UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SILVIA HELENA SERAPHIN DE GODOY

**Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias (*Oreochromis niloticus*)
no Brasil**

Pirassununga

2018

SILVIA HELENA SERAPHIN DE GODOY

**Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias (*Oreochromis niloticus*)
no Brasil**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GG5890 Godoy, Silvia Helena Seraphin de
Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias
(Oreochromis niloticus) no Brasil / Silvia Helena
Seraphin de Godoy ; orientadora Andrezza Maria
Fernandes. -- Pirassununga, 2018.
68 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. Aquicultura. 2. Micotoxinas. 3. CLAE. 4.
Peixes. 5. Pisciculturas. I. Fernandes, Andrezza
Maria , orient. II. Título.

CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM RAÇÕES E TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) DO BRASIL", protocolada sob o CEUA nº 3956160118, sob a responsabilidade de **Andreza Maria Fernandes** e equipe: **Silvia Helena Seraphin de Godoy** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 13/04/2018.

We certify that the proposal "OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN FEEDS AND TILAPIAS (*Oreochromis niloticus*) FROM BRASIL", utilizing 51 Fishes (males and females), protocol number CEUA 3956160118, under the responsibility of **Andreza Maria Fernandes** and team: **Silvia Helena Seraphin de Godoy** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 04/13/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2017** a **07/2018**

Área: **Engenharia de Alimentos**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **1 a 2 anos**

N: **51**

Linhagem: **Tilápia - *Oreochromis niloticus***

Peso: **500 a 2000 g**

Resumo: Os peixes são uma importante fonte de proteínas, micronutrientes e ácidos graxos poli-insaturados. As tilápias (*Oreochromis niloticus*) têm um grande potencial de cultivo e ampla aceitação comercial. A deposição de aflatoxinas nos peixes é residual e cumulativa, no entanto há diferenças de sensibilidade entre as espécies. A legislação brasileira contempla limites apenas para rações de modo geral. O objetivo do trabalho é avaliar a ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias de piscicultura do Brasil. Serão coletadas 40 amostras de rações (500 g cada amostra) e 40 amostras de tilápias (1 kg de peixe para compor uma amostra), de diferentes propriedades no Brasil. Amostras de ração serão avaliadas para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e amostras de tecido muscular e fígado para aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1. As amostras serão analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando colunas de imunoafinidade para a etapa de purificação. Espera-se obter um conhecimento do nível de contaminação da espécie no Brasil, colaborando para embasar possíveis limites na legislação brasileira para aflatoxinas em pescados.

Local do experimento: Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos [] USP/Pirassununga-SP.

Pirassununga, 16 de abril de 2018

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Tizio
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

SILVIA HELENA SERAPHIN DE GODOY

**Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias (*Oreochromis niloticus*)
no Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

Data de aprovação: 19 /11/2018

Banca examinadora:

Dra. Fernanda Bovo Campagnollo
Unicamp

Dr. George Shigueki Yasui
ICMBio/CEPTA

Profa. Dra. Elyara Maria Pereira da Silva
Profa. da FZEA/USP

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a minha família, em especial ao
meu esposo Maico,
minha filha Luiza,
minha mãe Maria Helena
e ao meu querido pai (*in memoriam*) Hernando Seraphin.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde, força e coragem de ir em busca de meus sonhos e por tudo que tem feito em minha vida! Obrigada Meu Senhor!

Agradeço ao meu esposo Maico por sempre estar ao meu lado em tudo o que eu preciso e ser um amigo, companheiro, eterno namorado e um pai maravilhoso para nossa filha Luiza.

Agradeço à você minha filha querida, por fazer meu coração transbordar de amor!

Eu amo vocês!

Agradeço à Professora Andrezza Maria Fernandes, por toda confiança que sempre deposita e depositou em mim e por ter me incentivado a fazer o mestrado. Muito obrigada, Andrezza!

Ao Professor Ricardo Luiz Moro de Sousa, agradeço pelo respeito, companheirismo, confiança e ajuda em tudo o que eu preciso. Muito obrigada também, Ricardo!

A todos os proprietários das pisciculturas que visitamos e que nos cederam às amostras. Agradeço também à Maria Fernanda e à Amanda, pela ajuda com as coletas. Muito obrigada, meninas!

A todo o pessoal do Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica, que passaram comigo o meu dia a dia de trabalho e mestrado vinculado, meu muito obrigado a vocês:

Andréa, Samara, Thaís, Loiane, Paula, Carol, Wal, Milena, Marcelo Felisberto, Marcelo Cândido e Tati.

Aos alunos que passaram por aqui, os quais gosto muito e deixaram saudades: Marisa, Marina, Euder, Juliana, Sabrina, Anna, Rocio, Marcela, Flávia Vargas e Karen Galvão.

Aos membros da Comissão Julgadora pela participação e contribuições.

Ao Departamento de Medicina Veterinária, à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, muito obrigada pela oportunidade.

"Há um ditado chinês que diz que, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando um pão, ao se encontrarem, eles trocam os pães; cada um vai embora com um. Porém, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando uma idéia, ao se encontrarem, trocam as idéias; cada um vai embora com duas. Quem sabe, é esse mesmo o sentido do nosso fazer: repartir idéias, para todos terem pão.."

Mario Sérgio Cortella

RESUMO

GODOY, S. H. S de. **Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Brasil**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Os peixes são uma importante fonte de proteínas, micronutrientes e ácidos graxos poli-insaturados. As tilápias (*Oreochromis niloticus*) têm um grande potencial de cultivo e ampla aceitação comercial. A deposição de aflatoxinas nos peixes é residual e cumulativa, no entanto há diferenças de sensibilidade entre as espécies e a legislação brasileira contempla limites apenas para rações de modo geral. O objetivo do trabalho foi avaliar a ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias de pisciculturas do Brasil. Foram coletadas 43 amostras de rações (500 g cada amostra) e 42 amostras de tilápias (500 g de peixe para compor uma amostra) de diferentes propriedades no Brasil. Amostras de ração, fígado e músculo foram avaliadas para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando colunas de imunoafinidade para a etapa de purificação. Foram encontrados 16,28% e 86,05% de amostras de ração positivas para AFG₁ e AFB₁, respectivamente. No entanto, todas as amostras de ração mostraram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. AFG₁ e AFB₁ foram detectadas em 7,14% e 85,72% das amostras de fígado, respectivamente, com níveis de 0,152 µg AFG₁/kg e variando de 0,150 a 0,866 µg AFB₁/kg. A AFB₁ foi encontrada em 19,05% das amostras de músculo, com níveis variando de 0,150 a 0,372 µg/kg. Embora os valores encontrados nas rações estejam abaixo dos limites estabelecidos e os níveis em fígado e músculo tenham sido baixos, o monitoramento e os esforços para a diminuição da exposição às aflatoxinas devem ser considerados.

Palavras-chave: Aquicultura. Micotoxinas. CLAE. Peixes. Pisciculturas.

ABSTRACT

GODOY, S.H.S de. Occurrence of aflatoxins in fish feed and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. 2018. 68 f. Dissertation (Master's) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Fish are an important source of proteins, micronutrients and polyunsaturated fatty acids. The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) has a great potential for production and wide commercial acceptance. The deposition of aflatoxins in fish is residual and cumulative; however there are differences in sensitivity among species. The Brazilian legislation contemplates limits only for animal feed in general. The aim of this study was to evaluate the occurrence of aflatoxins in feed and tilapia from fish farms in Brazil. A total of 43 feed samples (500 g each sample) and 42 tilapia samples (500 g of fish to compose a sample) were collected from different properties in Brazil. Samples of feed, fish liver and muscle were evaluated for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using immunoaffinity columns for the purification step. It were found 16.28% and 86.05% of feed samples positive for AFG₁ and AFB₁, respectively. However, all feed samples were within the limits established by Brazilian legislation. AFG₁ and AFB₁ were detected in 7.14% and 85.72% of the liver samples, respectively, with levels of 0.152 µg AFG₁/kg and ranging from 0.150 to 0.866 µg AFB₁/kg. AFB₁ was found in 19.05% of muscle samples, with levels varying from 0.150 to 0.372 µg/kg. Although the values found in feed were below the established limits, and the levels found in liver and muscle samples were low, monitoring and efforts to reduce aflatoxin exposure should be considered.

Key-words: Aquaculture. Mycotoxins. HPLC. Fish. Fish farming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	21
Figura 2 -Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁	26
Figura 3 - Amostras de tilápias.	35
Figura 4 - Fígado e músculo de tilápia.	35
Figura 5 -Tubos contendo amostras do músculo e do fígado das tilápias para armazenamento. ...	36
Figura 6 -Composição geral das rações analisadas, baseadas nos rótulos das embalagens.	41
Figura 7 - Curvas de Calibração das AFG ₁ , AFB ₁ , AFG ₂ e AFB ₂	45
Figura 8 - Cromatograma com os tempos de retenção de cada aflatoxina na concentração de 0,5 µg/kg	46
Figura 9 - Distribuição dos níveis de aflatoxinas nas amostras de ração provenientes das pisciculturas analisadas.....	52
Figura 10 – Distribuição dos níveis de aflatoxinas nas amostras de fígado.	55
Figura 11 – Distribuição dos níveis de aflatoxinas nas amostras de músculo.	56

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 -Produção de algumas espécies de peixe no Brasil em 2016.....	19
Tabela 2 -Produção brasileira de peixes.	20
Tabela 3 -Valores referentes à atividade de água (Aa) para o desenvolvimento e produção de aflatoxinas nas espécies <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	24
Tabela 4 - Classificação segundo a IARC das principais micotoxinas.....	25
Tabela 5 - Identificação e atividade de água (Aa) das rações em diferentes pisciculturas.	43
Tabela 6 - Limites de Detecção e Limites de Quantificação das respectivas amostras.	46
Tabela 7 -Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de ração para peixes.	48
Tabela 8 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.	49
Tabela 9 -Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de músculo de tilápia.	50
Tabela 10 - Aflatoxinas nas rações de pisciculturas.	51
Tabela 11 - Aflatoxinas no fígado da tilápia.	54
Tabela 12 -Aflatoxinas no músculo da tilápia.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa:	Atividade de água
AF:	Aflatoxina
AFB₁:	Aflatoxina B ₁
AFB₂:	Aflatoxina B ₂
AFG₁:	Aflatoxina G ₁
AFG₂:	Aflatoxina G ₂
AFL:	Aflatoxicol
AFM₁:	Aflatoxina M ₁
AFP₁:	Aflatoxina P ₁
AFQ₁:	Aflatoxina Q ₁
CCD:	Cromatografia de Camada Delgada
CIA:	Coluna de Imunoafinidade
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-EM:	Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa
DNOCS:	Departamento Nacional de Obras Contra a Seca
DON:	Desoxinivalenol
EUA:	Estados Unidos da América
FAO:	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FUMO:	Fumonisina
IARC:	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA:	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
min:	Minuto
MPA:	Ministério da Pesca e Aquicultura
NADPH:	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
Ton:	Tonelada

ONU:	Organização das Nações Unidas
OTA:	cratoxina A
ppb:	Partes por Bilhão
PTFE:	Politetrafluoretileno
rpm:	Rotação por Minuto
ZEA:	Zearalenona

LISTA DE SÍMBOLOS

α:	Alfa
$^{\circ}\text{C}$:	Grau Celsius
g:	Grama
μg:	Micrograma
μL:	Microlitro
μm:	Micrômetro
M:	Molar
mm:	Milímetros
mg:	Miligrama
nm:	Nanômetro
%:	Porcentagem
kg:	Quilograma

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Aquicultura no Brasil e no mundo	19
2.2	Produção de tilápia no Brasil e no mundo	20
2.3	Micotoxinas	23
2.4	Aflatoxinas	25
2.4.1	<i>Aflatoxinas em humanos</i>	28
2.4.2	<i>Aflatoxinas em peixes</i>	29
2.5	Legislação.....	30
2.6	Métodos cromatográficos	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	Amostragem.....	34
4.1.1	<i>Amostragem da ração.....</i>	34
4.1.2	<i>Amostragem do pescado</i>	34
4.2	Determinação da atividade de água nas amostras de ração	36
4.3	Determinação das aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .	36
4.3.1	<i>Padrões e Solventes utilizados</i>	36
4.3.2	<i>Curvas de calibração</i>	37
4.3.3	<i>Desempenho do método analítico</i>	37
4.3.4	<i>Limites de Detecção e Quantificação.....</i>	37
4.3.5	<i>Extração das aflatoxinas</i>	38
4.3.6	<i>Determinação de aflatoxinas nas amostras de ração - Método I</i>	38
4.3.7	<i>Determinação das aflatoxinas nas amostras de fígado das tilápias - Método II</i>	38
4.3.8	<i>Determinação das aflatoxinas nas amostras de músculo das tilápias - Método III....</i>	39
4.3.9	<i>Derivatização química das aflatoxinas</i>	39
4.3.10	<i>Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	40
4.4	Comitê de ética	40

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Composição da Ração	41
5.1	Atividade de água (Aa) da ração.....	42
5.2	Resultados do Desempenho do Método Analítico	44
5.2.1	<i>Curvas de Calibração de Aflatoxinas.</i>	45
5.2.2	<i>Tempos de Retenção</i>	46
5.2.3	<i>Avaliação do Desempenho dos Métodos Analíticos</i>	46
5.3	Deteção e Quantificação de Aflatoxinas nas Amostras	51
5.3.1	<i>Aflatoxinas na ração</i>	51
5.3.2	<i>Aflatoxinas no fígado e músculo da tilápia</i>	54
6	CONCLUSÃO.....	60
7	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores do agronegócio que mais cresce no mundo (ZYCHOWSKI et al., 2013). A demanda mundial por pescado tem aumentado significativamente nas últimas décadas, principalmente devido ao crescimento populacional e a busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis. Neste contexto, a aquicultura é a alternativa mais viável para aumentar a oferta de pescado, uma vez que a pesca extrativista está relativamente estática desde 1980 (FAO, 2016). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), em 2016 foram produzidas aproximadamente 80 milhões de toneladas de pescado proveniente da aquicultura, o que representa cerca de 231,6 bilhões de dólares (FAO, 2018).

Neste contexto, o Brasil apresenta grande potencial para aquicultura devido à grande disponibilidade de água e insumos para alimentação animal, extensa costa marítima, grande diversidade de espécies com potencial zootécnico e mercadológico, além de não competir com nenhuma outra atividade agropecuária. De acordo com a Associação Brasileira da Piscicultura (PeixeBR, 2018), a produção nacional de peixes em cativeiro cresceu 8% em 2017, esse crescimento no país se deve aos investimentos feitos no setor nos últimos anos.

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) é, sem dúvida, a espécie de tilápia mais cultivada, atingindo a uma produção mundial estimada em 4,2 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2018). Segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (PeixeBR, 2018), o Brasil é quarto maior produtor mundial de tilápia, depois da China, Indonésia e Egito. As tilápias são encontradas em várias partes do mundo e possuem um enorme potencial de cultivo, se adaptando bem aos viveiros e apresentando uma ampla aceitação comercial e extensa demanda do consumo de seu filé (MOREIRA, 2001). A qualidade da carne da tilápia é o que mais se destaca nessa espécie, sendo ela apreciada mundialmente, e o que motiva a sua produção é o seu rápido crescimento e capacidade de criação em diversos sistemas de produção (AYROZA, 2009).

Os peixes são uma importante fonte de proteínas para humanos e animais, fornecendo vitaminas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados (FARAG; EL-TABIY; HASSAN, 2011; BARBOSA et al., 2013). Sua carne é macia, com uma estrutura consistente e de fácil digestão, diferente de outras carnes ou outros tipos de proteínas (FARAG; EL-TABIY; HASSAN, 2011). Com isso, a demanda pelo consumo de peixes vem aumentando nos últimos

anos, pois os consumidores estão em busca de alimentos saudáveis e de qualidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo frequente de peixes, de uma a duas porções (150 g cada porção) por semana, o que resulta em 11,7 kg/habitante/ano (QUAAS et al., 2016). No entanto, em contraste aos benefícios do consumo de pescado, estes podem constituir rota de exposição a vários contaminantes.

No cultivo de espécies como a tilápia em países tropicais, é comum observar rações produzidas com procedimentos inadequados de ensacamento, transporte e armazenamento. Esses fatos, aliados as altas temperaturas e umidade, são, provavelmente, as principais causas de crescimento fúngico e, conseqüentemente, da produção de aflatoxinas (CHAVEZ-SANCHEZ; PALACIOS; MORENO, 1994), o que torna muito importante a qualidade na alimentação dos peixes (BARBOSA et al., 2013).

De fato, as aflatoxinas vêm ganhando destaque nesses últimos anos na aquicultura, visto que a contaminação em grãos pode ser transferida para as rações, que são ingeridas pelos peixes. Assim, podem causar muitas perdas econômicas no setor, também trazendo riscos à saúde humana. Deste modo, pode haver um acúmulo de resíduos de aflatoxinas em tecidos animais, podendo levar a um risco para a saúde pública (SANTACROCE et al., 2008). Quando a aflatoxina é transferida a pequenas taxas para os tecidos do animal, há risco não só para a sua saúde, mas também para saúde humana, devido ao consumo do produto (SPRING; FEGAN, 2005). As aflatoxinas são produzidas naturalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e podem crescer nos alimentos quando armazenados de forma incorreta, sob temperaturas elevadas e condições úmidas (ZYCHOWSKI et al., 2013), com destaque para a aflatoxina B₁ (AFB₁), que é considerada a mais tóxica de todas as aflatoxinas (SANTACROCE et al., 2008).

Em vista do crescimento do cultivo de tilápia, estudos vêm sendo desenvolvidos para avaliar a ocorrência de AFB₁, seus efeitos tóxicos e propriedades fisiológicas (DENG et al., 2010). Destaca-se que a AFB₁ é o composto tóxico de maior risco à saúde humana e para os animais (ALINEZHAD et al., 2011) e tem demonstrado ser o carcinógeno de fígado mais agressivo conhecido em várias espécies de animais e em humanos, sendo associado ao carcinoma hepatocelular (PITT; HOCKING, 2009).

Portanto, o presente estudo é importante para o conhecimento dos níveis de contaminação da espécie no Brasil e na discussão e embasamento de possíveis níveis de

tolerância na legislação para rações para peixes e para o produto final. Pois, há uma carência de estudos sobre aflatoxinas em peixes, tornando-se necessária a avaliação em diferentes espécies (LOPEZ et al., 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura no Brasil e no mundo

A produção mundial de pescado vem crescendo nos últimos anos, chegando a 171 milhões de toneladas em 2016, sendo que 151,2 milhões de toneladas dessa produção foram destinadas para o consumo humano e 51,4 milhões de toneladas foram produzidas pela aquicultura em águas continentais (FAO, 2018). Em 2014, o Brasil ocupou o 14º lugar no "ranking" dos 25 principais países produtores de espécies cultivadas (FAO, 2016), assim, a aquicultura desponta como a alternativa mais viável para continuar aumentando a oferta de proteína animal nos próximos anos, uma vez que a pesca extrativista encontra-se em declínio.

A tilápia foi a espécie mais produzida no Brasil em 2016, como se pode observar na Tabela 1, segundo o IBGE, registrando um aumento de 4,4% em relação à produção de 2015 (PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, 2016).

Tabela 1 -Produção de algumas espécies de peixe no Brasil em 2016

Produção de Peixe	Quantidade Total Produzida	
	Ton	%
Tilápia	239,09	47,1
Tambaqui	136,99	27
Tambacu e Tambatinga	44,94	8,9
Carpa	20,33	4,0
Pintado, Cachara, Cachapira, Pintachara e Surubim	15,86	3,1
Pacu e Patinga	13,06	2,6

Fonte: Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 44, p. 1-51, 2016.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil apresenta o maior potencial para a aquicultura, especialmente devido a sua disponibilidade hídrica, clima favorável e grande diversidade de espécies aquáticas, alta disponibilidade de insumos para a produção de ração, além de não competir com outra atividade agropecuária (PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, 2013).

Nos últimos anos, o Brasil tem investido no setor da aquicultura, como mostra a Tabela 2, segundo o IBGE. Estima-se que até 2025 haja um crescimento na produção de pescado no Brasil de 104% (FAO, 2016). E esse crescimento se deu por meio de políticas públicas e pesquisas apoiadas pelo governo, com dados estatísticos, campanhas para incentivar o

consumo de peixe e planejamento da produção em grandes reservatórios de águas represadas (FLORES; PEDROZA FILHO, 2013).

Tabela 2 - Produção brasileira de peixes

Ano	Valor Total de Produção	Criação de Peixes		Aumento
	(Bilhões de reais)	Total (Ton)	Percentual (%)	Percentual (%)
2013	2,02	392,49	66,1	-
2014	2,71	474,33	70,2	17,3
2015	3,06	483,24	69,9	1,5
2016	3,26	507,12	70,9	4,4

Fonte: **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, 2013-2016.

Nos últimos anos, há relatos de que uma melhor nutrição aliada ao aumento do conhecimento nutricional pode diminuir a incidência de doenças, despesas médicas e aumentar a qualidade de vida, pois grande parte dos problemas de saúde no mundo estão relacionadas à alimentação e nutrição (MOHANTY et al., 2017). Neste cenário, o peixe se torna uma excelente fonte nutricional com vários tipos de nutrientes necessários e fundamentais para ao nosso organismo. A maioria dos peixes de água doce constitui excelente fonte de ácidos graxos poli-insaturados (ANDRADE et al., 1997), além de importante fonte de proteínas, vitaminas e minerais (FAO, 2016).

2.2 Produção de tilápia no Brasil e no mundo

Mais de 22 espécies de tilápia são cultivadas em todo o mundo. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), tilápia Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), tilápia Azul (*Oreochromis aureus*), *Oreochromis macrochir*, *Oreochromis hornorum*, *Oreochromis galilaeus*, *Tilapia zillii* e *Tilapia rendalli*, são as espécies mais cultivadas comercialmente. Atualmente, o cultivo de tilápias é amplamente praticado em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo todo (EL SAYED, 1999), e a espécie ficou em 4º lugar em 2016 dentre as espécies mais cultivadas no mundo (FAO, 2018).

O nome tilápia vem de grupos de peixes tropicais de água doce da família Chichlidae e são distribuídos em três gêneros, com diferenças em seus cuidados parentais: *Tilapia* (desovam em substratos), *Sarotherodon* (o macho ou ambos incubam seus ovos na boca) e

Oreochromis (a fêmea incuba os ovos na boca) (YASUI et al., 2006) e a maior parte das tilápias cultivadas é do gênero *Oreochromis* (EL-SAYED, 2006).

A tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Figura 1) é originária da Costa do Marfim e sua distribuição mundial ocorreu por volta de 1960 a 1980, chegando ao Brasil em 1971 (FAO, 2005). Neste ano, a tilápia do Nilo foi introduzida pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) no Nordeste do país e em 1996 introduziram a tilápia tailandesa (ou Chitralada), na qual foi observado melhor desempenho na engorda, trazendo impactos positivos e ganhando popularidade nos "pesque-pagues" do Sul e Sudeste. A partir de 2001 e 2002, a produção e processamento da tilápia começaram a se multiplicar nessas regiões (KUBITIZA, 2011).

Figura 1- Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Fonte: EL-SAYED, Abdel-Fattah M. **Tilapia culture**. CABI, 2006.

A tilápia do Nilo prefere habitar águas rasas, com temperaturas da água em torno de 29 a 31°C, demonstrando saciedade quando alimentados nessas temperaturas, e com crescimento três vezes maior do que em temperatura da água a 22°C (POPMA; LOVSHIN, 1995). Em geral, os peixes se alimentam de vários organismos vegetais e animais, tais como algas, plantas aquáticas, frutos, semente, crustáceos, larvas e ninfas de insetos, vermes, moluscos, anfíbios, peixes, entre outros. A tilápia do Nilo, além dos itens supracitados, se alimenta de fitoplâncton, uma excelente fonte de minerais e vitaminas, principalmente para tilápias em viveiros, além de aceitar bem rações (KUBTIZA, 2000).

A maturidade sexual das tilápias é por volta dos seis meses. Os gêneros *Oreochromis* e *Sarotherodon* fazem seus ninhos no fundo dos corpos d'água e os ovos, após fertilizados, são recolhidos na boca da fêmea, onde são incubados. Após o nascimento das larvas, a fêmea

ainda cuida da prole recolhendo-as na boca, sempre que necessário. O gênero *Tilápia* faz sua desova em ninhos no fundo dos corpos d'água, onde os ovos se desenvolvem e eclodem (MOREIRA, 2001). A desova ocorre acima de 24°C e o pico de produção de larvas fica entre 27°C e 32°C (KUBITZA, 2000).

A tilápia é uma espécie que apresenta alto interesse comercial e zootécnico devido a sua rusticidade, crescimento rápido, boa conversão alimentar, além de aceitar rações com grande facilidade desde o período larval (MEURER et al., 2002). Sua carne é de ótima qualidade, sendo bastante apreciada pelo mercado consumidor em função da ausência de espinhos e pelas características organolépticas de seu filé (MEURER; HAYASHI; BOSCOLO, 2003).

Os sistemas de cultivos mais utilizados para a criação de tilápia são o sistema semi-intensivo (viveiros) ou o intensivo (em tanques-rede), sendo este realizado em grandes reservatórios do país, como o rio São Francisco, no nordeste, e rio Tietê, na região sudeste (OSTSENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008). A regulamentação do uso de águas públicas para produção intensiva de peixes em tanques-rede impulsionou o cultivo da tilápia, sendo a espécie responsável por 90% das solicitações de áreas aquícolas no País Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2017). Nesse sistema é comum em tanques o oferecimento de rações extrusadas, de acordo com o tamanho do peixe, várias vezes ao dia (MOREIRA, 2001).

O consumo de ração, a qualidade da água, a qualidade dos alevinos e os parâmetros de desempenho são os principais pontos na produção de tilápia (KUBITZA, 1999). A ração é responsável por cerca de 50% a 80% dos custos da produção nas pisciculturas (HASAN, 2017). Segundo o Sindirações, de Janeiro a Setembro de 2017 no Brasil foram produzidos 747 mil toneladas de ração para peixe e camarão, um crescimento de 3,4%. (SINDIRAÇÕES, 2017).

A intensificação dos sistemas de produção fez aumentar o uso dos recursos naturais e dos insumos e em sistemas intensivos de produção o uso da ração pode representar até 70% desses custos (CYRINO, 2012). No Egito, por exemplo, a utilização de sistemas intensivos fez aumentar a demanda na indústria de ração e os custos de produção com a alimentação aumentaram de 60% a 100% (HASAN, 2010).

Nas pisciculturas a qualidade das rações utilizadas tornou-se extremamente importante, pois são através de rações formuladas comercialmente que se consegue suprir as necessidades

nutricionais nos períodos de crescimento dos peixes (DAS CHAGAS CARDOSO FILHO et al., 2011). No entanto, as rações também são via de exposição a vários contaminantes quando produzidas inadequadamente, com transporte e armazenamento desapropriados.

2.3 Micotoxinas

O crescimento de fungos pode aumentar o risco da produção de micotoxinas quando as práticas de colheita, secagem, manuseio, armazenamento, embalagem e condições de transporte são inadequados (BHAT; RAI; KARIM, 2010). Fatores ambientais, como temperatura e umidade alta, podem favorecer o desenvolvimento de fungos toxigênicos. Portanto, regiões tropicais e semi tropicais contribuem para a produção de micotoxinas (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010; AFSAH-HEJRI et al., 2013).

Em geral os fungos produtores de micotoxinas que afetam grãos no campo requerem um teor de umidade de 22 a 25%, enquanto os que afetam no armazenamento crescem em grãos com teor de umidade de 13% a 18% (AFSAH-HEJRI et al., 2013). A quantidade de carboidratos favorece a produção de toxinas. Fungos do gênero *Aspergillus* têm facilidade em crescer em oleginosas, como amendoim. Os bolores em geral precisam de uma umidade relativa acima de 80% e uma atividade de água (A_a) mínima em torno de 0,70 para se desenvolverem, sendo mais resistentes aos efeitos das condições de baixa A_a do que as leveduras e bactérias (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). Valores de A_a para *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores referentes à atividade de água (Aa) para o desenvolvimento e produção de aflatoxinas nas espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

Fungo	Atividade	Aa mínima	Aa ótima
<i>Aspergillus flavus</i>	Crescimento	0,80	0,98
	Produção de aflatoxina	0,82	0,95 - 0,99
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Crescimento	0,80 - 0,83	0,99
	Produção de aflatoxina	0,86 - 0,87	0,95

Fonte: IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em Alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 7, p. 138-161, 2010.

A contaminação por micotoxinas em culturas leva também a prejuízos econômicos, pela necessidade de destruição do produto ou destinação à alimentação animal, o que aumenta os prejuízos aos animais, podendo ocasionar menor crescimento, doenças e morte. Além disso, as toxinas podem ser transferidas para carne e leite (BENNETT; KLICH, 2003). A presença de fungo no alimento não significa que necessariamente haverá produção de micotoxina, assim como a micotoxina pode estar presente no alimento mesmo depois de ter sido eliminado o fungo (MAZIEIRO; BERSOT, 2010).

A maioria das micotoxinas são quimicamente estáveis, resistindo ao armazenamento, processamento e a temperaturas altas. Sendo assim, é imprescindível o controle e a prevenção, pois uma vez produzida a toxina, a simples remoção do bolor se torna inútil (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009) e a toxina pode contaminar rações (SPRING; FEGAN, 2005) e alimentos para consumo humano. As micotoxinas podem ser encontradas em cervejas e vinhos, nas carnes e produtos de origem animal, em praticamente todos os tipos de cereais, oleaginosas, produtos alimentícios em geral, em rações e em matérias primas (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Há vários tipos de micotoxinas, sendo que as mais preocupantes são as aflatoxinas (AF), fumonisinas (FUMO), desoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA) e a zearalenona (ZEA) (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010; SPRING; FEGAN, 2005). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC), classifica os agentes tóxicos por grupos, incluindo as micotoxinas (Tabela 4), descrevendo os agentes do Grupo 1 como carcinógeno para humanos, grupo no qual estão inseridas as aflatoxinas (IARC; WHO, 2018; WHO; IARC, 1993).

Tabela 4 - Classificação segundo a IARC das principais micotoxinas

Classificação	Descrição	Micotoxina
Grupo 1	Carcinogênico para humanos	AFG ₁ , AFG ₂ , AFB ₁ e AFB ₂
Grupo 2A	Provavelmente carcinogênico para humanos	-
Grupo 2B	Possivelmente carcinogênico	AFM ₁ , Fumonisina B ₁ e B ₂ , Ocratoxina A
Grupo 3	Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos	Zearalenona, Deoxinivalenol, T-2, Nivalenol
Grupo 4	Provavelmente não carcinogênico para humanos	-

Fonte: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC; WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–121.** Lyon, 2018.

2.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas são toxinas produzidas por espécies de fungos do gênero *Aspergillus*. As aflatoxinas foram descobertas após um surto que matou mais de 100.000 perus na Inglaterra, no qual as aves consumiram farelo de amendoim proveniente do Brasil contaminado por bolores, ficando a doença conhecida como *Turkey X disease* (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* (NOMURA et al., 2011). As principais espécies que produzem aflatoxinas são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (SANTACROCE et al., 2008; FARAG; EL-TABIY; HASSAN, 2011).

As características morfológicas que distinguem as espécies de *Aspergillus* estão nas paredes dos conídios. O *Aspergillus flavus* tem conídios com paredes relativamente delgadas, estreitas e um pouco rugosas, enquanto que os conídios do *Aspergillus parasiticus* são esféricos e cobertos com pequenos espinhos, e os conídios do *Aspergillus nomius* são mais rugosos (RODRIGUES et al., 2009).

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* são os principais fungos aflatoxigênicos (BENNETT; KLICH, 2003). *Aspergillus flavus* produz aflatoxinas B₁ (AFB₁) e B₂ (AFB₂), já o *Aspergillus parasiticus* e o *Aspergillus nomius* produzem também G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) (BAQUIÃO et al., 2012). As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ recebem esse nome porque quando são expostas à luz UV, fluorescem a cor azul (*blue*) e verde (*green*), enquanto que os números

1 e 2 indicam composto maiores e menores, respectivamente (PITT; HOCKING, 2009). A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um metabólito hidroxilado produzido pela AFB₁, encontrado principalmente no leite e em produtos lácteos (PRANDINI et al., 2009). Na Figura 2 podem-se observar as estruturas químicas de cada aflatoxina.

Figura 2 - Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁

Fonte: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003.** Rome: FAO, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>>. Acesso em: 30 jun. 2015.

A AFB₁ é considerada a mais tóxica de todas as aflatoxinas, seguida por AFG₁, AFB₂ e AFG₂, visto que a AFB₁ é biotransformada pelas células hepáticas em vários metabólitos. Estes metabólitos podem ser formados em animais e humanos quando estes ingerem alimentos contaminados com a AFB₁ (SANTACROCE et al., 2008).

Aflatoxicose é definida como uma patologia relacionada ao consumo de aflatoxinas em alimentos ou em rações, assim, uma aflatoxicose aguda ocasiona morte do indivíduo e uma

aflatoxicose crônica resulta em câncer, imunossupressão e outras doenças tardias (BENNETT; KLICH, 2003).

As aflatoxinas podem ser encontradas em milho, sorgo, arroz, trigo, especiarias, amendoim, soja, girassol, caroço de algodão, nozes, amendoim, coco e leite (BHAT; RAI; KARIM, 2010). Atualmente, a tendência do uso de ingredientes de origem vegetal em formulações de alimentos para a criação de peixes tem intensificado o potencial de surgimento de aflatoxicoses em sistemas agrícolas devido à possibilidade de contaminação por aflatoxinas nestas fontes vegetais (SANTACROCE et al., 2008). Devido ao mau armazenamento da ração ou alimento destinado aos peixes, pode ocorrer desenvolvimento de bolores como o *Aspergillus flavus*, capaz de produzir aflatoxinas, tóxicas para os peixes (EL-SAYED, 2006).

Absorvidas no trato gastrointestinal, as aflatoxinas são biotransformadas primeiramente no fígado por enzimas do citocromo P450, enzimas microssomais do sistema de oxidações de função mista (OLIVEIRA; GERMANO, 1997), chamada de Fase I, fase de ativação (SANTACROCE et al., 2008). A detoxificação de um composto, que é chamada de fase II, ocorre por hidroxilação e os resultantes são excretados na urina ou na bile (BIEHL; BUCK, 1987). O citocromo P450 constitui uma superfamília, ampla e diversificada, de enzimas responsáveis pela biotransformação oxidativa da maioria das drogas e outros xenobióticos lipofílicos (ZANGER; SCHWAB, 2013). Essas enzimas têm a função de inativar vários xenobióticos no organismo.

Um exemplo de um carcinógeno humano xenobiótico é a aflatoxina B₁, esta é bioativada através de um único passo para epoxidação mediada pelo citocromo (HASLER, et al., 1999). É identificada como um composto 8,9-óxido de AFB₁, ou AFB₁-epóxido (anteriormente denominado AFB₁-2,3 epóxido) (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Esse composto é capaz de se ligar ao DNA, RNA e a proteínas (BENNETT; KLICH, 2003; OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A AFB₁-epóxido se liga ao DNA e modifica a sua estrutura com a formação de adutos através da ligação com guaninas, na posição N7, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53, originando assim mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁ (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

A AFB₁, além de poder produzir a AFB₁-epóxido, que pode ser excretada ou ligada ao DNA, pode também produzir outros compostos por hidroxilação, como a AFM₁, a AFQ₁ e

AFB_{2a}, e por desmetilação a AFP₁, na qual esses compostos são excretados no leite (AFM₁), na urina ou bile, e depois nas fezes (BIEHL; BUCK, 1987; SANTACROCE et al., 2008).

O aflatoxicol (AFL) é outro importante metabólito produzido pela AFB₁ através de uma enzima citoplasmática dependente de NADPH, um agente redutor, que reduz a AFB₁ à AFL, ao que parece com uma toxicidade menor. Porém, essa conversão é reversível e com esse mecanismo o AFL pode voltar à forma de AFB₁ servindo de estoque de toxicidade para a AFB₁ (BIEHL; BUCK, 1987; SANTACROCE et al., 2008).

2.4.1 Aflatoxinas em humanos

As aflatoxicoses diferenciam-se em toxicidade aguda e crônica. Não há muitos relatos de toxicidade aguda em humanos. A intoxicação aguda ocorre pela ingestão do alimento que está contaminado com concentrações elevadas de aflatoxinas. Isso ocorre ocasionalmente em países subdesenvolvidos, como no grave surto de aflatoxicose aguda humana no Quênia em 2004, em que ocorreram 317 casos e 125 óbitos (39,4% de mortalidade). Neste caso, o milho destinado ao consumo humano foi contaminado com níveis de aflatoxinas que variaram de 20 a 8.000 µg/kg (LEWIS et al., 2005; PROBS; NJAPAU; COTTY, 2007).

Os efeitos deletérios das micotoxinas são produzidos principalmente quando a absorção se dá por via oral, mas podendo também ocorrer por inalação ou absorção pela pele, afetando vários órgãos e sistemas, principalmente o fígado, rins e sistemas nervoso, endócrino e imunológico (CAST, 2003). Os efeitos da intoxicação humana aguda se caracterizam por vômitos, dor abdominal, edema pulmonar ou cerebral, necrose e esteatose. Outros sintomas incluem anorexia, depressão, icterícia, diarreia e fotossensibilidade (MARIN et al., 2013).

A intoxicação crônica é o tipo mais comum da toxicidade das aflatoxinas e acontece pela ingestão de pequenas quantidades destes compostos tóxicos durante um longo período de tempo. Estes efeitos tóxicos nos humanos são dependentes de fatores como idade, espécie, gênero, estado nutricional, dose e tempo de exposição (MARIN et al., 2013). Em humanos, os piores efeitos das micotoxinas tendem a ser crônicos. Os principais efeitos registrados são indução de câncer, lesão renal, depressão do sistema imune, propriedades alergênicas, teratogênicas, carcinogênicas e mutagênicas, sendo o fígado o principal órgão alvo (ALINEZHAD et al., 2011; AFSAH-HEJRI et al., 2013; CARDOSO FILHO, 2011; JINAP et

al., 2012; PAPP et al., 2002). Com isso, a segurança de alimentos relacionada aos pescados deve ser estudada para avaliarmos os riscos à saúde humana relacionada à ingestão deste alimento.

2.4.2 Aflatoxinas em peixes

Em geral, os efeitos tóxicos das aflatoxinas em animais são diversos e podem provocar baixa conversão alimentar, diminuição do crescimento, distúrbios metabólicos, fisiológicos, nervosos e reprodutivos, problemas no sistema imune, órgãos vitais, queda na produção e mortalidade dos animais (KUBITZA, 2010). As aflatoxinas podem afetar vários animais, incluindo peixes, suínos, aves, roedores e bovinos. Aves e os suínos são mais sensíveis a aflatoxinas do que os ruminantes, visto que a principal alimentação desses animais são grãos e por não serem ruminantes, pois nestes pode haver degradação das toxinas pela flora ruminal (AFSAH-HEJRI et al., 2013).

Em peixes, há dificuldade no diagnóstico preciso de aflatoxicoses e os estudos dos efeitos das aflatoxinas em espécies aquáticas são muito restritos. Alguns sinais que estão associados às aflatoxicoses são: brânquias pálidas, baixa taxa de crescimento, lesão no fígado e imunossupressão (BARBOSA et al., 2013), sintomas muito comuns para qualquer doença em peixes. O primeiro surto de aflatoxicose em espécies aquáticas foi relatado nos Estados Unidos em 1960, em trutas arco-íris. Exames revelaram que os animais apresentavam hepatomegalia e fígado multinodular com carcinoma primário, sendo a causa atribuída aos peixes consumirem farelo de algodão mofado (SANTACROCE et al., 2008).

A influência das aflatoxinas em peixes já foi reportada por alguns autores. Anh Tuan et al. (2002) alimentaram tilápias do Nilo (*O. niloticus*) com dietas contendo 10.000 µg de AFB₁/kg e 100.000 µg de AFB₁/kg por oito semanas e verificaram lesões no fígado. Segundo os autores, esses compostos podem também reduzir o crescimento e atingir o sistema imune dos peixes. Outro trabalho, realizado por Deng et al. (2010), avaliou os efeitos tóxicos e os resíduos de AFB₁ na alimentação de tilápias (*O. niloticus* e *O. aureus*) durante vinte semanas. Até a décima semana não foram observados efeitos tóxicos nos peixes, mas após esse período, com dietas contendo 245 µg de AFB₁/kg detectou-se a aflatoxina no fígado, além de uma diminuição do crescimento e desordem hepática. Huang et al. (2011) relataram que em carpas gibel (*Carrassius auratus gibello*) a exposição à AFB₁ em rações contendo até 2.000 µg de

AFB₁/kg não apresentou nenhum efeito no crescimento e função hepática, mas apresentou diminuição no tamanho dos oócitos, o que pode causar problemas na fertilidade. Chavez-Sanchez, Palacios e Moreno (1994) alimentaram tilápias com diferentes níveis de aflatoxinas por 25 dias e observaram uma redução na taxa de crescimento e consumo da ração, o fígado foi gravemente afetado pela ingestão de aflatoxina, mas não foi observada nenhuma alteração externa nos peixes.

A deposição de aflatoxinas nos peixes é residual e cumulativa, com efeitos visualizados no músculo e fígado (PLAKAS et al., 1991). No entanto, sabe-se que há diferenças quanto a sensibilidade à aflatoxina, devido ao diferente metabolismo entre as espécies (ABDELHAMID, 2007; NAKATSURU et al., 1990; NGETHE et al., 1993). Algumas pesquisas internacionais verificaram a deposição de aflatoxinas em algumas espécies de peixes e camarões. El-Sayed e Khalil (2009) encontraram altos níveis de AFB₁ ($\approx 5 \mu\text{g/kg}$ no músculo de robalos (*Dicentrarchus labrax* L.), concluindo que a espécie é vulnerável à AFB₁. Relataram também alta concentração de aflatoxina B₁ ($4,25 \mu\text{g/kg}$) no músculo comestível de robalos, sugerindo um risco significativo para a transmissão de AFB₁ aos humanos. Huang (2011) reportou que os resíduos de aflatoxina foram detectados em diferentes tecidos do camarão, sendo o músculo o tecido com maior acúmulo: $14,2 \mu\text{g/kg}$ de AFB₁ quando alimentado com $100 \mu\text{g/kg}$ de AFB₁ por quatro semanas. Dados acerca do acúmulo das aflatoxinas nos tecidos dos peixes são necessários para avaliar o risco aos consumidores.

2.5 Legislação

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estipula que o limite máximo para aflatoxinas seja de $50 \mu\text{g/kg}$ para qualquer matéria prima para alimentação direta ou de componente de rações destinada ao consumo animal (REIS; CORRÊA; FERNANDES, 2010).

A mais recente legislação brasileira que dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos é a Resolução RDC 138 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 08 de fevereiro de 2017 (ANVISA, 2017). Foram estabelecidos limites para aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), fumonisinas (B₁ e B₂), ocratoxina A, desoxinivalenol,

zearalenona e patulina em alguns produtos alimentícios. No entanto, não há limites estabelecidos em produtos de origem animal, exceto para leite e queijos (ANVISA, 2011).

Os limites tolerados nos Estados Unidos da América (EUA) para micotoxinas nos alimentos destinados a alimentação animal variam bastante de acordo com a micotoxina, o alimento e a espécie animal. Para aflatoxinas, os limites de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em alimentos como milho, farelo de algodão e amendoim destinados a gado de corte, suínos e aves são de 300 µg/kg. Limites para fumonisinas B₁, B₂ e B₃ em grãos de milho e subprodutos destinados a suínos e peixe da espécie bagre é de 20.000 µg/kg (FAO, 2004).

A União Européia estabelece limites máximos de AFB₁ para toda matéria-prima e ração destinada à alimentação animal variando de 5 a 20 µg/kg e descreve esses limites para vários tipos de espécies de animais, definindo ainda 1.000.000 µg/kg como limite para alcalóides de Ergot e para todos os alimentos com cereais não moídos destinados aos animais (FAO, 2004).

2.6 Métodos cromatográficos

Existem vários métodos qualitativos e quantitativos para analisar as micotoxinas, como a cromatografia de camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), imunoensaios, cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (CL-EM) e a cromatografia a gás associada à espectrometria de massa (CG-EM) (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009). A cromatografia é uma técnica de separação em que os componentes são distribuídos entre duas fases: uma fase estacionária, fixa e de grande área superficial, e outra, a fase móvel, onde um fluido passa através da fase estacionária. Tal técnica foi desenvolvida pelo botânico russo Mikhael Tswett no início do século XX, quando ele separou pigmentos coloridos de extratos de folhas verdes de plantas utilizando um tubo com carbonato de cálcio (LANÇAS, 2009).

Os procedimentos analíticos para a determinação das aflatoxinas partem da extração, utilizando misturas de solventes e água em proporções diferentes, purificação da amostra usando colunas de imunoafinidade e a determinação com derivatização pós-coluna ou pré-coluna, utilizando um cromatógrafo, como o CLAE, com detectores de fluorescência.

Para a purificação de aflatoxinas podem ser utilizadas colunas de imunoafinidade (CIA), que exercem um papel essencial no método de purificação, concentração da amostra e a

análise de aflatoxinas. A coluna de imunoafinidade é composta por anticorpos (monoclonal e policlonal) na forma de um tipo de gel em tampão fosfato contidos em uma pequena coluna. Quando adicionadas à amostra, as aflatoxinas se ligam aos anticorpos da coluna, ficando retidas na CIA, em seguida a coluna é lavada com solventes apropriados para desfazer a ligação das aflatoxinas-anticorpos, para posterior secagem e quantificação (LI et al., 2011).

A quantificação de aflatoxinas por CLAE usando detectores de fluorescência é um dos métodos analíticos mais utilizados, devido à alta eficiência, sensibilidade e alta resolução, que a partir de uma amostra permite a detecção de vários compostos, como é o caso da detecção das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. As AFB₁ e AFG₁, devido ao seu baixo sinal de fluorescência, necessitam de uma derivatização utilizando um fluoróforo adequado para aumentar o sinal e alguns derivatizadores pré-coluna, como o ácido trifluoracético, transformam AFB₁ em AFB₂α e a AFG₁ em AFG₂α (LI et al., 2011).

Os conhecimentos básicos de um método analítico são muito importantes para uma excelência na quantificação e detecção de aflatoxinas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de aflatoxinas em fígado e músculo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e rações provenientes de pisciculturas do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

Detectar e quantificar aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amostras de ração de pisciculturas do Brasil.

Detectar e quantificar aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e em amostras de fígado e músculo de tilápias provenientes de pisciculturas do Brasil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

As amostras de ração e de tilápias (*O. niloticus*) foram coletadas em 42 pisciculturas localizadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Alagoas, as propriedades foram denominadas P1, P2, P3, até P42.

As amostras analisadas do Estado de São Paulo foram provenientes dos municípios de: Araras, Arthur Nogueira, Arandu, Caconde, Corumbataí, Espírito Santo do Pinhal, Estiva Gerbi, Jundiaí, Leme, Limeira, Louveira, Mogi Mirim, Paulínia, Pirassununga, Porto Ferreira, Sales, Santa Cruz da Conceição, Santa Fé do Sul, Santo Antonio do Jardim, São João da Boa Vista, Tapiratiba e Valinhos. No Estado de Minas Gerais, as amostras foram coletadas nas cidades de Alterosa, Alfenas, Poços de Caldas e Diamantina e do Estado de Alagoas na cidade de Maceió.

4.1.1 Amostragem da ração

Foram coletadas 43 amostras de rações extrusadas. As amostras de rações foram coletadas em sacos estéreis (100 g de diferentes pontos da embalagem, constituindo uma única amostra de 500 g) e transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP/Pirassununga, onde foram armazenadas a -20°C até serem submetidas às análises.

4.1.2 Amostragem do pescado

As amostras de tilápias (*O. niloticus*) foram coletadas no período de Abril de 2017 a Janeiro de 2018, de acordo com a disponibilidade de cada piscicultura. Em geral, os proprietários doavam de três a cinco tilápias (300-500g) para compormos uma amostra, conforme apresentado na Figura 3.

As amostras foram acondicionadas dentro de caixas isotérmicas com gelo e transportadas para o Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e

Engenharia de Alimentos – USP/Pirassununga, onde imediatamente após a chegada ao laboratório, as amostras de peixes foram submetidas à separação do músculo e fígado, Figuras 4 e 5, os quais foram congelados em tubos de 50 mL a -80°C até o momento da análise.

Figura 3 - Amostras de tilápias

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 4 - Fígado e músculo de tilápia

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 5 -Tubos contendo amostras do músculo e do fígado das tilápias para armazenamento

Fonte: Acervo pessoal.

4.2 Determinação da atividade de água nas amostras de ração

As amostras de ração foram trituradas para determinação da atividade de água utilizando-se o equipamento AquaLab (Decagon Devices, São José dos Campos, Brasil).

4.3 Determinação das aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.3.1 Padrões e Solventes utilizados

Os padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (Mix de aflatoxina Oekanal[®] 20 µg/mL B₁, G₁, B₂, G₂ em acetonitrila), diluídos em acetonitrila para obtenção da concentração exata das aflatoxinas, utilizando-se como solventes metanol e acetonitrila Grau HPLC.

4.3.2 Curvas de calibração

Para a curva de calibração das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram utilizadas cinco concentrações, com 0.5, 1, 5, 10 e 15 µg/mL de cada padrão. As quantidades correspondentes a cada concentração foram colocadas em um vial e evaporadas até a secura sob fluxo de N₂. Em seguida, foram derivatizadas com 25 µL de ácido trifluoroacético, e ressuspendidas com 975 µL de acetonitrila-água (2:8, v/v), homogeneizadas em vortex durante um minuto e 50 µL de cada solução padrão foram injetados no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.3.3 Desempenho do método analítico

Para a avaliação do desempenho do método analítico foram feitos ensaios de recuperação em amostras contaminadas artificialmente com as aflatoxinas. Foi contaminada artificialmente com AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ uma amostra de ração, fígado e músculo, nas concentrações de 5 e 20 µg de AF/kg. Antes da contaminação das amostras, as mesmas foram quantificadas para verificarmos se existia alguma contaminação, só em seguida foi realizado a fortificação adicionando as concentrações pré estabelecidas no momento da extração da amostra, na qual se pesa a amostra e adiciona a solução de metanol-água (80:20, v/v).

As fortificações foram realizadas três vezes (triplicata) para cada concentração do composto, seguindo os métodos descritos a seguir (Método I, II e III) e submetidas à derivatização e injetadas no sistema CLAE para obtenção de percentuais de recuperação e coeficiente de variação.

4.3.4 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir do preparo das soluções padrões de aflatoxinas (Sigma-Aldrich Mix de aflatoxina Oekanal[®] 20 µg/mL B₁, G₁, B₂, G₂ em acetonitrila), até atingirmos a menor concentração detectada e quantificada de aflatoxinas nas amostras de ração, fígado e músculo (VICAM, 2017).

4.3.5 Extração das aflatoxinas

A determinação de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) nas amostras foi efetuada de acordo com Michelin et al. (2017), utilizando-se colunas de imunoafinidade Aflatest WB[®] (Vicom, Watertown, Estados Unidos da América) e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito resumidamente a seguir.

4.3.6 Determinação de aflatoxinas nas amostras de ração - Método I

A amostra de ração foi previamente homogeneizada e triturada. Em seguida, a amostra analítica (25 g) foi colocada em um frasco, juntamente com 5 g de NaCl e adicionou-se 100 mL de metanol-água (80:20, v/v). Após a agitação a 250 rpm em mesa agitadora (Lucadema, São Paulo, Brasil) por 30 minutos, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº1 (Inc. Clifton, New Jersey, USA) e recolhida em um frasco. Em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 10 mL de solução de tampão fosfato 0,01M, acrescidos de 0,5 mL da amostra filtrada. A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade Aflatest WB[®] (Vicom, Watertown, USA) com fluxo de 1-2 gotas/s. Em seguida, a coluna foi lavada com 15 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M. A eluição da micotoxina foi realizada com a passagem de 1,5 mL de metanol pela coluna de imunoafinidade. O eluato foi recolhido em um vial de 2 mL. Os vials foram armazenados a -20° até o momento da derivatização química.

4.3.7 Determinação das aflatoxinas nas amostras de fígado das tilápias - Método II

Foi pesada 1 grama da amostra de fígado em um tubo de 50 mL e em seguida, adicionado 10 mL de metanol-água (80:20, v/v), e macerada durante 3 minutos. A amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos. Depois transferido o sobrenadante para outro tubo cônico de 50 mL e filtrado com filtro PTFE 0,45 µm Chromafil[®] Xtra. Foram adicionados 25 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M, em um tubo cônico de 50 mL e acrescidos de 1 mL da amostra filtrada. A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade Aflatest WB[®] (Vicom, Watertown, USA) com fluxo de 1-2 gotas/s. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M e posteriormente com 1 mL de água ultrapura. A eluição da micotoxina foi realizada com a passagem de 1,5 mL de metanol-acetonitrila (2:3, v/v) pela coluna de imunoafinidade. O eluato então recolhido em um vial de

2 mL. Em seguida, o eluato foi evaporado até a secura sob fluxo de N₂. Os vials foram armazenados a -20° até o momento da derivatização química.

4.3.8 Determinação das aflatoxinas nas amostras de músculo das tilápias - Método III

A amostra de músculo do peixe foi previamente homogeneizada e picada em pequenos pedaços. Em seguida, a amostra analítica (5 g) foi colocada em um tubo cônico de 50 mL, juntamente com 20 mL de metanol-água (80:20,v/v), e homogeneizada com o auxílio de um *mixer* durante 3 minutos, para sua total trituração. A mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos. Em um tubo cônico de 50 mL foram adicionados 25 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M, acrescidos de 4 mL da amostra filtrada. A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicom, Watertown, USA) com fluxo de 1-2 gotas/s. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de solução de tampão fosfato 0,01 M e posteriormente com 1 mL de água ultrapura. A eluição da micotoxina foi realizada com a passagem de 1,5 mL de acetonitrila-metanol (3:2, v/v) pela coluna de imunoafinidade. O eluato então recolhido em um vial de 2 mL. Em seguida, o eluato foi evaporado até a secura sob fluxo de N₂. Os vials foram armazenados a -20° até o momento da derivatização química.

4.3.9 Derivatização química das aflatoxinas

Para a derivatização pré-coluna foi utilizado o ácido trifluoroacético (TFA), que converte as AFG₁ e AFB₁ em AFG_{2a} e AFB_{2a}.

Para as amostras de ração e curva de calibração as soluções padrões foram derivatizadas em 25 µL de ácido trifluoroacético por 5 minutos e ressuspensas com 975 µL de acetonitrila-água (2:8, v/v), totalizando um volume final de 1 mL. Homogeneizada em vortex por 1 minuto e posteriormente injetada no sistema CLAE.

As amostras de fígado e músculo das tilápias foram derivatizadas com 30 µL de ácido trifluoroacético por 10 minutos e ressuspensas com 970 µL de acetonitrila-água (2:8, v/v), perfazendo um volume final de 1 mL. A solução foi agitada em vortex por 1 minuto e posteriormente injetada no sistema CLAE.

4.3.10 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para todas as análises foram injetados 50 µL de cada amostra no sistema CLAE, cromatógrafo modelo Prominence 20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), com injetor automático, SIL-20A HT (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A quantificação das amostras de aflatoxinas foi determinada pelo software LabSolutions (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) através das áreas dos picos e da equação da curva analítica. A partir desses dados foram realizados os cálculos das concentrações das amostras, para se chegar ao resultado final em µg/kg de cada composto.

A fase móvel utilizada para separação dos compostos foi isocrática composta por: água:acetonitrila:metanol (5,4:1:1 v/v/v) com um fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a Hyperclone BDS C18 (3µm) 100 x 4,6 mm (Phenomenex[®], Califórnia, EUA), cartucho de pré-coluna da Shim Pack GVP-ODS 10L x 4,6 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e detector de fluorescência RF-20A com excitação de 350 nm e emissão de 450 nm (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

4.4 Comitê de ética

Para a realização deste trabalho, o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), sob o protocolo 3956160118.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição da Ração

A composição geral das rações analisadas, seguindo a descrição da rotulagem, foi bastante similar, como pode ser observada na Figura 6. Esta composição demonstra quais ingredientes sempre fazem parte da alimentação dos peixes e o que compõe as suas rações, com apenas algumas diferenças nas matérias-primas utilizadas (farelo de arroz, farelo de gérmen de trigo, farinha de peixe, farinha de sangue, farinha de trigo e de vísceras de aves).

Figura 6 -Composição geral das rações analisadas, baseadas nos rótulos das embalagens

Fonte: Própria autoria.

As rações para animais são produzidas com vários ingredientes, como grãos, leguminosas, proteína animal, vitaminas e minerais, com quantidades adequadas para o crescimento rápido, saudável e ganho de peso (GRECO et al., 2017). Segundo Jakić-Dimić et al. (2005), os cereais são fonte de energia e as leguminosas ricas em proteínas, e esses fazem parte da alimentação dos animais (90%), incluindo os peixes.

As rações extrusadas são comuns para alimentação de animais domésticos, aquáticos e em alguns casos para o gado (PENG; MARCHAL; VAN DER POEL, 2018; ROKEY; PLATTNER; SOUZA, 2010), em pisciculturas é padrão oferecer rações extrusadas pela fluabilidade e rendimento. É chamada de extrusão por cozedura, ou extrusão termoplástica, e é produzida com temperaturas em torno de 125 a 150°C, alta pressão, com teor de umidade de 23 a 28%. Após a extrusão, a ração é seca em temperaturas de 90 a 180°C, reduzindo assim o teor de umidade a valores inferiores a 10% (ROKEY; PLATTNER; SOUZA, 2010).

Um estudo feito por Castells et al. (2006) avaliou a redução de aflatoxinas pela extrusão por cozedura e constatou uma diminuição eficaz em altas temperaturas (170°C a 200°C) e menos eficaz a baixas temperaturas (140°C). Porém, temperaturas mais altas durante a extrusão (160°C) podem influenciar negativamente na qualidade protéica das rações e em outros parâmetros nutricionais do alimento (PENG; MARCHAL; VAN DER POEL, 2018). Mas, por existir vários aspectos importantes envolvidos no processo de fabricação das rações extrusadas, este não é um processo favorável contínuo na redução de aflatoxinas, já que a resistência térmica das aflatoxinas é em torno de 268°C (PENG; MARCHAL; VAN DER POEL, 2018) e os processos de extrusão não atingem essa temperatura.

Nas coletas realizadas foi observado que em muitas pisciculturas as rações eram armazenadas suspensas do piso em galpões, porém sem controle de temperatura e umidade. As rações que estavam em uso (embalagens abertas) e em estoque eram mantidas no mesmo local. O armazenamento inadequado é um fator de risco que favorece o surgimento de bolores e micotoxinas nos alimentos (BHAT; RAI; KARIM, 2010).

5.1 Atividade de água (Aa) da ração

Na Tabela 5 está descrito o tipo de ração que foi coletada de cada propriedade e o valor encontrado de atividade de água. Algumas propriedades utilizavam a mesma ração e outras utilizavam mais de um tipo de ração.

Tabela 5 - Identificação e atividade de água (Aa) das rações em diferentes pisciculturas

Pisciculturas	Amostras de ração	Ração coletada	Atividade de água
P1/P2	01	8 mm	0,62
P3	02	8 mm	0,52
P4	03	4 mm	0,59
P5	04	8 mm	0,62
P6	05	8 mm	0,70
P7/P8/P9/P10/P11/P12	06	3-4 mm (Estoque)	0,62
P7/P8/P9/P10/P11/P12	07	4-6 mm (Estoque)	0,66
P13	08	4-6 mm	0,75
P14	09	6 mm	0,66
P15	10	2-4 mm	0,65
P16	11	3-4 mm	0,65
P16	12	4-6 mm	0,57
P17	13	6 mm	0,60
P18	14	6-8 mm	0,49
P19/P20	15	2-4 mm	0,58
P19/P20	16	2-4 mm (Estoque)	0,52
P21	17	4 mm	0,69
P22	18	2 mm	0,63
P23	19	6 mm	0,65
P24	20	10 mm	0,60
P25	21	6 mm	0,62
P26	22	8 mm	0,64
P27	23	8 mm	0,60
P28	24	6-8 mm	0,49
P29	25	8 mm	0,59
P30	26	-	0,65
P31	27	10 mm	0,65
	28	6 mm	0,56
P32	29	6 mm	0,62
	30	8 mm	0,61
P33	31	8-10 mm	0,59
P34	32	farelada	0,69
	33	4 mm	0,44
	34	6 mm	0,53
P35	35	8-10 mm	0,44
P36	36	4-6 mm	0,56
P37	37	5 mm	0,57
P38	38	8-10 mm	0,64
P39	39	4 mm	0,69
	40	4 -5 mm	0,54
P40	41	10-15 mm	0,59
P41	42	6 mm	0,64
P42	43	2 mm	0,68

Fonte: Própria autoria.

Os resultados da atividade de água (Aa) nas 43 amostras de ração (Tabela 5) apresentaram valor máximo de 0,75 e valor mínimo de 0,44 e média de 0,60.

A atividade de água e a temperatura são fatores importantes que podem determinar o crescimento fúngico nos alimentos secos (MOHAMED et al., 2012). Em geral, a atividade de água menor que 0,60 evita o aparecimento de fungos (ROKEY; PLATTNER; SOUZA, 2010). As condições para a produção de micotoxinas são geralmente mais restritas que aquelas necessárias para o crescimento fúngico e podem diferir entre diferentes micotoxinas produzidas pela mesma espécie de fungo (FRISVAD; SAMSON, 1991). No entanto, segundo Jakić-Dimić et al. (2005), a produção de AFB₁ pode ocorrer em condições de, baixa atividade de água e temperatura, pois avaliando amostras de milho constatou crescimento fúngico em 100% das amostras, além de contaminação com zearalenona, ocratoxina A e aflatoxina B₁.

Alguns estudos avaliaram a relação entre a Aa e o crescimento fúngico em rações para peixes. Massocco (2016) avaliou a ocorrência de fungos toxigênicos na ração e aflatoxinas em cinco pisciculturas do estado de São Paulo e encontrou baixa Aa nas amostras de ração, com valor máximo de 0,72 Aa e mínimo de 0,45 Aa. Todas as amostras apresentaram crescimento do gênero de *Aspergillus* e, das cepas isoladas, 84,2% eram capazes de produzir aflatoxinas. Barbosa et al. (2013) verificou a microbiota fúngica e a presença de AFB₁, fumosinina B₁ e ocratoxina A em 60 amostras de ração para peixe de pisciculturas do estado do Rio de Janeiro e encontraram valores médios de atividade de água de 0,598 nas amostras.

Todavia, a presença de fungos na ração não está associada diretamente à presença de micotoxinas, deste modo, as condições ótimas para o crescimento de fungos não são necessariamente ótimas para a produção de toxinas (HUSSEIN; BASEL, 2001).

5.2 Resultados do Desempenho do Método Analítico

As curvas de calibração e a avaliação do desempenho dos métodos analíticos foram realizadas para aflatoxinas nas rações e tilápia (*O. niloticus*) e esses dados são apresentados a seguir.

5.2.1 Curvas de Calibração de Aflatoxinas

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂ foram, 0,997, 0,995, 0,997 e 0,995 respectivamente. Foram feitos cinco pontos com concentrações de 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 15,0 µg/kg de cada aflatoxina. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7 - Curvas de Calibração das AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂

Curvas de calibração com 5 pontos obtidas para as soluções padrão de (a) **AFG₁** (coeficiente de correlação $r = 0,996$), (b) **AFB₁** (coeficiente de correlação $r = 0,997$), (c) **AFG₂** (coeficiente de correlação $r = 0,995$), (d) **AFB₂** (coeficiente de correlação $r = 0,994$).

Fonte: Própria autoria.

5.2.2 Tempos de Retenção

Os tempos de retenção de cada aflatoxina podem ser verificados na Figura 8. Observa-se que as AFG₁ e AFB₁ se transformaram em AFG_{2a} e AFB_{2a}, respectivamente, devido a derivatização pré-coluna que foi realizada utilizando ácido trifluoracético (TFA) para aumentar a intensidade de fluorescência dessas aflatoxinas em análises de CLAE.

Figura 8 - Cromatograma com os tempos de retenção de cada aflatoxina na concentração de 0,5 µg/kg

Cromatograma com os tempos de retenção de cada aflatoxina, sendo: AFG_{2a}: 4.629 min para AFG₁, AFB_{2a}: 6.722 min para AFB₁, 10.287 min para AFG₂ e 15.987 min para AFB₂.

Fonte: Própria autoria.

5.2.3 Avaliação do Desempenho dos Métodos Analíticos

Todos os resultados dos limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Limites de Detecção e Limites de Quantificação das respectivas amostras

Limites	Ração (µg/kg)	Fígado (µg/kg)	Músculo (µg/kg)
LD	0,03	0,05	0,03
LQ	0,09	0,15	0,09

LD: Limite de Detecção e LQ: Limite de Quantificação.

Fonte: Própria autoria.

Os ensaios de recuperação nas amostras de ração e de fígado foram efetuados em conjunto com os alunos Carolina Maria Bedoya Serna, Euder Cesar Michelin e Marina Martinêz Massoco, os quais também avaliaram aflatoxinas em rações e peixes, em diferentes experimentos.

A recuperação média para os dois níveis de toxina na ração foi de 85% para AFB₁, 92,9% para AFB₂, 81,4% para AFG₁ e de 88,4% para AFG₂. Os níveis e porcentagens obtidas podem ser observados na Tabela 7.

Os níveis e porcentagens obtidos para as amostras de fígado podem ser observados na Tabela 8. As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no fígado foram de 104,0%, para AFB₁, 112,6% para AFB₂, 91,5% para AFG₁ e de 104,5% para AFG₂.

Para as amostras de músculo os níveis e porcentagens obtidos podem ser observados na Tabela 9. As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no músculo foram de 87,4% para AFB₁, 92,7% para AFB₂, 82% para AFG₁ e de 86,2% para AFG₂.

Para AFB₁ ou para a soma de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, recomendam-se níveis de 1 a 10 µg/kg, com recuperações de 70 a 110%, e para níveis >10 µg/kg, com recuperações de 80 a 110% (UNIÃO EUROPÉIA CE. 401, 2006). Quanto aos percentuais do coeficiente de variação (CV), recomenda-se não exceder valores de 30% para níveis de 1 a 9,99 µg/kg e 20% para níveis de 10 a 99,99 µg/kg (BRASIL, 2011). Os percentuais de recuperação e coeficientes de variações para todos os métodos realizados neste estudo (ração, fígado e músculo) mostraram-se adequados e dentro faixa de desempenho de métodos analíticos para análises de micotoxinas.

Tabela 7 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de ração para peixes

AFB₁ Adicionada (µg/kg)	AFB₁ Observada (µg/kg)	AFB₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	3,8	4,1	81,2	9,3
	3,9			
	4,5			
20,0	16,0	17,7	88,7	9,7
	17,7			
	19,5			
AFB₂ Adicionada (µg/kg)	AFB₂ Observada (µg/kg)	AFB₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,2	4,5	90,6	7,4
	4,5			
	4,9			
20,0	18,6	19,0	95,1	5,9
	18,2			
	20,3			
AFG₁ Adicionada (µg/kg)	AFG₁ Observada (µg/kg)	AFG₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	3,7	4,1	82,3	7,7
	4,3			
	4,3			
20,0	16,9	16,1	80,5	4,3
	15,7			
	15,7			
AFG₂ Adicionada (µg/kg)	AFG₂ Observada (µg/kg)	AFG₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,1	4,5	90,2	8,9
	4,9			
	4,5			
20,0	20,0	17,3	86,6	5,9
	14,8			
	17,1			

Fonte: Própria autoria.

Tabela 8 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe

AFB₁ Adicionada (µg/kg)	AFB₁ Observada (µg/kg)	AFB₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,9	5,5	109,9	8,4
	5,0			
	5,7			
20,0	19,4	19,5	98,0	9,6
	21,5			
	17,8			
AFB₂ Adicionada (µg/kg)	AFB₂ Observada (µg/kg)	AFB₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	6,7	6,4	123,0	8,3
	5,8			
	6,7			
20,0	20,4	20,4	102,21	7,3
	21,9			
	18,9			
AFG₁ Adicionada (µg/kg)	AFG₁ Observada (µg/kg)	AFG₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,7	4,2	85,3	11,6
	3,7			
	4,3			
20,0	20,7	19,5	97,6	13,4
	21,3			
	16,5			
AFG₂ Adicionada (µg/kg)	AFG₂ Observada (µg/kg)	AFG₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,7	5,5	110,4	13,7
	4,7			
	6,2			
20,0	20,5	19,7	98,5	9,8
	21,1			
	17,5			

Fonte: Própria autoria.

Tabela 9 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de músculo de tilápia

AFB₁ Adicionada (µg/kg)	AFB₁ Observada (µg/kg)	AFB₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,0	4,4	89,0	7,8
	4,7			
	4,5			
20,0	16,0	17,0	85,8	5,2
	17,7			
	17,4			
AFB₂ Adicionada (µg/kg)	AFB₂ Observada (µg/kg)	AFB₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,4	4,7	93,9	5,9
	5,0			
	4,7			
20,0	17,0	18,2	91,6	5,6
	18,9			
	18,7			
AFG₁ Adicionada (µg/kg)	AFG₁ Observada (µg/kg)	AFG₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	3,8	4,1	82,9	7,7
	4,4			
	4,2			
20,0	15,8	16,0	81,1	1,9
	16,4			
	16,0			
AFG₂ Adicionada (µg/kg)	AFG₂ Observada (µg/kg)	AFG₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,0	4,2	85,3	6,3
	4,5			
	4,2			
20,0	16,3	17,3	87,2	5,4
	18,1			
	17,5			

Fonte: Própria autoria.

5.3 Detecção e Quantificação de Aflatoxinas nas Amostras

5.3.1 Aflatoxinas na ração

Na Tabela 10 pode-se observar que foram encontradas somente AFG₁ e AFB₁ nas amostras de ração. Em nenhuma amostra foi detectada AFG₂ e AFB₂. Houve ocorrência de AFG₁ e AFB₁ em 16,28% e 86,05% das amostras de ração, respectivamente, sendo que em 9,30% e 39,54% delas foram encontrados somente traços de AFG₁ e AFB₁, respectivamente. As amostras com níveis quantificáveis de AFG₁ e AFB₁ representaram 6,98% e 46,51% do total, respectivamente. Assim, nota-se que houve uma alta ocorrência de AFB₁ nas rações analisadas.

Tabela 10 - Aflatoxinas nas rações de pisciculturas

Níveis na ração	AFG ₁		AFB ₁	
	n	%	n	%
ND (<LD)	36	83,72	6	13,95
Traços (entre LD e LQ)	04	9,30	17	39,54
Níveis quantificáveis (>LQ)	03	6,98	20	46,51
Positivos (>LD)	07	16,28	37	86,05
Total de amostras	43	100%	43	100%

ND: não detectado; LD: limite de detecção = 0,03 µg/kg; LQ: Limite de Quantificação = 0,09 µg/kg; Traços: valores entre o LD e LQ.

Fonte: Própria autoria.

Na Figura 9 está apresentada a distribuição de aflatoxinas nas amostras de ração. Os níveis encontrados foram considerados baixos, pois não excederam 1 µg/kg de aflatoxinas. Os níveis encontrados para AFG₁ variaram de 0,09 a 0,540 µg/kg, e para AFB₁ variaram de 0,09 a 0,736 µg/kg.

Figura 9 - Distribuição dos níveis de aflatoxinas nas amostras de ração provenientes das pisciculturas analisadas

Fonte: Própria autoria.

Os níveis de aflatoxinas das rações analisadas mostraram-se dentro do limite estabelecido pela Legislação Brasileira do Ministério da Agricultura da Portaria MA/SNAD/SFA N°. 07, de 09/11/88, que é de 50 µg/kg (soma da AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂) para qualquer matéria prima ou ração destinada ao consumo animal (BRASIL, 1988). A União Européia estipula limites máximos de 20 µg/kg de AFB₁ em matérias primas e rações destinadas aos animais, mas não estabelece limites para peixes (FAO, 2004).

As amostras 08 e 38 das pisciculturas P13 e P38, respectivamente, foram as que apresentaram níveis mais altos de AFB₁, de 0,698 µg/kg e 0,736 µg/kg, respectivamente. Essas rações estavam em uso e suas atividades de água foram de 0,75 e 0,64, respectivamente. A atividade de água da amostra 08 foi a mais alta de todas as amostras das rações analisadas. Massocco (2016) também encontrou AFB₁ (1,4 µg/kg) em uma amostra de ração para peixe e a mesma apresentou Aa 0,72, sendo a Aa mais alta de todas as amostras analisadas.

A atividade de água indica a quantidade de água disponível no alimento (CHEVANAN; MUTHUKUMARAPPAN; ROSENTRATER, 2009; ROKEY; PLATTNER; SOUZA, 2010). Quanto maior a Aa no alimento, maior a chance dos microorganismos se desenvolverem (FOLEY; ROSENTRATER, 2013). Normalmente, uma Aa menor que 0,70 já garante que não ocorrerá uma deterioração fúngica (PENG; MARCHAL; VAN DER POEL, 2018). Mas,

mesmo que as rações comerciais venham com níveis de garantia controlados pelo fabricante, o armazenamento inadequado das rações pode favorecer o crescimento fúngico e consequentemente a produção por aflatoxinas. Segundo Feddern et al. (2013), o armazenamento de grãos sob teor apropriado de umidade, com controle da temperatura, de insetos e umidade relativa do ar, já garante eventuais desenvolvimentos de fungos nas rações.

Os estudos descritos a seguir mostram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, também utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de aflatoxinas em rações.

Gonçalves, Naehrer e Santos (2016) avaliaram amostras de rações para peixes e camarões oriundas da Europa e da Ásia e encontraram níveis médios de aflatoxinas totais de 0,43 µg/kg em 17% das amostras européias e níveis médios de 51,83 µg/kg em 68% das amostras asiáticas. Nesse trabalho eles também avaliaram outras micotoxinas (zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas totais e ocratoxina A) e verificaram co-ocorrência de micotoxinas em 76% das rações analisadas.

No trabalho de Marijani et al. (2017), foi avaliada a presença de micotoxinas em rações e ingredientes para ração de peixe em quatro países da África Oriental, e foram encontrados níveis de < 2 a 806 µg/kg de AFB₁ em 64,3% das amostras de rações produzidas nas próprias fazendas, 50% nas matérias primas, e 35,7% nas rações comerciais locais, no entanto, não detectaram micotoxinas nas rações importadas.

Mohamed et al. (2017) avaliaram a ocorrência natural de aflatoxinas em 25 amostras de rações para peixe coletadas em pisciculturas na região do Qena, no Egito, e verificaram que 96% das amostras continham aflatoxinas (AFB₁, AFB₂ e AFG₂), com níveis de 0,07 a 8,10 µg de AFB₁/kg em 64% das amostras de ração.

Outros estudos, utilizando outros métodos que não a CLAE, não encontraram AFB₁ na ração em níveis quantificáveis. Barbosa et al. (2013) analisaram amostras de ração para peixes de pisciculturas do estado do Rio de Janeiro, encontrando 55% de AFB₁ abaixo do limite de detecção (< 3 µg/kg) e 90% de FB₁ com níveis médios de 2.600 µg/kg. Neste estudo foi utilizado um kit imunoabsorvente como método de determinação, observando-se uma co-ocorrência de 50% dessas micotoxinas e em 3,3% uma ocorrência simultânea de três micotoxinas (AFB₁, FB₁ e OTA). Hashimoto (2003) encontrou níveis mais altos em amostras de rações de pisciculturas da cidade de Londrina/PR, reportando níveis que variaram de não

detectável a 15,60 µg/kg de AFB₁, sendo que 38,10% das amostras estavam acima do limite de quantificação de 4 µg/kg. Entretanto, deve-se levar em consideração que neste trabalho o método utilizado para determinação de aflatoxinas foi a cromatografia de camada delgada.

As aflatoxinas podem afetar negativamente o crescimento e a utilização de alimentos pelos peixes, resultando em um impacto negativo na produção (ADE-NIJI et al., 2014), além do potencial carcinogênico (MURJANI, 2003). De acordo com Russo e Yanong (2010), espécies como a tilápia têm maior potencial de desenvolvimento de aflatoxicose, pois os ingredientes vegetais, formulados em suas dietas, têm um potencial maior para a contaminação por aflatoxinas em relação aos ingredientes de origem animal. Além disso, condições tropicais e subtropicais aumentam ainda mais esse potencial devido ao armazenamento sob condições úmidas e quentes (RUSSO; YANONG, 2010).

5.3.2 Aflatoxinas no fígado e músculo da tilápia

Os resultados de aflatoxinas no fígado das tilápias encontram-se na Tabela 11. Não foram detectadas AFG₂ e AFB₂ nas amostras de fígado, no entanto, 85,72% das amostras foram positivas para AFB₁, sendo que em 40,48% foram encontrados traços e em 45,24% das amostras foi possível quantificar a toxina. A AFG₁ foi detectada em 7,14% das amostras de fígado, sendo que em 4,76% foram detectados traços e em 2,38% níveis acima do limite de quantificação.

Tabela 11 - Aflatoxinas no fígado da tilápia

Níveis no fígado	AFG ₁		AFB ₁	
	n	%	n	%
ND (<LD)	39	92,86	06	14,28
Traços (entre LD e LQ)	02	4,76	17	40,48
Níveis quantificáveis (>LQ)	01	2,38	19	45,24
Positivos (>LD)	03	7,14	36	85,72
Total de amostras	42	100%	42	100%

ND: não detectado; LD: limite de detecção = 0,05 µg/kg; LQ: Limite de Quantificação = 0,15 µg/kg; Traços: entre o LD e LQ.

Fonte: Própria autoria.

A distribuição dos níveis de AFG₁ e AFB₁ encontrados nas amostras de fígado está apresentada na Figura 10. A amostra na qual foi possível quantificar a AFG₁ apresentou um nível de 0,152 µg/kg. No entanto, os níveis de AFB₁ variaram de 0,150 a 0,866 µg/kg.

Figura 10 – Distribuição dos níveis de aflatoxinas nas amostras de fígado

Fonte: Própria autoria.

Os níveis de aflatoxinas no músculo das tilápias estão apresentados na Tabela 12. Não foram encontradas AFG₁, AFG₂ e AFB₂ nas amostras de músculo das tilápias. A AFB₁ foi quantificada em 16,67% das amostras e traços foram detectados em 2,38% das amostras, totalizando 19,05% de amostras positivas. Os níveis de AFB₁ encontrados no músculo variaram de 0,150 a 0,372 µg/kg (Figura 11).

Tabela 12 -Aflatoxinas no músculo da tilápia

Níveis no músculo	AFB ₁	
	n	%
ND (<LD)	34	80,95
Traços (entre LD e LQ)	01	2,38
Níveis quantificáveis (>LQ)	07	16,67
Positivos (>LD)	08	19,05
Total de amostras	42	100%

ND: não detectado; LD: limite de detecção = 0,03 µg/kg; LQ: Limite de Quantificação = 0,09 µg/kg; Traços: entre o LD e LQ.

Fonte: Própria autoria.

Figura 11 – Distribuição dos níveis de aflatoxinas nas amostras de músculo

Fonte: Própria autoria.

Neste estudo, foi avaliada a ocorrência natural de aflatoxinas nas pisciculturas em suas condições normais de rotina, isto é, não foi realizada uma contaminação na ração para avaliação dos resíduos e tempo de exposição. E ainda assim, foram encontrados resíduos de AFB₁ no fígado, mesmo que em baixos níveis, em 85,72% das amostras e no músculo em 19,05% das amostras, o que significa que os peixes são expostos à alimentação contaminada com aflatoxinas e são suscetíveis ao acúmulo das toxinas nos tecidos.

Em estudo semelhante, Mohamed et al. (2017) avaliaram a ocorrência de aflatoxinas no músculo de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) na região do Qena, Egito, e constataram que em 96% das amostras o músculo estava contaminado com aflatoxinas (AFB₁, AFB₂ e AFG₂), e 60% das amostras apresentavam níveis de 0,370 a 12,9 µg de AFB₁/kg.

A aflatoxina B₁ é a mais importante de todas as aflatoxinas (considerando sua toxigenicidade e ocorrência, dificilmente se um produto que contenha aflatoxinas G₁, G₂ e B₂ na ausência de aflatoxina B₁). Ainda, geralmente a soma da concentração das três é menor que a concentração da aflatoxina B₁ (FAO, 2003). Nas amostras de fígado e músculo testadas, não foram encontradas AFB₂ e AFG₂, e a AFG₁ foi encontrada somente em três amostras de fígados, prevalecendo a detecção em maior número da AFB₁.

Vários estudos apontam que níveis residuais de AFB₁ no fígado dos peixes é maior que os encontrados no músculo (DENG et al., 2010, EL SAYED; KHALIL, 2009; NOMURA et al., 2011). Uma explicação seria pelo fato de o fígado exercer um papel essencial na metabolização da AFB₁ nos animais (ANATER et al., 2016), sendo que após a ingestão da AFB₁ ocorre biotransformação hepática (SANTACROCE et al., 2008), o que explicaria os níveis mais elevados de AFB₁ encontrados nas amostras de fígado e mais baixos no músculo.

Nos estudos a seguir, foram realizadas quantificações da acumulação de aflatoxinas nos órgãos, no músculo e nas vias de excreções de várias espécies de peixes. Deng et al. (2010), encontrou que tilápias (*O. niloticus* e *O. aureus*) alimentadas com concentrações diferentes de AFB₁ (19, 85, 245, 638, 793 e 1641 µg/kg) ao longo de 20 semanas apresentaram acúmulo significativo de AFB₁ no fígado, mas não no músculo, no qual não foi detectado em nenhuma amostra. A detecção da AFB₁ no fígado após 15 semanas de uma dieta contendo 638 µg AFB₁/kg apresentou concentração média de 20,6 µg/kg, enquanto que o controle apresentava níveis de 11,7 µg/kg de AFB₁.

Em estudo realizado por El Sayed e Khalil (2009), robalos (*Dicentrarchus labrax* L.) foram alimentados por 42 dias com uma dieta contendo 18 µg/kg de AFB₁ e os níveis acumulados no final do experimento foram de 4,25 µg de AFB₁/kg no músculo.

O lambari (*Astyanax altiparanae*) foi estudado por Michelin et al. (2017). Os peixes foram alimentados com dietas contendo 10 µg/kg, 20 µg/kg e 50 µg/kg de AFB₁ por um período de 120 dias e os autores detectaram acúmulo de AFB₁ no fígado e no músculo após 90 dias nos lambaris alimentados com a dieta de 50 µg AFB₁/kg de ração. Os níveis acumulados chegaram a 215,34 µg/kg no fígado e 58,47 µg/kg no músculo, mostrando que o acúmulo de AFB₁ no músculo do lambari no período 120 dias foi semelhante aos níveis das dietas oferecidas aos peixes.

Em bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) foram avaliados o músculo, órgãos, o plasma e a bile nos tempos de 2, 4, 24, 48 e 96 horas após a administração oral de 250 µg AFB₁/kg aos peixes. Foi constatado que houve uma eliminação rápida do músculo (2 horas: 19 µg AFB₁/kg, em 4 horas: 40 µg AFB₁/kg e em 24 horas apenas traços, menos de 5 µg AFB₁/kg). Em 96 horas, os resíduos de AFB₁ foram encontrados apenas no plasma, rins e fígados, com seus metabólitos excretados pelas vias urinárias e biliares (PLAKAS et al., 1991).

Diversos estudos avaliaram o desempenho dos peixes alimentados com dietas contendo aflatoxinas. Anh Tuan et al. (2002) alimentaram tilápias do Nilo (*O. niloticus*) por 8 semanas com dietas contendo 250 µg/kg, 2.500 µg/kg, 10.000 µg/kg, 100.000 µg/kg de AFB₁. Ao final do estudo, observaram que nos níveis mais altos (10.000, 100.000 µg de AFB₁/kg) os peixes apresentaram redução no ganho de peso, conversão alimentar ruim, baixo hematócrito e mortalidade. Não foram observados efeitos agudos e sub crônicos na dieta contendo 250 µg de AFB₁/kg nos peixes, o que demonstrou que em concentrações baixas é difícil que o desempenho de tilápias do Nilo seja afetado. Chaves-Sanchez, Palacios e Moreno (1994) reportaram menor consumo e taxa de crescimento quando avaliaram tilápias do Nilo (*O. niloticus*) por 25 dias com dietas contendo 375 µg/kg, 752 µg/kg, 940 µg/kg, 1.500 µg/kg, 1.880 µg/kg e 3.000 µg/kg de AFB₁, e em baixas doses (94 µg/kg) não foram notados sinais de toxicidade nas tilápias.

Bagres juvenis (*Clarias gariepinus*) foram alimentados com dietas contendo AFB₁ e FB₁ (Dieta A: Controle 2 µg AFB₁/kg e 3 mg FB₁/kg; Dieta B: 7,3 µg AFB₁/kg e 15 mg FB₁/kg; Dieta C: 17,6 µg AFB₁/kg e 24,6 mg FB₁/kg; Dieta D: 48 µg AFB₁/kg e 43 mg FB₁/kg e Dieta E: 93 µg AFB₁/kg e 83 mg FB₁/kg) por 56 dias. Os peixes resistiram a dietas contendo até 17,6 µg AFB₁/kg e 24,6 mg FB₁/kg, sendo que com dietas em concentrações maiores foram observadas reduções no ganho de peso, no crescimento, na taxa de eritócitos, hemoglobina e hematócito (ADEYEMO et al., 2018).

Embora com a ingestão de baixos níveis de AFB₁ não sejam notados sintomas de aflatoxicose, esses níveis podem resultar em efeitos crônicos, e normalmente o produtor só perceberá que algo está acontecendo quando houver uma mortalidade de origem desconhecida sem outras doenças e causas evidentes (SANTACROCE et al., 2008). Com isso, a ingestão de baixos níveis de aflatoxinas pode trazer um risco para os peixes e prejuízo econômico para os produtores, mesmo em baixas quantidades de AFB₁.

Sabe-se que algumas espécies de peixes são mais sensíveis a AFB₁ do que outras. A truta arco íris destaca-se como a mais suscetível à AFB₁, já a tilápia e o bagre do canal vêm demonstrando serem mais resistentes (EL SAYED; KHALIL, 2009; PLAKAS et al., 1991; SANTACROCE et al., 2008). Essa diferença de suscetibilidade entre as espécie de peixe é, provavelmente, devido à capacidade de desintoxicação, mais ou menos eficiente, ou seja, algumas espécies vão excretar metabólitos menos tóxicos da AFB₁ com mais facilidade e

outras tendem a biotransformar AFB₁ em metabólitos mais tóxicos, como o composto exo-8,9-epóxido (SANTACROCE et al., 2008).

A legislação brasileira não estabelece limites máximos de aflatoxinas para produtos de origem animal para o consumo humano, como carnes, exceto para AFM₁ em produtos lácteos (leite fluido, leite em pó e queijos) (ANVISA, 2011). A União Européia também não possui limites para produtos de origem animal, exceto para leite (AFM₁) (UNIÃO EUROPÉIA, CE. 1881, 2006). Nos Estados Unidos da América o limite máximo é de 20 µg/kg de aflatoxinas (somatória de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) para qualquer produto (FAO, 2004).

Os níveis encontrados nas amostras de músculo foram inferiores aos limites estipulados pela FAO (2004), mas podemos afirmar que alimentos de origem animal têm potencial de expor humanos aos efeitos tóxicos das aflatoxinas. De fato, um estudo brasileiro mostrou deposição residual de 58,47 µg/kg no músculo de lambari (*Astyanax altiparanae*) após 90 dias de exposição a uma dieta contendo 50 µg AFB₁/kg (MICHELIN et al., 2017). Isto demonstra que o limite deveria ser revisado na legislação brasileira atual, uma vez que o fato de as espécies serem diferentes e, portanto, os limites não impedem danos aos animais e aos consumidores. Em consequência à comprovada carcinogenicidade, a ingestão de aflatoxinas, em especial a AFB₁, deve ser a mais baixa possível (VÖLKEL; SCHRÖER-MERKER; CZERNY, 2011).

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram detectadas aflatoxinas G₁ e B₁ nas amostras de ração para tilápia do Nilo nas propriedades avaliadas. Mesmo com todas as amostras avaliadas dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, os esforços para a diminuição da exposição dos animais às aflatoxinas devem ser contínuos.

Quanto às aflatoxinas nas tilápias, houve detecção de resíduos de AFG₁ e AFB₁ nos fígados e AFB₁ nos músculos dos animais, comprovando que há ingestão de ração contaminada com aflatoxinas pelos peixes em condições de criação em pisciculturas.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que há ocorrência de aflatoxinas nas pisciculturas. Deste modo, deve-se controlar a contaminação nas rações destinadas para peixes para garantir a segurança dos consumidores e são necessárias discussões acerca dos limites existentes na legislação brasileira para aflatoxinas em rações animais, bem como de possíveis limites para aflatoxinas em partes comestíveis de peixes.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMID, A. M. Mycotoxins. In: _____. **Fish with special emphasis on the Egyptian situation**. 2007. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MAMycotoxins/articles/mycotoxins-fish-special-emphasis-t461/p0.htm>>. Acesso em 24 set. 2013.
- ADEYEMO, B. T. et al. Effects of dietary mixed aflatoxin B1 and fumonisin B1 on growth performance and haematology of juvenile *Clarias gariepinus* catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 491, p. 190-196, 2018.
- ADE-NIJI, C. A. et al. Mouldy groundnut cake and hydrated sodium calcium aluminosilicate in practical diet for African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Fisheries and Aquaculture Journal**, Los Angeles, v. 4, n. 1, art. 083, 2014.
- AFSAH-HEJRI, L. et al. A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 12, n. 6, p. 629-651, 2013.
- ALINEZHAD, S. et al. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with emphasis to *Aspergillus* section Flavi. **Iranian Journal of Fisheries**, Iran, v. 10, n. 3, p. 363-374, 2011.
- ANATER, A. et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 451, p. 1-10, 2016.
- ANDRADE, A. D. et al. Omega-3 fatty acids in baked freshwater fish from south of Brazil. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 47, n. 1, p. 73-76, 1997.
- ANH TUAN, N. et al. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B₁. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, n. 1, p. 311-319, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC 138, 08 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 fev. 2017. nº 29, Seção 1, p. 45.
- _____. Resolução RDC 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1, n. 37, p. 72-73.
- AYROZA, L. M. S. **Criação de Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR**. 2009. 92 f. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- BAQUIÃO, A. C. et al. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, Kidlington, v. 28, n. 2, p. 224-229, 2012.
- BARBOSA, T. S. et al. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. **International Aquatic Research**, Heidelberg, v. 5, n. 3, 2013.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, p. 497-516, 2003.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, n. 1, p. 57-81, 2010.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA nº. 07, de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 nov. 1988. Seção I, p. 21.

CARDOSO FILHO, F. C. **Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil**. 2011. 33 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. Mycotoxins, risks in plant, catfish. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 29, p. 805-808, 1991.

CASTELLS, M. et al. Reduction of aflatoxins by extrusion-cooking of rice meal. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 71, n. 7, p. C369-C377, 2006.

CHAVEZ-SANCHEZ, Ma. C.; PALACIOS, C. A. M.; MORENO, I. O. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B 1. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 49-60, 1994.

CHEVANAN, N.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; ROSENTRATER, K. A. Extrusion studies of aquaculture feed using distillers dried grains with solubles and whey. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 2, n. 2, p. 177-185, 2009.

CYRINO, J. E. P. Manejo alimentar em manejo alimentar eficaz viabiliza aquacultura lucrativa e sustentável. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 11, p. 73-76. Jul./Dez. 2012.

DAS CHAGAS CARDOSO FILHO, F. et al. Qualidade higiênico-sanitária da ração utilizada em piscicultura. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 391-394, 2011

DENG, Shi-Xi et al. Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 3, p. 233-240, 2010.

EL-SAYED, Abdel-Fattah M. **Tilapia culture**. Wallingford: CABI, 2006.

EL-SAYED, Abdel-Fattah M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 149-168, 1999.

EL-SAYED, Y. S.; KHALIL, R. H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 47, n. 7, p. 1606-1609, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Produção de tilápia no Brasil cresce 223% em dez anos**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21621836/producao-de-tilapia-no-brasil-cresce-223-em-dez-anos>>. Acesso: 04 jun. 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of World fisheries and aquaculture** - meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018.

_____. **The State of world fisheries and aquaculture**: contributing to food security and nutrition for all. Rome: FAO, 2016. 200 p.

_____. **Cultured aquatic species information programme - *Oreochromis niloticus***. (Linnaeus, 1758). Rome: FAO, 2005.

_____. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Rome: FAO, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>>. Acesso em: 30 jun. 2015.

FARAG, H. E. M.; EL-TABIY, A. A.; HASSAN, H. M. Assessment of ochratoxin A and aflatoxin B levels in the smoked fish with special reference to the moisture and sodium chloride content. **Research Journal of Microbiology**, Dubai, v. 6, p. 813-825, 2011.

FEDDERN, V. et al. Aflatoxins importance on animal nutrition. In: ABYANEH, M. R. (Ed.). **Aflatoxins**: recent advances and future prospects. London: InTech, 2013.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. **Handbook of Applied Mycology**, Wallingford, v. 3, p. 31-68, 1991.

FOLEY, J. J.; ROSENTRATER, K. A. Physical properties of extruded corn coproducts. In: ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 2013, Kansas City. **Proceedings...** Kansas City: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2013. p. 331.

FLORES, R. M. V.; PEDROZA FILHO, M. X. Fish consumption in Brazil: is the internal market able to accommodate the strong growth projected for Brazilian aquaculture? In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON AGRICULTURAL STATISTICS, 6., 2013, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBGE, 2015. p. 707.

GRECO, M. et al. Effect of water activity and temperature on the growth of Eurotium species isolated from animal feeds. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 35, n. 1, p. 39-48, 2017.

GONÇALVES, R. A.; NAEHRER, K.; SANTOS, G. A. Occurrence of mycotoxins in commercial aquafeeds in Asia and Europe: a real risk to aquaculture? **Reviews in Aquaculture**, Hoboken, v. 10, n. 2, p. 263-280, 2016.

HASAN, M. R. Feeding global aquaculture growth. **FAO Aquaculture Newsletter**, Rome, n. 56, p. II, 2017.

HASAN, M. R. On-farm feeding and feed management in aquaculture. **FAO Aquaculture Newsletter**, Rome, n. 45, p. 48, 2010.

HASHIMOTO, E. H. et al. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 123-132, 2003.

HASLER, J. A. et al. Human cytochromes P450. **Molecular Aspects of Medicine**, Kidlington, v. 20, n. 1, p. 1-137, 1999.

HUANG, Y. et al. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B1. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 319, n. 1, p. 89-97, 2011.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Shannon, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. In: **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p. 138-161, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–121**. Lyon, 2018.

JAKIĆ-DIMIĆ, D. et al. The influence of mycotoxins in food on fish health status. **Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke**, Novi Sad, n. 109, p. 73-79, 2005.

JINAP, S. et al. Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods. **Food Control**, Kidlington, v. 26, p. 42-48, 2012.

KUBITZA, F. O status atual e as tendências da tilapiculturano Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 124, p. 10-19, 2011.

KUBITZA, F. Micotoxinas e seus efeitos sobre peixes. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 121, p. 14-23, 2010.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285 p.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias—parte I. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 52, p. 42-50, 1999.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009. 382 p.

LEWIS, L. et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 113, p. 1763-1767S, 2005.

LI, P. et al. Aflatoxin measurement and analysis. In: TORRES-PACHECO, I. (Ed.). **Aflatoxins: detection, measurement and control**. Rijeka: InTech, 2011. p. 183-208.

LOPES, P. R. S. et al. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 1029-1034, 2005. Disponível em:

<www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2005001000012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 set. 2013.

MARIJANI, E. et al. Mycoflora and mycotoxins in finished fish feed and feed ingredients from smallholder farms in East Africa. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 169-176, 2017.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 60, p. 218-237, 2013.

MASSOCCO, M. M. **Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em pisciculturas do estado de São Paulo: rações e espécies comerciais de pescado de cultivo**. 2016. 71 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, João Pessoa, v. 12, p. 89-99, 2010.

MEURER, F. et al. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1801-1809, 2003. Suplemento 2.

MICHELIN, E. C. et al. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 34, n. 2, p. 265-272, 2017.

MOHAMED, S. et al. Effect of water activity and temperature on the germination and growth of *Aspergillus tamarii* isolated from “Maldivian fish”. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 160, n. 2, p. 119-123, 2012.

MOHAMED, H. M. A. et al. Detection of aflatoxin-producing fungi isolated from Nile tilapia and fish feed. **EXCLI Journal**, Mainz, v. 16, p. 1308-1318, 2017.

MOHANTY, B. P. et al. Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security. **Food Chemistry**, Amsterdam, 2017. In press.

MOREIRA, H. L. M. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. 199 p.

MURJANI, G. **Chronic aflatoxicosis in fish and its relevance to human health**. Central Institute of Freshwater Aquaculture, India, 2003. 17 p.

NAKATSURU, Y. et al. Immunological detection of in vivo aflatoxin B1 – DNA adduct formation in rats, rainbow trout and coho salmon. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 11, p. 1523-1526, 1990.

NGETHE, S. et al. Species differences in hepatic concentration of orally administered 3H AFB1 between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 114, p. 355-358, 1993.

NOMURA, H. et al. Uptake by dietary exposure and elimination of aflatoxins in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 9, p. 5150-5158, 2011.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

OSTSENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: SEAP-FAO, 2008. 276 p.

PAPP, E. et al. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, Philadelphia, v. 73, p. 39-46, 2002.

PLAKAS, S. M. et al. Tissue disposition and excretion of 14 C-labeled aflatoxin B1 after oral administration in channel catfish. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 29, p. 805-808, 1991.

PEIXE BR. Disponível: <<http://www.peixebr.com.br/anuario-peixebr-2018>>. Acesso: 10 maio 2018.

PENG, W.-X.; MARCHAL, J. L. M.; VAN DER POEL, A. F. B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 237, p. 129-153, 2018.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage - Genus *Aspergillus* FR**. New York: Springer, 2009. 307 p.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, 1996.

PRANDINI, A. L. D. O. et al. On the occurrence of aflatoxin M 1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 47, n. 5, p. 984-991, 2009.

PROBST, C.; NJAPAU, H.; COTTY, P. J. Outbreak of an e aflatoxicosis, identification of the causal agent. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2762-2764, 2007.

PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, Rio de Janeiro: IBGE, 1974-. v. 44, p.1-51, 2016.

PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, Rio de Janeiro: IBGE, 1974-. v. 43, p. 1-49, 2015.

PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, Rio de Janeiro: IBGE, 1974-. v. 42, p. 1-39, 2014.

PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, Rio de Janeiro: IGBE, 1974-. v. 41, p. 1-108, 2013.

QUAAS, M. F. et al. **Fishing for proteins**: how marine fisheries impact on global food security up to 2050: a global prognosis. Washington: WWF Germany, 2016.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 8, n. 3, p. 202-251, 2009.

REIS, G. M.; CORRÊA, B.; FERNANDES, P. M. Resíduos de aflatoxinas em produtos de origem animal: um problema econômico e de saúde pública. In: MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU DA PUC GOIÁS, 5., 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2010. p. 57. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/V%20MOSTRA%20DE%20PRODUO%20CIENTIFICA/SAUDE/57.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2014.

RODRIGUES, P. et al. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus section flavi* isolated from portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 187-193, 2009.

ROKEY, G. J.; PLATTNER, B.; SOUZA, E. M. Feed extrusion process description. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 510-518, 2010.

RUSSO, J. A. R.; YANONG, R. P. E. Molds in fish feeds and aflatoxicosis. **Fact Sheet FA-95**, Florida, 2010. 3 p.

SANTACROCE, M. P. et al. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 99-130, 2008.

SINDIRAÇÕES. **Boletim Informativo do Setor**. Dez. 2017. Disponível: <http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2017/12/boletim_informativo_do_setor_dez_2017_vs_final_port_sindiracoes.pdf>. Acesso: 27 ago. 2018.

SPRING, P.; FEGAN, D. F. Mycotoxins - a rising threat to aquaculture. **In: ANNUAL SYMPOSIUM OF THE NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES**, 21., 2005, Lexington. **Proceedings...** Lexington, 2005. p. 323-331.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Luxembourg, p.70/12-70/34, 2006.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 1881/2006, European commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December, 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European union**, L364/5, 15–17.

VICAM. **Aflatest HPLC**: instruction manual - 715001733 Rev B. 2017. 32 p.

VÖLKEL, I.r; SCHRÖER-MERKER, E.; CZERNY, C. P. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. **Food and Nutrition Sciences**, Irvine, v. 2, n. 8, p. 852-867, 2011.

YASUI, G. S. et al. Cultivo monosssexual de tilápias: importância e obtenção por sexagem e inversão sexual. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 51, p. 37-61, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Some naturally occurring substances**: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyons: International Agency for Research on Cancer, 1993. (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, v. 56).

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, Philadelphia, v. 138, n. 1, p. 103-141, 2013.

ZYCHOWSKI, K. E. et al. The effect of NovaSil dietary supplementation on the growth and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-B1 contaminated feed. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 376, p. 117-123, 2013.