UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARINA MARTINÉZ MASSOCCO

**Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em pisciculturas do Estado de São
Paulo: rações e espécies comerciais de pescado de cultivo**

Pirassununga

2016

MARINA MARTINÉZ MASSOCCO

Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em pisciculturas do Estado de São

Paulo: rações e espécies comerciais de pescado de cultivo

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.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes.

Pirassununga

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

M419o Massocco, Marina Martinêz
 Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas
 em pisciculturas do Estado de São Paulo: rações e
 espécies comerciais de pescado de cultivo / Marina
 Martinêz Massocco ; orientadora Andrezza Maria
 Fernandes. -- Pirassununga, 2016.
 71 f.

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

 1. Micotoxinas. 2. AFB1. 3. Aspergillus. 4.
 Fungos filamentosos. 5. Peixes. I. Fernandes,
 Andrezza Maria, orient. II. Título.

MARINA MARTINÉZ MASSOCCO

Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em pisciculturas do Estado de São Paulo: rações e espécies comerciais de pescado de cultivo

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.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes FZEA-USP - Orientadora

Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura

Dra. Fernanda Bovo Campagnollo

À minha família, aos amigos e à
todos que contribuíram para a
realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de concluir mais uma etapa na minha vida.

À toda a minha família por todo apoio e incentivo. Aos meus amados pais, Luiz e Roseli, pelo amor e palavras de conforto. Ao meu irmão Daniel e minha cunhada Juliana, pelo carinho. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu companheiro e namorado, Luiz Eduardo, pela paciência, apoio e amor.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Profa Dra. Andrezza Maria Fernandes pela oportunidade, confiança e orientação neste trabalho.

À Universidade de Missouri (EUA) pela oportunidade de intercâmbio, em especial, ao Prof. Dr. David R. Ledoux pela ajuda na realização do experimento, e ao meu querido amigo Dr. George E. Rottinghaus, pela orientação e suporte no desenvolvimento da metodologia, e quem foi mais que um orientador para mim, uma pessoa pela qual tive o privilégio de conhecer e quem tem todo o meu respeito e admiração.

À toda a equipe do Laboratório Multiusuário de Microbiologia, e em especial aos amigos, Andrea, Carolina, Euder, Juliana, Marcela, Marisa, Samara e Silvia pelos ensinamentos, momentos de risada e ajuda ativa nas etapas desse projeto.

À toda a equipe do Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos pela amizade e ajuda.

Ao querido Prof. Dr. Gelson Andrade, a quem tive o prazer de conhecer e conviver durante meu estágio PAE e quem se mostrou uma pessoa especial e amiga.

À querida Profa. Dra. Eny Maria Vieira (IQSC – USP/São Carlos) pelo incentivo e apoio para a realização do meu Mestrado.

Às minhas amigas as quais tive a sorte de conhecer e conviver durante essa jornada no Mestrado, Bruna, Caroline, Júlia, Laura, Marluci, Yana. Obrigada pela amizade e carinho.

Aos funcionários e alunos do ICMBio - CEPTA (Centro Nacional De Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais) por toda a ajuda e atenção.

Aos proprietários e funcionários das pisciculturas pelas amostras e contribuição com a pesquisa.

Aos membros da Comissão Julgadora pela participação e pelas contribuições.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

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. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O estudo teve por finalidade avaliar a contaminação por aflatoxinas (AF) em três espécies de peixes no Estado de São Paulo, avaliando também a micobiota e a ocorrência das toxinas nas rações. Foram coletadas amostras de ração, em uso e em estoque, e amostras dos peixes lambari (*Astyanax altiparanae*), matrinxã (*Brycon cephalus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em cinco pisciculturas localizadas no Estado de São Paulo. As amostras de ração foram avaliadas quanto à contaminação fúngica, classificando os *Aspergillus* quanto à espécie e ao potencial toxigênico. A contagem de bolores variou de $1,0 \times 10^2$ UFC/g até $4,0 \times 10^4$ UFC/g, sendo o maior valor encontrado em rações em uso. A atividade de água variou de 0,45 a 0,72. Na análise da micobiota da ração, o gênero *Aspergillus* foi encontrado em 100% das amostras avaliadas, além dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*. Dentre os isolados de *Aspergillus* seção Flavi, 84,2% produziram aflatoxinas. Foram identificadas diferentes espécies de *Aspergillus*, sendo 42,1% classificados como *Aspergillus flavus*. A detecção e quantificação de aflatoxinas foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de ração, tecido muscular e fígado dos peixes. AFB₁ e AFG₂ foram detectadas em 8,34% e 16,67% das amostras de ração, respectivamente. No tecido muscular, apenas uma amostra apresentou 5,4 µg AFM₁/kg. Nas amostras de fígado, 50% apresentaram AFM₁, variando de 2,3 a 17,1 µg/kg, e 16,67% apresentaram AFB₁ em níveis de 8,9 a 12,7 µg/kg. Embora tenham sido encontrados níveis baixos de aflatoxinas na ração das propriedades investigadas, a detecção nos tecidos dos peixes sugere que os animais ingeriram a toxina em algum momento. Assim, pode-se concluir que o risco de contaminação por aflatoxinas em pisciculturas no estado de São Paulo existe e deve ser controlado.

Palavras-chave: Micotoxinas. AFB₁. *Aspergillus*. Fungos filamentosos. Peixes.

ABSTRACT

MASSOCCO, M. M. **Occurrence of toxigenic fungi and aflatoxins in fish farming from state of Sao Paulo:** feed and commercial fish species. 2016. 71 f. MSc Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The study aimed to evaluate the contamination by aflatoxins (AF) in three species of fish in the state of Sao Paulo, evaluating also the mycobiota and the occurrence of toxins in feed. It were collected feed samples, in use and stored, and fish samples: lambari (*Astyanax altiparanae*), matrinxã (*Brycon cephalus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in five fish farming from state of Sao Paulo. Feed samples were evaluated for fungal contamination, classifying *Aspergillus* at species and their toxigenic potential. The mold count ranged from 1.0×10^2 CFU/g to 4.0×10^4 CFU/g, and the highest value was found in feed in use. The water activity ranged from 0.45 to 0.72. Regarding mycobiota analysis, the genus *Aspergillus* was found in 100% of the samples, as well *Penicillium*, *Fusarium* and *Cladosporium* genus were noted. Among the isolates of *Aspergillus* section Flavi, 84.2% produced aflatoxins. Different *Aspergillus* species were identified, with 42.1% classified as *Aspergillus flavus*. The detection and quantitation of aflatoxins in feed samples, fish muscle and fish liver were performed by high performance liquid chromatography (HPLC). AFB₁ and AFG₂ were detected in 8.34% and 16.67% of feed samples, respectively. In fish muscle, only one sample showed 5.4 µg AFM₁/kg. In the liver samples, 50% presented AFM₁, ranging from 2.3 to 17.1 µg/kg, and 16.67% had AFB₁ at levels from 8.9 to 12.7 µg/kg. Despite the low levels of aflatoxin in the fish feed from the investigated properties, the detection in fish tissues suggests that animals could have ingested the toxin anytime. Thus, it can be concluded that the risk of aflatoxin contamination in fish farming in the state of Sao Paulo exists and it must be controlled.

Keywords: Mycotoxins. AFB₁. *Aspergillus*. Filamentous fungi. Fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	20
Figura 2 - Estrutura química da aflatoxina AFM ₁	22
Figura 3 - Composição das rações amostradas.	39
Figura 4 - Amostras de peixes. A. Lambari. B. Pacu. C. Matrinxã	39
Figura 5 - Colônias de fungos filamentosos em amostra de ração para peixes, ágar DG18.	43
Figura 6 - Fungos do gênero <i>Aspergillus</i> identificados ao microscópio ótico.....	44
Figura 7. Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão para a análise da ração de peixe (a) AFB ₁ (coeficiente de correlação r= 0,996), (b) AFB ₂ (coeficiente de correlação r= 0,997), (c) AFG ₁ (coeficiente de correlação r= 0,995), (d) AFG ₂ (coeficiente de correlação r= 0,994).	46
Figura 8 - Cromatograma obtido para padrão das AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ contendo 20 µg/L.....	47
Figura 9 - Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão na análise do tecido muscular e fígado dos peixes (a) AFB ₁ (coeficiente de correlação r= 0,999), (b) AFB ₂ (coeficiente de correlação r= 0,999), (c) AFG ₁ (coeficiente de correlação r= 0,998), (d) AFG ₂ (coeficiente de correlação r= 0,999), (e) AFM ₁ (coeficiente de correlação r= 0,999)	49
Figura 10 - Cromatograma obtido para padrão das AFM ₁ , AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ e AFG ₂ contendo 20 µg/L.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas das principais aflatoxinas.	21
Tabela 2 - Tipos de aflatoxinas, fungos produtores e commodities afetadas.	25
Tabela 3 - Limites máximos tolerados (LMT) para aflatoxinas em alimentos.	29
Tabela 4 - Atividade de água nas amostras de rações das pisciculturas.	40
Tabela 5 - Resultados da contagem de bolores nas amostras de rações das pisciculturas.	42
Tabela 6 - Potencial toxigênico dos isolados de <i>Aspergillus</i> das amostras de rações das pisciculturas.	45
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 tecido muscular de lambari.	51
Tabela 9 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de matrinxã.	52
Tabela 10 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de pacu.	53
Tabela 11 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado dos peixes.	54
Tabela 12 - Aflatoxinas em amostras de ração das propriedades.	55
Tabela 13 - Aflatoxinas nas amostras de tecido muscular dos peixes das propriedades.	58
Tabela 14 - Aflatoxinas nas amostras de fígado dos peixes das propriedades	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AF	Aflatoxina
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFM₁	Aflatoxina M ₁
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
kg	Quilograma
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Micrograma
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Piscicultura no Brasil.....	16
2.2 Micotoxinas.....	18
2.2.1 Aflatoxinas	19
2.2.2 Biotransformação da aflatoxina B ₁	21
2.2.3 Efeito das aflatoxinas.....	22
2.3 Fungos toxigênicos	24
2.4 Contaminação da ração para peixes de cultivo	25
2.5 Legislação brasileira para micotoxinas	28
3 OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Amostragem	31
4.1.1 Amostragem da ração.....	31
4.1.2 Amostragem do pescado	31
4.2 Atividade de água (Aa) da ração	31
4.3 Avaliação da microbiota fúngica da ração	32
4.4 Sequenciamento do DNA ribossomal das cepas de <i>Aspergillus</i> Seção Flavi isoladas da ração.....	32
4.5 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de <i>Aspergillus</i> isoladas da ração .	33
4.6 Determinação de aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
4.6.1 Solventes e Padrão.....	34
4.6.2 Extração das aflatoxinas.....	34
4.6.3 Análise de aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂) em ração – Método I	34

4.6.4	Análise de aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁) em pescado – Método II	35
4.6.5	Derivatização química das aflatoxinas.....	36
4.6.6	Curva de Calibração das aflatoxinas – Métodos I / II.....	36
4.6.7	Limite de detecção e quantificação para aflatoxinas.....	36
4.6.8	Avaliação do Desempenho do Método Analítico	37
4.6.9	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
4.7	Comitê de Ética	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Amostragem	38
5.1.1	Ração	38
5.1.2	Pescado.....	39
5.2	Atividade de água (Aa)	40
5.3	Avaliação da microbiota fúngica	41
5.4	Avaliação do potencial toxigênico.....	44
5.5	Identificação molecular das cepas de <i>Aspergillus</i> isoladas	45
5.6	Determinação de aflatoxinas nas amostras	45
5.6.1	Análise da ração – Método I	46
5.6.2	Análise do tecido muscular e fígado – Método II	48
5.6.3	Detecção e Quantificação de Aflatoxinas nas Amostras.....	55
6	CONCLUSÃO.....	62
	REFERENCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é favorecido pela atividade de piscicultura devido aos seus 8,5 mil km de litoral e 5,5 milhões de hectares de reservatórios de águas doces, representando aproximadamente 8% da água doce disponível no planeta (DUARTE, 2016). Além disso, também é visto no contexto internacional como um dos países com grande potencial para a piscicultura por suas condições climáticas que favorecem a implantação de cultivos de peixes de água doce (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002).

A criação de organismos aquáticos é uma das atividades econômicas de grande importância no país. Segundo Duarte (2016), atualmente no Brasil pode-se encontrar mais de 3.000 espécies de peixes. Devido à grande variedade, alguns peixes nativos são listados como de grande potencial para a utilização na piscicultura, tais como o dourado, jaú, matrinxã, piaui, jundiá, pirarucu e pintado.

O crescimento da atividade de piscicultura tem gerado uma série de preocupações por parte dos pesquisadores, com relação à qualidade dos produtos utilizados na alimentação de peixes de viveiro. A seleção inadequada e a armazenagem imprópria de certos ingredientes para fabricação da ração são fatores que contribuem para o desenvolvimento de fungos que, em condições ótimas, podem produzir micotoxinas. A presença destas toxinas no alimento prejudica não somente os animais que ingerem rações contaminadas, mas também o homem, através da ingestão de produtos de origem animal, processados ou *in natura*, contendo as micotoxinas (OPAS, 1983; CARDOSO FILHO, 2011).

Sendo assim, a presença das micotoxinas no organismo dos animais aquáticos é preocupante, uma vez que podem persistir ou acumular-se nos tecidos desses animais, constituindo um risco para saúde humana (ALMEIDA et al., 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Piscicultura no Brasil

Ao longo dos anos, os recursos hídricos vêm ganhando mais importância em todo o mundo no que diz respeito ao manejo sustentável da água para o bem-estar das populações e o desenvolvimento dos países. O território brasileiro detém 12% das reservas de água doce do planeta, totalizando 53% dos recursos hídricos da América do Sul (BRASIL, 2016a). Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente, são 200 mil microbacias espalhadas em 12 regiões hidrográficas, como as bacias do São Francisco, do Paraná e a Amazônica, a qual é considerada a mais extensa do mundo, com 60% localizada no Brasil (BRASIL, 2016b).

Com todo esse potencial hídrico, o setor da aquicultura tem sido destaque no cenário nacional. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelou que a atividade de aquicultura (criação de peixes, camarão, ostras, mexilhões e outros produtos para fins comerciais) somou R\$ 3,1 bilhões em produção nacional no ano de 2013. Dentro dessa produção, a criação de peixes (piscicultura) liderou o setor, com a participação de 66,1% do valor total da produção, seguido pela criação de camarões (carcinicultura) com 25% desse valor. Neste mesmo ano, a produção total da piscicultura brasileira foi de 392,5 mil toneladas, sendo a região Centro-Oeste responsável por 26,8% (105 mil toneladas) do total da produção nacional (BRASIL, 2014).

No Brasil são encontradas variadas espécies de peixes, tanto em forma como em tamanho, e muitas podem ser destinadas à piscicultura para a produção de alimento, ornamental ou para pesca esportiva. Diversas espécies apresentam grande potencial produtivo devido ao crescimento rápido, boa conversão alimentar, rusticidade ou por demanda do mercado consumidor para a prática da piscicultura (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

A atividade da piscicultura paulista tem sofrido forte investimento através do desenvolvimento de tecnologias, do planejamento e da organização desse setor. No estado de São Paulo, a criação de peixes se destina em grande parte às indústrias de processamento de pescado, as quais atendem ao mercado interno, e o restante à exportação, aos pesque-pagues e ao mercado atacadista, especialmente a Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP) (AYROZA; AYROZA, 2012).

Dentre as espécies nativas cultivadas na piscicultura brasileira, o lambari (*Astyanax altiparanae*) se destaca como opção de negócio devido a alguns aspectos peculiares da espécie, como elevada taxa de sobrevivência das larvas e juvenis, o rápido crescimento, o hábito alimentar (onívoro) e a facilidade de manejo do seu processo de reprodução. O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o matrinxã (*Brycon cephalus*) também são uma grande opção de negócio, tanto pela facilidade na adaptação de criação em cativeiros como pela carne de excelente qualidade que apresentam (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

O lambari-do-rabo-amarelo ou tambuí (*Astyanax altiparanae*) é uma espécie de peixe de água doce encontrado na bacia do rio Tietê e seus afluentes. Possuem hábito alimentar onívoro. São animais ligeiros e pequenos (atingem no máximo 15 centímetros) podendo chegar a 60 gramas de peso. O crescimento desses animais é muito rápido, eles atingem a maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade e apresentam dimorfismo sexual (as fêmeas são maiores que os machos). Além das características biológicas favoráveis ao cultivo e de reprodução dessa espécie, as características de utilização também são interessantes para a piscicultura, como massa proteica para fabricação de rações e produção de conserva ou iscas vivas para pesca esportiva (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

O peixe matrinxã (*Brycon cephalus*) apresenta corpo alongado com coloração prateada e cauda escura. Essa espécie pode atingir até 80 centímetros de comprimento e cinco quilos de peso. Na natureza, são encontrados nas águas da bacia Amazônica e da bacia Araguaia-Tocantins. Além do fácil manejo, possuem ótimo crescimento em sistemas de cultivo por resistirem à áreas de altas densidades. É um peixe bem aceito em estabelecimentos de pesque-pague (MATHIAS, 2016b).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe de água doce. Essa espécie tropical é originário das águas da bacia do Prata, porém pode ser encontrado do nordeste da Argentina até o centro-oeste brasileiro. Pela facilidade de criação e adaptação à alimentação industrializada, o pacu é uma das espécies mais cultivadas na piscicultura nacional, perdendo apenas para a tilápia e para a carpa. Ao longo do corpo apresenta coloração cinza com manchas em tons alaranjados. A anatomia do seu corpo favorece o fornecimento de uma carne farta muito apreciada pela sua textura e sabor (MATHIAS, 2016a).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2014), a produção de peixes no mundo vem crescendo. Em 1950,

a produção foi de 20 milhões de toneladas e em 2012 a produção aumentou para 156,2 milhões de toneladas, das quais 97% foram destinadas para consumo humano direto. Consequentemente, o consumo de peixe per capita aumentou de 9,9 kg em 1960 para 19,1 kg em 2012. O aumento dessa produção se deve principalmente à aquicultura, que manteve altas taxas de crescimento desde a década de 80. Assim, em 2012, a produção aquícola havia aumentado para 66,5 milhões de toneladas, sendo que esse aumento foi possível devido ao progresso tecnológico e à melhora na produtividade.

Atualmente, o consumo de peixe em todo o mundo tem aumentado em relação ao consumo de carne bovina, suína e de aves, devido principalmente à disponibilidade, acesso e preço (ANATER et al., 2016). O pescado está presente na alimentação humana como uma opção de alimento saudável por possuir um alto valor nutricional como fonte natural de proteínas e outros nutrientes como vitaminas (como a tiamina, a niacina e a vitamina B12), minerais (fósforo, zinco, ferro e cálcio) e ácidos graxos essenciais (ômega 3) (BRASIL, 2006). Com isso, a preocupação com a qualidade da carne de peixes disponível no mercado tem aumentado.

Os ingredientes e a qualidade nutricional da ração destinada aos peixes de cultivo tornaram-se alvo de estudo. Muitas espécies de peixe exigem um alto teor proteico na composição da ração (30-50%), variando de acordo com a espécie e a fase de crescimento do animal (ALCESTE, 2000a). Ingredientes como farinha de peixe, farelo de soja, farinha de semente de algodão, farinha de milho e trigo são comumente usados como fontes de proteína (ALCESTE, 2000b).

Na piscicultura intensiva, a nutrição de peixes é essencial e pode representar cerca de 50 a 80% dos custos de produção. Peixes nutridos com alimentos e rações de alta qualidade tendem a expressar de forma mais eficiente um potencial de crescimento e reprodução, além de suportarem condições adversas de qualidade de água, manuseio e transporte, e serem menos suscetíveis a doenças e parasitoses (KUBITZA, 1999).

2.2 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários, caracterizados por baixo peso molecular e estrutura química muito variável (NOGUEIRA, 2009). Fungos toxigênicos são responsáveis pela produção de um ou mais desses metabólitos

secundários, porém, nem todos os fungos são toxigênicos e nem todos os metabólitos secundários de fungos são tóxicos. Uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos, assim como uma única espécie de fungo pode produzir uma ou várias micotoxinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As micotoxinas podem estar presentes em cereais e seus derivados, os quais são utilizados na alimentação animal (CHU, 1991). Essas toxinas podem contaminar culturas no campo, antes, durante e depois da colheita, podendo ser produzidas em alimentos durante o armazenamento em condições favoráveis de temperatura e umidade (ALINEZHAD et al., 2011). As micotoxinas apresentam, de modo geral, grande estabilidade química, que permite a permanência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos de industrialização (CHU, 1991; SANTACROCE; CONVERSANO, 2008).

Existem cerca de 300 micotoxinas identificadas, porém, as mais comumente encontradas em alimentos e que apresentam propriedades tóxicas influenciando a saúde pública e a agricultura, são aflatoxinas, fumonisinas, toxina T-2, zearalenona, ocratoxina, tricotecenos, patulina e, deoxinivalenol (DON) (SCUSSEL, 2000; ABDIN; AHMAD; JAVED, 2010).

2.2.1 Aflatoxinas

A aflatoxina (AF) é uma toxina produzida por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. As aflatoxinas são produzidas por um grande número de espécies de *Aspergillus*. Existem três seções filogeneticamente distintas: Flavi, Ochraceorosei, Nidulatans. As espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. parvisclerotigenus*, *A. bombycis* pertencem à seção Flavi; *A. rambellii*, *A. ochraceoroseus* à seção Ochraceorosei; e *Emericella astellata*, *E. venezuelensis* à seção Nidulatans (ABDIN; AHMAD; JAVED, 2010). No entanto, essas toxinas são produzidas principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (MOSS, 1998).

A aflatoxina é um composto solúvel em clorofórmio e apresenta fluorescência sob a luz ultravioleta. Existem quatro aflatoxinas principais, denominadas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 1). As letras “B” e “G” se referem à fluorescência sob luz ultravioleta, assim, as aflatoxinas B₁ e B₂ apresentam coloração azul (*blue*) e as aflatoxinas G₁ e G₂ coloração verde (*green*) sob luz ultravioleta (Tabela 1) (WOGAN; BUSBY, 1980).

Figura 1 - Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂.

Fonte: FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p.

A diferença na estrutura química entre os grupos de aflatoxinas “G” e “B” está na presença de um anel 3-lactona no grupo “G”, ao invés do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação 8,9 também é encontrada na forma de um éter de vinil no terminal do anel do furano em AFB₁ e AFG₁, e não em AFB₂ e AFG₂ (Figura 1). Essa diferença na estrutura química desses compostos está associada com uma mudança muito significativa em sua atividade, fazendo com que B₁ e G₁ sejam consideradas mais tóxicas do que B₂ e G₂ (VERMA, 2004).

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), classificou as quatro aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ como agentes carcinogênicos (grupo 1) para humanos (IARC, 2002). Porém, segundo Miller (1995), a aflatoxina B₁ tem sido o centro de estudos e pesquisas por ser considerada a mais tóxica e a mais encontrada das aflatoxinas.

Tabela 1 - Características físico-químicas das principais aflatoxinas.

Aflatoxina	Fórmula Molecular	Massa molecular	Ponto de Fusão (°C)	Emissão de fluorescência (nm)/cor
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	425/ azul
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425/ azul
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	244-246	450/ verde
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450/ verde

Fonte: Adaptado de ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS. **Micotoxinas**. Washington, 1983. p.125-135. (Critérios de Salud Ambiental, 11).

2.2.2 Biotransformação da aflatoxina B₁

A biotransformação das aflatoxinas é um processo complexo e com múltiplas vias: epoxidação, hidroxilação, desmetilação e redução (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). As vias de biotransformação da AFB₁ podem variar entre as espécies de animais, justificando os diferentes graus de suscetibilidade a essa toxina (WOGAN, 1992; SANTACROCE; CONVERSANO, 2008).

No organismo, ao serem ingeridas, as aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal devido a sua lipossolubilidade e distribuídas a diferentes órgãos, como tecido muscular, tecido adiposo, rins e, principalmente, fígado (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

A forma ativada da aflatoxina B₁ (AFB₁) é identificada como 8,9-epóxido de AFB₁, originada através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranóide da molécula de AFB₁. Este novo composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas. A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA se dá principalmente no nitrogênio 7 da guanina, dificultando a síntese do ácido ribonucleico (RNA) e comprometendo a atividade biológica, originando os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁, pois a ligação covalente desse composto ao DNA resulta na formação do aduto aflatoxina-N⁷-guanina (LOPES et al., 2005; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Após a formação, esses adutos podem ser retirados da molécula, deixando sítios vagos, que tendem a ser

preenchidos com adenina, resultando em um ponto de mutação significativo (HSIEH; ATKINSON, 1991).

Além da epoxidação, a biotransformação primária da AFB₁ também inclui a hidroxilação para formar as aflatoxinas AFM₁, AFQ₁ e AFB_{2a}; a redução para formar o aflatoxicol e o-desmetilação para formar aflatoxina P1. Contudo, as principais reações das aflatoxinas no organismo são hidroxilação, oxidação e desmetilação (WU et al., 2009).

A AFM₁ (Figura 2) é uma forma hidroxilada da aflatoxina B₁, produzindo um derivado hidrossolúvel e possibilitando a sua excreção por fluidos corporais (SILVA, 2005). Esta toxina é excretada no sistema circulatório sanguíneo, podendo se ligar às células ou proteínas plasmáticas e podendo estar presente no leite, ovos, urina, fezes, músculos e tecidos comestíveis de animais (CREPPY, 2002).

Em 1993, a (IARC, 1993), classificou a AFM₁ como um possível agente carcinogênico (grupo 2B) para humanos. Porém, em 2002, após novas investigações, a AFM₁ foi reclassificada no grupo 1 (IARC, 2002).

Figura 2 - Estrutura química da aflatoxina AFM₁

Fonte: DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 36, p. 548-555, 1994.

2.2.3 Efeito das aflatoxinas

No organismo dos peixes, as aflatoxinas agem como inibidores da síntese de ácido nucleico. Elas diminuem a síntese de proteínas, modificam o metabolismo lipídico e a via respiratória mitocondrial dependendo do nível de exposição à micotoxina, além de debilitar o sistema imunológico do animal, tornando-o mais vulnerável a infecções oportunistas causadas por bactérias, vírus e parasitas. As lesões que podem ser observadas pela aflatoxicose aguda em peixes jovens são encontradas em brânquias pálidas, coagulação sanguínea deficiente, anemia,

pequena taxa de crescimento e redução do peso durante o crescimento (ALMEIDA et al., 2011; BARBOSA et al., 2013).

Nos alimentos de origem animal as micotoxinas mais preocupantes incluem as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), ocratoxina A e toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (FB₁, FB₂ e FB₃; tricotecenos como desoxinivalenol, T-2 e HT-2 toxina e ZEN), porém as aflatoxinas ganham destaque no estudo com diferentes espécies de peixes (ANATER et al., 2016).

Os efeitos do acúmulo de AFB₁ no organismo dos peixes são dependentes de fatores como tipo e dose da micotoxina, tempo de exposição, espécie animal, sexo e idade (DENG et al., 2010), sendo os peixes jovens mais vulneráveis aos efeitos da aflatoxicose (ALMEIDA et al., 2011). A deposição de aflatoxinas nos peixes é residual e acumulativa à medida que o tempo de exposição é prolongado (PLAKAS et al., 1991), sendo o fígado e o músculo as partes mais afetadas (ANATER et al., 2016; DENG et al., 2010).

El-Sayed e Khalil (2009) encontraram níveis de AFB₁ (4,5 µg/kg) no músculo comestível de robalos (*Dicentrarchus labrax* L.) quando alimentados com uma dieta contendo baixos níveis de AFB₁ por um longo período, sugerindo um risco significativo de contaminação dos humanos por AFB₁.

Huang et al. (2011) observaram que os resíduos de aflatoxina foram detectados em diferentes tecidos do camarão, sendo o músculo a parte com maior acúmulo: 14,2 µg AFB₁/kg quando alimentado com 100 µg AFB₁ por kg de alimento por quatro semanas. Deng et al. (2010) observaram distúrbios bioquímicos no organismo de tilápias quando detectado acúmulo residual de AFB₁ no fígado desses animais alimentados com uma dieta acima de 245 µg AFB₁/kg durante um período de 20 semanas. Por outro lado, resultados negativos foram reportados quanto ao acúmulo de aflatoxinas no tecido de tilápias vermelhas (USANNO et al., 2005) e em camarões (BAUTISTA et al., 1994) expostos a altas concentrações de AFB₁ por um longo período.

No Brasil, Lopes et al. (2005) demonstraram que concentrações de aflatoxina superiores a 350 µg/kg de ração acarretam deposição residual no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*).

O consumo de alimentos contaminados e a transmissão de AFB₁ através de resíduos em peixes pode representar um risco à saúde do ser humano, ocasionando efeitos adversos no organismo (MAHFOUZ, 2015). Os principais efeitos registrados

são indução de câncer, lesão renal e depressão do sistema imune, apresentando propriedades alergênicas, teratogênicas, carcinogênicas e mutagênicas (PAPP et al., 2002; ALINEZHAD et al., 2011; MILLER; WILSON, 1994, JINAP et al., 2012).

2.3 Fungos toxigênicos

Os fungos toxigênicos são organismos adaptados para colonizar, crescer e produzir toxinas em uma variedade de substratos, em condições favoráveis, de acordo com as exigências das diferentes espécies existentes (STOLOFF, 1979).

Segundo o “*Group For Assistance On Systems Relating To Grain After Harvest*” (GASGA, 1997), fungos produtores de micotoxinas em alimentos podem ser divididos em dois grupos: aqueles que invadem o alimento na pré-colheita, denominados fungos de campo; e aqueles que ocorrem após a colheita, chamados fungos de armazenamento. No primeiro grupo, existem três tipos de fungos: patógenos de plantas, tais como *F. graminearum* (desoxinivalenol, nivalenol); fungos que crescem em plantas senescentes ou estressadas, como *F. verticillioides* (fumonisina) e algumas vezes *A. flavus* (aflatoxinas); fungos que inicialmente surgem na planta antes da colheita e predispõem o produto à contaminação por micotoxinas após a colheita, como a *P. verrucosum* (ocratoxina) e a *A. flavus* (aflatoxinas).

A contaminação fúngica ocasionada por fungos filamentosos em alimentos é responsável por perdas na produtividade, no valor nutricional e por danos à saúde pública. O desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas (Tabela 2) dependem de fatores como a suscetibilidade do substrato, a colonização do fungo produtor, a temperatura e a umidade do substrato, a umidade relativa do ar durante o armazenamento e a capacidade biológica do fungo produzir micotoxinas (GUIMARAES et al., 2010).

Os principais gêneros de fungos toxigênicos são *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, e *Alternaria* (GRECO; PARDO; POSE, 2015; HUWIG et al., 2001).

As condições ideais para a produção das aflatoxinas dependem de fatores como a umidade relativa do ar (superior a 80%), o teor de umidade do substrato e a temperatura do ambiente (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Northolt et al. (1976), ao estudarem o efeito da atividade de água e da temperatura sobre o crescimento *A. parasiticus* e a produção de aflatoxina, não detectaram quantidades de aflatoxina B₁ significativas em valores de atividade de água (Aa) inferiores a 0,83

e temperaturas inferiores a 10°C. As condições ideais para o desenvolvimento da maioria das espécies de *Aspergillus* estão na faixa de 0,80 a 0,85 de Aa, e em temperatura ambiente em torno de 30°C (OPAS, 1983).

Para reduzir ou evitar o crescimento de fungos e a produção da maioria das micotoxinas em alimentos estocados, é necessário controlar a atividade de água presente nesses alimentos. Para um armazenamento seguro, a atividade de água no alimento deve ser de 0,7 ou menos, a fim de controlar a deterioração fúngica e a produção de micotoxinas em alimentos (GASGA, 1997).

Tabela 2 - Tipos de aflatoxinas, fungos produtores e commodities afetadas.

Tipos de Aflatoxinas	Fungos produtores	Commodities afetadas
B ₁ , B ₂	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. parvisclerotigenus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. toxicarius</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. rambellii</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>Emericella astellata</i> , <i>E. venezuelensis</i> .	Semente de algodão, amendoim, pasta de amendoim, ervilha, sorgo, arroz, pistache, milho, bagaço oleaginoso, farinha de milho, semente de girassol, figos, especiarias, carnes, produtos lácteos, sucos de frutas (maçã, goiaba).
G ₁ , G ₂	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. toxicarius</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> .	Amendoim, sementes de algodão, semente de girassol, nozes, pistache, manteiga de amendoim, farinha de milho, ervilha, cereais, milho, figos, carnes, especiarias, produtos lácteos, sucos de frutas (maçã, goiaba).

Fonte: Adaptado de ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 192, n. 6, p. 409-25, 2010.

2.4 Contaminação da ração para peixes de cultivo

A presença de fungos na ração não está associada diretamente à presença de micotoxinas, não existindo uma correlação definitiva entre a presença de micotoxinas nesses alimentos e a micobiota encontrada no produto (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Desse modo, a ausência dos fungos no alimento não garante que este esteja livre de

contaminação, uma vez que as toxinas resistem por um longo período mesmo após a eliminação do fungo (PAPP et al., 2002; YOSHISAWA, 2001). As espécies de fungos são capazes de produzir micotoxinas em *commodities* no campo e no armazenamento, desde que encontre condições apropriadas para seu crescimento (ALMEIDA et al., 2011).

Casos de contaminação de alimentos por micotoxinas são encontrados em diferentes partes do mundo (BRYDEN, 2012). Contaminação por aflatoxinas são comumente encontrados em áreas tropicais e subtropicais no mundo, principalmente em grãos e cereais com alto teor de amido e lipídeo em sua composição, como o amendoim, semente de algodão, milho, trigo, girassol e soja (Tabela 2) (DENG et al., 2010; PINOTTI et al., 2016).

Os cereais e grãos são a maior fonte de transmissão de fungos e micotoxinas em rações (GUILLAMONT et al., 2005). Dentre os componentes da ração para pescado, as matérias primas mais suscetíveis à contaminação por micotoxinas são os farelos, farinha de glúten de milho, cereais, óleos, farinhas de peixe e de ossos, produtos lácteos e peixe seco (PINOTTI et al., 2016; ABDELHAMID, 2007; SANTACROCE; CONVERSANO, 2008; HUANG et al., 2011).

As rações contaminadas por micotoxinas, além de reduzir o desempenho e afetar o estado geral de saúde do animal, também podem causar a redução da produtividade, problemas reprodutivos, vulnerabilidade a infecções, aumento da morbidade e mortalidade (MANDARINO et al., 1989; CARDOSO FILHO, 2011).

Segundo Jouany (2007), a umidade e a temperatura são fatores que devem ser controlados durante o armazenamento de grãos em silos, pois poderão afetar o crescimento e a atividade dos fungos. Para evitar deterioração e contaminação durante a armazenagem, são importantes sistemas de ventilação adequados associados com operações de arrefecimento e de secagem. A rotação periódica dos grãos também pode reduzir pontos úmidos no interior do silo.

A melhor prevenção ainda se dá na fase de produção da micotoxina, no controle das condições favoráveis à produção (HUWIG et al., 2001). O crescimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas também podem ser limitados pelo uso de ácido propiônico ou isobutirato de amônio, ou pelo uso alguns aditivos para a alimentação, como antioxidantes, vitamínicos, aminoácidos contendo enxofre e oligoelementos também podem ser úteis como desintoxicantes (NAHM, 1995). A fim de evitar casos de micotoxicoses em animais, alguns trabalhos (HUWIG et al., 2001;

ELLIS et al., 2000) investigam a possibilidade de misturar adsorventes na ração animal, as quais se ligam às micotoxinas no trato gastrointestinal do animal no processo da digestão.

A presença de aflatoxinas em rações para peixes já foi reportada por alguns autores. Altug e Beklevik (2003) observaram 85 amostras positivas em 153 analisadas, com níveis acima de 21 µg/kg. Jakić-Dimić et al. (2005) analisaram 43 amostras de ingredientes para ração de peixe e encontraram AFB₁ variando de 5 a 40 µg/kg.

No Brasil, principalmente no estado de São Paulo, tem sido investigada e relatada a ocorrência de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal, tais como amendoim, feijão, milho e rações (SABINO et al., 1988).

Barbosa et al. (2013) encontraram gêneros de fungos como *Wallemia*, *Eurotium*, *Mucor*, *Aureobasidium*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* em rações para tilápia no estado do Rio de Janeiro. Santos (2006) analisou 136 amostras de ração para camarão, estocadas e em uso, e obteve como resultado que 94,4% delas estavam contaminadas por fungos. Além disso, identificou a ocorrência dos gêneros *Aspergillus* (86,11%), *Penicillium*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Mucor*.

Na região amazônica, Kluczkovski e Kluczkovski Junior (2013) observaram contaminação por *Aspergillus* spp toxigênicos em 85% das amostras de farinha de peixe analisadas, sendo 20% contaminadas com aflatoxinas em nível médio de 15,5 µg/kg.

O estudo dos fungos toxigênicos em rações é importante, visto que os alimentos fornecidos aos peixes são suscetíveis à contaminação por fungos e suas micotoxinas, podendo acarretar perdas econômicas na criação de peixes, interferindo no crescimento, desenvolvimento e reprodução desses animais aquáticos (NUNES, 2009). Deve-se destacar que o cultivo e identificação taxonômica de fungos são laboriosos e requerem vasta experiência do analista. Recentemente, métodos mais rápidos e mais objetivos de identificação de fungos em alimentos têm sido empregados, como técnicas moleculares (KONIETZNY; GREINER, 2003). O sequenciamento de fragmentos de genes permite a avaliação direta de polimorfismos de DNA, fornecendo o melhor tipo de dado para inferências filogenéticas e determinação de relações de parentesco entre indivíduos e populações (FIOCRUZ, 2016).

2.5 Legislação brasileira para micotoxinas

Em muitos países, as legislações são elaboradas e regulamentam os limites de aflatoxinas em alimentos *in natura* e processados para proteger os consumidores contra os efeitos nocivos das micotoxinas (FREIRE et al., 2007).

A regulamentação brasileira para limites máximos de micotoxinas em alimentos para consumo humano e animal ainda não é tão detalhada e específica. Segundo Freire et al. (2007), a elaboração de uma legislação depende de dados baseados em diferentes aspectos, tais como os aspectos científicos (disponibilidade de informações toxicológicas, distribuição das micotoxinas em alimentos e metodologias analítica), aspectos políticos e econômicos relacionados aos interesses comerciais e impactos na disponibilidade da oferta de alimentos.

Pela Portaria MA/SNAD/SFA nº 183, de 09 de novembro de 1988, o Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA) estipula que para qualquer matéria-prima, seja para alimentação direta ou utilizada como ingrediente em rações destinadas ao consumo animal, o limite máximo para a soma das aflatoxinas ($AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$) é de 50 $\mu\text{g/kg}$ (BRASIL, 1988). O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem animal (PNCRC)/Animal é composto pelos seus programas setoriais para o monitoramento em carnes e demais produtos de origem animal. Na Instrução Normativa SDA Nº 13, de 15 de julho de 2015 é apresentado o escopo analítico para o monitoramento dos produtos de origem animal. No que diz respeito à análise de aflatoxinas, este prevê o monitoramento da AFB_1 apenas em fígado de suínos e aves, e da aflatoxina M_1 no leite, e no Plano de Amostragem de Pescado estão contemplados apenas os limites de referência para substâncias cloradas, contaminantes inorgânicos (metais pesados), antimicrobianos, corantes, dioxinas e furanos e substâncias de ação anabolizante (BRASIL, 2015).

Em relação a alimentos para consumo humano, a Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. No Anexo I da Resolução RDC Nº 07 estão expostos os limites máximos para aflatoxinas ($AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$ e AFM_1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas ($FB_1 + FB_2$), patulina (PAT) e zearalenona (ZEN) admissíveis em

alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas. A Tabela 3 apresenta alguns alimentos e seus respectivos valores de Limite Máximo Tolerável (LMT), porém não há limites estabelecidos em produtos de origem animal, exceto para leite e queijos (ANVISA, 2011).

Tabela 3 - Limites máximos tolerados (LMT) para aflatoxinas em alimentos.

Micotoxina	Alimentos	LMT (µg/Kg)
Aflatoxina M ₁	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Aflatoxinas	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20

Fonte: Adaptado de AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. 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.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a contaminação por aflatoxinas em três espécies de peixes de interesse comercial no Estado de São Paulo, avaliando também a micobiota e a ocorrência das toxinas nas rações.

3.2. Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar fungos filamentosos em rações para pescado de cultivo e classificar as espécies de *Aspergillus*;
- b) Avaliar o potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* seção Flavi nas rações para pescado de cultivo;
- c) Detectar e quantificar aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) nas rações para pescado de cultivo;
- d) Detectar e quantificar aflatoxinas (M₁, B₁, B₂, G₁ e G₂) no tecido muscular e fígado de lambari, matrinxã e pacu provenientes de cinco pisciculturas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

As amostras de ração e os pescados foram coletados de pisciculturas no Estado de São Paulo. Foram amostrados cinco estabelecimentos localizados na região centro-leste do estado.

4.1.1 Amostragem da ração

De acordo com o manejo da propriedade e disponibilidade, foram coletadas amostras de ração, em uso no momento e estocada, de alevinos e de ração de crescimento. Amostras de cada ração (100 g coletadas de diferentes pontos da embalagem, constituindo uma única amostra de 500 g para cada tipo de ração) foram coletadas em sacos estéreis, transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP/Pirassununga, e submetidas às análises.

4.1.2 Amostragem do pescado

Foram coletados aproximadamente 1 kg de cada uma das três espécies de peixes de água doce: lambari (*Astyanax altiparanae*), matrinxã (*Brycon cephalus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas para o Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP/Pirassununga. Imediatamente após a chegada ao laboratório, as amostras foram dispostas em alíquotas, separando-se o tecido muscular e o fígado dos animais, os quais foram congelados a -20°C até o momento da análise.

4.2 Atividade de água (Aa) da ração

Todas as amostras foram submetidas à determinação da atividade de água utilizando o equipamento AQUALAB 4TE (Decagon Devices, Inc., Pullman, EUA).

4.3 Avaliação da microbiota fúngica da ração

Dez gramas de cada amostra previamente homogeneizada foram diluídas em 90 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-5} , com a inoculação de 0,1 mL em meio de cultivo DG18, escolhido de acordo com a atividade de água apresentada pelas amostras (PITT; HOCKING; GLENN, 1983). As placas foram incubadas à temperatura de 25°C por cinco dias, e após este período foi efetuada a contagem de colônias. A partir deste resultado, foi aplicada a correção pelo fator de diluição para o cálculo do número de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g) (BUSTA; PETERSON; ADAMS, 1984).

As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar batata dextrose e identificadas pela técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Após o período de microcultivo, foram observadas as características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) das colônias formadas conforme descrito por Pitt e Hocking (2009).

Os fungos foram classificados até gênero, enquanto aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção Flavi, identificados por triagem em meio AFPA (Ágar *Aspergillus flavus* e *parasiticus*), foram classificados em espécie, conforme descrito a seguir no item 4.4.

4.4 Sequenciamento do DNA ribossomal das cepas de *Aspergillus* Seção Flavi isoladas da ração

O DNA ribossomal foi extraído e purificado diretamente das colônias fúngicas a partir do ágar yeast extract sucrose (YES) (ABDOLLAHI; BUCHANAN, 1981; DEGOLA et al., 2007), seguindo o protocolo do kit PrepMan Ultra® (Applied Biosystems, EUA). A concentração de DNA foi mensurada por espectrofotometria (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280} .

Um fragmento de aproximadamente 650 pb da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi amplificado por um protocolo de termociclagem (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), que inclui etapas de desnaturação (94°C por 3 min.), seguido por ciclos de desnaturação (94°C por 1 min.), anelamento (57°C por 1 min.), e extensão (72°C por 1 min.) em termociclador.

Fragmentos de tamanho esperado para o Internal Transcribed Spacer (região ITS) do DNA ribossomal foram purificados do gel através do illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, EUA), conforme recomendações do fabricante e, em seguida, submetidos a sequenciamento bidirecional com a utilização de ABI Prism™ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, EUA) em sequenciador automático (ABI Prism™ Genetic Analyzer 3100, Perkin-Elmer, Applied Biosystems, EUA).

A busca inicial de similaridade das sequências obtidas com aquelas de outros fungos foi realizada pelo programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997). A edição e alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas para a região ITS foram realizados com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.2 (HALL, 1999), utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em *default*.

4.5 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus* isoladas da ração

Para avaliação do potencial aflatoxigênico, um inóculo da colônia de *Aspergillus* seção *Flavi*, obtido do cultivo da cepa em ágar Batata Dextrose à 25°C, foi semeado em ágar coco e incubado à 25°C por 15 dias. Após esse período, todo o conteúdo da placa foi transferido para frasco erlenmeyer de 250 mL e cada 10 g da cultura com o ágar foi acrescida de 30 mL de clorofórmio. Os frascos foram submetidos a agitador mecânico horizontal durante 30 minutos. Os extratos clorofórmicos foram filtrados em papel de filtro e recolhidos em frascos âmbar. Os filtrados foram evaporados até resíduo em banho-maria (60°C) e armazenados a - 4 °C até a análise (LIN; DIANESE, 1976).

Foi realizada a triagem através de cromatografia em camada delgada (CCD) com os extratos ressuspensos em 1 mL de clorofórmio e aplicados 10 µL de cada extrato em cromatofolha de sílica gel G60 (Merck, Darmstadt, Alemanha). A cromatografia foi realizada em cuba cromatográfica contendo como fase móvel solução saturada de clorofórmio:acetona (9:1, v/v). Após a corrida cromatográfica, as cromatofolhas foram secas em capela de exaustão e observadas em sala escura sob luz UV com faixa de comprimento de onda (λ) de 365nm. As manchas das amostras

foram comparadas as dos padrões de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) de acordo com o R_f dos padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.6 Determinação de aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.6.1 Solventes e Padrão

Todos os solventes utilizados (metanol, acetonitrila) nas etapas de determinação de aflatoxinas na ração e no tecido muscular e fígado foram grau de alta pureza (Panreac AppliChem, Barcelona, Espanha). A água ultrapura utilizada foi obtida no equipamento Synergy® Water Purification System (Merck Millipore, Corporation, Darmstadt, Alemanha).

Os padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram preparados a partir de suas concentrações iniciais (Mix de Aflatoxina Oekanal® 20 µg/mL B₁, G₁, B₂, G₂ em acetonitrila; Aflatoxina M₁ Oekanal® 0,5µg/mL em acetonitrila), e realizadas as diluições em acetonitrila para obtenção exata das concentrações.

4.6.2 Extração das aflatoxinas

A extração de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁) nas amostras foi efetuada mediante metodologia utilizada no Laboratório de Toxicologia sob coordenação do Dr. George Rottinghaus (University of Missouri), utilizando-se colunas de imunoafinidade Aflatest WB® (VICAM, A Water Business, MA, EUA), e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.6.3 Análise de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) em ração – Método I

Para a análise de ração, a amostra foi previamente homogeneizada e triturada. Em seguida, a amostra analítica (25 g) foi colocada em um frasco, juntamente com 5 g de NaCl e 100 mL de solução metanol:água (80:20, v/v). Após a agitação manual (3 minutos), a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA) e recolhida em um frasco. Em um tubo Falcon foram adicionados 10 mL de solução tampão fosfato 0,01 M, acrescidos de 0,5 mL do filtrado. A solução

foi passada através da coluna de imunoafinidade com fluxo de 1-2 gotas/seg. 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 tubo “*vials*” de 2 mL e, em seguida, evaporado até a secar sob fluxo de N₂. Os *vials* foram armazenados a -4 °C até o momento da derivatização química.

4.6.4 Análise de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁) em pescado – Método II

4.6.4.1 Tecido muscular

A amostra de tecido muscular foi previamente homogeneizada e picada em pequenos pedaços. Em seguida, a amostra analítica (5 g) foi colocada em um frasco, juntamente com 20 mL da solução metanol:água (80:20, v/v), e homogeneizada com o auxílio de um *mixer* durante 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi filtrado com a ajuda de filtro de seringa PTFE 0,45µm CHROMAFIL® Xtra. Em um tubo Falcon foram adicionados 25 mL de solução tampão fosfato 0,01 M, acrescidos de 4 mL do filtrado.

A solução foi passada através da coluna de imunoafinidade com fluxo de 1-2 gotas/seg. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de solução 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 pela coluna de imunoafinidade. O eluato foi recolhido em um vial de 2 mL e, em seguida, evaporado até a secar sob fluxo de N₂. Os vials foram armazenados a - 4 °C até o momento da derivatização química (item 4.6.5).

4.6.4.2 Fígado

A amostra de fígado foi previamente homogeneizada e picada em pequenos pedaços. Em seguida, a amostra analítica (1 g) foi colocada em um frasco, juntamente com 10 mL da solução metanol:água (80:20, v/v), e homogeneizada com o auxílio de um *mixer* durante 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi filtrado com a ajuda de filtro de seringa PTFE 0,45µm CHROMAFIL® Xtra. Em um tubo Falcon foram adicionados 25 mL de solução tampão fosfato 0,01 M, acrescidos de 1 mL do filtrado. A solução foi passada através da coluna

de imunoafinidade com fluxo de 1-2 gotas/seg. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de solução 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 da solução acetonitrila:metanol (3:2, v/v) pela coluna de imunoafinidade. O eluato foi recolhido em um vial de 2 mL e, em seguida, o eluato foi evaporado até a secura sob fluxo de N₂. O eluato foi recolhido em um vial de 2 mL e, em seguida, evaporado até a secura sob fluxo de N₂. Os vials foram armazenados a - 4 °C até o momento da derivatização química (item 4.6.5).

4.6.5 Derivatização química das aflatoxinas

A derivatização química foi realizada como um tratamento pré coluna dos resíduos das amostras usando o ácido trifluoracético (TFA) (NEON, São Paulo, Brasil) para converter as aflatoxinas AFB₁ e AFG₁, que fluorescem fracamente em meios polares, para altamente fluorescentes AFB_{2a} e AFG_{2a}, respectivamente (GREGORY; MANLEY, 1982). Em todas as amostras, o resíduo foi derivatizado com 25 µL de ácido trifluoracético, e ressuspenso com 975 µL da solução acetonitrila:água (2:8, v/v), totalizando um volume final de 1mL.

4.6.6 Curva de Calibração das aflatoxinas – Métodos I / II

Para a curva de calibração foram utilizadas concentrações de 1, 5, 10 e 20 ng/mL de cada padrão. As quantidades correspondentes a cada concentração foram colocadas em um vial e evaporadas até a secura sob fluxo de N₂ e derivatizadas antes da injeção no cromatógrafo.

4.6.7 Limite de detecção e quantificação para aflatoxinas

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração ou quantidade de uma substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004). O limite de quantificação (LOQ) é estabelecido por meio da análise de concentrações decrescentes do analito na matriz até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO,

2003). O LOQ foi determinado pela análise de soluções padrão de cada aflatoxina, diminuindo as concentrações até o menor nível quantificado.

4.6.8 Avaliação do Desempenho do Método Analítico

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de aflatoxinas, foram realizados ensaios de recuperação em amostras artificialmente contaminadas com as toxinas. As amostras foram artificialmente contaminadas com as soluções de trabalho, de maneira a obter níveis de contaminação de 5,0 e 20,0 µg AF/kg. As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata para cada nível de toxina, e submetidas aos métodos descritos (Método I / II), para obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

4.6.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Após derivatização química foram injetados 50µL de cada amostra em um cromatógrafo Shimadzu modelo Prominence vinculado ao software Lab Solutions (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) através de injetor automático. Para a separação das aflatoxinas foi utilizada uma fase móvel isocrática composta por água:acetonitrila:metanol (5,4:1:1 v/v/v) a um fluxo de 1 mL/min. Foram utilizados um cartucho de pré-coluna Shim-Pack GVP-ODS 10L X 4,6 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), coluna HyperClone BDS C18 (3µm) 100 x 4,6 mm (Phenomenex®, Califórnia, EUA) e detector de fluorescência RF-20A (excitação: 350nm e emissão: 450nm). A quantificação das aflatoxinas nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, na equação de regressão da curva de calibração.

4.7 Comitê de Ética

Para a realização desse projeto, o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), processo nº 15.1.146.74.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostragem

Foram amostradas cinco pisciculturas localizadas região centro-leste do estado de São Paulo, nos municípios de Mogi-Mirim, Pirassununga, Porto Ferreira, Santa Cruz da Conceição e Corumbataí. As propriedades foram denominadas P1, P2, P3, P4 e P5. Foram coletadas amostras de ração e das três espécies de peixes (lambari, pacu e matrinxã).

5.1.1 Ração

As propriedades P1, P2, P3 e P4 utilizam apenas um tipo de ração para os peixes de cultivo, portanto foram coletadas ração em estoque e em uso. A propriedade P5 possui diferentes tamanhos de ração, apenas em uso: 2 mm, 4,5 mm (A e B), 6 mm e 8 mm. A composição dos tipos de rações extrusadas amostradas está apresentada na Figura 3.

Nota-se que a composição das rações foi similar, diferindo apenas na adição de alguns ingredientes de origem vegetal (quirera de arroz, sorgo integral, feijão moído). Independentemente do tipo ou espécie do peixe, os cereais são fontes de energia e as leguminosas são fontes proteicas, constituindo a parte principal da alimentação (90%) destinada a esses animais (TOLOSA et al., 2014).

Figura 3 - Composição das rações amostradas.

Fonte: Própria autoria

5.1.2 Pescado

Foram coletados os peixes pacu e matrinxã nas cinco propriedades, porém o lambari foi coletado somente em duas propriedades (P2 e P3) por não estarem em um tamanho juvenil/adulto na época da amostragem.

No laboratório, foi realizado o preparo das amostras, retirando-se tecido muscular e fígado (Figura 4), os quais foram armazenados em freezer à -20 °C até o momento da análise.

Figura 4 - Amostras de peixes. A. Lambari. B. Pacu. C. Matrinxã

Fonte: Própria autoria

5.2 Atividade de água (Aa)

Os resultados das amostras de ração avaliadas encontram-se na Tabela 4. Pode-se notar que as rações apresentaram baixa atividade de água, com o valor mínimo de 0,45 e o máximo de 0,72. De acordo com os resultados obtidos, foi escolhido o meio de cultura Agar Dicloran Glicerol (DG18) para a contagem de fungos filamentosos nas rações (PITT; HOCKING, 2009).

Tabela 4. Atividade de água nas amostras de rações das pisciculturas.

Piscicultura	Tipo de ração	Atividade de água
P1	estoque	0,64
	uso	0,71
P2	estoque	0,58
	uso	0,53
P3	estoque	0,64
	uso	0,61
P4	uso	0,72
P5	uso 2mm	0,48
	uso 4,5 mm A	0,45
	uso 4,5 mm B	0,55
	uso 6 mm	0,45
	uso 8 mm	0,50

Fonte: Própria autoria

O conteúdo de água presente nos alimentos e grãos pode ser expresso em termos de percentual de umidade e em atividade de água (Aa), que varia numericamente de 0 a 1. A umidade mostra o conteúdo total de água presente no meio, enquanto que a atividade de água indica o conteúdo de água livre disponível no substrato para o crescimento de microrganismos e consequentes reações químicas que podem alterar a qualidade do alimento (KAREL, 1975). A umidade relativa do ar é um parâmetro que interfere diretamente na atividade de água do alimento. Produtos com baixa Aa armazenados em ambientes com alta umidade relativa poderão ter a Aa aumentada e então sofrer deterioração microbiana (HOFFMANN, 2001).

O crescimento dos fungos toxigênicos e a síntese das aflatoxinas podem ser influenciados por fatores como composição do substrato, pH, atividade de água, temperatura e potencial redox (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002; BRYDEN, 2012). De acordo com Leeson; Dias; Summers (1995), as condições ideais para o

crescimento do gênero *Aspergillus* e consequente produção das aflatoxinas são em uma temperatura de armazenamento na faixa de 24 a 35°C, umidade relativa do ar entre 80 e 85%, e umidade do substrato de 17%.

A espécie *Aspergillus parasiticus* é produtora das quatro aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), enquanto que *A. flavus* produz apenas duas (B₁, B₂) (MAZIERO; BERSOT, 2010). As condições para crescimento e produção das aflatoxinas das duas principais espécies de *Aspergillus*, *A. flavus* e *A. parasiticus*, são similares. Ambos podem crescer num pH ótimo entre 3,5 a 8 e temperatura ótima de 32 a 33°C. A atividade de água mínima requerida para o crescimento das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* é de 0,80 e 0,84, respectivamente. Para a produção da aflatoxina os valores são de 0,82 para *A. flavus* e 0,87 para *A. parasiticus* (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Na produção de aflatoxinas, a temperatura ótima é influenciada pelo tipo de substrato no qual o fungo está presente. Para o *Aspergillus parasiticus*, a temperatura varia de 12 a 42°C e a temperatura considerada ótima é de 25°C. No caso do *Aspergillus flavus*, é de 13 a 37°C, tendo como ótimas temperaturas entre 16 a 31°C (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002).

O *Aspergillus* spp. é um gênero amplamente distribuído e encontrado em regiões de alta umidade (regiões tropicais e subtropicais), contudo, em condições de altas temperaturas e baixa atividade de água, tem a capacidade de crescer e contaminar uma variedade de substratos, podendo ser encontrado no período de armazenamento dos alimentos (PITT; HOCKING, 1997).

5.3 Avaliação da microbiota fúngica

Na tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos para a avaliação da microbiota fúngica. Apenas duas amostras não apresentaram crescimento. A contagem mínima de bolores obtida foi de $1,0 \times 10^2$ UFC/g ou 2,00 log UFC/g e a contagem máxima foi de $4,0 \times 10^4$ UFC/g ou 4,60 log UFC/g. Segundo Martins e Martins (2001), rações de boa qualidade microbiológica não devem ultrapassar de 5,0 log UFC/g.

As duas amostras que apresentaram a contagem de $4,0 \times 10^4$ UFC/g eram de rações em uso. Observou-se que as rações em estoque apresentaram menores

contagens em relação às rações em uso. No entanto, os valores de atividade de água para as rações foram baixos.

Tabela 5 - Resultados da contagem de bolores nas amostras de rações das pisciculturas.

Piscicultura	Tipo de ração	Contagem (UFC/g)	Contagem (log UFC/g)
P1	estoque	$1,0 \times 10^2$	2,00
	uso	$2,1 \times 10^4$	4,33
P2	estoque	$2,6 \times 10^3$	3,41
	uso	$4,0 \times 10^4$	4,60
P3	estoque	$< 10^1$ est	$< 1,00$
	uso	$2,9 \times 10^3$	3,46
P4	uso	$1,4 \times 10^4$	4,15
P5	uso 2mm	$4,0 \times 10^4$	4,60
	uso 4,5 mm A	$< 10^1$ est	$< 1,00$
	uso 4,5 mm B	$3,0 \times 10^4$	4,48
	uso 6 mm	$1,5 \times 10^3$	3,18
	uso 8 mm	$1,0 \times 10^2$	2,00

UFC/g: unidades formadoras de colônias por grama.

Est: estimado.

Fonte: Própria autoria

As amostras de ração em uso avaliadas (Tabela 5) apresentaram fungos dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*. O gênero *Aspergillus* foi encontrado em 100% das amostras analisadas, incluindo rações em uso e em estoque. *Penicillium* e *Fusarium*, gêneros que incluem espécies toxigênicas, foram encontrados nas rações, alertando para a possibilidade da ocorrência de outras micotoxinas, além das aflatoxinas.

Corroborando com este estudo, Greco; Pardo; Pose (2015), avaliando a microbiota na ração destinada à alimentação de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), identificaram 13 espécies de fungos produtores de micotoxinas, dentre as espécies destacaram-se os gêneros *Eurotium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor*. Almeida et al. (2011) também identificaram a presença dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* em amostras de ração destinadas à robalos, sendo a espécie *Aspergillus flavus* encontrada em 40,2% das amostras analisadas, variando entre 2,0 e 3,2 log UFC/g.

Cardoso Filho (2011) avaliou 36 amostras de ração para peixes e identificou os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*, sendo que as espécies

mais isoladas foram *Aspergillus flavus*, *Eurotium* spp. e *Penicillium implicatum*, com as contagens fúngicas variando entre 2,96 e 4,00 log UFC/g.

Figura 5 - Colônias de fungos filamentosos em amostra de ração para peixes, ágar DG18.

Fonte: Própria autoria

As espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são comumente encontradas como contaminantes de *commodities* durante a secagem e armazenamento (SWEENEY; DOBSON, 1998), enquanto que as espécies de *Fusarium* são encontradas como contaminantes pré-colheita (ABRAMSON, 1998). *Cladosporium* spp. é um gênero comumente encontrado no ambiente, sendo que as espécies podem ocorrer como saprófitas e como patógenos de plantas (PITT; HOCKING, 2009). Este gênero apresenta uma alta ocorrência no ecossistema brasileiro, principalmente no ar e no solo (GAMBALE, 1998). De acordo com Greco; Pardo; Pose (2015), as espécies de *Eurotium* e *Penicillium* também são potencialmente capazes de produzir toxinas, porém, pouco se sabe da sua ocorrência em rações para peixes e consequente toxicidade.

A partir dos isolados foram identificadas em microscópio ótico 19 colônias do gênero *Aspergillus* (Figura 6). Estas colônias foram submetidas à triagem em meio *Aspergillus flavus parasiticus* (AFPA) e seguiram para avaliação do potencial toxigênico e identificação molecular.

Figura 6 - Fungos do gênero *Aspergillus* identificados ao microscópio ótico.

Fonte: Própria autoria

5.4 Avaliação do potencial toxigênico

Os procedimentos para a avaliação do potencial toxigênico foram realizados em 19 isolados identificados microscopicamente como pertencentes ao gênero *Aspergillus* tendo como referência Pitt e Hocking (2009) e com crescimento característico em meio seletivo AFPA (Ágar *Aspergillus flavus* e *parasiticus*).

O meio AFPA é recomendado para detecção e contagem de *A. parasiticus* e *A. flavus*. A coloração amarelo/laranja apresentada no reverso da placa com meio AFPA é uma característica diferencial na identificação das colônias de *A. parasiticus* e *A. flavus*. Essa coloração é devido à concentração de citrato férrico e a adição de extrato de levedura. Outras vantagens desse meio que favorece o crescimento dessas espécies são a taxa de crescimento melhorada de *A. flavus*, devido ao equilíbrio de peptona e extrato de levedura, e a de inibição melhorada de bactérias e fungos de crescimento rápido devido à mistura de dicloran e cloranfenicol presentes no meio (SIGMA-ALDRICH, 2004).

Dos 19 isolados analisados, oito eram provenientes da propriedade P5, cinco da P2, três da P3, dois da P5 e um da P4. Dezesesseis isolados (84,2%) produziram aflatoxinas, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 - Potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* das amostras de rações das pisciculturas.

Piscicultura	Tipo de ração	Número de colônias toxigênicas			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
P2	estoque	2	2	0	0
	uso	3	3	0	0
P3	uso	3	3	0	0
P5	uso 2 mm	1	1	1	1
	uso 4,5 mm	2	2	1	1
	uso 6 mm	5	5	3	1

Fonte: Própria autoria.

No Piauí, Cardoso Filho (2011) não encontrou cepas toxigênicas entre os isolados de *Aspergillus* detectados nas rações. No mesmo estado, Nunes (2009) encontrou fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* (50,9%) e *Aspergillus* e seus teleomorfos (29,3 %) nos ingredientes utilizados e nas rações.

5.5 Identificação molecular das cepas de *Aspergillus* isoladas

No total, 19 colônias, inicialmente classificadas como *Aspergillus* seção Flavi, foram submetidas à técnica descrita no item 4.4.

O sequenciamento dos isolados de *Aspergillus* revelou espécies de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus tubingensis* e *Aspergillus cristatus* nas amostras de ração. Desses, 42,1% foram classificados como *Aspergillus flavus*.

5.6 Determinação de aflatoxinas nas amostras

As curvas de calibração e a avaliação do desempenho dos métodos analíticos foram efetuadas em conjunto com os alunos Carolina Maria Bedoya Serna, Euder Cesar Michelin e Silvia Helena Seraphin de Godoy, os quais também avaliam aflatoxinas em rações e peixes em diferentes projetos. Estes dados são apresentados a seguir.

5.6.1 Análise da ração – Método I

5.6.1.1 Curvas de Calibração para Aflatoxinas

Para a análise da ração de peixe, os coeficientes de determinação (R^2) das curvas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram 0,992, 0,993, 0,990 e 0,988, respectivamente. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7 - Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão para a análise da ração de peixe (a) AFB₁ (coeficiente de correlação $r = 0,996$), (b) AFB₂ (coeficiente de correlação $r = 0,997$), (c) AFG₁ (coeficiente de correlação $r = 0,995$), (d) AFG₂ (coeficiente de correlação $r = 0,994$).

Fonte: Própria autoria

Os tempos de retenção para AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂ foram de 4,61, 6,82, 10,34, 16,32 minutos, respectivamente. O cromatograma obtido para os padrões de aflatoxina contendo 20 $\mu\text{g/L}$ pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Cromatograma obtido para padrão das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ contendo 20 µg/L.

Fonte: Própria autoria

5.6.1.2 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para aflatoxinas – Método I

Na análise da ração, os limites de detecção e quantificação para todas as aflatoxinas foram de 0,2 µg/kg e 0,8 µg/kg, respectivamente.

5.6.1.3 Avaliação do Desempenho do Método Analítico – Método I

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de aflatoxinas, foram realizados ensaios de recuperação em amostras artificialmente contaminadas com as toxinas. Os percentuais obtidos da recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises estão expostos na Tabela 7.

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.

AFB ₁ Adicionada (µg/kg)	AFB ₁ Observada (µg/kg)	AFB ₁ 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			
AFB ₂ Adicionada (µg/kg)	AFB ₂ Observada (µg/kg)	AFB ₂ 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			
AFG ₁ Adicionada (µg/kg)	AFG ₁ Observada (µg/kg)	AFG ₁ 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			
AFG ₂ Adicionada (µg/kg)	AFG ₂ Observada (µg/kg)	AFG ₂ 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

A recuperação média para a toxina na ração foi de 85% para AFB₁, 92,9% para AFB₂, 81,4% para AFG₁ e de 88,4% para AFG₂.

5.6.2 Análise do tecido muscular e fígado – Método II

5.6.2.1 Curva de calibração para Aflatoxinas

Para a análise do tecido muscular e do fígado dos peixes, os coeficientes de determinação (R^2) das curvas de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ foram 0,997, 0,997,

0,997, 0,998 e 0,998, respectivamente. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 9.

Figura 9 - Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão na análise do tecido muscular e fígado dos peixes (a) AFB₁ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (b) AFB₂ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (c) AFG₁ (coeficiente de correlação $r = 0,998$), (d) AFG₂ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (e) AFM₁ (coeficiente de correlação $r = 0,999$)

Fonte: Própria autoria

Os tempos de retenção para AFM₁, AFG₁, AFB₁, AFG₂, AFB₂, foram de: 2,65, 4,61, 6,92, 10,37 e 16,27 minutos, respectivamente. O cromatograma obtido para os padrões de aflatoxinas contendo 20 $\mu\text{g/L}$ pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Cromatograma obtido para padrão das AFM₁, AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ contendo 20 µg/L.

Fonte: Própria autoria

5.6.2.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para aflatoxinas – Método II

Na análise do tecido muscular e do fígado dos peixes, os limites de detecção e quantificação para todas as aflatoxinas foram de 0,5 µg/kg e 2 µg/kg, respectivamente.

5.6.2.3 Avaliação do Desempenho do Método Analítico – Método II

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de aflatoxinas, foram realizados ensaios de recuperação em amostras artificialmente contaminadas com as toxinas. Os percentuais obtidos da recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises estão expostos na Tabela 8.

As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no tecido muscular do peixe lambari foram de 94,7% para AFB₁, 97,4% para AFB₂, 101,4% para AFG₁ e de 100,1% para AFG₂ e 93,1% para AFM₁.

Tabela 8 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de lambari.

AFB ₁ Adicionada (µg/kg)	AFB ₁ Observada (µg/kg)	AFB ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,2	4,7	94,8	18,5
	3,7			
	5,3			
20,0	18,6	18,9	94,5	1,5
	19,0			
	19,1			
AFB ₂ Adicionada (µg/kg)	AFB ₂ Observada (µg/kg)	AFB ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,6	4,9	97,9	20,2
	3,8			
	5,3			
20,0	19,1	19,4	96,8	1,7
	19,3			
	19,7			
AFG ₁ Adicionada (µg/kg)	AFG ₁ Observada (µg/kg)	AFG ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	6,0	5,1	102,5	22,8
	3,8			
	5,6			
20,0	19,9	20,0	100,2	1,5
	20,4			
	19,8			
AFG ₂ Adicionada (µg/kg)	AFG ₂ Observada (µg/kg)	AFG ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,9	5,1	102,0	20,2
	3,9			
	5,4			
20,0	19,3	19,6	98,2	1,8
	20,0			
	19,7			
AFM ₁ Adicionada (µg/kg)	AFM ₁ Observada (µg/kg)	AFM ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,7	4,6	91,3	23,1
	3,6			
	4,4			
20,0	19,5	19,0	94,9	14,3
	21,4			
	16,1			

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 tecido muscular de matrinxã.

AFB ₁ Adicionada (µg/kg)	AFB ₁ Observada (µg/kg)	AFB ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,3 4,9 3,7	4,3	85,8	14,0
20,0	15,6 14,5 18,2	16,1	80,5	12,0
AFB ₂ Adicionada (µg/kg)	AFB ₂ Observada (µg/kg)	AFB ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,7 5,0 3,9	4,5	90,4	12,3
20,0	17,8 16,4 19,7	18,0	89,9	9,3
AFG ₁ Adicionada (µg/kg)	AFG ₁ Observada (µg/kg)	AFG ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,7 5,2 3,1	4,3	86,6	24,9
20,0	16,0 13,5 14,4	14,6	73,2	8,7
AFG ₂ Adicionada (µg/kg)	AFG ₂ Observada (µg/kg)	AFG ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,0 5,3 3,5	4,6	92,3	21,0
20,0	17,0 15,2 17,3	16,5	82,6	6,7
AFM ₁ Adicionada (µg/kg)	AFM ₁ Observada (µg/kg)	AFM ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,2 3,8 5,4	4,5	89,1	18,4
20,0	23,8 21,9 20,8	22,1	110,7	6,9

Fonte: Própria autoria

As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no tecido muscular do peixe matrinxã foram de 83,2% para AFB₁, 90,2% para AFB₂, 79,9% para AFG₁ e de 87,5% para AFG₂ e 99,0% para AFM₁.

Tabela 10 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de pacu.

AFB ₁ Adicionada (µg/kg)	AFB ₁ Observada (µg/kg)	AFB ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,5	4,8	96,5	10,7
	4,6			
	5,4			
20,0	23,4	19,8	98,9	19,7
	15,7			
	20,3			
AFB ₂ Adicionada (µg/kg)	AFB ₂ Observada (µg/kg)	AFB ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,4	4,9	97,8	10,4
	4,8			
	5,4			
20,0	23,7	19,9	99,6	20,3
	15,7			
	20,3			
AFG ₁ Adicionada (µg/kg)	AFG ₁ Observada (µg/kg)	AFG ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,9	5,3	106,5	8,0
	5,2			
	5,8			
20,0	24,4	21,0	105,0	20,0
	16,3			
	22,3			
AFG ₂ Adicionada (µg/kg)	AFG ₂ Observada (µg/kg)	AFG ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,6	5,2	103,3	11,4
	5,2			
	5,7			
20,0	24,8	20,6	102,9	21,2
	16,0			
	20,9			
AFM ₁ Adicionada (µg/kg)	AFM ₁ Observada (µg/kg)	AFM ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	3,8	5,3	105,5	29,7
	5,2			
	6,9			
20,0	19,9	19,4	97,1	2,2
	19,1			
	19,2			

Fonte: Própria autoria

As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no tecido muscular do peixe pacu foram de 97,7% para AFB₁, 98,7% para AFB₂, 105,8% para AFG₁ e de 103% para AFG₂ e 101,3% para AFM₁.

Tabela 11 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado dos peixes.

1	AFB ₁ Observada (µg/kg)	AFB ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
	5,9			
5,0	5,0	5,5	109,9	8,4
	5,7			
	19,4			
20,0	21,5	19,5	98,0	9,6
	17,8			
AFB ₂ Adicionada (µg/kg)	AFB ₂ Observada (µg/kg)	AFB ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
	6,7			
5,0	5,8	6,4	123,0	8,3
	6,7			
	20,4			
20,0	21,9	20,4	102,21	7,3
	18,9			
AFG ₁ Adicionada (µg/kg)	AFG ₁ Observada (µg/kg)	AFG ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
	4,7			
5,0	3,7	4,2	85,3	11,6
	4,3			
	20,7			
20,0	21,3	19,5	97,6	13,4
	16,5			
AFG ₂ Adicionada (µg/kg)	AFG ₂ Observada (µg/kg)	AFG ₂ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
	5,7			
5,0	4,7	5,5	110,4	13,7
	6,2			
	20,5			
20,0	21,1	19,7	98,5	9,8
	17,5			
AFM ₁ Adicionada (µg/kg)	AFM ₁ Observada (µg/kg)	AFM ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
	4,6			
5,0	3,5	4,5	90,76	21,1
	5,4			
	23,5			
20,0	20,1	23,0	115,30	11,8
	25,5			

Fonte: Própria autoria

Comparando as médias obtidas pelos ensaios de recuperação nas amostras de tecido artificialmente contaminadas, pode-se notar que as maiores médias de recuperação foram de AFG₁ nas amostras de tecido do peixe pacu e lambari (105,8% e 101,4%, respectivamente), no entanto no peixe matrinxã, a melhor média foi 99% (AFM₁).

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 e 103,0% para AFM₁.

5.6.3 Detecção e Quantificação de Aflatoxinas nas Amostras

5.6.3.1 Aflatoxinas nas rações

Na tabela 12 pode-se observar que foram encontradas AFB₁ e AFG₂ em 8,34% e 16,67% das amostras, respectivamente.

Embora tenham sido detectados fungos toxigênicos nas amostras avaliadas, foi detectada AFB₁ em somente uma amostra, com o nível de 1,4 µg/kg, estando abaixo do limite da União Europeia para ração animal (10 µg/kg). Esta ração estava em uso e também apresentou a maior atividade de água (0,72) entre as amostras avaliadas. Deve-se notar que presença de fungos na ração não está associada diretamente à presença de micotoxinas, não existindo uma correlação definitiva entre a presença de micotoxinas nesses alimentos e a micobiota encontrada no produto (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Tabela 12 - Aflatoxinas em amostras de ração das propriedades.

Piscicultura	Tipo de ração	Aflatoxinas (µg/kg)			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
P1	estoque	ND	ND	ND	0,8
	uso	ND	ND	ND	1,2
P2	estoque	ND	ND	ND	ND
	uso	ND	ND	ND	ND
P3	estoque	ND	ND	ND	ND
	uso	ND	ND	ND	ND
P4	uso	1,4	ND	ND	ND
P5	uso 2 mm	ND	ND	ND	ND
	uso 4,5mm A	ND	ND	ND	ND
	uso 4,5mm B	ND	ND	ND	ND
	uso 6 mm	ND	ND	ND	ND
	uso 8 mm	ND	ND	ND	ND

Limite de detecção (LOD): 0,2 µg/kg; Limite de quantificação (LOQ): 0,8 µg/kg.

ND: inferior ao LOQ.

Fonte: Própria autoria

A ração animal é naturalmente contaminada, simultaneamente, por vários fungos, os quais são capazes de produzir diversas toxinas (ALONSO et al., 2013). As principais micotoxinas identificadas em rações destinadas à alimentação de animais são as aflatoxinas, desoxinivalenol (DON), fumonisinas, ocratoxina A (OTA), toxina T-2 e zearalenona (ZEA), as quais irão diferir quanto ao tipo e prevalência em diferentes regiões do mundo (PINOTTI et al., 2016).

Embora as rações comerciais adquiridas nas propriedades sejam comercializadas com nível de garantia controlado pelo fabricante, o armazenamento inadequado das mesmas pode favorecer o crescimento fúngico e uma subsequente contaminação por aflatoxinas. Para (CAST, 2003), um produto armazenado em condições de baixa umidade relativa e com uma baixa atividade de água, provavelmente não apresentará desenvolvimento de fungos e consequente produção de toxinas.

Hashimoto et al. (2003), no Paraná, encontraram níveis de aflatoxinas variando de não detectável até 15,6 ng/g. Porém, na maioria das amostras de ração analisadas (61,90%) os valores encontrados foram abaixo de 4 ng/g. No mesmo estado, Buck (2005) detectou níveis de 7,84 a 26,49 µg/kg de aflatoxinas totais em 17% das amostras de ração analisadas. Carvalho Gonçalves-Nunes et al. (2015) detectaram níveis médios de AFB₁ em farelo de soja (5,8 µg/kg), em farelo de milho (1,1 µg/kg), e em outros cereais (7,4 µg/kg), e na ração de peixes encontrou 3,8 µg/kg.

As contaminações por micotoxinas em rações acontecem durante o armazenamento sob condições adversas, tais como elevada umidade do ar ou no local, altas temperaturas, risco de respingos de chuva ou goteiras, locais pouco ventilados e sujos, presença de insetos, roedores e outros animais, sacos mal acomodados e empilhados, em contato direto com o piso ou com as paredes do depósito, entre outras (KUBITZA, 2010). Sendo assim, as rações em uso estão mais vulneráveis à contaminação por não estarem protegidas nas embalagens, facilitando as condições para o crescimento fúngico.

Durante as visitas às propriedades de piscicultura para a coleta dos materiais, foi observado que todas as propriedades mantinham as rações em uso e em estoque armazenadas no mesmo galpão, razão pelo qual pode ocorrer contaminação de um produto contaminado para outro, caso não estiverem em condições apropriadas para armazenamento.

5.6.3.2 Aflatoxinas nos peixes

Os níveis de aflatoxinas encontrados no tecido muscular e no fígado dos peixes das propriedades estão dispostos nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. No tecido muscular dos animais não foram detectados níveis de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. AFM₁ foi detectada em apenas uma amostra (8,34%), no peixe matrinxã, com nível de 5,4 µg/kg.

Das amostras de fígado analisadas, em 50 % foram detectados níveis de AFM₁, em níveis de 2,3 a 17,1 µg/kg. Similarmente ao tecido muscular, no fígado também não foram detectados níveis de AFB₂, AFG₁ e AFG₂. A AFB₁ foi observada em duas amostras (16,67%) de fígado, em níveis de 8,9 µg/kg e 12,7 µg/kg (Tabela 14).

Tabela 13 - Aflatoxinas nas amostras de tecido muscular dos peixes das propriedades.

Piscicultura	Aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$)				
	AFM ₁	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Lambari					
P2	ND	ND	ND	ND	ND
P3	ND	ND	ND	ND	ND
Matrinxã					
P1	ND	ND	ND	ND	ND
P2	ND	ND	ND	ND	ND
P3	ND	ND	ND	ND	ND
P4	ND	ND	ND	ND	ND
P5	5,4	ND	ND	ND	ND
Pacu					
P1	ND	ND	ND	ND	ND
P2	ND	ND	ND	ND	ND
P3	ND	ND	ND	ND	ND
P4	ND	ND	ND	ND	ND
P5	ND	ND	ND	ND	ND

Limite de detecção (LOD): 0,5 $\mu\text{g/kg}$; Limite de quantificação (LOQ): 2,0 $\mu\text{g/kg}$.

ND: inferior ao LOQ.

Fonte: Própria autoria

Este trabalho avaliou a ocorrência de aflatoxinas nas pisciculturas em condições naturais, ou seja, não houve controle sobre o tempo de exposição a uma dieta contaminada. Mesmo com um número baixo de amostras, os resultados obtidos indicam que houve acúmulo de AFB₁ no fígado do peixe lambari e matrinxã provenientes da propriedade P2. Também foram encontrados níveis de AFM₁ nos peixes matrinxã, lambari e pacu provenientes da mesma propriedade (P2). Na propriedade P1 também foi encontrada AFM₁ nos peixes matrinxã e pacu (Tabela 14). Embora os resultados obtidos sobre os níveis de aflatoxinas nos músculos dos animais tenham sido baixos, pode-se inferir que talvez não tenha havido uma longa exposição a rações contaminadas por aflatoxinas a fim de ter provocado um acúmulo com níveis detectáveis no tecido muscular desses animais.

Vale ressaltar que mesmo a alimentação de peixes com baixos níveis de AFB₁ podem induzir a problemas graves de saúde nos animais, podendo também representar um elevado risco de transmissão de AFB₁ para consumidores humanos através dos resíduos acumulados na parte comestível dos peixes (EL-SAYED; KHALIL, 2009). De acordo Anater et al. (2016), na maioria dos estudos que reportam de níveis residuais de AFB₁ em tecidos biológicos de peixes, o nível de AFB₁ residual no fígado é muito mais elevado do que no músculo. A explicação mais aceita para esses resultados é de que o fígado desempenha um papel fundamental no

metabolismo de AFB₁ no organismo dos animais. No presente trabalho, na análise residual de aflatoxinas no fígado, houve a detecção de níveis de AFM₁ e AFB₁ em duas amostras de fígado. Destas duas amostras de fígado, apenas uma apresentou maior nível residual de AFB₁ (12,7 µg/kg) comparado com o valor de AFM₁ encontrado (8,8 µg/kg).

Tabela 14 - Aflatoxinas nas amostras de fígado dos peixes das propriedades

Piscicultura	Aflatoxinas (µg/kg)				
	AFM ₁	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Lambari					
P2	17,1	8,9	ND	ND	ND
P3	ND	ND	ND	ND	ND
Matrinxã					
P1	11,8	ND	ND	ND	ND
P2	8,8	12,7	ND	ND	ND
P3	ND	ND	ND	ND	ND
P4	ND	ND	ND	ND	ND
P5	8,0	ND	ND	ND	ND
Pacu					
P1	6,7	ND	ND	ND	ND
P2	2,3	ND	ND	ND	ND
P3	ND	ND	ND	ND	ND
P4	ND	ND	ND	ND	ND
P5	ND	ND	ND	ND	ND

Limite de detecção (LOD): 0,5 µg/kg; Limite de quantificação (LOQ): 2,0 µg/kg.

ND: inferior ao LOQ.

Fonte: Própria autoria

Alguns fatores podem estar envolvidos e justificariam os diferentes resultados obtidos neste trabalho para as variadas espécies estudadas. Tais fatores são: a) baixos níveis de aflatoxinas na ração, b) tempo de exposição, c-) suscetibilidade das diferentes espécies.

As diferentes espécies de peixes respondem diferentemente quanto à suscetibilidade a toxicidade crônica e aguda das aflatoxinas. Nos peixes, os sinais clínicos observados em casos de intoxicações leves incluem uma redução no apetite e no crescimento, e comprometimento dos índices de conversão alimentar. A intoxicação crônica é provocada pela exposição de níveis tóxicos não letais de micotoxinas por prolongados períodos. Neste tipo de intoxicação, vários órgãos do animal como o rim, baço, fígado e coração são afetados e lesionados (KUBITZA, 2010). Dentre os vários órgãos, o fígado é o primeiro órgão afetado, devido ao processo de biotransformação primária AFB₁, resultando na formação de metabólitos tóxicos como a AFM₁. Porém, os padrões de biotransformação da AFB₁ podem variar

consideravelmente entre as espécies animais ou até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (LOPES, 2008), fator esse que poderia justificar os diferentes resultados de detecção de AFB₁ no fígado (Tabela 14) nas espécies avaliadas.

No estudo de Michelin (2016), os peixes lambari-de-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) foram alimentados com uma dieta contendo 10, 20 e 50 µg de AFB₁/kg de ração num período total de 120 dias. Os peixes apresentaram acúmulo de aflatoxinas no músculo e no fígado, havendo maiores níveis detectados após 90 dias de experimento. No músculo dos lambaris, a concentração de aflatoxina B₁ observada ao final do período de exposição (120 dias) foi semelhante aos níveis empregados na dieta (50 µg de AFB₁/kg de ração). Além disso, as aflatoxinas na dieta prejudicaram o desempenho dos lambaris, sendo observados menor peso e tamanho nos peixes submetidos aos tratamentos com aflatoxinas em relação ao grupo controle.

Mesmo a ingestão de baixos níveis de micotoxinas já é suficiente para comprometer o sistema imunológico, causando problemas de sanidade animal e diminuição da produtividade (GRECO; PARDO; POSE, 2015; CARVALHO GONÇALVES-NUNES et al., 2015). A exposição frequente dos peixes às micotoxinas, sendo elas individuais ou associadas a outras micotoxinas, representa um risco contínuo para a saúde do animal (PIETSCH et al., 2013). No organismo dos peixes, as micotoxinas podem induzir alterações (reabsorção de nutrientes, alterações celulares e de órgãos) e produzir efeitos funcionais e morfológicas os quais podem levar à morte (TOLOSA et al., 2014).

Arana et al. (2002), verificaram que AFB₁ afetava o crescimento de trutas diplóides (*Oncorhynchus mykiss*) porém não de triplóides quando alimentadas com 80 µg de AFB₁ por Kg de alimento. No trabalho de Boonyaratpalin et al. (2001) verificou-se que o crescimento do camarões tigre preto (*Penaeus monodon* Fabricius) foi reduzido quando alimentados com uma dieta contendo concentrações entre 500 a 2500 µg AFB₁/kg, além de apresentarem manchas avermelhadas distribuídas pelo corpo e cauda quando alimentados com a dieta contendo o nível mais alto de AFB₁. No Pasquitão, Andleeb et al. (2015) relataram que o fígado de peixes (*Catla catla*) tratados com uma dieta contendo concentrações de 20, 30 e 40 µg AFB₁/kg apresentaram, ao final de 90 dias, necrose extensiva, inflamação crônica, perda de cor do tecido (pálido). No tratamento com 40 e 50 µg AFB₁/kg foram encontrados peixes mortos, provando que o fígado é o órgão mais afetado pelas aflatoxinas. Por

outro lado, Baglodi et al. (2015), avaliaram a espécie *Labeo rohita*, e relataram que não houve mudanças significativas no desempenho de crescimento ou mudanças comportamentais desses animais quando alimentados com uma dieta contaminadas com níveis de AFB₁ de 50, 100 e 150 µg/kg durante 130 dias.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, foram encontrados níveis baixos de aflatoxinas na ração destinada a peixes de cultivo das propriedades investigadas, os quais atendem aos limites da legislação brasileira vigente. No entanto, houve detecção de fungos toxigênicos nas rações e acúmulo de aflatoxinas nos tecidos dos peixes, sugerindo que houve ingestão de aflatoxinas pelos animais.

Conclui-se que existe contaminação por aflatoxinas em pisciculturas no estado de São Paulo e, sendo assim, deve-se controlar a contaminação dos peixes pelas aflatoxinas, evitando-se riscos à saúde dos consumidores.

REFERENCIAS

- ABDELHAMID, A. M. **Mycotoxins in fish with special emphasis on the egyptian situation**. 2007. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mycotoxins-fish-special-emphasis-t461/p0.htm>>. Acesso em: 24 fev. 2016.
- ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 192, n. 6, p. 409-25, 2010.
- ABDOLLAHI, A.; BUCHANAN, R. L. Regulation of aflatoxin biosynthesis: induction of aflatoxin production by various carbohydrates. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 46, p. 633-635, 1981.
- ABRAMSON, D. Mycotoxin formation and environmental factors. In: SINHA, K. K.; BHATNAGAR, D. (Eds.). **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York: Marcel Dekker 1998. p. 255-277.
- ALCESTE, C. C. Alternative protein sources in tilapia feed formulation. **Aquaculture Magazine**, Arden, v. 26, p. 70-75, 2000a.
- ALCESTE, C. C. Some fundamentals of tilapia nutrition. **Aquaculture Magazine**, Arden, v. 26, p. 74-76, 2000b.
- ALINEZHAD, S.; TOLOUEE, M. et al. Mycobiota and aflatoxin B₁ contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed with emphasis to *Aspergillus* section *Flavi*. **Iranian Journal of Fisheries Science**, Iran, v. 10, n. 3, p. 363-374, 2011.
- ALMEIDA, I.F.M.; MARTINS, H.M.L.; SANTOS, S.M.O.; FREITAS, M.S.; COSTA F. J.M.G.M.; BERNARDO, F.M.A. Mycobiota and Aflatoxin B₁ in Feed for Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Toxins*, 3: 163-171, 2011.
- ALONSO, V. A. et al. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 115, p. 637-643, 2013.
- ALTSCHUL, S. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403- 410, 1997.
- ALTUG, G.; BEKLEVIK, G. Level of aflatoxin in some fish feeds from fish farming processes, feed factories and imported feeds. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 27, p. 1247-1252, 2003.
- ANATER, A.; et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 451, p. 1-10, 2016.
- ANDLEEB, S. et al. Effect of aflatoxin B₁-contaminated feed on growth and vital organs of advance fry of *Catla catla*. **Journal of Animal and Plant Sciences**, Nairobi, v. 25, n. 3, p. 816-825, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. 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.

ARANA, S. et al. Differential effect of chronic aflatoxin B1 intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 34, n. 2, p. 253-263, 2002.

AYROZA, L. M. S.; AYROZA, D. M. M. R. **Panorama da piscicultura no estado de São Paulo**. 2012. Disponível em: <<http://www.apta regional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2012/julho-dezembro-2/1227-panorama-da-piscicultura-no-estado-de-sao-paulo/file.html>>. Acesso em: 10 set. 2016.

BAGLODI, V. et al. Effect of dietary incorporated aflatoxin (AFB1) on the survival and growth performance of *Labeo rohita*. **Journal of Experimental Zoology India**, Uttar Pradesh, v. 18, n. 2, p. 603-607, 2015.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2005. 472 p.

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, art. 3, 2013.

BAUTISTA, M. N. et al. Aflatoxin contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas and pre-adult *Penaeus monodon*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 65, p. 5-11, 1994.

BOONYARATPALIN, M. et al. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Aquaculture Research**, Chichester, v. 32 p. 388-398, 2001. Suplemento 1.

BRASIL. Ministério das Relações Exteriores. **Recursos hídricos**. 2016a. Disponível em:< <http://www.itamaraty.gov.br/pt-BR/politica-externa/desenvolvimento-sustentavel-e-meio-ambiente/176-recursos-hidricos>>. Acesso em: 25 maio 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Água**. 2016b. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/agua>>. Acesso em: 26 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes**, 2015. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

BRASIL. Portal Brasil. **Economia e emprego: aquicultura**. 2014. Disponível em:<<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/12/maiores->

[produtores-de-peixes-do-brasil-nao-estao-no-litoral-e-sim-no-centro-oeste-mostra-ibge](#)> Acesso em: 20 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**: promovendo a alimentação saudável. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/SNAD/SFA nº. 07, de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 nov. 1988. Seção I, p. 21.968.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, p. 134-158, 2012.

BUCK, E. L. **Micotoxinas em ração comercial para peixes**. 2005. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; ADAMS, D. M. Colony count methods. In: SPECK, M. L. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public Health Association, 1984, p. 914.

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

CARVALHO GONÇALVES-NUNES, E. M. et al. Screening of aflatoxin B1 and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. **Latin American Journal of Aquatic Research**, Valparaíso, v. 43, n. 3, p. 595-600, 2015.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, p. 291-306, 1991.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems task force report. Ames, Iowa, USA, n. 139, 2003.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, n. 1/2, p. 1-10, 2002.

DEGOLA, F. et al. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 103, p. 409-41, 2007.

DENG, S. X. et al. Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) during long-term dietary exposure. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, p. 233-240.2010

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 36, p. 548-555, 1994.

DUARTE, M. **Aquicultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/zootecnia/aquicultura-no-brasil/>>. Acesso em: 09 agosto 2016.

ELLIS, R. W. et al. Reduction of the bioavailability of 20 µg/kg aflatoxin in trout feed containing clay. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 183, p.179-188, 2000.

EL-SAYED, Y. S.; KHALIL, R. H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B₁ in marine water-reared sea bass (*Diacentrarchus labrax* L.). **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 47, p. 1606-1609, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Economic analysis of supply and demand for food up to 2030**: special focus on fish and fishery products. Rome: FAO, 2014 (Audun Lem, Trond Bjørndal, Alena Lappo).

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ. Genômica. Análise de fragmentos. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/.../Sequenciamento%20de%20DNA-finalnew1.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2016.

FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p.

GAMBALE, W. Fungos contaminantes. In: ZAITZ, C. et al. (Ed.). **Compêndio de micologia médica**. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 1998. p. 113-121.

GROUP FOR ASSISTANCE ON SYSTEMS RELATING TO GRAIN AFTER HARVEST – GASGA. **Mycotoxins in Grain**. 1997. (CTA - Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation ACP-EU. TECHNICAL LEAFLET, 3). Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/x5008e/x5008e01.htm>>. Acesso em: 02 jul. 2016

GRECO, M.; PARDO, A.; POSE, G. Mycotoxigenic fungi and natural Co-Occurrence of mycotoxins in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds. **Toxins**, Basel, v. 7, p. 4595-4609, **2015**.

GREGORY J. F.; MANLEY, D. B. High performance liquid chromatographic quantitation of aflatoxin metabolites in animal tissues. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, Washington, v. 65, n. 4, p. 869-875, 1982

GUILLAMONT, E. M. et al. A comparative study of extraction apparatus in HPLC analysis of ochratoxin A in muscle. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 383, p. 570-575, 2005.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Sympium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

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, jan./jun. 2003.

HOFFMAN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto, n. 9, p. 23-30, jul./ago. 2001.

HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. Bifuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 283, p. 525-532, 1991.

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

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

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 122, p. 179-188, 2001

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. World Health Organization. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, 2002. v. 82, 171 p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. World Health Organization. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Lyon, v. 56, p. 19-23, 1993.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**. 2003.

JAKIĆ-DIMIĆ, D. et al. The influence of mycotoxins in food on fish health status. **Proceedings for Natural Sciences Matica Srpska**, Novi Sad, v. 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.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 342-362, 2007.

KAREL, M. Water activity and food preservation. In: KAREL, M.; FENNEMA, O. R.; LUND, D. B (Eds.). **Principles of food science**. Part II: physical principles of food preservation. New York: Marcel Dekker, 1975. chap. 8, p. 237-263.

KLUCZKOVSKI, A. M.; KLUCZKOVSKI JUNIOR, A. Aflatoxin in fish flour from the Amazon region. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. **Aflatoxins**: recent advances and future prospects. Rijeka: InTech, 2013. cap. 9, p. 197-206.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in food. **Brazilian Journal Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 283-300, 2003.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. 3. ed. Jundiaí: Degaspari, 1999. 123 p.

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

LEESON, S.; DIAS, G.; SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995. 352 p.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-69, 1976.

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: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2005001000012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 set. 2015.

LOPES, P. R. S. **Efeito das aflatoxinas e dos adsorventes sobre o desempenho zootécnico de alevinos e juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

MAHFOUZ, M. E. Ameliorative effect of curcumin on aflatoxin B1-induced changes in liver gene expression of *Oreochromis niloticus*. **Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 49, n. 2, p. 275-286, 2015.

MANDARINO, J. M. G. et al. Detoxificação de milho (*Zea Mays* L.) contaminado com aflatoxinas através do processamento por extrusão termoplástica. **Semina**, Maringá, v. 10, p. 6 -11, 1989.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 37, n. 538, p. 85-88, 2001.

MATHIAS, J. **Pacu**: destaque da piscicultura nacional, reconhecido pelo sabor da carne e pelas formas arredondadas, o peixe tem mercado certo, o que garante boas vendas. 2016a. Disponível em:

<<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1682607-4530,00.html>>
Acesso em: 11 set. 2016.

MATHIAS, J. **Matrinxã**: rápido crescimento e alto valor comercial fazem desta espécie de peixe uma ótima opção para a piscicultura em várias regiões do país. 2016b. Disponível em:
<<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1705369-4530,00.html>>
Acesso em: 12 Set. 2016 (b)

MAZIERO, T. M.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MICHELIN, E. C. **Transferência de aflatoxinas da ração para lambaris (*Astyanax altiparanae*) cultivados em piscicultura**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

MILLER, D. M.; WILSON, D. M. Veterinary diseases related to aflatoxins. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Eds.). **The Toxicology of aflatoxins**. New York: Academic Press, 1994. p. 347-364.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, Kidlington, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium**, Oxford, v. 84, p. 62S-76S, 1998.

NAHM, K. H. Possibilities for preventing mycotoxicosis in domestic fowl. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 51, p. 177-185, 1995.

NOGUEIRA, J. H. C. **Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Biológico, São Paulo, 2009.

NORTHOLT, M. D. et al. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Milk and Food Technology**, Des Moines, v. 39, p. 170-174, 1976

NUNES, E. M. C. G. **Microbiota fúngica nos ingredientes e em ração para piscicultura**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2009.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS. **Micotoxinas**. Washington, 1983. p.125-135. (Critérios de Salud Ambiental, 11).

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

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2. ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2002.

PIETSCH, C. et al. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in commercial fish feed: an initial study. **Toxins**, Basel, v. 5, p. 184-192, 2013.

PINOTTI, L. et al. Mycotoxin Contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal byproducts. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 2, p. 45, 2016.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. Heidelberg: Springer, 2009. 519 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; GLENN, D. R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Chichester, v. 54, p. 109-114, 1983.

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

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-78, 2004.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, Lawrence, v. 42, p. 265-70, 1950.

SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, p. 81-85, 1988.

SANTACROCE, M. P.; CONVERSANO, M. C. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 18, p. 99-130, 2008.

SANTOS, F. C. F. **Fungos em rações para camarões cultivados no estado do Piauí**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2006.

SCUSSEL V. M. Hepato-cellular carcinoma and hepatic disease to consumption of food contaminated by aflatoxin B₁ in Santa Catarina state. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXIN, 10., 2000, Guarujá. **Anais...** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2000. p. 86-88.

SIGMA-ALDRICH. **17121, Aspergillus Differentiation Agar**, Base (AFPA, Base). St. Louis, MO, nov. 2004.

SILVA, J. O. **Ocorrência de aflatoxina B1 em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2008.

STOLOFF, L. The three eras of fungal toxin research. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 56, n. 9, p. 784-788, 1979.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 141-158, 1998.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1994.

TOLOSA, J. et al. Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins in feed and fish from aquaculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 51, p. 12462-12470, 2014.

USANNO, O. et al. Effects of aflatoxin B₁ on sex reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn. × *O. mossambicus* Peters). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 27, p. 187-197, 2005. Suplemento 1.

VERMA, R. J. Aflatoxin cause DNA damage. **International Journal of Human Genetics**, New Delhi, v. 4, n. 4, p. 231-236, 2004.

WOGAN, G. N.; BUSBY, W. F. JR. Naturally occurring carcinogens. In: LIENER, I. E. (Ed.). **Toxic constituents of plant feedstuffs**. New York: Academic Press Inc., 1980.

WOGAN, G. N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, Hoboken, v. 374, p. 123-137, 1992.

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 41, n. 1, p. 1-17, 2009.

YOSHISAWA, T. **Mycotoxins analyses for federative republic of Brazil**. Japan: Trainig Course, 2001. 283 p.