 ± 0,21	37,48 ± 0,28	36,86 ± 0,30
<i>RDW (%)</i>	11,85 ± 0,29	11,64 ± 0,18	11,57 ± 0,13

<i>Total de plaquetas (x 1000/μL)</i>	884,50 $\pm$ 34,50	868,50 $\pm$ 24,72	919,70 $\pm$ 38,6
DOZE MESES			
	Ração	Peixe de cultivo	Peixe do Cachoeira
<i>Total de leucócitos (x1000/μL)</i>	7,11 $\pm$ 0,07	7,21 $\pm$ 0,18	7,23 $\pm$ 0,20
<i>Segmentados (%)</i>	24,00 $\pm$ 3,21	25,80 $\pm$ 3,24	32,50 $\pm$ 5,42
<i>Bastonetes (%)</i>	0,50 $\pm$ 0,50	0,33 $\pm$ 0,21	0,20 $\pm$ 0,20
<i>Linfócitos (%)</i>	47,00 $\pm$ 5,00	38,00 $\pm$ 4,65	45,80 $\pm$ 3,80
<i>Monócitos (%)</i>	26,33 $\pm$ 2,96	19,00 $\pm$ 2,16	20,00 $\pm$ 3,36
<i>Eosinófilos (%)</i>	2,66 $\pm$ 0,66	5,40 $\pm$ 1,36	3,60 $\pm$ 0,74
<i>Basófilos (%)</i>	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,20
<i>Total de eritrócitos (milhões/mm³)</i>	8,53 $\pm$ 0,18	8,06 $\pm$ 0,15	8,30 $\pm$ 0,33
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	16,40 $\pm$ 0,40	16,30 $\pm$ 0,30	15,94 $\pm$ 0,64
<i>Hematócrito (%)</i>	48,15 $\pm$ 1,45	44,20 $\pm$ 1,16	45,66 $\pm$ 2,53
<i>VCM (fL)</i>	56,50 $\pm$ 0,50	58,00 $\pm$ 0,57	56,20 $\pm$ 0,66
<i>HCM (ng)</i>	19,25 $\pm$ 0,05	21,43 $\pm$ 0,39	19,74 $\pm$ 0,27
<i>CHCM (g/dL)</i>	34,10 $\pm$ 0,20	36,90 $\pm$ 0,76	35,06 $\pm$ 0,58
<i>RDW (%)</i>	12,40 $\pm$ 0,10	11,82 $\pm$ 0,39	12,14 $\pm$ 0,34
<i>Total de plaquetas (x 1000/μL)</i>	688,50 $\pm$ 38,5	701,7 $\pm$ 17,68	671,80 $\pm$ 37,02

A análise das amostras de carne de peixe de cultivo e do rio Cachoeira evidenciaram quantidade média cinco vezes maior de Al^{+3} e seis vezes de Zn^{+2} , que foram estatisticamente significativas. Não houve diferença significativa de quantidade de Ni^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} e Hg^{+2} entre as amostras (tabela 5).

Tabela 5. Quantidade de metais pesados na musculatura das amostras de peixe de cultivo e do rio Cachoeira.

<i>Branco</i>	<i>Peixe de cultivo</i>	<i>Peixe do Cachoeira</i>
---------------	-------------------------	---------------------------

Al^{+3} (ppm)	16,600 $\pm$ 0,008	10,580 $\pm$ 0,073	56,520 $\pm$ 0,018*
Cr^{+2} (ppm)	0	1,170 $\pm$ 0,029	4,35 $\pm$ 0,007
Zn^{+2} (ppm)	0,155 $\pm$ 0,006	59,700 $\pm$ 0,002	381,900 $\pm$ 0,003***
Ni^{+2} (ppm)	0	0	0
Pb^{+2} (ppm)	0	0	0
Cu^{+2} (ppm)	0,014 $\pm$ 0,028	2,940 $\pm$ 0,006	3,720 $\pm$ 0,019
Cd^{+2} (ppm)	0	0	0,930 $\pm$ 0,056
Hg^{+2} (ppm)	0	0	0

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,05$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos ração e peixe de cultivo ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Parâmetros de estresse oxidativo

O aumento significativo de TBARS esteve presente em todos os órgãos analisados e também no plasma nos dois períodos de exposição, evidenciando o aumento significativo de peroxidação lipídica causador de dano à membrana celular. De modo análogo, a redução significativa de SH que ocorreu no baço, cerebelo, córtex, fígado e plasma nos dois períodos de exposição ressalta o aumento de estresse oxidativo. O aumento da carbonilação de proteínas após 9 meses de exposição que ocorreu em todos os órgãos, com exceção dos rins, também reafirma a elevação do estresse oxidativo. Após 12 meses de exposição, a elevação de PC manteve-se significativa no cerebelo, córtex, coração e fígado.

Após 9 meses de exposição, a atividade da CAT aumentou significativamente no fígado, córtex e eritrócitos e decresceu no baço, coração e rim. Porém, após 12 meses de exposição, predominou queda significativa da atividade dessa enzima no baço, cerebelo, córtex, coração e rim, sendo mantido aumento no fígado e nos eritrócitos.

A atividade da SOD diminuiu significativamente no baço, cerebelo, córtex e fígado e aumentou nos eritrócitos após 9 meses de consumo de carne de peixe do rio Cachoeira. Após 12 meses de exposição, predominou queda significativa da atividade da SOD, que ocorreu no baço, cerebelo, córtex, fígado e eritrócitos, tendo diminuído significativamente apenas nos rins.

A atividade da GSH-Px aumentou no baço, fígado e eritrócitos após 9 meses de consumo da carne de peixe do rio Cachoeira e diminuiu significativamente no cerebelo, córtex e coração. Contudo, após 12 meses de exposição, percebeu-se predominância de queda significativa da atividade dessa enzima, no cerebelo, córtex, fígado, coração e rim, havendo elevação de sua atividade apenas nos eritrócitos e no baço. Considerando que a carne de peixe do rio Cachoeira apresentou nível cinco vezes maior de Al^{+3} e Zn^{+2} , é possível que as alterações encontradas guardem relação com o excesso desses metais.

Al^{+3} é um elemento não essencial nos organismos que pode mediar toxicidade aguda e crônica. Dentre os vários efeitos tóxicos, a neurotoxicidade é indubitavelmente a mais proeminente, sendo este metal associado com doenças neurodegenerativas (mal de Parkinson e de Alzheimer) (ZHOU *et al.*, 2021). Conforme Samir & Rashed (2018), o aumento da formação de EROs mediado por Al^{+3} , como o H_2O_2 e o radical O_2^- gerados por perturbação da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial podem aumentar o estresse oxidativo a ponto de ocorrer dano do DNA. Segundo Kumar & Gill (2014), o cérebro é mais vulnerável à toxicidade do Al^{+3} por causa da natureza não mitótica dos neurônios, alto consumo de oxigênio e de lipídios e baixa defesa antioxidante. Al^{+3} acumula em todas as regiões do cérebro, principalmente no hipocampo (sítio de formação de memória e aprendizado) e induz peroxidação lipídica no cérebro e redução do conteúdo de SH por meio de aumento da produção de EROs induzida por ferro.

A produção aumentada de EROs promove também oxidação de proteínas, levando a alterações estruturais e funcionais, de modo que a carbonilação dessas biomoléculas (introdução de grupos funcionais aldeídos ou cetonas) mostrou correlação positiva com o desenvolvimento de várias doenças em seres humanos. Assim, a peroxidação lipídica resulta em uma variedade de produtos, dentre os quais espécies carboniladas formadas por clivagem oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados podem reagir com grupos nucleofílicos de outras biomoléculas, incluindo aminoácidos como lisina, cisteína, histidina e arginina. As proteínas carboniladas possuem papel importante nas desordens causadas por estresse oxidativo porque alteram a função proteica, prejudicam a sinalização intracelular e podem apresentar potencial pró-inflamatório. Ainda, a carbonilação de biomoléculas é de natureza irreversível, assim, elas precisam ser degradadas ou metabolizadas em espécies menos reativas por outras vias de detoxificação (GRIESSER *et al.*, 2017).

Ao nível cardíaco, o estresse oxidativo é o principal promotor da toxicidade dos metais, de modo que o dano mitocondrial por estresse oxidativo em cardiomiócitos pode levar à apoptose (ZHOU *et al.*, 2021). Al^{+3} pode gerar alta concentração de EROs, que pode causar peroxidação lipídica das membranas celulares e interferir com a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, causar ligação cruzada de proteínas e ácidos nucleicos e outras macromoléculas, levando a disfunção metabólica e morte celular (ZHOU *et al.*, 2021).

O excesso de Al^{+3} contribui para aumento de estresse oxidativo no cérebro, fígado e rim, além de modificar a atividade de enzimas antioxidantes. Al^{+3} aumenta a lipoperoxidação lipídica nos rins e seu acúmulo leva à degeneração de celulares tubulares, prejudicando a filtração glomerular (RAHIMZADE *et al.*, 2022). Al^{+3} é absorvido principalmente pelo trato gastrointestinal, acumulando facilmente nas células hepáticas e suas organelas (CHERAGHI & ROSHANAIEI, 2019) e causa peroxidação lipídica e dano oxidativo a proteínas e ao DNA no fígado, além de degeneração do retículo endoplasmático rugoso e consequente queda da produção de proteínas e edema mitocondrial. Essas alterações resultam em dano ao parênquima hepático que aumenta o nível sanguíneo de TGP, de TBA-RS e de citocinas pró-inflamatórias (RAHIMZADE *et al.*, 2022).

A exposição ao Al^{+3} resulta em aumento de TBA-RS nos tecidos hepático e renal por meio de aceleração da peroxidação lipídica mediada por ferro, perturbações do equilíbrio de minerais no sentido do Al^{+3} substituir íons de magnésio e ferro, causando redução da ligação de Fe^{+2} à ferritina, o que provoca aumento de ferro livre formação de radicais hidroxila pela reação de Fenton e esses radicais iniciam peroxidação dos lipídios da membrana celular, causando perda de sua fluidez, do potencial de membrana, aumento da permeabilidade e alterações nas funções de receptores (IMAM *et al.*, 2016). Assim, a toxicidade desse metal pode afetar os órgãos de modo generalizado conforme o estresse oxidativo sobrepõe as defesas antioxidantes.

Zn^{+2} é um metal essencial presente em mais de 2800 macromoléculas e mais de 300 enzimas, sendo utilizado em reações catalisadas por proteínas, transcrição do DNA, sistemas de transporte mediados por proteínas, sinalização intracelular e estabilização da estrutura da membrana celular quando em concentrações fisiológicas (PRASAD, BAO, 2019). Porém, lisossomos e mitocôndrias contribuem para morte celular quando a homeostasia do Zn^{+2} está alterada. Em condições de estresse oxidativo, a concentração de Zn^{+2} aumenta nos lisossomos, como resultado de liberação deste por metalotioneínas e promove disfunção lisossômica por

permeabilização da membrana e autofagia. Metalotioneínas que transportam Zn^{+2} pela membrana externa mitocondrial e o liberam no espaço intermembranar podem inibir a cadeia respiratória, reduzir a síntese de ATP e aumentar a síntese de EROs, afetando a permeabilidade mitocondrial e liberando fatores apoptóticos (MARET, 2019).

Compreende-se a elevação das enzimas antioxidantes no sentido de neutralizar o aumento de estresse oxidativo encontrado, porém essa capacidade é limitada e, ainda, os metais presentes em excesso podem contribuir para perturbação da atividade dessas enzimas: Al^{+3} foi associado com redução da atividade da SOD, CAT e GSH-Px, uma vez que essas enzimas dependem de elementos traço essenciais para seu funcionamento adequado cuja substituição por Al^{+3} prejudica a atividade (KUMAR & GILL, 2014), enquanto a ingestão aumentada de Zn^{+2} pode reduzir a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD por limitar a biodisponibilidade de Cu^{+2} e ferro, que são cofatores utilizados por essa enzima (SINGH, 2012). Rahimzade *et al.* (2022) também apontam para a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, da síntese de proteínas, alterações da funcionalidade de ácidos nucleicos, alterações da homeostase celular do ferro e da permeabilidade da membrana, aumento da produção de EROs e até apoptose celular desencadeada por excesso de Al^{+3} .

Embora os mecanismos explicados anteriormente sustentem o aumento do estresse oxidativo e as mudanças de atividade das enzimas antioxidantes encontrados no presente estudo, é importante ressaltar que não foram encontrados trabalhos que acompanharam a toxicidade por exposição por mais de 6 meses, o que limita outras comparações. Mesmo assim, o presente estudo evidencia que a toxicidade continua ocorrendo e, por exemplo, no fígado, aumentando, conforme a exposição a longo prazo, pode causar óbito, como ocorreu no grupo de animais que consumiu por 12 meses a carne de peixe do rio poluído. No baço, as alterações sobre parâmetros de estresse oxidativo foram significativas apenas a partir de seis meses de exposição e elevaram nos períodos posteriores. Ressalta-se também que a toxicidade observada foi advinda do consumo de carne de peixe em quantidade nutricionalmente recomendada, e não em excesso. Ainda, somado ao uso de utensílios de Al^{+3} no cozimento dos alimentos pode vir a contribuir para exposição cumulativa relevante em longo prazo no que refere à contribuição para o desencadeamento de patologias.

Parâmetros bioquímicos

Foi encontrada elevação significativa de FT4 no sangue de animais que consumiram tanto peixe de cultivo como do rio Cachoeira após 9 meses de exposição. Ainda, elevação significativa de TGP, ureia, LDL e VLDL, porém restritas ao grupo de animais que consumiu carne de peixe do rio Cachoeira, além de redução significativa do nível de TGO e de CT.

Após 12 meses de exposição, houve alteração significativa apenas das transaminases hepáticas, porém mais intensa do que após 9 meses de exposição. Associada com as alterações de estresse oxidativo no fígado, pode ter relação com a causalidade de hepatite química que possa ter resultado nos óbitos observados.

Embora observem-se evidências para redução da função tireoidiana quando da exposição ao Al^{+3} em períodos mais curtos que o do presente estudo, atribuída ao estresse oxidativo, infiltração inflamatória e degeneração das células epiteliais dos folículos tireoidianos (MEKKEY, 2021; ABBAS, ZAKI, 2016), destaca-se o estudo de Igbokwe, Igwenagu e Igbokwe (2019), no qual observou-se aumento da secreção de hormônios tireoidianos devido aos íons de Al^{+3} porque os órgãos alvo podem tornar-se menos sensíveis ao hormônio por queda da expressão de receptores nas membranas celulares.

O eixo endócrino hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano apresenta transportadores específicos para o Zn^{+2} , posto que esse metal participa da síntese, liberação e modulação da estrutura de fatores de transcrição de hormônios desse eixo (RABEH, EL-GHANDOUR, 2016; SEVERO et al., 2019) e sua deficiência foi associada com atrofia e degeneração tireoidiana, e aumento do estresse oxidativo sobre a tireoide (IBRAHIM et al., 2016; ARORA et al., 2018, SEVERO et al., 2019). Além disso, o Zn^{+2} promove a síntese da proteína ligadora de T4 e participa da atividade dos receptores o T3 (BALTACI, MOGULKOC, BALTACI, 2019). Desse modo, é possível que, em excesso, esse íon permita maior funcionamento do eixo endócrino tireoidiano, conforme observado após nove meses de exposição a carne de peixe.

Estudos anteriores caracterizaram a toxicidade do Al^{+3} utilizando doses maiores por períodos mais curtos do que no presente estudo sobre toxicidade hepática, tendo sido observadas alterações histopatológicas como vacuolização, aumento de infiltração de células inflamatórias, necrose dos hepatócitos e elevação das enzimas TGO e TGP (OKAIL, IBRAHIM, BADR, 2020; RAMOUD, SHALABY, 2019; IBRAHEEM et al., 2016; MOSTAFA et al., 2013), além do aumento de estresse oxidativo discutido anteriormente. Assim, considerando a linha temporal de exposição à carne de peixe do rio Cachoeira, aumento

significativo de TGP (que é marcador mais específico para dano hepático do que a TGO) foi observado a partir dos 6 meses e manteve-se até os 12 meses, porém com intensidade crescente, reafirmando a persistência da toxicidade hepática encontrada, clinicamente relevante. A redução de TGO aos doze meses também pode estar ligada à intensidade cumulativa de dano funcional, refletindo toxicidade que promoveu insuficiência hepática em sintetizar essa enzima.

A elevação sanguínea significativa de ureia guarda relação com toxicidade renal, posto que se trata de um biomarcador que é produto final do catabolismo proteico, eliminado 90% por filtração glomerular, porém pode retornar ao plasma em torno de 40-70% por difusão passiva (DUSSE *et al.*, 2016). Apesar de superestimar a taxa de filtração glomerular, a elevação da ureia no sangue surge mais precocemente em relação à da creatinina quando de insuficiência renal. Assim, compreende-se a nefrotoxicidade relacionada ao consumo de carne de peixe do rio Cachoeira ao associar-se o acúmulo de Al^{+3} nos rins, que eleva o estresse oxidativo a ponto de aumentar o nível sanguíneo de ureia, que se iniciou após 6 meses, manteve-se após 9 meses e aumentou em intensidade maior após 12 meses, destacando a relação com o acúmulo crescente do Al^{+3} e aumento proporcional de prejuízo da função renal.

Embora não tenham sido encontrados estudos que realizaram exposição ao Al^{+3} por mais de 6 meses, algumas hipóteses podem relacionar a toxicidade hepática deste metal no que tange as mudanças encontradas no lipidograma: o aumento de LDL e VLDL pode guardar relação com a intensidade crescente de hepatotoxicidade cuja ruptura de membranas celulares possa permitir extravasamento do conteúdo dos hepatócitos para o sangue ou, ainda, que a insuficiência hepática acarretasse em queda da atividade de enzimas lipases, o que resultaria em menor remoção dos TG da circulação, permitindo que as lipoproteínas que os contêm permanecessem mais circulantes.

O Zn^{+2} tem papel fundamental no desenvolvimento da síndrome metabólica, posto que regula a expressão de citocinas, da resposta inflamatória, é necessário para ativação de enzimas antioxidantes que neutralizam EROs e também na modulação do metabolismo de glicose e lipídios. Assim, esse metal tem reconhecidamente papel protetor sobre o lipidograma, glicemia e pressão arterial quando em níveis fisiológicos ou quando suplementado em doses terapêuticas em condição de deficiência (OLECHNOWICZ *et al.*, 2018). Apesar de numerosos trabalhos descreverem essas propriedades do Zn^{+2} , quando há excesso deste elemento, outros estudos referem aumento de lipoproteínas e maior risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica (GHASEMI *et al.*, 2014; ROTTER *et al.*, 2015). Embora os mecanismos sejam pouco

esclarecidos devido às complexas interações entre o Zn^{+2} e a sinalização celular pancreática e do tecido adiposo na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios, biodisponibilidade excessiva de Zn^{+2} pode promover obesidade, aumento do número de adipócitos e da deposição de gordura no tecido adiposo em humanos e outros animais (GHASEMI *et al.*, 2014).

Metais mensurados na carne de peixe

O ecossistema aquático pode acumular grandes concentrações de metais pesados que não são biodegradáveis, permitindo exposição e transferência destes a vários outros organismos (VOIGT; SILVA; CAMPOS; 2016). Os metais pesados são introduzidos no ambiente de forma natural, agrícola, industrial, atmosférica, por meio de efluentes domésticos e, ao atingir os rios, contaminam os seres aquáticos, que são fonte de alimento para o ser humano, tornando-se uma das fontes de contaminação por metais pesados (SOUZA, MORASSUTI, DEUS, 2018).

Os metais pesados podem acumular no organismo humano por meio do consumo de água, alimentos contaminados ou por inalação. O peixe pode conter determinados tipos de metais pesados que podem se acumular em diferentes órgãos, como o fígado e as brânquias do animal, e também no músculo, que é a parte mais consumida pelos seres humanos. Conforme prazo e intensidade de consumo, pode ocorrer biomagnificação do acúmulo de metais pesados ao longo dos diversos níveis tróficos da cadeia alimentar, o que afeta diretamente os seres humanos, posto que são os últimos membros da cadeia alimentar (DORNELLES, 2016; MOURO *et al.*, 2019).

Verificou-se no estudo de Grpta *et al.*, 2022 que os níveis altos de determinados metais pesados, dentre eles destaca elevado teor de Zinco, contido na água de rios podem gerar resistência aos antibióticos, se tornando assim um grande problema de saúde pública além da prejuízos para o meio ambiente. Mesmo metal encontrado em quantidade significativamente altas nos peixes do nosso estudo.

Considerando um cenário mais amplo, segundo a Organização Panamericana da Saúde (OPAS, 2019), estima-se que 77 milhões de pessoas tem algum episódio de doenças transmitidas por alimentos nas Américas e crianças menores de 5 anos perfazem 40% do total de doenças transmitidas por alimentos, totalizando 125 mil mortes por ano. Como as doenças transmitidas por alimentos influenciam negativamente o desenvolvimento socioeconômico, sobrecarregam os sistemas de saúde e impactam a economia nacional, o turismo e o comércio, medidas emergenciais são necessárias para minimizar essa realidade acerca da saúde da

população, o que beneficiaria não apenas os seres humanos, mas também as demais formas de vida dos ecossistemas.

A presença de Zn^{+2} e Al^{+3} na carne de peixes do rio Cachoeira maior que na de peixes de cultivo evidencia o grau de poluição do rio Cachoeira, devido ao descarte de resíduos advindos de atividade industrial ou efluentes domésticos não tratados, que são tóxicos ao meio ambiente e à vida marinha que nele se desenvolve. Acrescenta-se a isso o risco à saúde dos cidadãos que consomem o peixe deste rio. Destaca Chaves (2017) que, no território de Santa Catarina, 50% dos recursos hídricos estão contaminados com metais pesados, agrotóxicos, efluentes urbanos e industriais, e rurais. Assim, além da presença de metais pesados, vários outros tipos de compostos químicos podem contribuir para toxicidade importante ou interagir com os metais e aumentar seus efeitos nocivos aos organismos.

O Al^{+3} consegue atravessar a barreira hematoencefálica, acumula no encéfalo e guarda relação com vários transtornos neurológicos, como: encefalopatia, tremor, espasmos, déficit de memória, enfraquecimento da coordenação motora, lentidão dos movimentos lentos, convulsões, doença de Alzheimer e demência (WU *et al* 2012). Nos rins, além da hepato e nefrotoxicidade discutidas, o acúmulo de Al^{+3} pode causar depleção do ferro em pessoas com queda da função renal e diminuição na síntese do ferro heme, levando a anemia microcítica. Portadores da doença celíaca podem ter permeabilidade intestinal aumentada para Al^{+3} e, assim, desenvolver doença óssea (osteomalácia) relacionada a este metal pesado (CHAPPARD, MABILLEAU, HUBERT 2016).

O Zn^{+2} possui amplos usos industriais contemporâneos: na indústria automobilística, de construção civil, eletrodomésticos, cerâmica, borracha, tintas, têxtil e farmacêutica (fabricação de desodorantes, filtros solares, fórmulas para o tratamento de micoses, acne, caspa). Esse metal pode depositar-se no fundo de rios e lagos e uma menor parte pode estar dissolvida na água ou permanecer como partículas suspensas. A exposição crônica ao Zn^{+2} pode causar anemia, redução de C-HDL e toxicidade pancreática (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2022).

Condições de toxicidade atribuídas ao Zn^{+2} incluem dose alta de suplementação, que tem aumentado devido à falta de conscientização e a emissão de vasta quantidade de Zn^{+2} por fontes naturais e antropogênicas, que causam sua entrada nas cadeias alimentares, resultando em biomagnificação em organismos vivos (HUSSAIN *et al.*, 2022). Embora a toxicidade em

humanos advinda do excesso de Zn^{+2} seja uma condição tratável e não ameaçadora à vida, vários sintomas que impactam a qualidade de vida incluem febre, dispneia, náusea, dor torácica, gastrointestinal, fraqueza muscular e tosse (HUSSAIN *et al.*, 2022). Entretanto, no presente estudo, houve exposição crônica cumulativa e concomitante ao Zn^{+2} e ao Al^{+3} , tornando o grau de toxicidade mais intenso, de modo a afetar significativamente os biomarcadores discutidos ao ponto de causar óbito. Isto é, o acúmulo desses metais e, possivelmente, de outros compostos químicos também tóxicos que podem ser transferidos por meio ingestão da carne de peixe contaminada salientam a obrigatoriedade da necessidade da implantação de medidas de recuperação e sustentabilidade dos ecossistemas e também de sensibilização da população acerca da preservação ambiental e do risco do consumo de alimentos provenientes de fontes cuja qualidade é questionável.

CONCLUSÃO

Observou-se que o consumo de carne de tilápia cozida do rio Cachoeira por 9 meses aumentou significativamente a peroxidação lipídica em todos os órgãos analisados e também a carbonilação de proteínas no cerebelo, córtex, coração e fígado, além de reduzir o conteúdo total de SH em todos os órgãos com exceção do coração. Ainda, baço, coração e rim apresentaram queda significativa da atividade da CAT enquanto córtex, fígado e eritrócitos, aumento. Baço, cerebelo, córtex, fígado apresentaram queda significativa da atividade da SOD e os eritrócitos, aumento. No cerebelo, córtex, coração e rim, houve redução significativa da atividade da GSH-Px e, no baço, fígado e eritrócitos, aumento. Acerca dos parâmetros bioquímicos, houve elevação significativa de T4L, TGP, ureia, VLDL e LDL e redução de CT e de TGO. Não houve alterações hematológicas. As alterações encontradas guardam relação com o nível maior de Al^{+3} e Zn^{+2} presente na carne de peixe do rio Cachoeira que, em longo prazo, foi intensa a ponto de causar impacto clinicamente relevante e óbito. Assim, é preciso buscar o equilíbrio do meio ambiente por meio da recuperação destas águas para que os peixes ofereçam menor risco aos seres vivos que os consomem, e um trabalho imediato de conscientização da população sobre a toxicidade em longo prazo da ingestão da carne de peixe desse rio.

REFERÊNCIAS

1. AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 121-126, 1984. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
2. ABBAS, M.; ZAKI, A. The possible ameliorative effect of zinc on aluminum induced thyroid toxicity in rats. *Mansoura Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, v. 24, n. 2, p. 97-112, 2016. DOI 10.21608/mjfmct2016.47927
3. AGUIAR, Lilian K. de; et al. Fatores associados à doença renal crônica segundo critérios laboratoriais da Pesquisa Nacional de Saúde. *Rev.Bras. Epidemiol.*, v.23, e.200101, 2020. p.1-13. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/rbepid/2020.v23/e200101/pt>. Acesso em:13 de jul de 2022.
4. AHMED S. IBRAHEEM, AMIN A. SELEEM, MOHAMED F. EL-SAYED, BASMA H. HAMAD. Single or combined cadmium and aluminum intoxication of mice liver and kidney with possible effect of zinc. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, v. 77, p. 91-101, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2016.12.004>
5. ANVISA. Contaminantes são agentes biológicos, físicos ou químicos que são introduzidos no alimento de forma não intencional e que podem trazer danos à saúde da população. Ministério da Saúde, 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/contaminantes>. Acessado 15 fev.2021.
6. ANVISA. RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0259_20_09_2002.html. Acessado 15 fev. de 2021.
7. ARORA, M. *et al.* STUDY OF TRACE ELEMENTS IN PATIENTS OF HYPOTHYROIDISM WITH SPECIAL REFERENCE TO ZINC AND COPPER. *BIOMED J SCI & TECH RES* V. 6, N. 2, P. 5100-5194, 2018. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.06.001336
8. BONDY, S. C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *Neurotoxicology*, v. 31, n. 5, p. 575-81, 2010.
9. BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. 2004.
10. BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 222, de 28 de março de 2018. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. 2018.

11. BENVENUTI, M. A.; FISCHER, L. G. Peixes: morfologia e adaptações. *Cadernos de Ecologia Aquática* v. 5, n. 2, p. 31-54, 2010.
12. CHAVES, T. F. Uma análise dos principais impactos ambientais verificados no Estado de Santa Catarina. *R. gest. sust. ambient.*, v. 5, n. 2, p. 611- 634, 2017.
13. CHAPPARD, D.; BIZOT, P. MABILLEAU, G.; HUBERT L. Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al^{+3} deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie*, v. 100, p. 95-105, 2016.
14. CHERAGHI, E.; ROSHANAIEI, K. The protective effect of curcumin against aluminum chlorideinduced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Pharm Biomed Res* 2019; 5(1): 11
15. DORNELLES, F. N. Avaliação de cobre e zinco em água, sedimento e peixes do Rio Apucarantina na região da Terra Indígena Apucarana (Tamarana, PR). 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2016.
16. DUSSE, L. M. S.; RIOS, D. R. A; SOUSA, L. P. N.; MORAES, R. M. S.; DOMINGUETI, C. P.; GOMES, K. B. Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente? *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 2016. DOI: 10.21877/2448-3877.201600427
17. EL-MOSELHY K. M., OTHMAN A. I., EL-AZEM H.A., EL-METWALLY M. E. A., 2014 Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 30:1-9.
18. FALUDA.A, FILHO W.S. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol.* 109 (2 Supl 1) • Ago 2017 • <https://doi.org/10.5935/abc.20170121>.
19. GALIB SM, MOHSIN A.B.M, PARVEZ M.T, LUCAS M.C, CHAKI N, ARNOB S.S, HOSSAIN MI, ISLAM M.N. 2018. Municipal wastewater can result in a dramatic decline in freshwater fishes: a lesson from a developing country. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.*, 419, p.1-12. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018025>.
20. GHASEMI A, ZAHEDIASL S, HOSSEINI-ESFAHANI F, AZIZI F. Gender differences in the relationship between serum zinc concentration and metabolic syndrome. *Ann Hum Biol.* 2014;41(5):436–442
21. GRIESSER, E.; VEMULA, V.; RAULIEN, N.; WAGNER, U.; REEG, S.; GRUNE, T.et al. Crosstalk between lipid and protein carbonylation in dynamic cardiomyocyte model of

- mild nitroxidativestress. *Redox Biology*. Volume 11, April 2017, Pages 438-45
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.028>.
22. GUPTA, S., GRAHAM, D., SREEKRISHNAN, T., & AHAMMAD, S. Efeitos da poluição por metais pesados na co-seleção de resistência a metais e antibióticos em rios urbanos no Reino Unido e na Índia. *Poluição Ambiental*, 2022. 119326. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119326
 23. HE, L. *et al.* Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 44, n.2, p. 532-553, 2017.
 24. HUSSAIN, S.; KAHN, M.; SHEIKH, T. M. M.; MUMTAZ, M. Z. ET AL. Zinc essentiality, toxicity, and its bacterial bioremediation: a comprehensive insight. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, article 900740, 2022. DOI 10.3389/FMICB.2022.900740.
 25. IBRAHIM, H. S. et al. Effect of Selenium and Zinc Supplementation on Hypothyroidism in Rats. *ARC Journal of Nutrition and Growth (AJNG)* Volume 2, Issue 2, p. 16-27, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.20431/2455-2550.0202002>
 26. IMAM T. S., KHALIFA H.A., HUSSEIN H. M., ALI H.A. Aluminum –Induced Oxidative Stress and Hepato -Renal Impairment in Male Albino Rats: Possible Protective trial with Naringenin. *Life Sci J* 2016;13(1s):93-104]. ISSN 1097-8135 (print); ISSN 2372-613X (online) <http://www.lifesciencesite.com>. 10. doi:10.7537/marslsj1301s1610.
 27. IGBOKWE I.O; IGWENAGU E; IGBOKWE N.A; Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects.2019 Oct;12(2):45-70. DOI: 10.2478/intox-2019-0007.
 28. JEN, M.; YAN, A.C. Syndromes associated with nutritional deficiency and excess. *Clin Dermatol.*, v.28, n.6, p.669-85, nov./dez. 2010
 29. KLOTZ K, WEISTENHÖFER W, FRAUKE N, HARTWIG A, VAN THRIEL C, DREXLER H. The Health Effects of Aluminum Exposure. *Dtsch arztebl Int* 114: 653-659, 2017.
 30. KUMAR, V., & GILL, K. D. *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: 2014. A review. NeuroToxicology*, 41, 154–166. doi:10.1016/j.neuro.2014.02.004
 31. LASKOWSKI W, GÓRSKA-WARSEWICZ H, KULYKOVETS O. Meat, Meat Products and Seafood as Sources of Energy and Nutrients in the Average Polish Diet. *Nutrients*. 2018; 10(10):1412. <https://doi.org/10.3390/nu10101412>
 32. LIMA, D.P. Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do rio

33. cassiporé, estado do amapá, Amazônia, Brasil. Macapá, 2013
34. MARKLUND, S. F. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett*, v. 184, n. 2, p. 237–239, 1985. DOI:10.1016/0014-5793(85)80613-x
35. MARET, W. The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019.doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019
36. MOURO, V, G, S et al. Subacute Testicular Toxicity to Cadmium Exposure Intraperitoneally and Orally. *Oxidative medicine and cellular longevity*, Volume 2019 |Article ID 3429635 | <https://doi.org/10.1155/2019/3429635>
37. MORINA A., MORINA F., DJIKANOVIC V., SPASIC S., KRPO-CETKOVIC J., KOSTIC B., LENHARDT M . Common barbel (*Barbus barbus*) as a bioindicator of surface river sediment pollution with Cu and Zn in three rivers of the Danube River Basin in Serbia. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, 23:6723-6734.
38. MOSTAFA, H.; ALAA-ELDIN, E. A.; ABOUHASHEM, N. S.; EL-SHAFEI, D. A. Toxic Potentials of Aluminum Exposure on the Brain, Liver and Kidney in Adult Male Albino Rats: Biochemical, Histopathological and Immunohistochemical Study. *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol.* V. 21, N. 2, P. 49-72, 2013. DOI 10.21608/MJFMCT.2015.47280
39. NAZERI, P., SHAB-BIDAR, S., PEARCE, E. N., & SHARIAT, M. Thyroglobulin concentration and maternal iodine status during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Thyroid*. doi:10.1089/thy.2019.0712
40. NOVOSLAVSKIJ, A., TARENTJEVA, M., EIZENBERGA, I. et al. Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Ann Microbiol* 66, 1–15 2016. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1102-5>
41. OLIVEIRA K.J F, KOURY, J. C., DONANGELO, C. M.. Micronutrientes e capacidade antioxidante em adolescentes sedentários e corredores. *Rev. Nutr.* 20 (2) Apr 2007 • <https://doi.org/10.1590/S1415-52732007000200006>
42. OKAIL, H. A.; IBRAHIM, A. S.; BADR, A. H. The protective effect of propolis against aluminum chloride-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *The Journal of Basic and Applied Zoology* (2020) 81:34. <https://doi.org/10.1186/s41936-020-00169-9>.
43. OLECHNOWICZ J, TINKOV A, SKALNY A, SULIBURSKA J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol Sci*. 2018 Jan;68(1):19-31. doi: 10.1007/s12576-017-0571-7.

44. PINHEIRO, P. C., DALCIN, R. H., & BATISTA, T. T. (2017). A ictiofauna de áreas com interesse para a proteção ambiental de Joinville, Santa Catarina, Brasil. *Acta Biológica Catarinense*, 4(3), 73-89.
45. PRASAD, A. S., & BAO, B. Molecular Mechanisms of Zinc as a Pro-Antioxidant Mediator: Clinical Therapeutic Implications. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 2019 8(6), 164. <https://doi.org/10.3390/antiox8060164>
46. PROGRAMA INTERNACIONAL DE SEGURANÇA QUÍMICA SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS PERIGOSAS À SAÚDE E AO AMBIENTE/Organização Mundial da Saúde, Programa Internacional de Segurança Química; tradução Janaína Conrado Lyra da Fonseca, Mary Rosa Rodrigues de Marchi, Jassyrara Conrado Lyra da Fonseca. -- São Paulo: Cultura Acadêmica, 2008.
47. PAULINO M. G., BENZE T. P., SADAUSKAS-HENRIQUE H., SAKURAGUI M. M., FERNANDEZ J. B., FERNANDES Mfernandes. N. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science of the Total Environment*, v.497-498, p. 293-306, 2014.
48. RABEH, N. M.; EL-GHANDOUR, H. A. Effect of Iron, Zinc, Vitamin E and Vitamin C Supplementation on Thyroid Hormones in Rats with Hypothyroidism. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 2016; 5(3): 201-210. doi: 10.11648/j.ijnfs.20160503.18
49. RAHIMZADEH, M. R. *et al.* Aluminum poisoning with emphasis on its mechanism and treatment of intoxication. *Emergency Medicine International*, v. 2022, p. 1-13, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/1480553>
50. RAMOUD, G. M., SHALABY, R. A. Experimental evaluation of protective action of resveratrol against aluminum- induced toxicity in male rats. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, v. 6, n. (1), p. 11-24, 2019. <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2019.06.01.-002>.
51. REZNICK& PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol.*, v. 233, p. 357-363, 1994. DOI: 10.1016/s0076-6879(94)33041-7.
52. ROTTER I, KOSIK-BOGACKA D, DOLEGOWSKA B, SAFRANOW K, LUBKOWSKA A, LASZCZYNSKA M. Relationship between the concentrations of

- heavy metals and bioelements in aging men with metabolic syndrome. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12:3944–3961
53. SANCHES FILHO, P. J.; FONSECA, V. K.; HOLBIG, L. Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. *Ecotoxicol. and Environ. Contamin*, v. 8, n. 1, p. 105-111, 2013. DOI:10.5132/eec.2013.01.015.
 54. SAMIR A, RASHED L. Effects of occupational exposure to aluminium on some oxidative stress and DNA damage parameters. *Human & Experimental Toxicology*. 2018:901-908. doi:10.1177/0960327117747024.
 55. SOUZA A,K,R; MORASSUTI; DEUS C.,Y; W de DEUSPOLUIÇÃO DO AMBIENTE POR METAIS PESADOS E UTILIZAÇÃO DE VEGETAIS COMO BIOINDICADORES. *Acta Biomedica Brasiliensia / Volume 9/ nº 3/ Dezembro de 2018*.
 56. SULE, K *et al*. Mechanisms of Co, Ni, and Mn toxicity: From exposure and homeostasis to their interactions with and impact on lipids and biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.1862, n8, p. 183250, 2020
 57. SINGH K.B. Long Term Excessive Zn Supplementation Induced Oxidative Stress in Wistar Rats Fed on Semi-Synthetic Diet, *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 3 No. 6, 2012, pp. 724-731. doi: 10.4236/fns.2012.36098.
 58. SANDHU G, Djebali D, Bansal A, Chan G, Smith SD. Serum concentrations of aluminum in hemodialysis patients. *Am J Kidney DIS* 2011;57:523-5
 59. SEVERO, J. S. S.; MORAIS, J. B. S.; FREITAS, T. E. C. ET AL. The role of zinc in thyroid hormones metabolism. *VITAMIN AND NUTRITION RESEARCH*, V. 89, N. 1-2 P. 2019. [HTTPS://DOI.ORG/10.1024/0300-9831/A000262](https://doi.org/10.1024/0300-9831/A000262)
 60. TORIANI *et al*. Preclinical Toxicological Evaluation of the Consumption of Fish from the Cachoeira River Hydrographic Basin in Rats. *International Journal of Advanced Engineering*, v. 9, n. 6, p. xx-xx, 2022. DOI: 10.22161/ijaers.96.45
 61. UYSAL K; EMRE Y; KÖSE E. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey), *Microchem J.*, v. 90, n. 1, 2008 p. 67–70, DOI:10.1016/j.microc.2008.03.005.
 62. VOIGT, C. L.; SILVA, C. P. da.; CAMPOS, S. X. de. Avaliação da bioacumulação de metais em *Cyprinus carpio* pela interação com o sedimento e água de reservatório. *Química Nova*, v. 39, n. 2, p.180-188, 2016.

63. WEBBER P., BEHR E. R., KNORR C. D. L., VENDRUSCOLO D. S., FLORES E. M. M., DRESSLER V. L., BALDISSEROTTO B. Metals in the water, sediment and tissue of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical Journal*, v. 106, p. 61-66, 2013.
64. WENDEL A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 77, p. 325-33, 1981. DOI: 10.1016/s0076-6879(81)77046-0.
65. WOLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption, 25-29 January 2010, Rome, Italy. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44666>. Acessado em: 20 fev de 2021.
66. WU, Z., DU, Y., XUE, H., WU, Y., ZHOU, B. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol Aging*. 2012 Jan;33(1): 199.e1-12.
67. JEN, M.; YAN, A.C. Syndromes associated with nutritional deficiency and excess. *Clin Dermatol*.v.28, n.6, p.669-85, nov. /dez. 2010.
68. ZSCHORNAK, T.; OLIVEIRA, T. M. N. Avaliação do impacto da implantação do sistema de esgotamento sanitário na qualidade da água da bacia hidrográfica do rio Cachoeira, em Joinville, Santa Catarina. *Revista DAE*, v. 66, n. 212, p. 118-131, 2018.
69. ZHOU, L., He, M., Li, X., Lin, E., Wang, Y., Wei, H., & Wei, X. (2021). Molecular Mechanism of Aluminum-Induced Oxidative Damage and Apoptosis in Rat Cardiomyocytes. *Biological Trace Element Research*. doi:10.1007/s12011-021-02646-W

6.4 Artigo 4: Revisão de Literatura sobre Doenças Causadas pelo Consumo de Peixe Contaminado

Doenças causadas por consumo de carne de peixe contaminada revisão de literatura.



Brazilian Journal of Development | 113999
ISSN: 2525-8761

Disorders caused by contaminated fish meat consumption: Literature review

Doenças causadas por consumo de carne de peixe contaminada: Revisão de literatura

DOI:10.34117/bjdv7n12-264

Recebimento dos originais: 12/11/2021
Aceitação para publicação: 08/12/2021

Sônia dos Santos Toriani

Post-graduation Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Joinville, SC, Brazil.
E-mail: soniatorani.nutri@gmail.com

Eduardo Manoel Pereira

Department of Pharmacy, University of Joinville Region – UNIVILLE, Joinville, SC, Brazil.

Daniela Delwing-de Lima

Post-graduation Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Joinville, SC, Brazil.

Therézinha Maria Novais de Oliveira

Post-graduation Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Joinville, SC, Brazil.

ABSTRACT

Between 2007 and 2017, Brazil registered 99,826 outbreaks of foodborne diseases and 0.84% of those were associated with fish meat intake. It is estimated that approximately 56 million infection cases occur worldwide due to raw or undercooked fish meat containing several disease-causing parasites. Hence, this study aimed to review the literature concerning diseases caused by ingestion of contaminated fish meat. Reviews, case reports and epidemiologic studies were searched in Portuguese, Spanish and English in the databases LILACS, Pubmed, Science Direct, SciELO and Scholar Google using as keywords: transmissible diseases, contaminated fish and human infections were used to retrieve papers from 2014 to 2020. Nine papers, including seven reviews, one case report and one case-control study fulfilled inclusion criteria and presented several consequences of contaminated raw or undercooked fish meat ingestion, which ranged from nematode, bacterial and toxin diseases that may cause gastrointestinal problems to allergic reactions, lung infection, endemic acute myalgia, bacteremia, meningitis and death. Growing fish meat intake in several dishes presents significant health risk due to the pathogenic potential of toxins and parasites that remain when food is consumed raw or undercooked. Tighter sanitary surveillance, population health education, training and sensitization of health professionals in recognizing and notifying cases might contribute to minimize risk.

Keywords: fish, fish meat, infectious diseases, transmissible diseases, food and nutrition safety, food safety.



RESUMO

Entre 2007 a 2017, foram notificados 99.826 mil surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Destas, 0,84% foi associado à ingestão de pescados. Estima-se que, aproximadamente, 56 milhões de casos no mundo de infecções por consumo de pescados, crus ou mal cozidos, contendo vários parasitas capazes de provocar doenças. Por isso, o presente estudo objetivou revisar a literatura acerca dos dados notificados sobre doenças alimentares causadas por ingestão de carne de peixe contaminada. Foram utilizados os bancos de dados LILACS, MEDLINE, Science direct, Google acadêmico e Pubmed para busca de artigos publicados a partir de 2014 utilizando com palavras-chave: doenças transmitidas, peixes contaminados e infecções humanas em português, inglês e espanhol, sendo incluídos relatos de caso, revisões e estudos epidemiológicos. Nove artigos foram incluídos, sendo sete revisões, um relato de caso e um estudo caso-controle, que apresentaram as consequências do consumo de carne de peixe crua ou mal cozida no que tange a causalidade de várias infecções por nematódeos, bactérias e toxinas passíveis de provocar problemas gastrintestinais agudos, reações alérgicas, infecções pulmonares, mialgia aguda endêmica, bacteremia, meningite e óbito. O consumo crescente de carne de peixe crua ou mal cozida em diversas preparações oferece risco não desprezível para a saúde, devido ao potencial patogênico dos parasitas e toxinas encontrados neste alimento. Atuação mais incisiva da vigilância sanitária, educação em saúde da população para os riscos, capacitação dos profissionais de saúde e sensibilização para notificação dos casos podem contribuir para minimizar esses riscos.

Palavras-chave: peixe, doenças infecciosas, doenças transmissíveis, segurança alimentar e nutricional, inocuidade dos alimentos.

1 INTRODUCTION

Fish meat is an especially important food for health and should be included in people's daily meals at least twice a week. It is a food rich in A, E, D, B1, B2, B5, B6 and B9 vitamins; minerals such as calcium, phosphorus, sodium, potassium, manganese, copper, cobalt, zinc, iron, iodine and all the essential amino acids in balance (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2018).

However, for the nutritional contribution to be within the appropriate safety parameters, such source of animal protein must meet the consumers' food safety standards with the desired quality. Thereby, the sites where fishes breed and are grown must be free from contaminations, since they can be transferred to the human organism after ingestion in different degrees, depending on the quantity, consumption time and contamination level of such food, which may cause significant health problems such as predisposition to cancer, cardiovascular diseases and neurotoxicity (Fernandes *et al.*, 2012; Silva, Santos, 2016).

Because fish meat presents greater possibility for microbial growth, chemical changes and breakdown by endogenous enzymes, this food is subject to rapid



deterioration. Therefore, the way of conservation, handling, processing, preserving, storage and transportation, when not carried out in the appropriate manner, following the guidelines of food safety, may cause damaging effects for the consumer's health, and it justifies measures of quality control and respective special care (FAO, 2016).

Pathologies resulting from fish meat consumption may be caused by toxins produced by the fish itself, by toxic substances or microorganisms contained in contaminated water in which fish breed, deriving from degraded areas, and waste and garbage dump sites. Contaminants may be mainly bacteria of genus *Vibrio*, *Listeria*, *Clostridium*, also A type hepatitis virus A (HAV), adenovirus, Norwalk or norovirus (Magalhães, 2012).

In order to avoid consumers' exposure to diseases arising from ingested fish, food safety must be focused on the guaranty of the commercialized fish integrity, by means of systematic practice of the best procedures on handling employed by the fishing industry, thereby ensuring the product quality from catching to handling. However, once consumed raw, semi-raw or partially smoked, and when the appropriate measures of control and prevention are not taken, the consumption of this type of food may become a problem for public health (FAO, 2016). Aiming to know the main diseases transmitted by the consumption of contaminated fish, a literary review was performed on the cases of notified diseases caused by the consumption of fish meat.

2 METHODOLOGY

In this review, articles indexed in the following data bases were searched: Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS), Science direct, Google scholar and Pubmed. The search was performed between May and June 2020 in the Portuguese, English and Spanish languages, using the keywords: transmitted diseases, contaminated fish and human infections. Articles which got off the subject and publications preceding 2014 were excluded. Type of studies included were: reviews, epidemiological studies, and confirmed notified case reports on diseases transmitted by the consumption of contaminated fish found in the indicated bases published from January 2014 to December 2020.

3 RESULTS

A total of 28 articles were found. Nonetheless, only nine fulfilled the inclusion criteria. The remaining articles were excluded for they did not match the issue of the review, for not providing information proving the infections by means of medical diagnosis with notification of disease caused by the consumption of contaminated fish, and a mycobacterial infection case



report was excluded because it was not a disease caused by ingestion, but by contact with contaminated fish. Among the works included, there are seven literature review, a case report, and a case-control study.

The review of Oliveira *et al.* (2017) focused on cases of diphyllbothriasis resulting from consumption of raw fish meat in preparations such as sushi and sashimi and reported 92 notified cases (68 in São Paulo state). The disease most prevalent symptoms were abdominal cramps, diarrhea and weakness. The epidemiological inquiry showed that salmon imported from Chile and consumed raw (sushi and sashimi) were the species responsible for the outbreak. Dias *et al.* (2016) described the condition of a 25-year-old female patient weighting 49 kg who reported nausea, abdominal pain, weight loss, epigastric pain, and continuous diarrhea due to consumption of semi-raw fish two month before the symptom's onset. The diagnosis of diphyllbothriasis was achieved two days after the first symptoms appeared due to evidence of *Diphyllbothrium latum* eggs.

The study of Serrano-Moliner, Noralez-Suares-Varela, Valero (2018) reviewed the cases of nematodiasis registered from 2000 to 2016 in countries of the European Union and found 1523 cases, which were 1493 autochthonous and 30 imported. Several parasites were detected, namely: *Toxocara* spp (34.7%), *Ascaris lumbricoides* (27.1%), *Trichinella* spp (21.9%), *Anisakis* spp (15.5%) and *Angiostrongylus cantonensis* (0.8%).

Guardone *et al.* (2018) reviewed the occurrence of anisakiasis in Italy and 73 cases were found. The parasite was detected by endoscopy (51.4%) and laparotomy (48.6%). Intestinal (42.5%), stomach (43.8%), esophageal (1.4%) and ectopic (peritoneum and spleen – 12.3%) infection sites were observed. In most of the patients the source of infection was raw or undercooked anchovy (65.7%), followed by sardine (15.1%) and generic raw seafood (15.1%). Dominant symptoms were acute or chronic abdominal pain, nausea and diarrhea (less frequent) within a week after the consumption of fish meat. Ten cases of allergic reaction were confirmed.

The review of Eiras *et al.* (2018) analyzed cases of nematodiasis notified in travelers returning to 22 countries and found 100 cases, involving *Gnathostoma* sp. as the most frequent (85 cases), *Capillaria philippinensis* (8), *Anisakis simplex* (6 cases) and *Angiostrongylus cantonensis* (1 case). Bravo and Gontijo (2018) reviewed the clinical characteristics of the presentation of gnathostomiasis, parasitosis associated to the consumption of raw or marinated fish meat in the form of sushi, sashimi or ceviche, which, although being endemic in Southeast Asia, Japan and Latin America, increased number of cases has been observed in travelers who returned to non-endemic areas (USA



and Europe), and increase of reports of autochthonous cases in non-endemic countries (Brazil and Colombia), suggesting that the distribution of the parasite may be broader than it is known. However, this study did not bring data on the prevalence of the cases.

Souza *et al.* (2015) reviewed scombrototoxicosis cases (severe case of histamine intoxication) and highlight the relevance of quality control of histamine concentration in the fish. Since 1970, countries with the greatest rates of cases are Japan, the United States, and the United Kingdom (Food and Drug Administration, FDA, 2011), however there were reports of outbreaks in several other countries such as France, Denmark, and Canada. Asia is the continent with the greatest number of cases described. In the continent, histamine intoxication was the biggest cause of diseases in the 1950's and, to this day, it is the largest cause of intoxications (Cinquina *et al.*, 2004). According to FDA (2011), from 1960 to 1980, there were 42 outbreaks described in Japan, totaling 4,122 intoxicated individuals.

Tan *et al.* (2016) conducted a case-control study in Singapore to investigate the association of the consumption of yusheng, a raw fish-based dish (bighead carp and snakehead) with an outbreak of group B streptococcal bacteremia serotype III ST-283 in 2015. In the comparison of 40 cases with 58 controls, odds ratio of 5.1 was found to this relation, suggesting close involvement with the consumption. Age older than 65, diabetes, and cardiovascular disease were also risk factor with significant odds ratio.

Marques, Costa, Bentes (2017) reviewed the clinical presentation of acute epidemic myalgia with a view to alert the medical community after an outbreak in Salvador (BA), Brazil in December 2016, in which, nine patients from three different families presented in hospital reporting widespread severe muscular pain which evolved to rhabdomyolysis. The outbreak spread rapidly and by January 24th, 2017 there were 64 suspected cases notified and two deaths. The intoxication after fish meat intake (Haff disease) was considered the most probable source of the outbreak.

4 DISCUSSION

Considering the increase in the consumption of fish meat worldwide and the range of diseases susceptible to be contracted by means of raw or undercooked fish meat consumption, few articles on the risks were found. However, they emphasize the importance of a more prudent look at such practice, considered the pathogenic potential of the parasites found in fish meat.



Diphyllobothriasis was a non-existing disease in Brazil, but in 2004 it caused an outbreak in São Paulo state due to consumption of salmon in the form of sushi and sashimi (Oliveira *et al.*, 2017). Diphyllobothriasis is also known as “fish tapeworm” disease, and it is a parasite zoonosis of broad geographical distribution, caused by the ingestion of fish infected with the *Diphyllobothrium spp* parasite larvae and consumed raw, undercooked, smoked in inappropriate temperatures or submitted to insufficient freezing, causing long-term intestinal parasitosis in human beings (Arrais *et al.*, 2017).

Toxocarosis was the most frequent parasitosis indicated in the Serrano-Moliner, Noralez-Suares-Varela, Valero (2018) study. It is an infection more common in pediatric population, occasioned by the intake of eggs present in the soil, contaminating most frequently children living in areas with poor sanitation system, who live together with pets and who practice geophagy (Mota *et al.*, 2016). The human being is, in fact, an accidental host and the contamination may also take place by intaking undercooked food. Since maturation of the larvae is not possible in the human gastrointestinal system, it provokes its migration to several tissues, bringing to local inflammation of variable severity caused by the disease (Mota *et al.*, 2016).

The occurrence of ascariasis was also relevant in the previous review, which is a parasitosis related to poor hygiene, and the most frequent human geohelminthiasis in countries in which there is no adequate sanitation. The main disease carriers are children aging from 1 to 12 year, who can be asymptomatic or present abdominal pain, nausea, anorexia and, when the infection is more intense, intestinal obstruction (Marquetti, Carlotto, 2019). The parasite larvae may infect the lungs and cause bronchospasm, pneumonitis, and hemoptysis (Marquetti, Carlotto, 2019).

Serrano-Moliner, Noralez-Suares-Varela, Valero (2018) and Guardone *et al.* (2018) identified several cases of anisakiasis, disease caused by the ingestion of larvae of Anisakidae family nematode present in raw, marinated or undercooked fish meat. The human being is an accidental host and the infection courses with clinical picture marked by acute gastrointestinal symptomatology, though allergic reactions have also been observed (Aibinu, Smooker, Lopata, 2019). The authors emphasize high risk for those parasitoses and corresponding impact on public health and emphasize that the low number of notified cases conflicts with the frequent occurrence of such parasite in a broad range of Mediterranean fish, including those consumed marinated or raw, suggesting the human infections are underestimated, partly due to the fact that they are self-limited,



underreported, and diagnosed inappropriately because of little knowledge on human parasitology linked to seafood by the physicians.

However, in terms of impact on public health, *Trichinella* spp was the most important parasite found in the Serrano-Moliner, Noralez-Suares-Varela, Valero (2018) review because it may cause overly aggressive clinical picture liable to cause death. Trichinellosis is acquired by the ingestion of wildlife species undercooked meat (game meat) containing cysts with larvae of the respective nematode and their wild hostess include wild boar, bears and walruses (McIntyre *et al.*, 2007). The infection intensity is proportional to the number of larvae, assuming acute gastrointestinal symptomatic presentation, but it can evolve to striated muscles, pulmonary, cardiac, cerebral, and meningeal infection according to the parasites that infect those tissues, and it can evolve to death (McIntyre *et al.*, 2007). *Angiostrongylus cantonensis* was the least found parasite, however it is responsible for causing eosinophilic meningitis (Espirito-Santo *et al.*, 2013), therefore the risk of contamination by such parasite is not negligible.

Eiras *et al.* (2018) and Bravo and Gontijo (2018) studies highlight the gnathostomiasis as another parasitic nematodiasis acquired by the consumption of raw or undercooked fish meat containing the tertiary infective larvae. Some people may be infected by the intake of live fish, such as loaches, consumed in such way associated with whiskey or rice wine in Japan (Eiras *et al.*, 2018). Drinking water containing crustaceans (*Cyclops*) which act like intermediary hostess of larvae may also allow contamination (Subhedar *et al.*, 2014). The infection presents cutaneous symptoms (migratory nodular dermatitis or panniculitis), which oscillate in gravity and may have chronic course, however more severe complications may arise when deeper structure are invaded, such as lungs, mediastinum, eyes or central nervous system, because the parasite causes direct trauma injuries to the tissues and also by secretion of proteolytic and hemolytic compounds associated with tissue inflammation secondary to the intense eosinophilia (Bravo, Gontijo, 2018). The authors emphasize that few physicians who operate in non-endemic zone know those parasites, which results in difficulty to recognize the symptoms.

Intestinal capillariasis is rare, however it is a recognized nematodiasis arising by raw or undercooked fish meat ingestion due to high mortality aligned with delayed diagnosis and treatment, which frequently result in death because of protein loss by gastroenteropathy. Low incidence may be related to the fact that the endemic areas are farther from the most common tourism locations (Eiras *et al.*, 2018).



The formation of histamine in the fish and consequent risk for scombrototoxicosis motivate the traceability of that substrate, and it is an important quality criterium, since its levels are low in newly-captured fish and increase as they deteriorate, thereby indicating the fish freshness (Ntzimani *et al.*, 2008). Fish of families Scombridae (tuna, bonito, mackerel), Scomberesocidae (sand diver), Pomatomidae (bluefish), Coryphaenidae (common dolphinfish), Carangidae (yellowtail amberjack), Clupeidae (herring, sardine) and Engraulidae (anchovy) are the most involved in cases of scombrototoxicosis (Souza *et al.*, 2015), which present face and neck flushing, followed by a sensation of intense heat, face and neck rashes, general discomfort, diarrhea, intense and throbbing headache. Other signals include vertigo, pruritus, fainting spells, mouth and throat burning sensation and dysphagia (González *et al.*, 2020).

Souza *et al.* (2015) did not find official data on the occurrence of intoxication by histamine in Brazil and emphasize that many cases are not notified because it is not a disease with obligatory notification. In addition, intoxication symptoms may be mild and may not motivate the search for specialized care and the physicians, which, frequently, are unaware of the intoxication, which minimizes its consideration as diagnosis. Authors emphasize Evangelista's work (2010), who described the detection of histamine in scombrid related to three intoxication outbreaks involving tuna in the northeast region which affected a total of 25 people.

Apart from the previous complications, the finding of positive association between the consumption of yusheng and group B streptococcal bacteremia impresses by its gravity related to consumption of raw fish meat, which far exceeds the other clinical presentations described previously. The fact that the number of weekly cases dropped from 26 to only 5 after public health alert to interrupt the sale of raw fish-based dishes prepared with bighead carp and snakehead corroborates with the finding in the case-control study (Tan *et al.*, 2016).

The endemic acute myalgia outbreak, described by Marques, Costa, Bentes (2017) associated with consumption of raw or undercooked fish was characterized by short period of time between the emergence of myalgia and the exposition among affected family members, suggesting viral etiology or simultaneous exposure to a toxin. Despite both hypotheses have been investigated, Haff disease was taken as probable final cause of the outbreak. Rhabdomyolysis associated to Haff disease is considered an emerging disease, due to the increase in the consumption of fish meat and other freshwater crustaceans, and it is attributed to a toxin (unidentified), due to the rapid

Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.12, p.113999-114012 dec. 2021



Brazilian Journal of Development | 114007
ISSN: 2525-8761

evolution and absence of fever (Júnior *et al.*, 2016). Rhabdomyolysis evolves with muscle necrosis which liberates the protein myoglobin to the circulation and may cause rapid renal failure (Marques, Costa, Bentes, 2017). Haff disease and all rhabdomyolysis cases must be aggressively treated for prevention of severe metabolic and renal effects, which may lead to acute renal failure and other causes of morbimortality (Júnior *et al.*, 2016).

It is a basic human right to live in food security condition (Brasil, 2007), that guarantees to everybody regular and permanent access to quality food, in sufficient amount and based on health-promoting eating habits and which are socially, economically and environmentally sustainable (Brasil, 2013). Therefore, fish coming from aquaculture and fishing must meet the quality desired by the industry and the consumers by means of quality control in all phases of the production chain (collection, handling, conservation and preparation) (Brasil, 2013). The whole productive sector involved in the production of fish meat must actively participate in the public policies that guide the quality of this food due to its nutritional importance and to guarantee their safety (Cribb, Filho, Mello, 2018).

In view of the several risks linked to the consumption of raw or undercooked fish meat, ranging from gastrointestinal problems to allergic reactions and death, it is indispensable that the best practices for fishing, handling, preserving and cooking fish meat are adopted. Since it contains more water and less muscle fiber, fish meat is more susceptible to deterioration and contamination by several microorganisms such as virus, bacteria and worms, which may cause serious problems to human health. Therefore, for a safe fish consumption aiming to prevent these infections, such food must be apparently healthy, clean and be prepared with filtered water and well cooked.

Tighter action of the sanitary surveillance to audit the applying of the procedures of contaminants control, encouragement of notification of cases by healthcare professionals, and guidelines on safer ways of consuming fish meat to the population, emphasizing the risks of ingestion of raw or undercooked food will contribute to minimize the incidence of complications.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - 00.889.834/0001-08 for the scholarship support.

Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.12, p.113999-114012 dec. 2021



Brazilian Journal of Development | 114008
ISSN: 2525-8761

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.



REFERENCES

- Aibinu, I. E., Smooker, P. M., Lopata, A. L. (2019). Anisakis nematodes in fish and shellfish – from infection to allergies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **9**, p. 384-393. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626974/>. Access on 24 jan. 2021. Doi: 10.1016/j.ijppaw.2019.04.007.
- Arrais, B. R., Cruz, C. A., Bartoli, R. B. M., Paula, E. M. N. (2017). Difilobotriase: revisão de literatura. *Nucleus Animalium*, **9**(1), p. 35-40. Available from <https://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/animalium/article/view/1797>. Access on 25 jan. 2012. Doi: 10.3738/21751463.1797.
- Brasil. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. Avaliação de políticas e programas do MDS: resultados: Bolsa Família e Assistência Social. / Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome; Secretaria de Avaliação e Gestão da Informação – Brasília, DF: MDS; SAGI. 2007. Available from <https://fpabramo.org.br/acervosocial/wp-content/uploads/sites/7/2017/08/449.pdf>. Access on 18 fev. 2021.
- Brasil. Ministério do Desenvolvimento Social. O Direito Humano à Alimentação Adequada e o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Brasília: ABRANDH, 2013. Available from http://www.mds.gov.br/webarquivos/publicacao/seguranca_alimentar/DHAA_SAN.pdf. Access on: 26 jan. 2021.
- Bravo, F., Gontijo, B. Gnathostomiasis: an emerging infectious disease relevant to all dermatologists. (2018). *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **93**(2), p. 172-180. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962018000200172&lng=en&nrm=iso. Access on 25 jan. 2021. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20187498.
- Cinquina, A. L., Longo, F., Cali, A., de Santis, L., Baccelliere, R., Cozzani, R. (2004) Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *Journal of Chromatography*, **1032**(1-2), p. 79-85. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15065780/>. Access on 25 jan. 2021. Doi: 10.1016/j.chroma.2003.11.033.
- Cribb, A. Y., Filho, J. T., Mello, S. C. R. P. (2018). Manual técnico de manipulação e conservação de pescados. Brasília: Embrapa. 2018. Available from <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1110125/manual-tecnico-de-manipulacao-e-conservacao-de-pescado>. Access on 26 jan 2021.
- Dias, A. S., Oliveira Junior, L. A. T., Lafayette, E. P., Melotti, V. D. (2016). Ocorrência de difilobotriose em um paciente no sul do Estado do Espírito Santo. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, **5**(3), p. 200-205. Available from <https://portalrevistas.ucb.br/index.php/rmsbr/article/view/6627/4893>. Access on 15 fev. 2021.



Eiras, J. C., Pavanelli, G. C., Takemoto, R. M., Nawa, Y. (An overview of fish-borne nematodiasis among returned travelers for recent 25 Years – unexpected diseases sometimes far away from the origin. (2015). *Journal of Travel Medicine*, **22**(1), p. 328–332. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6046559/>. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.3347/kjp.2018.56.3.215.

Espirito-Santo, M. C. C., Pinto, P. L. S., Mota, D. J. G., Gryscek, R. C. B. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. (2013). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **55**(2), p. 129-132. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003646652013000200129&lng=en&nrm=iso. Access on 25 jan. 2021. Doi 10.1590/S0036-46652013000200012

Evangelista, W. P. Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009 [thesis on the internet]. Belo Horizonte: Federal University of Minas Gerais; 2010 [cited 18 feb. 2021]. Available from https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS8D4MWY/1/warley_p_evangelista_2010.pdf. Access on 15 feb. 2021.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2016. Available from http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2016_USBcard/booklet/web_i9942t.pdf. Access on 15 feb. 2021.

Food and Drug Administration (FDA). Fish and fishery products hazards and controls guidance. 4 ed. Washington: Office of Seafood; 2011. Chap. 7, pp.113-152.

Fernandes, A. C., Medeiros, C. O., Bernardo, G. L., Ebone, M. V., Di Pietro, P. F., Assis, M. A. A. *et al.* (2012). Benefits and risks of fish consumption for the human health. *Revista de Nutrição*, **25**(2), p. 283-295. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141552732012000200010&lng=en&nrm=iso. Access on 15 Feb. 2021. Doi:10.1590/S1415-52732012000200010.

González, M. C., Díaz, A. C., Moncayo, J. G., Marín, J. A. Intoxicación escombroide secundaria al consumo de atún: presentación de un caso. (2020). *Biomedica*, **40**(4), p. 594-598. Available from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012041572020000400594&lng=en&nrm=iso. Access on 25 Jan. 2021. Doi: 10.7705/biomedica.5283.

Guardone, L., Armani, A., Nucera, D., Constanzo, F., Mattiucci, S., Bruschi, F. Human anisakiasis in Italy: a retrospective epidemiological study over two decades. (2018). *Parasite*, **25**(1), p. 1-21. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6065268/>. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.1051/parasite/2018034.



- Júnior, O. T., Roderjan, C. M., Neto, E. C., Ponte, M. M., Seabra, M. C. P., Knibel, M. F. (2013). Doença de Haff associada ao consumo de carne de *Mylossoma duriventre* (pacu-manteiga). *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, **25**(4), p. 348-351. Available from https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103507X2013000400348&script=sci_abstract&lng=pt. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.5935/0103-507X.20130058.
- Magalhães, A. M. S., Costa, B. S., Tavares, G. C., Carvalho, S. I. G. (2012). Zoonoses parasitárias associadas ao consumo de carne de peixe cru. *PUBVET*, **6**(25), p. 1-48. Available from <https://www.pubvet.com.br/uploads/b8661657aea78baac0424af73dc3db21.pdf>. Acesso em 14 feb. 2021.
- Marques, B. A.; Costa, G. A.; Bentes, A. A. (2017). Mialgia aguda epidêmica. *Revista Médica de Minas Gerais*, **27**(3), p. S68-S72. Available from <http://rmmg.org/artigo/detalhes/2107>. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.5935/2238-3182.2017003.
- Marquetti, C. P.; Carlotto, M. S. (2019). *Ascaris lumbricoides*: revisão de literatura. *Revista de Enfermagem e Saúde Coletiva*, **4**(1), p. 2-7. Available from <https://revesc.org/index.php/revesc/article/view/28>. Access on 15 feb. 2021.
- McIntire, L., Pollock, S. L., Fyfe, M., Gajdhar, A., Isaac-Renton, J., Fung, J., Morshed, M. (2007). Trichinellosis from consumption of wild game meat. *Canadian Medical Association Journal*, **176**(4), p. 449-451. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17296956/>. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.1503/cmaj.061530.
- Mota, A. F., Machado, V., Peças, S., Viegas, V., Emilio, A., Vicente, M. (2016). *Toxocara canis*, o passageiro clandestino de um voo. *Nascer e Crescer*, **25**(2), p. 113-117. Available from http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S087207542016000200010&lng=pt&nrm=iso. Access on 25 jan. 2021.
- Ntzimani, A. G., Paleologos, E. K., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2008). Formation of biogenic amines and relation to microbial flora and sensory changes in smoked turkey breast fillets under various packaging conditions at 4 degrees C. *Food Microbiology*, **25**(3), p. 509-517. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18355676/>. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.1016/j.fm.2007.12.002.
- Oliveira, S. S. S., Nunes, E. C., Sousa, A. P. P., Marques, F. D., Ramos, I. S., Silva, M. B. et al. (2017). Estudo do número de casos de difilobotriase no Brasil. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, **13**(2), p. 29-38. Available from <http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/view/3252/2349>. Access on 25 jan. 2021.
- Serrano-Moliner, M.; Noralez-Suares-Varela, M.; Valero, M. A. Epidemiology and management of foodborne nematodiasis in the European Union, systematic review 2000–2016. (2018). *Pathogens and Global Health*, **112**(5), p. 249-258. Available from



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6225410/>. Access on 25 Jan. 2021. Doi: 10.1080/20477724.2018.1487663.

Silva, C. A., Santos, S. O. Avaliação do potencial risco à saúde humana de metais pesados em peixes marinhos consumidos em Aracaju, Maceió e Salvador, Brasil. (2016). Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. Available from <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157184/1/BP-126.pdf>. Access on 15 feb. 2021.

Souza, A. L. M., Calixto, F. A. A., Mesquita, E. F. M., Packness, M. P., Azeredo, D. P. (2015). Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura. *Arquivos do Instituto Biológico*, **82**(1), p. 1-11. Available from https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180816572015000100402&script=sci_abstract&tlng=pt. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.1590/1808-1657000382013.

Subhedar, V., Nandekars S., Jain, M., Bajpai, T. (2014). Gnathostomiasis: a rare case of cutaneous creeping eruptions. *Indian Journal of Dermatopathology and Diagnosis in Dermatology*, **1**, p. 32-34. Available from <https://www.ijdpdd.com/text.asp?2014/1/1/32/135195>. Access on 15 feb. 2021.

Tan S., Lin, Y., Foo, K., Koh, H. F., Tow, C., Zhang, Y. *et al.* (2016). Group B *Streptococcus* serotype III sequence type 283 bacteremia associated with consumption of raw fish, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*, **22**(11), p. 1970-1973. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088028/>. Access on 15 feb. 2021. Doi: 10.3201/eid2211.160210

Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.12, p.113999-114012 dec. 2021



Brazilian Journal of Development

DECLARAÇÃO

A Revista Brazilian Journal of Development, ISSN 2525-8761 avaliada pela CAPES como Qualis CAPES 2019 B2, declara para os devidos fins, que o artigo intitulado "Disorders caused by contaminated fish meat consumption: Literature review" de autoria de Sônia dos Santos Toriani, Eduardo Manoel Pereira, Daniela Delving-de Lima, Therezinha Maria Novais de Oliveira, foi publicado no v. 7, n.12, p.113999-114012.

A revista é on-line, e os artigos podem ser encontrados ao acessar o link:
<https://www.brazilianjournalofdevelopment.com/index.php/BJD/issue/view/152>

DOI: <https://doi.org/10.34117/brjdv7n12-264>

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente declaração.

São José dos Pinhais, 08 de Dezembro de 2021.



Prof. Dr. Edilson Antonio Catapan
Editor Chefe



QR de validação da publicação

7. CONCLUSÃO

Em vista do consumo de peixe estar aumentando na população brasileira, sendo a tilápia um dos alimentos mais consumidos e nutricionalmente equilibrados, para garantir os benefícios à população, a qualidade total do peixe desde o cultivo, coleta e a chegada à mesa, depende da carne de peixe advir de fontes ambientais limpas e adequadas.

Quando não são oriundos de locais de cultivo adequados, como de rios contaminados, podem trazer grandes prejuízos à saúde, tais como os danos ocasionados pela presença de metais pesados na carne do peixe do rio Cachoeira, que mesmo cozida continha elevada presença de alumínio e zinco, diferente dos peixes de cultivo que não continham nenhum tipo de metal pesado.

Verificou-se que, após um mês de consumo da carne de peixe do rio Cachoeira, houve aumento de proteínas carboniladas no coração e fígado, de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado, plasma e cerebelo; redução do conteúdo total de sulfidrilas no cerebelo, fígado e coração; diminuição da atividade da superóxido dismutase no fígado, da catalase nos rins e da concentração de HDL colesterol dos animais que receberam a carne de peixe do rio em relação aos outros grupos. Esses dados evidenciam o aumento do dano oxidativo aos órgãos, de modo que, em apenas um mês de consumo da carne de peixe do rio poluído já houve estresse oxidativo relevante.

Os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo e bioquímicos dos animais de 3 e 6 meses praticamente seguiram a mesma linha de alteração, com biomarcadores aumentados para os que consumiram a carne de peixe do rio Cachoeira, que aumentou a peroxidação lipídica no cerebelo, fígado, rim, plasma, córtex (apenas após 6 meses) e coração; aumentou a carbonilação proteica no coração, plasma, fígado (após 6 meses) e córtex (apenas após 6 meses); reduziu o conteúdo de SH no cerebelo, coração, fígado e plasma (após 6 meses). A atividade da catalase aumentou no córtex, fígado, eritrócitos (após 6 meses), rim (após 6 meses) e diminuiu no cerebelo (após 6 meses), coração e rim (após 3 meses). A atividade da superóxido dismutase aumentou no córtex (após 3 meses), rim (após 6 meses) e eritrócitos (após 6 meses) e diminuiu no cerebelo (após 6 meses) e fígado (após 6 meses). A atividade da glutational peroxidase diminuiu no rim, no cerebelo, coração e fígado após 6 meses e aumentou nos eritrócitos.

Após 3 meses de exposição, houve queda de tiroxina, transaminase glutâmica oxalacética e de colesterol HDL ao passo que houve aumento de triglicérides e de VLDL. Após 6 meses, observou-se aumento de tiroxina, triglicérides, transaminase glutâmica pirúvica e ureia.

Após 9 e 12 meses de consumo de carne de peixe do rio Cachoeira, houve aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no baço, córtex, cerebelo, coração, fígado, rim e plasma, aumento de proteínas carboniladas no baço, córtex, cerebelo, coração, fígado e plasma (após 9 meses); redução de sulfidrilas no baço (após 9 meses), córtex, cerebelo, fígado e plasma.

A atividade da catalase reduziu significativamente no baço, cerebelo (após 12 meses), córtex (após 12 meses), coração, rim, porém aumentou no fígado, córtex (após 9 meses) e eritrócitos. A atividade da superóxido dismutase diminuiu no baço, córtex, cerebelo, fígado, aumentou (9 meses) e diminuiu (12 meses) nos eritrócitos e aumentou no rim (após 12 meses). A atividade da glutathione peroxidase aumentou no baço, no fígado (após 9 meses) e nos eritrócitos, mas diminuiu no córtex, cerebelo, coração, fígado (após 12 meses) e rim (após 12 meses). Após 9 meses, observou-se aumento do nível sanguíneo de tiroxina, de transaminase glutâmica pirúvica, ureia, VLDL e LDL e redução de colesterol total. Após 12 meses de exposição, houve elevação das transaminases glutâmica pirúvica e oxalacética no sangue. Não houve alterações hematológicas após qualquer período de exposição. Houve cinco óbitos após 12 meses de consumo da carne de peixe do rio Cachoeira, que apresentou nível de alumínio e zinco, respectivamente, cinco e seis vezes maior que a do peixe de cultivo.

Os dados apontam para as consequências patológicas do acúmulo desses metais conforme consumida carne de peixe contaminada em longo prazo em quantidade nutricionalmente recomendada, mesmo cozida. A exposição ao excesso de metais pesados ocasionou inibição enzimática, oxidação de biomoléculas, alteração na estrutura e conformação de proteínas, alterações no sistema redox das células, aumentando do estresse oxidativo e baixando as defesas antioxidantes.

Diante desses resultados, torna-se explícita a necessidade de uma ampla mobilização em prol da saúde e equilíbrio deste rio, que, como vários do território nacional, estão contaminados em consequência das intervenções humanas no meio ambiente, comprometendo significativamente a saúde ambiental. Dada a dificuldade de eliminação destes metais pesados, seu acúmulo no meio ambiente permitiu transferência ao longo da cadeia alimentar, com prejuízo importante aos organismos, sendo possível que ocorra até para os seres humanos que consomem a carne de peixe do rio Cachoeira.

Faz-se urgente o envolvimento dos gestores públicos, organizações estaduais de meio ambiente, ministérios públicos estaduais, organizações da sociedade civil, reconhecerem a condição do rio Cachoeira e os riscos para a saúde da população do consumo de peixes coletados neste ambiente. Medidas de orientação à população, bem como intervenções voltadas para o tratamento e a recuperação deste ambiente aquático são essenciais.

8. REFERÊNCIAS

1. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2020 Veículo oficial da Associação Brasileira da Piscicultura, 2021. Disponível em file:///C:/Users/Sonia/Downloads/AnuarioPeixeBR2021.pdf. Acessado 08 de mar 2021.
2. ALMEIDA, Sérgio. O Cachoeira está menos poluído. Jornal Anotícia. 17/01/1999. Disponível em: <http://www1.an.com.br/1999/jan/17/0cid.htm>. Acesso em 22 de ag.2020.
3. BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre **Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação**. 2004.
4. ANTONELI, V. T. E. L. Caracterização do meio físico da bacia do Arroio Boa Vista, Guamiranga-PR. **Revista Caminhos da Geografia**, v. 8, n. 21, p. 46-58, 2007.
5. ARAUJO, M. C.; BEZERRA, I. N.; BARBOSA, F. dos S.; JUNGER, W. L.; YOKOO, E.M.; PEREIRA, R. A.; SICHIERI, R. Consumo de MaCronutrientes e ingestão inadequada de miCronutrientes em adultos. **Revista Saúde Pública**, v. 47, supl. 1, p. 177S-89S, 2013.
6. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA (ABP). Tilápia no Brasil: avanços no melhoramento genético através de parceria empresa-universidade, segundo levantamento da Peixe BR. Revista Aquaculture, 11. ed., 2018.
7. BORTOLON, B.; MENDES, M. S. S. A Importância da Educação Ambiental para o Alcance da Sustentabilidade. Revista Eletrônica de Iniciação Científica. Itajaí, Centro de Ciências Sociais e Jurídicas da UNIVALI. v. 5, n.1, p. 118-136, 1º Trimestre de 2014. Disponível em: www.univali.br/ricc - ISSN 2236-5044.
8. BRASIL.Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária: RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018.
9. BRASIL. Lei Federal Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm. Acesso em agosto de 2019.

10. BRASIL, Lei n. 6.938/1981, de 31 de agosto de 1990, art. 3º, III, Da Política Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/16938compilada.htm. Acessado em agosto de 2019.
11. BRASIL Lei complementar nº 29, de 14 de junho de 1996. Institui o Código Municipal do Meio Ambiente. Disponível em: <https://leismunicipais.com.br/a/sc/j/joinville/lei-complementar/1996/2/29/lei-complementar-n-29-1996-institui-o-codigo-municipal-do-meio-ambiente>. Acessado agosto de 2019.
12. BRASIL. Conselho Nacional de Segurança Alimentar. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006.
13. BRASIL, Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Boas Práticas de Manipulação de Pescado. Brasília: SEAP, 2012. 33p
14. BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ranking dos 10 rios mais poluídos do Brasil, 2013.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p.: il. ISBN 978-85-334-2176-9.
16. BRASIL Ministério do Meio Ambiente Secretaria de Biodiversidade – Sbio Conservação e Manejo de Espécies. Departamento de Conservação e Manejo de Espécies, Publicado: 16 Junho 2017.
17. BRASIL Ministério da Educação. Colapso dos rios brasileiros: mortos ou na UTI, 2019.. Disponível em : <https://www.gov.br/fundaj/pt-br/destaques/observa-fundaj-itens/observa-fundaj/revitalizacao-de-bacias/colapso-dos-rios-brasileiros-mortos-ou-na-uti>. Acessado 10 de dez de 2021
18. CrIBB, A. Y.; FILHO. J. T. de S.; MELLO, S. C. R. P. Manual técnico de manipulação e conservação de pescado, editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2018. (119 p.)
19. COAN, A. S. Caracterização ambiental da água e sedimento do rio cachoeira (Joinville-SC) por diferentes bioindicadores/ Aline Scheller Coan; orientadora Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira. – Joinville: UNIVILLE, 2019.
20. EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mercado daTilápia – 2º trimestre de 2016. Palmas: Embrapa, 2016. (Informativo

- Mercado da Tilápia, n. 8). Disponível em: <https://www.embrapa.br/pesca-e-aquicultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1051014/o-mercado-da-tilapia---2-trimestre-de-2016>.
21. FAO (a). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Acessado 20 de março de 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/es/c/I9540EN/>
 22. FAO (b). 2018. Fishery statistical collections: Consumption of fish and fishery products [online]. [Cited 31 March 2018]. Disponível em: www.fao.org/fishery/statistics/global-consumption/en
 23. FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde. The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges, 243 p. 2014.
 24. FAO Fisheries and Aquaculture Department. FAO Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012, 2014. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf>. Acesso em: 10/02/2018.
 25. FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, YEARBOOK. Fishery and Aquaculture Statistics Food balance sheets, annuaire. 2016. Rome/Roma. 104p.
 26. FAO (3), FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. El estado mundial de la pesca y la acuicultura Cumplir los, 2018.
 27. FAO. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Conselhos sobre comer peixe, da Agência de Proteção Ambiental e; Revisão de Conselhos de Peixe. Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, 2017.
 28. FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food-based approaches for improving diets and raising levels of nutrition. Concept Note. Roma, 2010.
 29. GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. Tratado de fisiologia médica. 12. Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2011.
 30. He Y, Huang H, Li L, Yang X, Zhao Y, et al. Freshness and Shelf Life of Air Packaged and Modified Atmosphere Packaged Fresh Tilapia Fillets during Freezing-point Storage. J Nutr Food Sci. 2016;6(6): 564. doi: 10.4172/2155-9600.1000564.

31. HLPE, 2014. Pesca e aquicultura sustentável na segurança alimentar e nutricional. Um Relatório do Painel de Alto Nível de Peritos sobre Segurança Alimentar e Nutricional do Comité de Segurança Alimentar Mundial, Roma 2014. p. 34.
32. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estatistica/>>. Acesso em: 26 abr. 2020.
33. JUNIOR A. P.& PEREIRA E. R. Degradação ambiental e a diversidade biológica/biodiversidade:uma revisão integrativa. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14 n.26; p. 2017. DOI: 10.18677/EnciBio_2017B79
34. KAWARAZUKA, N. The contribution of fish intake, aquaculture, and small-scale fisheries to improving food and nutrition security: a literature review. World Fish Center Working Paper, 2010. 51 p.
35. KENNEDY G; NANTEL, G.; SHETTY, P. The scourge of “hidden hunger”: global dimensions of micronutrient deficiencies. Food, Nutrition and Agriculture, v. 32, p. 8-16, 2003.
36. KIM, Yeni; HÁ, Eun-Hee; PARK, Hyesook; HÁ, Mina; KIM, Yangho; HONG, Yun-Chul; JUNG LEE, Eun; KIM, Hyesook; CHANG,, Namsoo; KIM, Bung-Nyun. Prenatal mercury exposure, fish intake and neurocognitive development during first three years of life: Prospective cohort mothers and Children's environmental health (MOCEH) study. Science of the Total Environment, v. 615, p. 1192-1198, 2018.
37. LIMA, D. P. Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes a bacia do Rio Cassiporé, Estado do Amapá, Amazônia, Brasil. Amazonas, 147. p, 2013.
38. LIMA, Daniel Pandilha de; SANTOS, Cesar; SILVA, Roberto de Souza ; YOSHIOKA, E. T. O.; BEZERRA, R. M. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. Revista Acta Amazonica, v. 45, n. 4, p. 405-414, 2015.
39. LINDSEY, B.; JANULEWICZ, P.; CARWILE, J. L; WHITE, R. F. Childhood and adolescent fish consumption and adult neuropsychological performance: An analysis from the Cape Cod Health Study. Neurotoxicology and Teratology, v. 61, p. 47-57, 2017.
40. LOPES, D. N. M. Mercúrio total em peixes do rio Jaguaribe – Jusante do dique de Itaiçaba/CE. Fortaleza, p. 12-38. 2012

41. LOZI AA. Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, Cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019, 77f.
42. LUZ, G. da; SILVA, S. da; MARQUES, S.; LUCIANO, T. F. ; SOUZA, C. T. Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 reduz marcadores inflamatórios e melhora a ação da insulina em fígado de camundongos. **Revista Nutrição**, v. 25, n. 5, p. 621-629, 2012. DOI: 10.1590/0103-1104202012419.
43. MACHADO I. L; GARRAFA V. Protection of the environment and future generations: bioethical developments and reflections. SAÚDE DEBATE | RIO DE JANEIRO, V. 44, N. 124, P. 263-274, JAN-MAR 2020.
44. MAGALHÃES, A.M.S. et al. Zoonoses parasitárias associadas ao consumo de carne de peixe Cru. PUBVET, v. 6, n. 25, 2012.
45. MAHAN, L. Kathleen; ESCOTT-STUMP, Sylvia. KRAUSE. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
46. MILOŠKOVIĆ, A., DOJČINOVIĆ, B.; KOVAČEVIĆ, S.; RADOJKOVIĆ N.; RADENKOVIĆ, M.; MILOŠEVIĆ, D.; SIMIĆ, V. Spatial monitoring of heavy metals in the inland waters of Serbia: a multispecies approach based on commercial fish. Environmental Science and Pollution Research, v. 23, n. 10, p. 9918-9933, 2016
47. NALSEHI, M.; MOSLEMI, M. S.; KRAKPAI, F.; ZARRINDAST, M., R. The role of omega-3 on modulation of cognitive deficiency induced by REM sleep deprivation in rats. Behavioural Brain Research, v. 351, p. 152-160, 2018.
48. NASCIMENTO, A. L. ANDRADE, S. L. L. SOUSA DE. Segurança alimentar e nutricional: pressupostos para uma nova cidadania? Ciencia e Cultura, v. 62, n. 4, p. 34-38, 2010.
49. OLIVEIRA T.M.N. Bacias hidrográficas da região de Joinville: Gesto e Dados, Editora Univille, 2017 p94.
50. ORTEGA, A. C.; BORGES, M. da S. Codex Alimentarius: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, SP, v. 19, n. 1, p. 71–81, 2015. DOI: 10.20396/san.v19i1.8634670. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8634670>. Acesso em: 26 jul. 2020.

51. PINHEIRO, P. C., Dalcin, R. H., & Batista, T. T. (2017). A ictiofauna de áreas cominteresse para a proteção ambiental de Joinville, Santa Catarina, Brasil. *ActaBiológica Catarinense*, 4(3), 73-89.
52. RIBEIRO, L. G. G.; ROLIM, N. D. Planet water whom and for whom: an analysis of fresh water as a fundamental right and its valuation marketing. *Revista Direito Ambiental e Sociedade*, v. 7, n. 1, 2017 (p. 7-33)
53. RIBEIRO, H.; JAIME, P. C.; VENTURA, D. Alimentação e sustentabilidade. *Estudos Avançados*, v. 31, n. 89, p. 185-198, 2017.
54. SPARLING. D. W. An Introduction to Ecotoxicology. In: *Ecotoxicology Essentials Environmental Contaminants and their Biological Effects on Animals and Plants*, 2016, p. 3-20.
55. STAP (The Scientific and Technical Advisory Panel of the Global Environment Facility). GEF guidance on emerging chemicals management issues in developing countries and countries with economies, 2012.
56. SILVA, A. F H. DA. Benefícios do consumo regular de pescado para a saúde humana. Trabalho Complementar apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências da Nutrição. Porto, 2016.
57. SILVA, C. A.; SANTOS S. de O. Avaliação do Potencial Risco à Saúde Humana de Metais Pesados em Peixes Marinhos Consumidos em Aracaju, Maceió e Salvador, Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros 2016, 22 p.
58. SOARES M. P.; GONÇALVES A.A. Seafood quality and safety. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012; 71(1):1-10
59. SCHULTER, Eduardo Pickler; FILHO, José Eustáquio Ribeiro Vieira. *Evolução da piscicultura no brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia*. Brasília: Rio de Janeiro: IPEA, 2017, 42 p.
60. SOUZA A K, MORASSUTTI C Y, DEUS W. Poluição do ambiente por metais pesados e utilização de vegetais como bioindicadore. *Acta Biomedica Brasiliensia* / Volume 9/ nº 3/ Dezembro de 2018. www.actabiomedica.com.br, DOI: <http://dx.doi.org/10.18571/acbm.189>
61. TEIXEIRA, R. S. *Óleo de peixe: saúde e produtos comercializados no Brasil*. Curitiba: UFPR, 2018. Disponível em:

<<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/57684/R%20-%20E%20-%20RODRIGO%20SPRICIGO%20TEIXEIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

Acesso em: 17 abril. 2020.

62. TRAJANO, E. Políticas de conservação e Critérios ambientais: princípios, conceitos e protocolos. *Estud. av.*, São Paulo, v. 24, n. 68, pág. 135-146, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?sCript=sci_arttext&pid=S0103-40142010000100012&lng=en&nrm=iso>. acesso em 15 de maio de 2020.

63. VASCONCELLOS, A.C, Santiago. “Carga de doença atribuída ao metilmercúrio: estimativas nacional, regional e local” Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública. Rio de Janeiro, junho de 2015
64. VAZ, D. S.S.; GUERA, F. M. R. M.; GOMES, C. F.; SIMÃO, A. N. C.; JUNIOR, J. M.s. A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. *Revista UNINGÁ*, vol 20, n2, 2014, pp.48-54.
65. VILLANI V. A governança nos serviços municipais de água e esgoto: Uma visão estruturada para o século XXI. 1ª Edição TOMO I São Paulo, SP – 2017.P 246 2017.
- VITOLO, M.R.V.Nutrição da gestação ao envelhecimento, 2ºed. Editora Rubio, Rio de Janeiro, 2015. 575p.
66. Walker, C.H. Sibly, R.M. Hopkin, S.P. Peakall D.B. 2012. *Principles of Ecotoxicology*, Fourth Edition. Londres: Taylor & Francis Group. New York.
67. World Bank/FAO/WorldFish. Hidden harvest: the global contribution of capture fisheries. World Bank Report No. 66469-GLB. 2012, 69 p.
68. ZANIBONI F. E. Piscicultura de espécies exóticas de água doce. In: POLI, C. R.; POLI, A.T. B.; ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. (Org). *Aquicultura, experiências brasileiras*. 1. ed. Florianópolis: Multitarefa, 2004. 456p.
69. ZSCHORNACK, T. Avaliação do impacto da implantação do sistema de esgotamento sanitário na qualidade da água da bacia hidrográfica do rio Cachoeira sob a ótica da saúde ambiental. 161 f. 2016. Dissertação de mestrado em Saúde e meio Ambiente, Universidade da região de Joinville (SC).

ANEXO A: INFORMAÇÃO SOBRE PRODUÇÃO DO PEIXE DE CULTIVO

Secretaria de
Agricultura e
Meio Ambiente



Joinville, 6 de julho de 2021.

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que a propriedade do Sr. Alcides Bergmann, localizada na Estrada Quiriri, é assistida regularmente pela equipe do Setor da Piscicultura da Unidade de Desenvolvimento Rural da Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente.

O tipo de cultivo daquela família é o mais comumente utilizado em nosso Município: monocultivo de tilápias em viveiro escavado amparado. A ração ofertada é para peixes onívoros com 30% de proteína bruta, a espécie cultivada é a tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, cuja origem é a Piscicultura Água Sul.

Nestas visitas são realizadas análises dos parâmetros de qualidade de água do viveiros. Abaixo segue o resultado da última análise, realizada no dia 30/06/2021:

Temperatura do ar: 18,5°C

Horário: 10 h

Oxigênio dissolvido: 7,5 mg/l ou 80% de saturação

Temperatura da água: 14,5°C

pH: 7,0

Alcalinidade: 20 mg/l

Amônia total: 0,6 mg/l

Amônia tóxica: 0,001 mg/l

Nitrato: 0 mg/l

Transparência: 44 cm

Os parâmetros apresentam-se dentro do ideal para a tilapicultura, oferecendo bem-estar aos peixes lá cultivados.


Susane Pahl-Klapp
Médica Veterinária


Fernanda Queiróz e Silva
Técnica em Aquicultura

ANEXO B: 1ª COLETA DOS PEIXES DO RIO CACHOEIRA

RELATÓRIO DE CAMPO

Objetivo: Coletar indivíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para o projeto de pesquisa INDICAMB2.

As atividades de campo foram realizadas em dezembro de 2020, durante o dia, sempre considerando a condição de ausência de chuvas de, no mínimo, dois dias antes das coletas. As coletas foram previamente planejadas, levando-se em conta a facilidade de acesso e a presença da espécie alvo (Pinheiro et al., 2017). As tilápias foram coletadas em um mesmo trecho do Rio Cachoeira, no bairro Costa e Silva, em Joinville, Santa Catarina, Brasil (Tabela 1; Figura 1A).

Tabela 1. Indicação do local de coleta, coordenada geográfica, data dos campos, esforço de captura (em horas), número de indivíduos capturados (N) e biomassa total.

Local	Coordenadas	Data	Esforço (h)	N	Peso (g)
Rio Cachoeira	26°16.084' S 048°51.880' W	02/12/2020	4	2	1500
		09/12/2020	4	6	1300
		17/12/2020	4	11	2300

Os peixes foram coletados utilizando tarrafas de malha entre nós de 4cm e edes de emalhe, com 8 metros de comprimento e 1 metro de largura, com malha entre nós de 6cm (Figura 1B). Após a captura, os indivíduos eram identificados, ao menor nível taxonômico possível, para confirmar que se tratava da espécie alvo, colocados em sacos plásticos, pesados, etiquetados, laCrados e acondicionados em caixa térmica com gelo, após o campo os peixes foram congelados (Figura 1C). Foram coletados 19 indivíduos, totalizando 5100 g de tilápias (Tabela 1). Os procedimentos de coleta adotados possuem autorização (SISBIO no 10476-3).

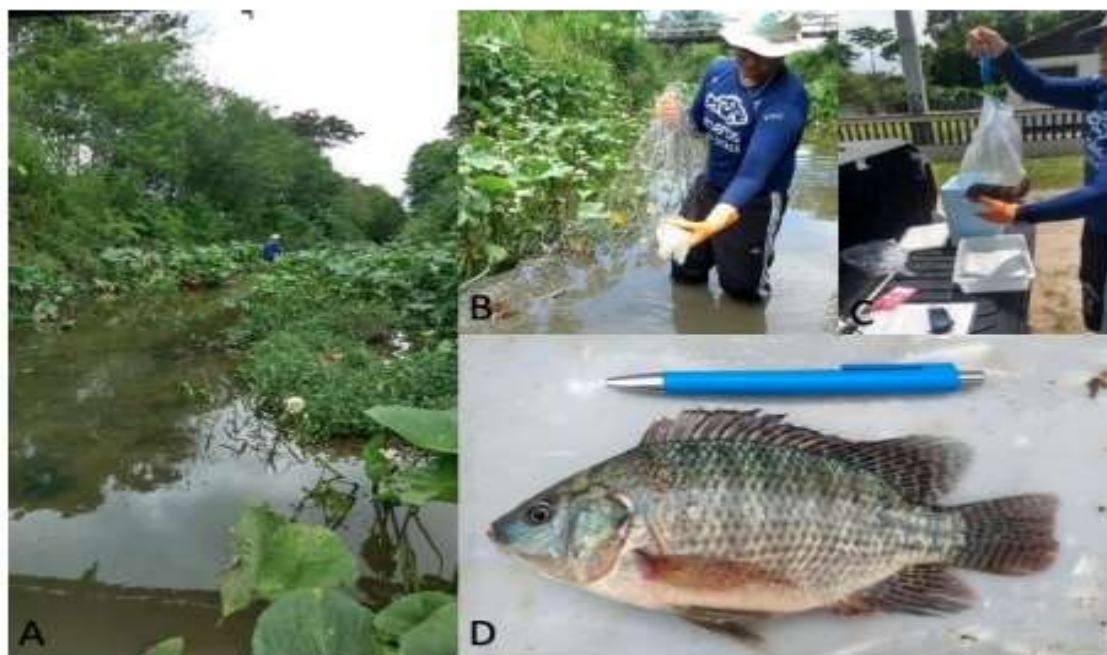


Figura 1. Local onde os peixes foram capturados (A), indivíduo sendo retirado da rede de emalhe (B), pesagem (C) e confirmação taxonômica (D). Imagens: Diogo Augusto Moreira.

Equipe:

Diogo Augusto Moreira, MSc (Biólogo CrBio 81154)

Johnatas Adelir-Alves, PhD (Biólogo CrBio 053967)

Referências:

PINHEIRO, P. C., DALCIN, R. H., & BATISTA, T. T. (2017). A ictiofauna de áreas com interesse para a proteção ambiental de Joinville, Santa Catarina, Brasil. *Acta Biológica Catarinense*, 4(3), 73-89.

ANEXO C: 2ª COLETA DOS PEIXES DO RIO CACHOEIRA

RELATÓRIO DE CAMPO

Objetivo: Coletar indivíduos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para o projeto de pesquisa INDICAMB2.

A coleta foi previamente planejada, levando-se em conta a facilidade de acesso e a presença da espécie alvo. O campo foi realizado durante o dia, sempre considerando a condição de ausência de chuvas de, no mínimo, dois dias antes da coleta (Pinheiro *et al.*, 2017).

Os peixes foram coletados no Rio Cachoeira (26°16'01"S - 48°51'40"W), próximo a escola Geovani Pascoalini Franco, no bairro Costa e Silva, em Joinville, Santa Catarina, Brasil. Conforme (Figura 1C).

Os peixes foram coletados utilizando tarrafa de malha entre nós de 3cm (Figura 1B). Foram coletados 3500 gramas de tilápia. Após a captura, os indivíduos eram identificados, ao menor nível taxonômico possível, para confirmar que se tratava da espécie alvo, colocados em sacos plásticos, pesados, etiquetados, lacrados e acondicionados em caixa térmica com gelo (Figura 1C). Os procedimentos de coleta adotados possuem autorização (SISBIO nº 10476-3).

Figura 1. Local onde os peixes foram capturados (A), paisagem (B) e confirmação taxonômica (C). Imagens: Diogo Augusto Moreira.



Equipe: Diogo Augusto Moreira, MSc (Biólogo CRBio 81154)
Johnatas Adelir-Alves, PhD (Biólogo CRBio 053967)

Referência: Pinheiro, P. C., Dalcin, R. H., & Batista, T. T. (2017). A ictiofauna de áreas com interesse para a proteção ambiental de Joinville, Santa Catarina, Brasil. *Acta Biológica Catarinense*, 4(3), 73-89.

ANEXO D: PARECER DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIVILLE)

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - FURJ
UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE



Joinville, 02 de outubro de 2019

OFÍCIO N.º 006/2019 – PRPPG/CEP

Para Pesquisadora Sonia Toriani

Projeto de pesquisa vinculado à Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Assunto: Parecer Processo de nº 01/2019

O projeto de Pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO DE PEIXES DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CACHOEIRA EM RATOS”, de sua responsabilidade, foi considerado **APROVADO** de acordo com o Parecer Consubstanciado, de 25/05/2019 em anexo e emitido em 02/10/2019.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais – CEUA/UNIVILLE, de acordo com as atribuições definidas na Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, Resolução 19/07 CEP/UNIVILLE e demais normas, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa CEUA nº 01/2019, protocolado em 23/05/2019.

Atenciosamente,

Marcia Luciane Lange Silveira
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Univille



UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

1) Dados Gerais

Protocolo nº: 01/2019

Data de entrada no Comitê: 23/05/2019

Comitê: () Humanas (X) Animais

Área Temática Especial: (X) Não

() Sim, Qual? Não se aplica.

Projeto de Doutorado vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Fonte Financiadora: Carta-convite

2) Título

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO DE PEIXES DA
BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CACHOEIRA EM RATOS**

3) Responsável

Sônia dos Santos Toriani

4) Participantes

Terezinha Maria Novais de Oliveira

Daniela Delwing de Lima

Eduardo Manoel Pereira

6) PARECER (SINTÉTICO)

- () Não aprovado
() Com Pendências
(X) Aprovado

Joinville, 25 de setembro de 2019

Atenciosamente,



Marcia Luciane Lange Silveira
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Univille

Universidade da Região de Joinville – Univille
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – CEUA
comiteta@univille.br | 47 3461-6216

ANEXO E: TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 12/ 12/2022.

1. Identificação do material bibliográfico: (X) Tese () Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: Sônia dos Santos Toriani

Orientador: Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira

Co-orientador: Dra. Daniela Delwing-de Lima

Data de Defesa: 23/08/2022

Título AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO CONSUMO DE PEIXES DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CACHOEIRA

Instituição de Defesa: UNIVILLE, Universidade DA Região de Joinville

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.



Assinatura do autor

Joinville 12/12/2022

Local/Data