UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINA MARIA BEDOYA SERNA

**Efeito de aflatoxinas na ração sobre matrinxã (*Brycon cephalus*):
acúmulo em tecidos e desempenho produtivo**

Pirassununga

2018

CAROLINA MARIA BEDOYA SERNA

**Efeito de aflatoxinas na ração sobre matrinxã (*Brycon cephalus*):
acúmulo em tecidos e desempenho produtivo**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

Pirassununga

2018

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

B412e Bedoya Serna, Carolina Maria
 Efeito de aflatoxinas na ração sobre Matrinxã
 (*Brycon cephalus*): acúmulo em tecidos e desempenho
 produtivo / Carolina Maria Bedoya Serna ;
 orientadora Andrezza Maria Fernandes. --
 Pirassununga, 2018.
 101 f.

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

 1. Micotoxinas. 2. AFB₁. 3. HPLC. 4.
 Contaminação. 5. Piscicultura. I. Fernandes,
 Andrezza Maria, orient. II. Título.

CAROLINA MARIA BEDOYA SERNA

Efeito de aflatoxinas na ração sobre matrinxã (*Brycon cephalus*): acúmulo em tecidos e desempenho produtivo

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

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Data de aprovação: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof.a. Dra. _____

Instituição: _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Dedico a minha mãe, meu pai e meu
irmão por serem o motor que dá
força a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir ter milhões de experiências a cada dia, por me colocar neste lugar e me permitir conhecer muitas pessoas que levarei para sempre no meu coração.

Agradeço a meus pais Ramón e Lucero pelo amor, apoio e paciência... sei que este ano não tem sido fácil para ninguém e ficar longe de vocês aumenta a minha saudade, no entanto, seu carinho e suas orações me dão a força para continuar adiante na vida... Agradeço sempre a Deus por me dar os melhores pais do mundo, vocês são únicos e por isso todo meu amor é para vocês.

Agradeço a meu irmão David por ser minha companhia e a força para ser melhor cada dia... Espero estar fazendo as coisas bem e ser teu melhor exemplo... Te amo!!!!... Meu cuidado e dedicação serão para você.

Agradeço a meu namorado Julian por seu amor, sua companhia, apoio incondicional, seus ensinamentos e querer viver junto comigo todos estes anos de aventuras... sou muito orgulhosa de você e agradeço a Deus todos os dias por juntar nossas vidas, Deus permita que sejam mais aprendizados e experiências do seu lado... Te Amo, meu amor!!

Agradeço a meus avós, Ramón e Marco Tulio, embora estejam no céu, sei que sempre cuidam de mim, agradeço pelo amor e apoio que me deram... Levarei vocês sempre no meu coração!!!

Agradeço a minha tia Liliana por ser o impulso em minha vida como estudante e profissional, agradeço pelo apoio no Mestrado e no Doutorado... Espero te retornar da melhor forma tudo aquilo que você me tem dado... Deus te abençoe sempre!!!

Agradeço a minha avó, minhas tias, meus tios, minhas primas e meus primos – também agradeço a minhas tias, tios e primos que já não estão – por suas orações, seu carinho e seu ânimo para eu continuar trilhando meu caminho.

Agradeço à professora Andrezza por me receber no seu laboratório, me dar um espaço no seu grupo de trabalho e se arriscar comigo sabendo que este projeto era um tema totalmente novo para mim... fico muito grata por todos os ensinamentos e pela oportunidade de fazer parte de um projeto tão maravilhoso... espero ter cumprido suas expectativas e tomara que a gente possa se encontrar de novo seja na Colômbia ou no Brasil ou quem sabe em outro lugar do mundo... Deus te abençoe sempre!!!

Agradeço à Silvinha pela paciência e dedicação e as batalhas vividas com o HPLC, só você sabe o que é começar do zero, do seu lado aprendi muito e tenha a certeza que esses ensinamentos levarei comigo a vida toda... Muito Obrigada por tudo!!!

Agradeço ao Euder Michelin, pelo apoio, por ser o parceiro de experimento e batalhas e por me mostrar um mundo que nunca pensei que ia viver, cuidar de bichinhos é demais!!!

Agradeço ao Lucas Carrion pela ajuda em todo o experimento e pelo tempo disponibilizado, foi muito legal trabalhar com você.

Agradeço ao pessoal dos Laboratórios Multiusuário de Microbiologia e de Higiene Zootécnica por sua amabilidade e me receber e permitir que me sentisse em casa... Muito Obrigada!!!

Agradeço ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – ICMBio – CEPTA, pelas instalações para levar a cabo nosso projeto, também agradeço ao Paulo Ceccarelli e ao George Yasui, pelo apoio, ensinamentos e tempo disponibilizado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, a qual me permitiu desenvolver este projeto de Doutorado.

Agradeço a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e a todos os professores pelos ensinamentos obtidos durante a realização do curso.

Agradeço a minha amiga Laura por seu carinho, sua paciência e por sua amizade incondicional... Obrigada por tudo, amiga!!!!... Agora a gente está longe e a saudade bate forte, mas com certeza vamos nos encontrar de novo na Colômbia... Te adoro, amiga!!!

Agradeço aos meus amigos Andrea, Julian, Nataly, Karina e Santiago por cada momento juntos, por cada festinha, reunião, almoço, janta etc., agora vocês são parte da minha vida por isso prometo nunca me esquecer de vocês. Muito obrigada, RIPIECITOS, adoro vocês... Obrigada mesmo!!!

Dicen por ahí que los momentos más difíciles son los que te hacen más fuerte...
y Tú me has enseñado que es posible sonreír a pesar de las dificultades y que
solo basta tener FE y creer en nosotros mismos para llegar muy lejos... la vida
sigue y las batallas ganadas o perdidas serán solo recuerdos, pero tendremos la
convicción de ser mejores cada día...

¡¡¡SALDREMOS TRIUNFANTES!!!

RESUMO

BEDOYA-SERNA, C. M. **Efeito de aflatoxinas na ração sobre Matrinxã (*Brycon cephalus*): acúmulo em tecidos e desempenho produtivo**. 2018. 101 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

A deposição de aflatoxinas em peixes é residual e cumulativa, além de causar efeitos adversos no peso, tamanho, consumo de ração e sobrevivência, demarcando amplas diferenças quanto à sensibilidade e metabolismo entre as espécies. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a transferência de aflatoxinas da ração para matrinxã (*Brycon cephalus*) e a influência sobre parâmetros biométricos, bioquímicos e histopatológicos. As aflatoxinas foram incorporadas na ração pelo método de imersão em metanol, obtendo-se os seguintes tratamentos: A. Controle – ração sem toxina; B. Ração + 10 µg Aflatoxina B₁/kg; C. Ração + 20 µg Aflatoxina B₁/kg e D. Ração + 50 µg Aflatoxina B₁/kg. As aflatoxinas foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no fígado e músculo de matrinxã. Para avaliação do desempenho produtivo foram mensurados o peso, comprimento, taxa de sobrevivência e consumo diário de ração. Para avaliação bioquímica e histopatológica foram realizadas coletas de sangue por punção da veia caudal para determinação das atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais (PT), albumina (ALB) e globulina (GLOB). Para observação histológica foram coletados fragmentos de fígado, que foram processados para posterior inclusão em parafina e coloração de hematoxilina e eosina. Os peixes expostos aos tratamentos B, C e D apresentaram menor peso e comprimento ($P < 0,05$) quando comparados com o tratamento controle, sendo os matrinxãs do tratamento C os mais afetados. O consumo de ração e a sobrevivência apresentaram diferenças a partir do dia 150 no tratamento D. Foi observado o acúmulo de AFB₁ no fígado em função do aumento da concentração da toxina na ração. No tratamento D, foram observados resíduos a partir do dia 30, com valores entre 0,17 e 0,62 µg AFB₁/kg. AST, FA, PT, ALB e GLOB, apresentaram alterações muito discretas, o que dificultou a identificação de danos hepáticos ou afecções à funcionalidade do fígado. A exposição à AFB₁ causou degeneração gordurosa moderada e severa, degeneração hidrópica, morte celular ou células em processo de morte e desorganização do arranjo cordonal. Conclui-se que matrinxã

sob condições experimentais não representa risco à saúde do consumidor, no entanto, é uma espécie sensível aos efeitos adversos das aflatoxinas.

Palavras chave: Micotoxinas, AFB₁, HPLC, Contaminação, Piscicultura.

ABSTRACT

BEDOYA-SERNA, C. M. **Effect of dietary aflatoxins on Matrinxã (*Brycon cephalus*): accumulation in tissues and performance.** 2018. 101 f. Doctoral Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The deposition of aflatoxins in fish is residual and cumulative, besides causing adverse non-lethal effects on weight, size, feed consumption and survival, establishing wide differences in sensitivity and metabolism among species. The present work aims to evaluate the transfer of aflatoxins from the feed to matrinxã (*Brycon cephalus*) and the influence on biometric, biochemical and histopathological parameters. The aflatoxins were incorporated into the feed by the method of immersion in methanol, obtaining the following treatments: A. Control - feed without toxin; B. Feed + 10 µg AFB₁/kg; C. Feed + 20 µg AFB₁/kg and D. Feed + 50 µg AFB₁/kg. Aflatoxins were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) in the liver and muscle of matrinxã. performance based on weight, length, survival rate and daily feed intake was evaluated. Blood samples were collected to determine the serum activity of aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AP), total proteins (PT), albumin (ALB) and globulin (GLOB). For histological observation, liver fragments were collected and processed in paraffin followed by hematoxylin and eosin staining. The fish exposed to treatments B, C and D presented lower weight and length ($P<0.05$) when compared with the control treatment, and the matrinxãs of treatment C were the most affected. Feed intake and survival showed differences from day 150 in treatment D. AFB₁ accumulation was observed in the liver as the toxin concentration in the diet increased. In treatment D, residues were observed from day 30 with values between 0.17 and 0.62 µg AFB₁/kg. AST, AF, PT, ALB and GLOB presented very discrete alterations, making it difficult to identify liver damage or liver function disorders. Exposure to AFB₁ caused moderate and severe fatty degeneration, hydropic degeneration, cell death or cells in the process of death and disorganization of the cordial arrangement. Concludes that matrinxã under experimental conditions does not pose a risk to consumer health, however, is a susceptible species to the adverse effects of aflatoxins.

Key words: Mycotoxins, AFB₁, HPLC, Contamination, Farming fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Consumo per capita (kg) de pescado por continente para o ano 2015.....	22
Figura 2 – Representação percentual da produção de peixes por regiões em 2016.	23
Figura 3– Matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>).....	25
Figura 4 – Boca de Matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>).....	25
Figura 5– Sistema Digestivo de Matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>).....	26
Figura 6 – Estrutura química das Aflatoxinas.	37
Figura 7 – Rota de biotransformação de AFB ₁	39
Figura 8 – Representação esquemática de amostragem mensal.	50
Figura 9 – Comprimento total médio do matrinxã sob o efeito de diferentes concentrações de aflatoxinas na ração durante o período experimental.	61
Figura 10 – Consumo individual diário de ração de matrinxã sob o efeito de diferentes concentrações de aflatoxinas na ração.....	62
Figura 11 – Curvas de calibração para ração.....	65
Figura 12 – Curvas de calibração para o músculo e fígado.....	66
Figura 13 – Cromatograma para soluções padrão de aflatoxinas (20 µg/mL).	67
Figura 14 – Atividade de fosfatase alcalina (FA) em sangue de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>) para cada tratamento.....	76
Figura 15 – Atividade de fosfatase alcalina (FA) em sangue de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>), para cada período experimental.....	77
Figura 16 – Fígado de matrinxã do tratamento controle. O traço indica arranjo cordonal dos hepatócitos. H&E 400X.....	85
Figura 17 – Frequência de ocorrência de degradação gordurosa em fígado de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>).....	85
Figura 18 – Degeneração gordurosa severa em fígado de matrinxã. H&E 400X	86
Figura 19 – Degeneração gordurosa moderada em fígado de matrinxã. H&E 400X.....	86
Figura 20 – Degeneração hidrópica e morte celular em fígado de matrinxã (seta). H&E 400X.	87
Figura 21 – Degeneração hidrópica e vacúolos de lipídeo em fígado de matrinxã (seta). H&E 400X	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais estados produtores de matrinxã nos anos 2015 e 2016.....	27
Tabela 2 – Ocorrência de alimentos contaminados por micotoxinas no Brasil.....	31
Tabela 3 – Efeitos adversos causados pelas principais micotoxinas.	34
Tabela 4 – Efeitos das aflatoxinas sobre algumas espécies de animais de produção.....	41
Tabela 5 – Efeitos de aflatoxinas em algumas espécies de peixes.	44
Tabela 6 – Informações nutricionais e ingredientes da ração fornecida aos peixes.....	48
Tabela 7 – Concentração média de Aflatoxinas na ração para peixe.	57
Tabela 8 – Parâmetros de qualidade de água.....	58
Tabela 9 – Peso médio dos matrinxãs sob o efeito de diferentes concentrações de aflatoxinas na ração durante o período experimental.....	59
Tabela 10 – Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de ração para peixes.	67
Tabela 11 – Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise para AFB ₁ em amostras de músculo de matrinxã.	68
Tabela 12 – Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.	68
Tabela 13 – Deposição de AFB ₁ em fígado de matrinxã durante o tempo experimental.....	69
Tabela 14 – Deposição de AFB ₁ em músculo de matrinxã durante o tempo experimental.	71
Tabela 15 – Atividade do aspartato aminotransferase (AST) em sangue de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>).....	75
Tabela 16 – Atividade de proteínas totais (PT) em sangue de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>)....	79
Tabela 17 – Atividade de albumina (ALB) em sangue de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>).....	80
Tabela 18 – Atividade de globulina (GLOB) em sangue de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFs:	Aflatoxinas
AFB ₁ :	Aflatoxina B ₁
AFB ₂ :	Aflatoxina B ₂
AFBO:	Epóxido de aflatoxina B ₁
AFG ₁ :	Aflatoxina G ₁
AFG ₂ :	Aflatoxina G ₂
AFL:	Aflatoxicol
AFM ₁ :	Aflatoxina M ₁
AFM ₂ :	Aflatoxina M ₂
AFQ:	Aflatoxina Q
AFP:	Aflatoxina P
ALB:	Albumina
ALT:	Alanina aminotransferase
AST:	Aspartato aminotransferase
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DON:	Desoxinivalenol
CLAE:	Cromatografia líquida de alta eficiência
EUA:	Estados Unidos da América
FA:	Fosfatase alcalina
FAO:	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FB ₁ :	Fumonisin B ₁
FB ₂ :	Fumonisin B ₂
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FMs:	Fumonisin
GGT:	Gama glutamiltransferase
GLOB:	Globulina
Hab:	Habitante
H&E:	Hematoxilina eosina
IARC:	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LD50:	Dose letal
LOD:	Limite de detecção

LOQ:	Limite de quantificação
Máx:	Máximo
Min:	Minuto
Mín:	Mínimo
ND:	Não detectado
NRRL:	<i>Culture Collection of the Agricultural Research Service</i>
OMS:	Organização Mundial da Saúde
OPS:	Organização Panamericana da Saúde
OTA:	Ocratoxina A
Ppb:	Partes por bilhão
Ppm:	Partes por milhão
PT:	Proteína total
RDC:	Resolução da Diretoria Colegiada
Rpm:	Revoluções por minuto
SAS:	Statistical Analysis System
TFA:	<i>Trifluoroacetic acid</i>
UE:	União Europeia
USDA:	<i>United States Department of Agriculture</i>
ZEA:	Zearalenona

LISTA DE SÍMBOLOS

A _w :	Atividade de água
cm:	Centímetro
NaCl:	Cloreto de sódio
g:	Grama
°C:	Grau Celsius
L:	Litro
µg:	Micrograma
µm:	Micrômetro
mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
mm:	Milímetro
M:	Molar
n:	Número
%:	Porcentagem
P:	Probabilidade
kg:	Quilograma
km:	Quilometro
R\$:	Reais
U:	Unidade
US\$:	Dólares americanos
v/v:	volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. AQUICULTURA: PERFIL MUNDIAL E BRASILEIRO	21
2.2. PISCICULTURA NO BRASIL	23
2.3. MATRINXÃ (<i>Brycon cephalus</i>)	24
2.3.1. Produção de Matrinxã no Brasil	26
2.4. MICOTOXINAS	28
2.4.1. Histórico das Micotoxinas	28
2.4.2. Micotoxinas em Alimentos para Consumo Humano e Animal	30
2.4.3. Efeitos Tóxicos das Micotoxinas em Humanos e Animais	32
2.4.4. Legislação	35
2.5. AFLATOXINAS	36
2.6. AFLATOXINAS EM PEIXES	42
2.6.1. Aflatoxinas em Rações para Peixes	42
2.6.2. Efeitos Tóxicos e Acúmulo em Tecidos	43
3. OBJETIVOS	46
3.1. OBJETIVO GERAL	46
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. COMITÊ DE ÉTICA	47
4.2. PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS	47
4.3. DIETAS EXPERIMENTAIS	47
4.4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E MANEJO	49
4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	51
4.6. DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM RAÇÃO, FÍGADO E MÚSCULO DE PEIXE	52

4.6.1. Curvas de calibração	52
4.6.2. Validação do método analítico.....	53
4.6.3. Determinação de aflatoxinas em amostras de ração	53
4.6.4. Determinação de aflatoxinas em amostras de fígado	54
4.6.5. Determinação de aflatoxinas em amostras de músculo.....	54
4.7. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA NO FÍGADO DE MATRINXÃ.....	55
4.7.1. Análises bioquímicas	55
4.7.2. Análises histopatológicas.....	55
4.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. DIETAS EXPERIMENTAIS	57
5.2. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E LIMNOLÓGICOS	57
5.3. DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS.....	64
5.3.1. Avaliação do desempenho do método analítico	64
5.3.2. Determinação de aflatoxinas em amostras de fígado e músculo de matrinxã	69
5.4. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA DE MATRINXÃ.....	74
5.4.1. Avaliação do perfil bioquímico.....	74
5.4.2. Avaliação histopatológica.....	84
6. CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui aproximadamente 12% da reserva total de água doce no mundo, e 7,4 mil km de extensão costeira, sendo um território com condições muito favoráveis para a produção pesqueira e aquícola (CAMPOS DA ROCHA et al., 2013; MUÑOZ; FLORES; PEDROZA FILHO, 2015).

A aquicultura foi introduzida no Brasil há mais de um século. No entanto, em comparação com outras cadeias de produção animal mais tradicionais (bovinocultura, suinocultura e avicultura), a aquicultura ainda dá seus primeiros passos no agronegócio nacional (MUÑOZ et al., 2015). A aquicultura brasileira está baseada na piscicultura, principalmente na produção de tilápia. No entanto, existem outras espécies de peixes com grande potencial na aquicultura, como o pacu, tambaqui, carpa, e o matrinxã, entre outros (IBGE, 2017).

O matrinxã (*Brycon cephalus*) é uma espécie nativa promissora para a piscicultura comercial por ser um peixe de carne nobre, boa conversão alimentar, fácil adaptação à ração artificial, fácil propagação e crescimento rápido na fase larval e alevinagem, o que permite uma rápida comercialização (GADELHA; ARAÚJO, 2013).

O uso de rações balanceadas e de boa qualidade é fundamental para o alcance de altas taxas de produtividade, em função da taxa de conversão alimentar (SIDONIO et al., 2012a). A ração é o insumo com maior custo da produção, podendo representar até 60% do total dependendo da espécie aquática (FAO, 2014). Embora as empresas responsáveis pela alimentação animal tenham trabalhado para produzir uma alimentação adequada a fim de melhorar a absorção de nutrientes, ainda há um desafio, que é produzir rações livres de contaminantes (SIDONIO et al., 2012b), como as micotoxinas.

O crescimento e proliferação de fungos toxigênicos e não toxigênicos é altamente dependente das condições climáticas do local de cultivo e armazenamento (umidade e temperatura). O Brasil, por ser um país tropical, apresenta condições climáticas propícias para o crescimento de diferentes tipos de fungos produtores de micotoxinas, tornando-o um país suscetível a ocorrências de contaminação de alimentos por micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

As aflatoxinas são produzidas por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, as quais se desenvolvem naturalmente em alimentos como amendoim, milho, feijão, arroz, trigo, entre outros. As principais aflatoxinas são B₁, B₂, G₁ e G₂. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a que apresenta maior toxicidade,

seguida de G₁, B₂ e G₂ (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Devido as suas propriedades tóxicas e estabilidade ao tratamento térmico, a presença de micotoxinas nos alimentos pode ser prejudicial à saúde humana e animal (OLIVEIRA et al., 2015).

Em saúde animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido pelas aflatoxinas (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Em saúde pública, as aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, decorrente da ingestão de alimentos contaminados. Existem evidências de que outras doenças, como a síndrome de Reye e o Kwashiorkor, também estejam associadas às aflatoxinas (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Os peixes expostos às aflatoxinas por tempos prolongados podem apresentar função hepática prejudicada; redução da eficiência alimentar; perda de peso; aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas; necrose e desenvolvimento de tumores no fígado e outros órgãos e aumento da mortalidade (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980).

Por sua vez, o potencial bioacumulador das aflatoxinas no organismo torna o peixe mais suscetível a estresses e patologias, assim como também exerce efeito sobre o sistema imunológico, contribuindo com a ocorrência de contaminações virais e bacterianas (LOPES, et al, 2005).

A presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano é um problema potencial para a saúde pública, pois seu acúmulo nos tecidos comestíveis de peixes aumenta a exposição do consumidor, tornando-se mais um fator de risco na saúde humana.

Devido ao exposto anteriormente, este trabalho tem como objetivo avaliar a transferência de aflatoxinas na ração para tecidos de matrinxã (*Brycon cephalus*) e a influência sobre a fisiologia e o desempenho produtivo da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AQUICULTURA: PERFIL MUNDIAL E BRASILEIRO

A aquicultura é o processo de produção em cativeiro de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais é total ou parcialmente aquático. A atividade de produção implica na intervenção do homem no processo de criação, em operações como alojamento, alimentação, proteção contra predadores, entre outros. A aquicultura pode ser continental ou marinha (FAO, 2016; SIDONIO et al., 2012a).

A produção mundial de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos, têm aumentado na última década, alcançando 170,9 milhões de toneladas em 2016, com um valor total de produção de US\$ 362 bilhões. No mesmo ano, a piscicultura representou 47% da produção total, aportando US\$ 232 bilhões ao setor (FAO, 2018).

Em 2016, aproximadamente 88% da produção mundial foi utilizada como alimento ou para consumo humano, os 12% restantes foram utilizados com propósito não alimentar, em sua maioria para produção de farinha e óleo de peixe (FAO, 2018).

Em relação ao consumo mundial de pescado, obteve-se um aumento de 9 kg/hab/ano em 1961 para 20,2 kg hab/ano em 2015. Estudos prévios realizados pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), mostram um consumo aproximado de 20,3 kg/hab/ano em 2016, dos quais, mais de 10 kg/hab/ano são fornecidos pela aquicultura, o mesmo estudo mostrou um consumo de 20,5 kg/ hab/ano em 2017 (FAO 2018). A Figura 1 mostra o consumo per capita de pescado por continente no ano 2015.

Figura 1– Consumo per capita (kg) de pescado por continente para o ano 2015.

Fonte: FAO (2018).

Embora a aquicultura não tenha melhores taxas de crescimento em comparação às décadas anteriores (5,8% em média entre 2001 e 2016), continua crescendo mais rapidamente do que outros grandes setores de produção de alimentos. Devido a esse aumento na produção, vários milhões de pessoas no mundo encontram uma fonte de renda e manutenção na indústria da pesca e no setor aquícola, sendo empregadas aproximadamente 59,6 milhões de pessoas em 2016 (FAO, 2018).

No Brasil, a aquicultura é um setor relativamente novo e apresenta grandes possibilidades de expansão, devido a algumas condições favoráveis. O Brasil possui a maior reserva de água doce do mundo, com mais de 8 mil km³ (aproximadamente 12% da reserva total de água doce no mundo), extensa costa (7,4 mil km), possui condições climáticas propícias, grande produção de grãos, principal matéria-prima das rações e mercado consumidor crescente (CAMPOS DA ROCHA et al., 2013; MUÑOZ; FLORES; PEDROZA FILHO, 2015).

Em 2016, o Brasil ocupou a 13ª posição mundial na produção aquícola, com 600 mil toneladas (FAO, 2018). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2016, o valor total da produção aquícola foi de R\$ 4,61 bilhões, sendo 70,9% oriundos da criação de peixes, seguido pela criação de camarões com 19,3% (IBGE, 2017).

2.2. PISCICULTURA NO BRASIL

No mundo, a piscicultura ainda é a que mais contribui com a aquicultura continental. Em 2016, foram produzidos 47,5 milhões de toneladas de peixe, sendo os principais produtores China, Índia, Indonésia, Vietnã, Bangladesh, Egito e Noruega (FAO, 2018).

A piscicultura no Brasil é uma atividade econômica que vem crescendo com o passar dos anos, passando de 392,49 mil toneladas em 2013 a 483,24 mil toneladas de pescado em 2015 (IBGE, 2014; 2016). Em 2016, o Brasil ficou na oitava colocação mundial com uma produção de 507,1 mil toneladas de pescado, aumentando 4,4% com relação ao ano anterior (FAO, 2018; IBGE, 2017).

Assim como em 2015, em 2016 a região Norte se destacou como maior produtora de peixes com 29,6% da produção nacional, seguida pelas regiões Sul e Sudeste, com uma representação de 24,7 e 17,4%, respectivamente (Figura 2) (IBGE, 2017).

Figura 2 – Representação percentual da produção de peixes por regiões em 2016.

Fonte: IBGE (2017).

Em 2015, o estado de Rondônia teve a maior produção piscícola, seguido pelos estados de Paraná e Mato Grosso (IBGE, 2016). Em 2016, o estado de Rondônia continuou sendo o maior produtor com 90,6 mil toneladas, seguido pelo estado de Paraná com uma produção de 76,1 mil toneladas (IBGE, 2017) e o estado de São Paulo atingiu a terceira posição com uma produção de 48,3 mil toneladas de peixes, aumentando sua produção mais de 35% em comparação com 2015. Este aumento se deve ao investimento na atividade e à entrada de novos produtores no setor (IBGE, 2017).

O Brasil apresenta ampla diversidade de espécies de peixes. Nas suas águas são encontradas espécies de várias formas e tamanhos, muitas delas aptas para piscicultura (CRESCÊNCIO, 2005). O país possui 10 bacias hidrográficas principais, portanto, existem diferenças regionais na produção de espécies de peixes, por exemplo, pintado ou surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), piraputanga (*Brycon microlepis*), curimba (*Prochilodus lineatus*), trairão (*Hoplias lacerdae*), piaçu (*Leporinus macrocephalus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), na bacia do rio Paraná; na bacia do rio São Francisco, destacam-se espécies como dourado (*Salminus brasiliensis*), pintado, piraputanga, piracanjuba, piau-branco (*Leporinus conirostris*), jundiá (*Rhamdia quelen*) e curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*); nas bacias do nordeste encontram-se espécies como piabanha (*Brycon insignis*), curimatã ou curimba (*Prochilodus lineatus*), jundiá, traíra (*Hoplias malabaricus*) e trairão; a bacia amazônica apresenta a maior ictiofauna do país, podem ser encontradas espécies como acará-açu (*Astronotus ocellatus*), acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*), tucunaré (*Cichla ocellaris*), pirarucu (*Arapaima gigas*), matrinxã (*Brycon cephalus*), curimatã, pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*) e surubim, entre outros (CRESCÊNCIO, 2005; MUÑOZ, et al., 2015). Seja pelo potencial produtivo, como crescimento rápido, boa conversão alimentar ou pela demanda no mercado, essa grande variedade de peixes disputa o interesse dos produtores. Uma destas espécies é o matrinxã.

2.3. MATRINXÃ (*Brycon cephalus*)

O matrinxã (*Brycon cephalus*) é uma espécie que pertence à classe Actinopterygii, à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae e gênero *Brycon* (GOMES; URBINATI, 2005; GADELHA; ARAÚJO, 2013). A subfamília Bryconinae, compreende um grupo de 43 espécies e apresenta uma ampla distribuição na América do Sul e Central (GADELHA; ARAÚJO, 2013). Por sua vez, o gênero *Brycon* se destaca por apresentar algumas espécies com elevado potencial zootécnico (ZANIBONI FILHO; REYNALTE-TATAJE; WEINGARTNER, 2006). Na natureza, o matrinxã é uma espécie que se encontra principalmente na bacia Amazônica (GOMES; URBINATI, 2005) e ao longo da sua vida utiliza diversos habitats para seu crescimento e reprodução como lagos, florestas alagadas e rios (LEITE; ARAUJO-LIMA, 2002).

O matrinxã (Figura 3) é um peixe de escamas; possui corpo alongado, um pouco alto e comprido; sua coloração é prateada viva nas laterais e no ventre, com coloração mais escura

na parte dorsal, nadadeiras e nadadeira caudal negras, e também apresenta uma mancha umeral preta ou cinza escura (GOMES; URBINATI, 2005). Apresenta boca pequena, com dentes mandibulares muito fortes, multicuspidados, cortantes e trituradores; na maxila superior, e estão dispostos em várias fileiras (Figura 4) (LADINES; RODRÍGUEZ; RODRÍGUEZ, 2011). Quando adulto, esta espécie pode chegar a um comprimento total entre 50 e 80 cm e pesar entre 4 e 5 kg (LIMA, 2003; MELO, 2007), e em condições de cativeiro pode atingir o tamanho comercial (1,5 kg) em 12 meses (HONCZARYK; INOUE, 2009).

Figura 3– Matrinxã (*Brycon cephalus*).

Fonte: Própria autoria.

Figura 4 – Boca de Matrinxã (*Brycon cephalus*).

Fonte: Própria autoria.

O matrinxã possui hábito alimentar onívoro, alimentando-se em seu ambiente natural de frutos, sementes, flores, restos vegetais, plantas herbáceas, insetos, restos de peixes, entre

outros (IZEL et al., 2004). Em cativeiro, apresenta boa aceitabilidade a rações extrusadas e peletizadas, bem como subprodutos agroindustriais (IZEL; PERIN; MELO, 1996).

O sistema digestório do matrinxã (Figura 5) é característico do seu hábito alimentar, apresenta estômago musculoso e bem definido, o qual tem boa capacidade de distensão para armazenar uma grande quantidade de alimento antes de ser digerido. Apresenta aproximadamente entre 21 e 25 cecos pilóricos que ajudam na absorção de nutrientes. O intestino junto com a vesícula biliar, realizam a digestão e absorção de nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais (LANDINES; RODRIGUEZ; RODRIGUEZ, 2005).

Figura 5– Sistema Digestivo de Matrinxã (*Brycon cephalus*).

A: Músculo. B: Fígado. C: Cecos pilóricos. D: Estômago

Fonte: Própria autoria.

Uma característica importante do matrinxã é que apresenta capacidade de ajustar seu metabolismo ao tipo de nutriente presente nas dietas, aumentando a atividade das enzimas digestivas em função do substrato ofertado (REIMER, 1982). Devido a isso, esta espécie pode aproveitar eficientemente os nutrientes como fonte de energia para realizar suas funções biológicas (GADELHA; ARAÚJO, 2013).

2.3.1. Produção de Matrinxã no Brasil

O matrinxã é uma espécie nativa promissora para a piscicultura comercial. É um peixe de carne nobre que tem boa aceitação pelo consumidor (RIBEIRO; TOBINAGA, 2002; SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2016). Apresenta boa conversão alimentar nos diferentes sistemas de criação (ARBELÁEZ-ROJAS; FRACALOSSO; FIM, 2002; BRANDÃO et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; IZEL et al., 2004; MARQUES et al. 2004), adapta-se

facilmente à ração artificial, é de fácil propagação e tem crescimento rápido na fase larval e alevinagem, o que permite uma rápida comercialização (GADELHA; ARAÚJO, 2013). Além disso, o matrinxã pode ser comercializado vivo para pesque-pagues devido as suas características agressivas que são atrativas para a pesca esportiva (IZEL; MELO, 2004).

A espécie pode ser produzida em sistemas semi-intensivo ou intensivo (ARBELÁEZ-ROJAS; FRACALOSSO; FIM, 2002), em tanques-rede ou tanques escavados, apresentando bons resultados (BRANDÃO et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; SILVA et al., 2015). Por ser um animal ectotérmico consegue adaptar-se bem a temperatura corporal em função da temperatura da água (GOMES; URBINATI, 2005). Guimarães e Storti-Filho (2003) reportaram que o matrinxã consegue suportar temperaturas entre 18 e 36°C, indicando que esta espécie pode ser cultivada numa extensa área geográfica.

O matrinxã apresenta elevado potencial zootécnico e, devido a isso, sua produção vem aumentando no decorrer dos anos. Em 2016, teve uma produção de 8,8 mil toneladas (IBGE, 2017). Segundo o IBGE, em 2015 e 2016 a região Norte foi a maior produtora de matrinxã, representando 94,5% e 96,6% da produção total dessa espécie, sendo que o estado do Amazonas se destaca como o maior produtor do país. A Tabela 1 mostra os 10 principais estados produtores nos anos 2015 e 2016.

Tabela 1– Principais estados produtores de matrinxã nos anos 2015 e 2016.

Unidades de Federação	Produção de matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>) em toneladas	
	2015	2016
Brasil	9.366,2	8.767,0
Acre	185,1	205,4
Amazonas	7.943,3	7.439,3
Goiás	64,7	66,0
Mato Grosso	328,5	108,3
Minas Gerais	36,8	43,3
Pará	104,8	87,3
Roraima	110,0	149,5
São Paulo	39,1	55,7
Sergipe	12,0	15,8
Tocantins	556,8	584,7

Fonte: IBGE – ESTATÍSTICAS (2015; 2016).

2.4. MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma grande variedade de fungos filamentosos, especialmente por espécies dos gêneros, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Claviceps* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (ERKMEN; BOZOGLU, 2016).

Estes metabólitos, em sua maioria, são compostos policetônicos, que não são essenciais para o crescimento vegetativo dos fungos toxigênicos. As micotoxinas são formadas no final da fase exponencial ou no início da fase estacionária do crescimento fúngico e apresentam diferentes propriedades químicas, biológicas e toxicológicas (SORIANO DEL CASTILLO, 2007).

Atualmente, existem mais de 200 micotoxinas identificadas, dentre as mais importantes se encontram as aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), fumonisinas (FMs), tricotecenos (desoxinivalenol, DON, nivalenol, 3-acetil-DON, 15-acetil-DON, toxina T-2, toxina HT-2, entre outros), citrinina, patulina, ácido penicílico, esterigmatocistina, toxinas da alternaria, entre outras (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016; GIMENO; MARTINS, 2011).

As micotoxinas apresentam, em maior ou menor grau, uma série de efeitos tóxicos em humanos e animais. Assim, o consumo de alimentos contaminados com estas toxinas vem sendo motivo de preocupação no campo dos alimentos e das rações.

2.4.1. Histórico das Micotoxinas

Os efeitos adversos das micotoxinas ou consumo de alimentos contaminados por fungos toxigênicos têm sido reportados desde os tempos antes de Cristo.

Segundo Schoental (1984), o consumo de grãos contaminados por fungos toxigênicos pode ter sido a causa da última das Dez Pragas do Egito. O declínio da civilização Etrusca pode também ser associado às micotoxinas T-2 e ZEA (SCHOENTAL, 1991 apud BHAT; RAI; KARIM, 2010¹). Por sua vez, a misteriosa morte de vários arqueólogos, pode ser atribuída à ocratoxina A presente em alguns túmulos egípcios (PITTET 1998 apud BHAT; RAI; KARIM, 2010²).

¹SCHOENTAL R. Mycotoxins, porphyrias and the decline of the Etruscans. **Journal of Applied Toxicology**, Oxford, v. 11, p. 453–4, 1991.

²PITTET A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an update review. **Veterinary Medical Review**, Columbia, v. 149, p. 479–92, 1998.

O ergotismo é a mais antiga micotoxicose identificada em humanos, causada por alcaloides ergóticos de *Claviceps purpurea*, os quais crescem nas espigas de gramíneas como trigo e centeio (MURPHY et al., 2006; PERAICA et al., 1999). Apresenta-se de duas formas, a gangrenosa, que começa pela inflamação das extremidades seguida pelo escurecimento, dessecação e queda dos membros; e a convulsiva, a qual exhibe delírios, perturbações sensoriais e agitação mental, entre outros, que, antigamente, manifestações eram relacionadas com bruxaria e possessão (SORIANO DEL CASTILLO, 2007).

Os alcaloides do gênero *Claviceps* são responsáveis pela doença da Idade Média conhecida como “Fogo de Santo Antônio”, que recebe esse nome pela intensa sensação de queimação causada nos membros das vítimas. Várias dessas epidemias ocorreram durante alguns séculos devastando a Europa Ocidental (BHAT; RAI; KARIM, 2010; MURPHY, 2006; SORIANO DEL CASTILLO, 2007). Outro caso associado ao ergotismo foi em 1692 em Salem-Massachusetts, onde os efeitos gangrenosos e convulsivos desta doença levaram ao julgamento de várias pessoas suspeitas de feitiçaria (RICHARD, 2007). Em tempos mais atuais, foi um grande número de pessoas vítimas de ergotismo: na Rússia em 1926, 11.000 pessoas foram afetadas (BARGER, 1931 apud KING, 1979³), na França em 1951 e na Índia em 1975 também ocorreram surtos desta doença (KRISHNAMACHARI; BHAT, 1976 apud KING, 1979⁴), e na Etiópia, entre 1977 e 1978, 140 indivíduos foram contaminados, muitos deles morreram por causa dos sintomas (KING, 1979).

As aflatoxicoses são micotoxicoses produzidas pelo consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas. O surto de aflatoxicose mais conhecido e que ajudou ao avanço nas pesquisas sobre estas toxinas ocorreu em 1960 na Inglaterra, onde morreram mais de 100.000 perus. A causa das mortes foi o consumo de ração produzida com torta de amendoim contaminada proveniente do Brasil. Os animais apresentavam sintomas como perda de apetite, diminuição na mobilidade, fraqueza nas asas e pernas e lesões necróticas no fígado. Naquele tempo não foi possível identificar o agente infeccioso, motivo que levou veterinários e pesquisadores a denominá-la como doença *Turkey X* (STEVENS et al., 1960 apud FONSECA, 1975⁵).

³BARGER, G. Ergot and Ergotism. **London**, 1931.

⁴KRISHNAMACHARI, K. A. V. R., BHAT, R. V. **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 64, p. 1624, 1976.

⁵STEVENS, A. J.; SAUNDERS, C. N.; SPENCE, J. B.; NEWHAM, A. G. Investigations into "diseases" of turkey poult. **Veterinary Record**, Barcelona, v. 72, n. 31, p. 627, 1960.

2.4.2. Micotoxinas em Alimentos para Consumo Humano e Animal

As micotoxinas são contaminantes potenciais de alimentos, rações e ingredientes. A contaminação por fungos toxigênicos e micotoxinas pode ocorrer antes da colheita, durante a colheita ou durante o armazenamento. Os fungos do gênero *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. são considerados os mais importantes no cultivo, enquanto *A. flavus*, *A. parasiticus* e *Penicillium* sp. são os fungos toxigênicos mais importantes no armazenamento (ERKMEN; BOZOGLU, 2016).

Diversos alimentos destinados ao consumo humano e animal são suscetíveis à contaminação por micotoxinas, entre eles se encontram cereais como milho, trigo, cevada, centeio e arroz; sementes oleaginosas como amendoim, soja, algodão e girassol; frutas secas; temperos; oleaginosas como nozes, pistaches, amêndoas, castanhas e avelãs; entre outros (ERKMEN; BOZOGLU, 2016).

A presença de micotoxinas nos alimentos depende de fatores biológicos, ambientais, de colheita e de armazenamento. Dentro destes fatores se consideram a suscetibilidade do cultivo; os fungos toxigênicos predominantes no cultivo; a presença de danos mecânicos e danos por insetos; o estado de maturidade do cultivo; a umidade; a umidade relativa; a atividade de água e a temperatura (ERKMEN; BOZOGLU, 2016; GIMENO; MARTINS, 2011).

O crescimento e proliferação de fungos toxigênicos e não toxigênicos é altamente dependente das condições climáticas do local de cultivo (umidade e temperatura). O Brasil, por ser um país tropical, apresenta condições climáticas propícias para o crescimento de diversos tipos de fungos produtores de micotoxinas, tornando-o um país suscetível a ocorrências de contaminação de alimentos por micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010). A Tabela 2 mostra alguns casos de alimentos contaminados por micotoxinas no Brasil.

Tabela 2 – Ocorrência de alimentos contaminados por micotoxinas no Brasil.

Alimento	Micotoxina	Referência
Amendoim, castanhas, milho e farinhas	AF até 1706 ppb OTA <25 ppb	Caldas; Silva e Oliveira (2002)
Amendoim	AFB ₁ 3,79 – 125,07 ppb AFB ₂ 0,07 – 2,3 ppb	González et al. (2008)
Doces de amendoim	AF (B ₁ +G ₁) 25,95 – 350,02 ppm AF (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂) >20 ppm	Eizendeher; Freitas e Cançado (2005)
Frutas secas	AF <2 ppb	Iamanaka et al. (2007)
Milho, arroz, trigo, cevada, aveia e farelo de soja	FB ₁ 2,43 – 24,35 ppm	Mallmann et al (2001b)
Arroz integral, polido e parbolizado	OTA 102 – 128 ppb ZEA 550 – 1955 ppb DON 300 ppb	Nunes et al (2003)
Trigo	DON 90 – 1250 ppb	Calori-Domingues et al. (2007)
Trigo	DON 82 - 1500 ppb	Lamardo; Navas e Sabino (2006)
Milho tipo pipoca	DON 30 – 40 ppb	Oliveira; Soares e Sawazaki (2001)
Alimentos à base de milho	AFB ₁ 8 – 59 ppb AFB ₂ 2,4 ppb OTA 64 ppb ZEA 448 ppb	Sekiyama et al. (2005)
Cultivares de milho	FB ₁ 1,63 – 25,69 ppm FB ₂ 0,38 – 8,60 ppm	Camargos et al. (2000)
Milho recém colhido	AFB ₁ 6 – 1600 ppb OTA 128 e 206 ppb ZEA 4640 ppb	Machinski et al. (2001)
Leite de cabra pasteurizado, UHT e em pó	AFM ₁ 0,011 – 0,161 ppb	Oliveira; Ferraz (2007)
Leite	AFM ₁ >0,5 ppb	González et al. (2005)
Queijo Minas frescal, canastra e padrão	AFM ₁ 0,02 – 6,92 ppb	Prado et al. (2000a)
Café solúvel e café torrado e moído	OTA 0,31 – 1,78 ppb OTA 0,99 – 5,87 ppb	Prado et al. (2000b)

AF: Aflatoxinas. AFB₁: Aflatoxina B₁. AFB₂: Aflatoxina B₂. AFG₁: Aflatoxina G₁. AFG₂: Aflatoxina G₂. DON: Desoxinivalenol. FB₁: Fumonisina B₁. FB₂: Fumonisina B₂. OTA: Ocratoxina A. ZEA: Zearalenona

Fonte: Própria autoria

A contaminação mundial de alimentos e rações por micotoxinas é um problema que atinge tanto países desenvolvidos como países em desenvolvimento, gerando enormes perdas econômicas ao redor do mundo. Segundo Fink-Gremmels (1999), uma grande porcentagem das plantações no mundo está contaminada com micotoxinas.

Existem vários critérios para avaliar o impacto econômico causado pelas micotoxinas em humanos e animais, entre eles podem-se encontrar mortalidade humana e animal, perda de alimentos, rações e forragens, aumento nos custos de saúde e custos veterinários etc. (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Pesquisadores da FAO tentaram simular as perdas econômicas causadas pelas micotoxinas, tendo-se em conta que as simulações realizadas não podem determinar a situação real, e encontraram que os custos de cultivo, de mitigação e pecuários somaram em média 1.404 milhões de dólares (CAST, 2003). Shane (1994 apud HUSSEIN; BRASEL, 2001⁶), estimou que as perdas no ano de 1980 em oito estados nos Estados Unidos chegaram aos 97 milhões de dólares por causa de aflatoxinas em milho. Também encontrou que fazendas de suínos se viram afetadas por milho contaminado, tendo perdas por 100 milhões de dólares. Por sua vez, na Índia, Vasanthi; Bhat (1998 apud HUSSEIN; BRASEL, 2001⁷) determinaram que por causa de amendoim com micotoxinas se perderam 10 milhões de dólares em exportações durante uma década.

Devido à dificuldade de calcular estes critérios, o impacto econômico se baseia no aspecto de exposição ou contaminação por micotoxinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

2.4.3. Efeitos Tóxicos das Micotoxinas em Humanos e Animais

A presença de micotoxinas na dieta pode causar efeitos adversos sobre a saúde de humanos e animais. Os efeitos tóxicos dependem de fatores como a idade, sexo, estado nutricional do indivíduo, grau de toxicidade da micotoxina, dose e tempo de exposição. A toxicidade crônica é a forma mais comum de micotoxicose, sendo causada pelo consumo de baixas concentrações destes compostos durante um período prolongado (MARIN et al., 2013; PERAICA et al., 1999).

⁶SHANE, S.H. Economic issues associated with aflatoxins. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (Eds.), **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance**. Academic Press, San Diego, p. 513 – 527, 1994.

⁷VASANTHI, S., BHAT, R.V. Mycotoxins in foods-occurrence, health & economic significance & food control measures. **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 108, p. 212 – 224, 1998.

Geralmente, os efeitos das micotoxinas em humanos são limitados a estudos de caso. Exposições agudas têm sido associadas com epidemias de hepatite tóxica (BHAT; KRISHNAMACHARI, 1977 apud HUSSEIN; BRASEL, 2001⁸), já outros estudos sugerem que doses subagudas por tempo prologado induzem efeitos tóxicos agudos letais (WILLIS et al., 1980 apud HUSSEIN; BRASEL, 2001⁹). Por sua vez, a exposição crônica às aflatoxinas tem sido associada com carcinoma hepatocelular (CHC) em humanos (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

O CHC é um dos tipos de câncer mais comum no mundo. Mais do 80% dos casos corresponde às populações asiáticas e africanas, tendo maior incidência em homens que em mulheres. Dentre os fatores identificados de risco para CHC, destacam-se a exposição às aflatoxinas e ao vírus da hepatite B (HBV) (BOTERO-TORO; LONDOÑO-SANIN; NAVAS, 2007; OLIVEIRA; GERMANO, 1997). De modo geral, estudos epidemiológicos realizados por diversos pesquisadores mostram um risco particularmente elevado de CHC em indivíduos com HBV crônico e expostos às aflatoxinas; no entanto, também há evidência do aumento do risco de CHC em indivíduos expostos às aflatoxinas sem infecção crônica de HBV (IARC, 2012). Portanto, é importante considerar a etiologia do câncer hepático como multifatorial, com uma provável interação sinérgica entre as aflatoxinas e o HBV (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). O efeito das micotoxinas sobre desempenho animal é considerado um grande problema para os pecuaristas independentemente da escala de produção. A redução do crescimento, diminuição da produção de ovos e leite, diminuição na eficiência reprodutiva e incremento à suscetibilidade ao estresse são alguns dos efeitos causados pelas micotoxinas em animais (IARC, 2012). A suscetibilidade às micotoxinas pode variar com a raça, espécie, idade, dose, duração da exposição e estado nutricional (RICHARD, 2007).

Levando em conta os diferentes efeitos adversos causados pelas micotoxinas, a Tabela 3 mostra os impactos causados pelas principais micotoxinas na saúde de humanos e animais.

⁸BHAT, R. V.; KRISHNAMACHARI, K. A. V. R. Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of Western India. **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 66, p. 55 – 58, 1977.

⁹WILLIS, R. M., MULVIHILL, J. J., HOOFNAGLE, J. H. Attempted suicide with purified aflatoxin. **Lancet**, Londres, v. 1, p. 1198 – 1199, 1980.

Tabela 3 – Efeitos adversos causados pelas principais micotoxinas.

Micotoxina	Efeitos adversos	
	Humanos	Animais
AFs	Aumentam o risco de câncer de fígado em pessoas com Hepatite B. Promovem o desenvolvimento de câncer hepatocelular. Podem afetar rins, baço e pâncreas. Associados à síndrome de Reye. Possível relação com a doença Kwashiorkor em crianças	Hepatotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos, podem causar morte. Afetam a síntese proteica. Contribuem na ocorrência de aplasia tímica.
Citrinina		Responsável por nefropatias em suínos e outros animais Leucoencefalomalácia em cavalos e coelhos. Edema pulmonar e hidrotórax em suínos.
FMs	Associados com casos de câncer esofágico.	Hepatotóxicos, carcinogênicos e apoptose em fígado de ratos. Inibe a biossíntese dos esfingolipídios.
OTA	Associado com nefropatia endêmica. Se acumula em tecidos e fluidos. Por se eliminar lentamente do corpo se considera hepatotóxica, imunossupressor, teratogênico e cancerígeno.	Nefrotóxico em suínos e aves. Carcinogênico em ratos. Se acumula em tecidos e fluidos, nefrotóxica e hepatotóxica.
Tricotecenos	DON pode causar síndrome de vômito similar como em animais, náuseas, diarreia, dor abdominal e de cabeça, tonturas e febre. T-2 e DAS, associados com inflamações da pele, vômito e dano no tecido hepático. Toxinas de <i>Stachybotrys</i> causa hemorragias nasais e traqueais, cefaleias, irritação de olhos e garganta e tonturas.	DON em altas concentrações causa náuseas, vômito e diarreias. Em baixas concentrações causa perda de peso e recusa a comer. Toxicidade aguda em pets. Imunossupressor e nefrotóxico. T-2 inibição da síntese de proteínas. Causa perda de peso, diarreias com sangue e diminuição da produção de ovos e leite. Placas caseosas no bico, mucosa no palato duro e desvio de bico e língua em frangos.
ZEA	Puberdade precoce, fibrose de útero, cancro da mama, carcinoma do endométrio, hiperplasia do útero, diminuição da fertilidade. Em homens pode ocorrer inflamação da glândula prostática, atrofia testicular e quistos nas glândulas mamárias.	Hiperestrogenismo, distúrbios de concepção e abortos em leitoas, aumento do prepúcio em machos. Problemas reprodutivos em vacas e ovelhas.

AFs: Aflatoxinas. FMs: Fumonisinias. OTA: Ocratoxina A. ZEA: Zearalenona

Fonte: PERAICA et al. (1999); RICHARD (2007); ROCHA et al. (2014).

Devido aos riscos à saúde humana e animal por parte das micotoxinas, em 1993 a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) avaliou o potencial carcinogênico das aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas (IARC, 2012a). Classificaram as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁) como agentes carcinogênicos para humanos pertencendo ao Grupo 1; enquanto as fumonisinas (B₁ e B₂) e ocratoxina A foram classificadas como possivelmente carcinogênicas (Grupo 2B), os tricotecenos, zearalenona, citrina e patulina pertencem ao Grupo 3 por não serem classificados como carcinogênicos em humanos (IARC, 2012b).

2.4.4. Legislação

Os limites regulatórios para as micotoxinas são muito variados, dependendo de fatores como a toxicidade da micotoxina e suas possíveis combinações; das legislações de cada país; do tipo de alimentos ou ração; da distribuição geográfica e ecológica das micotoxinas produzidas (ZAIN, 2011).

Muitos países têm adotado regulamentos para proteger os consumidores dos efeitos prejudiciais das micotoxinas, assim como os interesses econômicos dos produtores, visando garantir uma equidade no comércio dos alimentos (FAO, 2004).

Em 2003, pelo menos 99 países no mundo tinham regulamentos para micotoxinas. Nesses países existiam, no mínimo, limites para AFB₁ ou para o total de AFs em alimentos e rações (FAO, 2004).

A Europa tem os regulamentos mais extensos e detalhados, onde 39 países apresentam regulamentos para micotoxinas. Na União Europeia (EU) existem limites para AFM₁, OTA e patulina em alimentos e AFB₁ em rações. Nos Estados Unidos, implementam-se técnicas avançadas de amostragem e análise de micotoxinas, sendo que os limites para aflatoxinas são fixos para a soma de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, além de apresentar limites para a soma de FB₁, FB₂ e FB₃. Na América Latina, 19 países (que representa 91% da população) contam com regulamentos específicos para micotoxinas. No acordo MERCOSUL, composto pela Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, os limites para aflatoxinas são fixos para AF totais (FAO, 2004).

Na União Europeia, a Diretiva 100/2003/EC estabelece limites de 10 µg/kg para aflatoxina B₁ em rações completas (EC, 2003), enquanto que a Diretiva 1881/2006/EC, estabelece limites máximos de AFB₁, AF totais, AFM₁, OTA, patulina, DON, ZEA, FB₁+FB₂, T-2, HT-2 e citrinina em diversos alimentos de consumo humano (EC, 2006).

O FDA (*Food and Drug Administration*), nos Estados Unidos, estabelece limites máximos de 20 µg/kg de aflatoxinas em ingredientes para ração animal (FDA, 2015).

Por sua vez, no Brasil a legislação vigente apresenta limites de micotoxinas em alimentos e rações. A Portaria MA/SNAD/SFA 07/1988 estabelece limites máximos de 50 µg/kg de aflatoxinas em ingredientes e rações de consumo animal (BRASIL, 1988). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou pela Resolução de Diretoria Colegiada RDC 07/2011 e pela RDC 138/2017, os limites máximos de AFM₁, AF (B₁, B₂, G₁ e G₂), OTA, DON, Fumonisin (B₁ e B₂), ZEA e patulina em diversos alimentos de consumo humano (ANVISA, 2011).

Os limites para alimentação animal estabelecidos pelos órgãos fiscalizadores brasileiros não são eficientes, uma vez que são iguais para qualquer tipo de animal; no entanto, a absorção e metabolização das micotoxinas são diferentes entre as diversas espécies animais.

Em peixes, este fato se agrava, pois existem mais de 35 mil espécies, de diferentes hábitos alimentares, morfologias e metabolismos, podendo apresentar inúmeros efeitos adversos frente as micotoxinas.

Como citado anteriormente, o Brasil apresenta grande potencial para a aquicultura, com um dos maiores volumes de grãos para a produção de alimentos destinados à nutrição animal. Portanto, o presente trabalho auxilia no estabelecimento de níveis adequados na legislação brasileira e mundial.

2.5. AFLATOXINAS

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, mas também podem ser produzidas por outras espécies como *A. nomius*, *A. tamaritii* e *A. pseudotamaritii* (ALBERTS et al., 2006).

A formação de toxinas ocorre em condições de umidade e temperatura adequadas. O *Aspergillus* pode crescer e produzir toxinas de forma ótima a 25°C e A_w de 0,95. Com relação ao substrato, cepas de *A. parasiticus* têm maior rendimento de produção de aflatoxinas em amendoim, arroz, sorgo, trigo e milho que o *A. flavus* (HESSELTINE, 1976).

Existem em torno de 20 tipos diferentes de aflatoxinas, sendo as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) e o aflatoxicol (AFL), as principais por seu alto potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico. AFB₁ e AFM₁ são as aflatoxinas que apresentam maior toxicidade, seguidas

pelas AFG₁, AFM₂, AFB₂ e AFG₂ (Figura 6) (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; SORIANO DEL CASTILLO, 2007).

Figura 6 – Estrutura química das Aflatoxinas.

Aflatoxina B₁

Aflatoxina B₂

Aflatoxina G₁

Aflatoxina G₂

Aflatoxina M₁

Aflatoxina M₂

Fonte: HUSSEIN; BRASEL (2001); RAWAL; KIM; COULOMBE (2010).

As aflatoxinas são cristais sólidos de cor entre branco e amarelo, sem odor e sem sabor, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como metanol, clorofórmio, acetona, acetonitrila e dimetilsulfóxido. Quando as aflatoxinas se encontram em clorofórmio ou benzeno são muito estáveis sob refrigeração e escassez de luz; em solução aquosa são sensíveis à luz, se decompõem com o ar, oxigênio, soluções alcalinas ou ácidos suaves (OPS-OMS, 1983).

As denominações das aflatoxinas B e G se devem às fluorescências emitidas *blue* e *green* quando expostas à luz UV; assim, fluorescência na cor azul para AFB₁ e AFB₂, verde para AFG₁ e verde azulada para AFG₂ (GOMPERTZ et al., 2008). Os subscritos 1 ou 2 indicam a mobilidade que as aflatoxinas têm na cromatografia de camada delgada segundo o seu peso molecular (OPS-OMS, 1983). No caso das aflatoxinas M, sua denominação se deve à biotransformação hepática de aflatoxinas tipo B em M e sua posterior secreção no leite, tecidos e outros fluidos biológicos dos animais que consumiram o alimento contaminado (MURPHY et al., 2006).

As aflatoxinas são resistentes a altas temperaturas, de 237 – 320°C, se decompondo de acordo com o tempo de aquecimento, umidade e pH do alimento. Assim, as aflatoxinas não são destruídas por processos de ultrapasteurização (UHT), cocção, fritura ou fervura, fermentação, nixtamalização, mas podem ser destruídas em autoclave com soluções básicas como amônia ou hipoclorito de sódio (OPS-OMS, 1983).

2.5.1. Aflatoxina B₁: Mecanismos de Toxicidade

A aflatoxina B₁ é o mais potente cancerígeno biológico para homens e animais. A presença desta aflatoxina nos alimentos prejudica não somente os animais que ingerem rações contaminadas, mas também o homem, por meio da ingestão de produtos de origem animal, processados ou *in natura* (CARDOSO-FILHO, 2011).

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primeiramente no fígado (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A biotransformação das aflatoxinas ocorre principalmente em duas fases. A primeira fase ou fase de ativação (Figura 7) envolve reações de epoxidação, redução, hidroxilação, desmetilação e hidratação que resultam na formação dos diferentes metabólitos, AFB-epóxido (AFBO), AFL, AFM₁, AFQ₁, AFP₁ e AFB_{2a} (SANTACROCE, et al., 2008). A fase de desintoxicação (fase II), compreende a liberação dos metabólitos, os quais servem como biomarcadores para identificação da presença de agentes tóxicos no organismo (SANTACROCE, et al., 2008).

Figura 7 – Rota de biotransformação de AFB₁.

Fonte: Adaptado de CARVAJAL, 2013.

Na ativação da AFB₁ e posterior formação do AFBO participa o citocromo P-450, hemoproteína localizada dentro das membranas do retículo endoplasmático liso. Uma característica do AFBO é que se liga facilmente ao Ácido Desoxirribonucleico (DNA), Ácido Ribonucleico (ARN) ou proteínas celulares (CARVAJAL, 2013; SANTACROCE, et al., 2008). Primeiro, este metabólito se une ao N₇ da guanina do DNA, formando o aduto AFB₁-Gua, aproximadamente 70% deste aduto é eliminado na urina e leite, comportando-se como biomarcador de risco de câncer. A porcentagem restante pode se alojar em tecidos tumorais, indicando exposição recente e reparação do DNA (CARVAJAL, 2013).

O aduto AFB₁-Gua é muito instável e pode se desligar facilmente do DNA, permitindo a formação do aduto AFB₁-FAPY, o qual se acumula por anos e causa mutações no gene p53, associando-se frequentemente a neoplasias segundo os fatores hereditários do organismo (CARVAJAL, 2013).

Bioquimicamente, AFB₁ afeta proteínas, carboidratos e lipídeos, assim como os ácidos nucléicos e o metabolismo de proteínas. Biologicamente, esta aflatoxina pode ser um agente carcinogênico, mutagênico, teratogênico, imunossupressivo e hepatotóxico (BAPTISTA et al., 2004).

Em humanos, a aflatoxicose aguda resulta em icterícia progressiva, edema nos membros, dores, vômitos, necrose, cirrose, insuficiência hepática aguda e morte. A

aflatoxicose crônica resulta em câncer, supressão imunológica e outras patologias, sendo o fígado o principal órgão atingido (NIERMAN et al., 2008).

Em animais, a suscetibilidade à AFB₁ é dependente da espécie, por exemplo, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), gatos, coelhos e patos são espécies muito suscetíveis à presença desta aflatoxina (MURCIA-RODRÍGUEZ, 2010). A Tabela 4 apresenta alguns dos efeitos causados pelas aflatoxinas em várias espécies de animais de produção.

Tabela 4 – Efeitos das aflatoxinas sobre algumas espécies de animais de produção.

Animal	Concentração de micotoxina (ppb)	Efeito
Frangos	75 – 800 AFB ₁	Inibição no crescimento; Lesões hepáticas; Mortalidade
	500 AFB ₁	Fígado gorduroso; Aumento no tamanho do fígado
	308 e 610 AFB ₁	Aumento da mortalidade
	5000+aumento na concentração de proteína	Redução de peso
Poedeiras	100 AFB ₁	Problemas de nascimento dos pintinhos; Ovos com defeitos
	610 AFB ₁	Problemas no fígado; Diminuição na produção de ovos; Mortalidade
Peru	100 – 800 AFB ₁	Redução no ganho de peso; Lesões hepáticas
Suínos	230 AFB ₁	Problemas de fígado; Anemia; Problemas crescimento
	400 – 800 AFB ₁	Redução no crescimento; Hepatotoxicose; Suscetibilidade a salmonelose
	800 AFB ₁ +800 AFG ₁	AFB ₁ , AFM ₁ e AFG ₁ no leite
	400 AFB ₁ +400 AFG ₁	Leitões com problemas imunotoxigênicos
Vacas leiteiras	433 AFB ₁	Diminuição de produção de leite AFM ₁ no leite
	5500 AFB ₁	Distúrbios alimentícios; Perda de peso; Diminuição de produção de leite; Aumento na taxa bacteriana do leite; AFM ₁ no leite
Coelhos	100 – 150 AFB ₁	Diminuição no consumo; Atraso no crescimento; Problemas de absorção de nutrientes
	50 AFB ₁	Diarreia; Enterites
	33 – 10400 AFB ₁	Anorexia; Falta de coordenação; Perda de peso; Icterícia; Mortalidade

AFB₁: Aflatoxina B₁. AFG₁: Aflatoxina G₁.

Fonte: GIMENO E MARTINS (2011).

2.6. AFLATOXINAS EM PEIXES

2.6.1. Aflatoxinas em Rações para Peixes

O alimento é fundamental para todos os sistemas de produção animal, pois qualquer fator que afete a segurança desse alimento é uma restrição significativa à produção (BRYDEN, 2012).

A ração é uma porção de alimento que é fornecida aos animais, composta de diversos ingredientes e formulada de acordo com as exigências nutricionais de cada espécie. Este tipo de alimento representa um dos principais custos operacionais na produção animal (CARDOSO-FILHO et al., 2013); na aquicultura, representa aproximadamente 60% dos custos operacionais (FAO, 2014).

A qualidade dos ingredientes utilizados em rações para peixes tornou-se um aspecto limitante da piscicultura, pois esses alimentos são substratos ideais para o crescimento de fungos, que, sob condições adequadas, podem favorecer a produção de aflatoxinas (CAST, 2003).

Diversos estudos demonstram que a contaminação de rações ou de seus ingredientes é um problema frequente. Almeida et al. (2011) observaram a presença de fungos, a maioria da espécie *A. flavus*, em 35 amostras de ração para peixe em Portugal. Santos (2006) reportou a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Mucor* em 136 amostras de ração para camarão estocada e em uso. Gonçalves-Nunes et al. (2015) encontraram AFB₁ em farelo de soja, farelo de milho, outros cereais e rações para peixes nas concentrações de 5,8; 1,1; 7,4 e 3,8 µg/kg e uma frequência de 40; 33,3; 60 e 16,7%, respectivamente.

Abdelhamid; Khalil e Ragab (1998) detectaram altos níveis (> 1000 ppb) de aflatoxinas em ração comercial para peixes. Na Nigéria, Olorunfemi et al. (2013) avaliaram 94 amostras de ração para peixes e encontraram, além de fumonisinas e zearalenona, a presença de AFB₁ em concentrações médias de 103 µg/kg.

No Brasil, Hashimoto et al. (2003) relataram a presença de AFB₁ em níveis de 1.313 µg/g em 42 amostras de rações de peixes. Barbosa et al. (2013) analisaram 60 amostras de rações peletizadas para peixes e encontraram AFB₁ em 55% das amostras, sendo que 50% das amostras apresentaram ocorrência simultânea de AFB₁ e FB₁ e em 3,3% das amostras estavam presentes as micotoxinas FB₁, AFB₁ e OTA.

Estes resultados evidenciam que os ingredientes e as rações são excelentes substratos para proliferação de fungos e a subsequente produção de micotoxinas. A ocorrência simultânea de diferentes fungos toxigênicos e várias micotoxinas enfatiza a necessidade de ferramentas adequadas no controle em cada uma das etapas produtivas dos grãos (pré-colheita, pós-colheita e armazenamento), para determinar as implicações reais das micotoxinas na piscicultura.

2.6.2. Efeitos Tóxicos e Acúmulo em Tecidos

A aflatoxicose em peixes pode ser classificada em aguda, subaguda e crônica. O consumo de doses moderadas a altas de aflatoxinas pode causar nos peixes anemia; brânquias pálidas; valores reduzidos de hematócrito; edemas; hemorragias frequentes; alteração no metabolismo de nutrientes; danos no fígado; opacidade ocular, resultando em catarata e cegueira; lesões na superfície do corpo tais como podridão em nadadeiras e cauda; amarelamento da superfície do corpo; padrões anormais de natação e anorexia (CAGAUAN et al., 2004).

Entre os sintomas de aflatoxicose subaguda se encontram dano hepático moderado ou grave; olhos, pele e mucosas amarelados; problemas de coagulação sanguínea; piora na conversão alimentar; anemia, redução/alteração no desempenho; respostas imunológicas alteradas; danos renais e morte prematura (HAMILTON, 1990).

Peixes expostos às aflatoxinas por tempos prolongados podem apresentar função hepática prejudicada; redução da eficiência alimentar; perda de peso; aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas; necrose e desenvolvimento de tumores no fígado e outros órgãos e aumento da mortalidade (PIER; RICHARD; CYSEWSKI, 1980).

A resistência às aflatoxinas é dependente da espécie de peixe (SANTACROCE et al., 2008), assim, a variabilidade na sensibilidade à toxicidade pode ser determinada pelo valor de dose letal (LD50) (JANTRAROTAI; LOVELL, 1991). A Tabela 5 mostra alguns experimentos realizados com o objetivo de avaliar o efeito de várias concentrações de aflatoxinas em algumas espécies de peixes.

Tabela 5 – Efeitos de aflatoxinas em algumas espécies de peixes.

Espécie de peixe	Dose	Fornecimento	Efeitos	Referências
Tilápia do Nilo	5 – 39 ppb	Ração – 10 semanas	Mortalidade (67%). Superfície amarelada.	Caguan et al. (2004)
	200 ppb	Ração – 10 semanas	Diminuição de eritrócitos totais, leucócitos totais e hemoglobina. Baixo ganho de peso. Redução na taxa de sobrevivência	Selim; El-Hofy; Khalil (2014)
	10 e 100 ppm	Ração – 8 semanas	Redução de ganho de peso e hematócitos. Excesso de lipofuscina e núcleos hepatocelulares de tamanho irregular. Perda de peso e necrose hepática severa. Mortalidade (60%)	Tuan et al. (2002)
	245; 638; 793 e 1641 ppb 2,5 ppm	Ração – 5 a 20 semanas	Amarelamento da superfície do corpo. Escurecimento da superfície do corpo. Diminuição da taxa de eficiência alimentar. Baixo ganho de peso. Comportamento anormal	Deng et al. (2010)
Carpa (<i>Labeo rohita</i>)	1,25; 2,50 e 5 ppm	Intraperitoneal – 10 semanas	Redução da produção de radicais de oxigênio pelos neutrófilos. Redução dos níveis de proteína total e globulina	Sahoo; Mukherjee (2001)
	10, 20 e 40 ppm	Ração - 8 semanas	Redução de eritrócitos totais, leucócitos totais, hemoglobina e NBT.	Mohapatra et al. (2011)
Truta arco-íris	1190 ppb	Ração – 21 dias	Mortalidade	Nomura et al. (2011)
Robalo	0,18 ppm 0,018 ppm	Ração – 96 horas Ração – 6 semanas	Perda do equilíbrio, movimentos operculares rápidos, hemorragias da superfície dorsal da pele. Incremento de ALT, AST e ALP, proteína total, albumina e globulina	El-Sayed e Khalil (2009)
Jundiá	350; 757 e 1177 ppb 204 ppb	Ração – 35 dias Ração – 45 dias	Mortalidade. Diminuição no peso, comprimento e ganho de peso	Lopes et al. (2005)
	150; 250 e 350 ppb	Ração – 90 dias	Redução de hematócitos e hemoglobina	Lopes et al. (2010)
	41; 90 e 204 ppb	Ração – 45 dias	Redução de hematócitos, hemoglobina e glicose. Redução do teor de proteínas muscular e hepática.	Vieira et al. (2006)

Fonte: Própria autoria.

O potencial bioacumulador das aflatoxinas no organismo torna o peixe mais suscetível a estresses e patologias, assim como também exerce efeito sobre o sistema imunológico, contribuindo à ocorrência de infecções virais e bacterianas (LOPES, et al, 2005).

A deposição de aflatoxinas nos peixes é residual e cumulativa, concentrando-se os efeitos em fígado e músculo (PLAKAS et al., 1991). Diversos estudos avaliaram a deposição de aflatoxinas em peixes. Boonyaratpali et al. (2001) encontraram resíduos de aflatoxinas em músculo, cabeça e casca de camarão tigre (*Penaeus monodon Fabricius*) após quatro semanas de alimentação contaminada com 50 – 2000 ppb de AFB₁. Huang et al. (2014) detectaram deposição de aflatoxina B₁ no músculo e ovários de carpa (*Carassius auratus gibelio*), e concluíram que os índices dessa aflatoxina foram diretamente proporcionais à quantidade de aflatoxina adicionada na ração utilizada; em músculo os resíduos se mantiveram abaixo dos limites de segurança (5 µg/kg). El-Sayed e Khalil (2009) encontraram altos níveis de AFB₁ no músculo de robalos (*Dicentrarchus labrax* L.), e concluíram que a espécie avaliada é vulnerável às aflatoxinas e, por ser altamente consumido, pode se tornar um risco aos humanos. Nomura et al. (2011) encontraram resíduos de AFB₁, AFL e AFM₁ em músculo de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) após 24 horas de alimentação com níveis de 6.276 µg AFB₁/kg.

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*). Por sua vez, Michelin et al. (2017) encontraram deposição de AFB₁ em fígado e músculo de lambari (*Astyanax altiparanae*) após 90 dias de alimentação com ração contaminada com 10; 20 e 50 µg AFB₁/kg. Lambaris alimentados com 50 µg AFB₁/kg, apresentaram níveis similares à concentração fornecida no músculo após 120 dias de experimento.

Atualmente, no Brasil, há poucos estudos sobre a sensibilidade de espécies nativas às micotoxinas e sua possível influência na saúde do consumidor. Portanto, com este estudo se pretende encontrar respostas a esta situação, avaliando o efeito das aflatoxinas no matrinxã, espécie de alto interesse comercial no país.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a transferência de aflatoxinas na ração para tecidos de matrinxã (*Brycon cephalus*) e a influência sobre a fisiologia e o desempenho produtivo da espécie.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a transferência de aflatoxinas da ração para tecido muscular e fígado de matrinxã (*Brycon cephalus*).

Avaliar a influência das aflatoxinas sobre parâmetros biométricos de matrinxã (*Brycon cephalus*): peso, comprimento e consumo de ração.

Avaliar a influência das aflatoxinas sobre a fisiologia de matrinxã (*Brycon cephalus*): parâmetros bioquímicos no sangue e histopatológicos no fígado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), protocolo nº15.1.145.74.9.

4.2. PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS

A toxina foi produzida no Laboratório Multiusuário de Microbiologia, localizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Para produção de aflatoxinas, utilizou-se cepa padrão de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 cedida da coleção de cepas do ARS *culture collection* (United States Department of Agriculture – USDA), previamente repicada em ágar batata dextrose (Acumedia – Neogen, Brasil) e incubada em estufa BOD microprocessada (Marqlabor, Brasil) a 25°C por 15 dias.

A toxina foi produzida em material de cultura de acordo com Shotwell et al. (1966), obtendo uma concentração final de AFB₁ de 528 µg/g (MICHELIN et al., 2017).

4.3. DIETAS EXPERIMENTAIS

Para elaboração das dietas experimentais, foi utilizada ração comercial extrusada para peixes tropicais (Laguna Peixes Brasileiros – Ocialis, Invivo, Socil, Descalvado, Brasil), de 4 mm e 32% de proteína bruta. Na Tabela 6 estão as informações nutricionais e ingredientes da ração fornecida durante o período experimental.

Tabela 6 – Informações nutricionais e ingredientes da ração fornecida aos peixes.

Nutriente	Níveis de garantia por kg
Proteína bruta (min)	320 g
Extrato etéreo (min)	50 g
Fibra bruta (máx.)	50 g
Matéria mineral (máx.)	140 g
Cálcio (min)	15 g
Cálcio (máx.)	30 g
Fósforo (min)	6 g
Sódio (min)	3 g
Ferro (min)	30 mg
Cobre (min)	5 mg
Zinco (min)	60 mg
Manganês (min)	30 mg
Selênio (min)	0,3 mg
Cobalto (min)	0,1 mg
Iodo (min)	1 mg
Vitamina A (min)	12000 UI
Vitamina D3 (min)	2400 UI
Vitamina E (min)	50 UI
Vitamina K3 (min)	5 mg
Vitamina B1 (min)	10 mg
Vitamina B2 (min)	20 mg
Niacina (min)	100 mg
Ácido pantatênico (min)	50 mg
Vitamina B6 (min)	10 mg
Ácido fólico (min)	4 mg
Biotina (min)	0,1 mg
Vitamina B12 (min)	40 mg
Vitamina C (min)	270 mg
Umidade	120 g
Ingredientes: Farelo de Glúten de Milho, Milho Integral Moído, Farelo de Trigo, Farinho de Carne e Osso, Farinha de Penas Hidrolisadas, Calcário Calcitrício, Cloreto de Sódio, Caulim, Sulfato de Ferro, Sulfato de Cobre, Monóxido de Manganês, Óxido de Zinco, Sulfato de Cobalto, Iodato de Cálcio, Selenito de Sódio, Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina K3, Vitamina B1, Vitamina B2, Niacina, Ácido Pantatênico, Vitamina B6, Ácido Fólico, Biotina, Vitamina B12, Vitamina C, Etoxiquin, Hidróxido de Anizola Butilado (BHA), Ácido Propionico, Hidróxido de Amônia.	

Fonte: Informação do rótulo.

A ração foi previamente testada para presença de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As aflatoxinas foram incorporadas na ração pelo método de imersão em metanol descrito por Michelin et al. (2017), com modificações. Em solução de metanol-água (70:30), foram diluídas as doses de aflatoxinas correspondentes para cada tratamento a ser utilizado, sendo 4, 6 e 12,5 mL de AF para as concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$, respectivamente. A ração ficou submersa nessa solução; após 24 horas, foi disposta em bandejas para secagem em estufa (Cienlab, CE 220/81, Brasil) a 60°C, por 36 horas, para evaporação do metanol. Uma vez seca, analisou-se por CLAE para confirmação dos níveis esperados.

Como não há conhecimento da dose letal (DL50) para aflatoxinas em peixes da espécie matrinxã (*Brycon cephalus*), as concentrações de aflatoxinas na ração foram selecionadas pelos limites legais estabelecidos no Brasil (Portaria MA/SNAD/SFA 07/1988), nos Estados Unidos da América (FDA, 2015) e na União Europeia (EC 100/2003), sendo 50 $\mu\text{g/kg}$; 20 $\mu\text{g/kg}$ e 10 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. Deste modo, os níveis de aflatoxinas utilizados para compor os tratamentos foram:

- Tratamento A: Controle – ração sem toxina
- Tratamento B: Ração + 10 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$
- Tratamento C: Ração + 20 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$
- Tratamento D: Ração + 50 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$

4.4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E MANEJO

A criação dos peixes foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – ICMBio - CEPTA, Pirassununga, SP.

O experimento foi conduzido em sistema de criação fechado com recirculação de água. Foram utilizadas quatro caixas d'água de 1 m³ cada, além de três caixas de 500 litros cada, as quais tinham a função de filtro biológico.

Utilizou-se um aquecedor de resistência para garantir a temperatura adequada da água e bomba submersível (Rayma 950fire, Brasil) que distribuía a água por todo o sistema.

Juvenis de matrinxã, com peso médio de $44,8 \pm 3,45\text{g}$, foram alocados em cada caixa d'água com densidade inicial de 120 peixes por m³, totalizando 480 peixes, sendo que cada unidade experimental representou um tratamento (A; B; C; D).

O período total do experimental foi de 180 dias, e a cada 30 dias foram realizados levantamentos biométricos e coletas de fígado e músculo para análises de aflatoxinas.

Para cada tratamento foram realizadas três amostragens (repetições) mensais, sendo que cada amostra foi composta inicialmente por um *pool* de 10 peixes. Para cada uma das 12 amostras (3 amostragens em 4 tratamentos), foram coletados o fígado e o músculo, resultando em 24 amostras analíticas por mês, totalizando 144 amostras ao final do período experimental (Figura 8).

Figura 8 – Representação esquemática de amostragem mensal.

Fonte: Própria autoria.

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com 5% da biomassa, e o ajuste da quantidade de ração a ser oferecida foi realizado a cada mês. Diariamente, realizou-se a limpeza das caixas, liberando as sujidades concentradas no fundo,

assim como a limpeza do filtro, do aquecedor e da bomba, por meio de sifão para retirar os resíduos existentes. Uma vez por semana foi realizada troca de água e limpeza das paredes de todas as caixas.

Os parâmetros da qualidade da água (pH, amônia e oxigênio dissolvido) foram mensurados semanalmente e a temperatura da água foi monitorada diariamente.

Os parâmetros de qualidade da água, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia, foram monitorados com pH-metro microprocessado (Gehaka, PG 1800, Brasil), termômetro digital (Thermo couple Thermometer Comark KM28/P7, Reino Unido), oxímetro (YSI modelo 57, USA) e Test Amônia Tóxica Água Doce (Labcon, Alcon pet, Brasil), respectivamente.

Todos os peixes utilizados para as análises de aflatoxinas foram mantidos em jejum de 24 horas antes da eutanásia. O procedimento de eutanásia foi efetuado por imersão dos animais em água com cloridrato de benzocaína com 250 mg/L.

Os animais que não foram utilizados nas análises ao final do experimento foram eutanasiados e incinerados, bem como os que sofreram morte natural no decorrer do experimento e as sobras de amostras das análises de aflatoxinas.

4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Para os parâmetros biométricos, utilizou-se balança digital (Filizola, BP15, Brasil) para pesar os peixes e ictiômetro (Wildco, USA) para medir o comprimento total dos peixes.

Os parâmetros biométricos foram mensurados a cada 30 dias. Foram determinados o peso e o comprimento dos peixes coletados de cada tratamento, assim como o consumo médio de ração e a taxa de sobrevivência.

O consumo médio de ração foi calculado pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e a quantidade de ração não consumida (após secagem). A ração não consumida foi retirada das caixas após 30 minutos, identificada, seca a 60°C por 24 horas e pesada.

A taxa de sobrevivência foi determinada pela diferença entre a quantidade de indivíduos no início do experimento e a quantidade de indivíduos no final do experimento.

4.6. DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM RAÇÃO, FÍGADO E MÚSCULO DE PEIXE

A determinação de aflatoxinas (AFB₁; AFB₂; AFG₁; AFG₂) na ração e AFB₁; AFB₂; AFG₁; AFG₂; AFM₁ em tecidos de peixe, assim como as curvas de calibração e validação do método analítico, foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Michelin et al. (2017).

Para a validação do método analítico e para as curvas de calibração foram utilizados padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ (Mix de aflatoxina Oekanal[®] 20µg/mL B₁, G₁, B₂, G₂ em acetonitrila) e AFM₁ (Aflatoxina M₁ em acetonitrila), ambas da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Tanto na validação do método analítico quanto na determinação de aflatoxinas na ração, fígado e músculo foram utilizadas colunas de imunoafinidade Aflatest WB[®] (Vicam, Watertown, EUA) como método de purificação das toxinas para posterior detecção e quantificação.

A detecção e a quantificação das aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) foram conduzidas em um sistema CLAE Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão), equipado com detector de fluorescência Shimadzu SPD-20A (excitação: 350 nm e emissão: 450 nm) e coluna HyperClone[™] BDS C18 (3 µm) 4,6 x 100 mm (Phenomenex, Torrance, EUA), precedida de pré-coluna SecurityGuard[™] (5 µm) 4 x 10 mm (Phenomenex, Torrance, EUA). Utilizou-se como fase móvel uma solução água-metanol-acetonitrila nas proporções 540:100:100 respectivamente, com fluxo constante de 1 mL/min.

4.6.1. Curvas de calibração

Para as curvas de calibração, foram utilizadas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL de cada padrão de AF (AFB₁; AFB₂; AFG₁; AFG₂; AFM₁). As quantidades correspondentes a cada concentração foram colocadas em vial (Allcrom, LBSV012C, Brasil) e foram evaporadas em concentrador de ar comprimido a 40°C (Tecnal, TE-019, Brasil). Os padrões foram derivatizados com 25 µL de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich, Brasil) e ressuspendidas com 975 µL de acetonitrila (20%) (Panreac – AppliChem, Espanha), totalizando um volume final de 1 mL. A solução foi agitada em vortex (Biomixer, QL-901, Brasil) por 1 minuto e 50 µL de cada solução padrão foram injetados no sistema CLAE.

4.6.2. Validação do método analítico

Para os ensaios de recuperação, amostras de fígado e músculo foram contaminadas artificialmente com padrões de aflatoxinas (B_1 ; B_2 ; G_1 ; G_2 ; M_1), nas concentrações 5 e 20 μg AF/kg. Foram utilizadas colunas de imunoafinidade Aflatest WB[®] (Vicom, Watertown, EUA), como método de purificação. As amostras foram analisadas em triplicata em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e posteriormente foram realizados os cálculos dos percentuais de recuperação.

Foi utilizado o método da relação sinal-ruído para determinar os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Estabeleceu-se uma relação sinal-ruído de 3:1 para obtenção das concentrações mínimas a serem detectadas (CASSIANO et al., 2009; PASCHOAL et al., 2008; RIBANI et al., 2004).

4.6.3. Determinação de aflatoxinas em amostras de ração

No pré-tratamento da amostra, pesaram-se 12,5 g de ração para peixe, previamente moída, em seguida foram adicionados 2,5g de cloreto de sódio (NaCl) (Synth, Brasil) e 50 mL de metanol (80%) (Panreac – AppliChem, Espanha). Esta mistura foi homogeneizada em mesa de agitação (Lucadema, Brasil) por 30 minutos a 250 rpm para extrair as toxinas presentes na ração. Depois, o extrato foi filtrado em papel filtro. Uma alíquota de 0,5 mL do filtrado foi diluída em 10 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) 0,01 M (Sigma-Aldrich, USA) e agitada em vortex (Biomixer, QL-901, Brasil).

Como método de purificação, utilizou-se coluna de imunoafinidade Aflatest WB[®] (VICAM) com fluxo de 2 gotas/segundo. A eluição das micotoxinas foi realizada pela passagem de 1,5 mL de metanol grau HPLC (Panreac – AppliChem, Espanha) pela coluna de imunoafinidade. O eluato foi recolhido em vial de 2 mL (Allcrom, LBSV012C, Brasil) e evaporado em concentrador de ar comprimido (Tecnal, TE-019, Brasil). A amostra foi derivatizada com 25 μL de TFA (Sigma-Aldrich, Brasil) e ressuspensa com 975 μL de acetonitrila 20% (Panreac – AppliChem, Espanha). Após a ressuspensão, 50 μL da amostra foram injetados no sistema CLAE.

Os parâmetros de detecção e quantificação de aflatoxinas na ração estão descritos no item 5.6.

4.6.4. Determinação de aflatoxinas em amostras de fígado

Uma amostra de fígado previamente triturada e homogeneizada (1 g) foi colocada em um frasco, juntamente com 10 mL de metanol-água (80% v/v) e homogeneizada com o auxílio de um mixer durante três minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (Hermle, Z326K, Alemanha) a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro PTFE 0,45 µm (Allcrom, Brasil). Uma alíquota do filtrado (1 mL) foi diluída com 25 mL de PBS 0,01M (Sigma-Aldrich, USA) e homogeneizada em vortex (Biomixer, QL-901, Brasil).

Para purificação, utilizou-se coluna de imunoafinidade Aflatest WB[®] (VICAM) com fluxo de 2 gotas/segundo. A eluição das micotoxinas foi feita pela passagem de 1,5 mL de solução acetonitrila:metanol (3:2 v/v) pela coluna de imunoafinidade. Recolheu-se o eluato em um vial de 2 mL (Allcrom, LBSV012C, Brasil) e foi evaporado em concentrador de ar comprimido (Tecnal, TE-019, Brasil). A amostra foi derivatizada com 30 µL de TFA (Sigma-Aldrich, Brasil) e ressuspensa com 970 µL de acetonitrila 20% (Panreac – AppliChem, Espanha), após a ressuspensão 50 µL da amostra foram injetados no sistema CLAE.

Os parâmetros de detecção e quantificação de aflatoxinas no fígado estão descritos no item 5.6.

4.6.5. Determinação de aflatoxinas em amostras de músculo

Para o preparo da amostra analítica, foram coletados 5 g de músculo de peixe, previamente homogeneizado. O músculo foi misturado com 20 mL de metanol (80%) (Panreac – AppliChem, Espanha) durante cinco minutos e homogeneizado novamente com ajuda de um mixer por três minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (Hermle, Z326K, Alemanha) a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro PTFE 0,45 µm (Allcrom, Brasil). Uma alíquota do filtrado (4 mL) foi diluída em 25 mL de PBS 0,01M (Sigma-Aldrich, USA) e homogeneizada em vortex (Biomixer, QL-901, Brasil).

A purificação, eluição, derivatização e ressuspensão se realizaram de acordo com o descrito no item 5.6.4.

A detecção e quantificação de aflatoxinas no músculo, realizou-se como descrito no item 5.6.

4.7. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA NO FÍGADO DE MATRINXÃ

A cada 30 dias, foram coletados cinco exemplares de matrinxã por tratamento, para coleta de sangue e tecido hepático, totalizando 40 amostras por mês. Ao final do experimento, obtiveram-se 240 amostras, das quais 120 amostras de sangue e 120 de fígado, para avaliação bioquímica e histopatológica, respectivamente.

4.7.1. Análises bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção na veia caudal. Foram utilizadas seringas descartáveis de 3 mL e agulhas heparizadas de 30 x 7 mm. As amostras de sangue coletadas (aprox. 600 µL) foram dispostas em microtubos de 2 mL e conservadas em gelo (~4°C) até o local de processamento.

As análises foram realizadas na Unidade Didática Clínico Hospitalar, localizada na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. As amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos a 4°C para separação do plasma. Foram determinados os parâmetros de proteínas totais (PT), albumina (ALB), globulinas (GLOB), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA), de acordo com os procedimentos descritos pela fabricante do kit Analisa – GoldAnalisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, Brasil). A atividade enzimática foi expressa em U/L (Unidades/Litro).

4.7.2. Análises histopatológicas

A extração dos tecidos hepáticos e o preparo das amostras e as análises histopatológicas foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, localizado no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – ICMBio – CEPTA.

Para as análises histopatológicas, as amostras de fígado foram fixadas em solução de Bouin (Ácido Pírico; Álcool Etílico 96% ou 99%; Formaldeído P. A; Ácido Acético Glacial) por 24 horas. Após esse tempo, as amostras foram clarificadas com álcool 70% até remoção do excesso da solução de Bouin. A desidratação das amostras foi realizada em solução alcoólica em concentrações crescentes (80%, 95% e 100%). Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em soluções etanol-xilol em concentrações crescentes do xilol. Para formação dos cubos de parafina-tecido, utilizaram-se soluções xilol-parafina, sendo a última solução 100% parafina – mistura poli-isobutileno – (Paraplast[®], Sigma-Aldrich).

As amostras foram seccionadas (5 μm) em micrótomo de rotação semiautomático CUT 5062 (SLEE Medical, Mainz, Alemanha). Os tecidos desparafinados foram corados com hematoxilina e eosina.

Todos os materiais foram analisados em microscópio digital de luz DMS300 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Foi determinada a frequência de observação das lesões, sendo fotodocumentadas as lâminas com alterações histopatológicas.

4.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando um modelo de medidas repetidas, com um fator de tratamento (dose, com 4 níveis) e um fator longitudinal (tempo, com 7 níveis), em um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições.

Posteriormente, as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Tukey com nível de significância de 5%. Em todas as análises foi utilizado o ProcMixed do SAS 9.3 (SAS, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DIETAS EXPERIMENTAIS

De acordo com os limites máximos de aflatoxinas estabelecidos nas legislações da União Europeia (10 µg/kg), dos Estados Unidos (20 µg/kg) e do Brasil (50 µg/kg), foram produzidas as rações experimentais para cada tratamento. Na Tabela 7 estão apresentados os níveis de aflatoxinas (B₁; B₂; G₁; G₂) nas rações utilizadas no presente experimento.

Tabela 7 – Concentração média de Aflatoxinas na ração para peixe.

Aflatoxinas (µg/kg)	Tratamento			
	A	B	C	D
AFB ₁	ND	10,55 ± 3,69 ^c	25,71 ± 5,62 ^b	56,47 ± 14,04 ^a
AFB ₂	ND	1,33 ± 0,78	2,75 ± 2,17	5,92 ± 3,12
AFG ₁	ND	0,67 ± 1,18	0,43 ± 0,34	1,18 ± 1,20
AFG ₂	ND	1,14 ± 2,00	0,23 ± 0,20	0,18 ± 0,13
AF total	ND	12,33 ± 4,20 ^c	28,12 ± 6,55 ^b	62,08 ± 16,23 ^a

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg.

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05).

Limite de detecção (LOD): 0,03 µg/kg; Limite de quantificação (LOQ): 0,09 µg/kg. ND: não detectado

Fonte: Própria autoria.

5.2. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E LIMNOLÓGICOS

Na Tabela 8 estão apresentados os parâmetros de qualidade de água do presente experimento. Na piscicultura, dos parâmetros limnológicos a serem monitorados, o oxigênio dissolvido (OD) é o fator mais crítico para manter a saúde do peixe. No entanto, também é muito importante o controle da temperatura, pH, compostos nitrogenados, entre outros (GOMES; URBINATI, 2005).

No cultivo de matrinxã, têm sido reportados valores de OD entre 2,8 e 9,9 mg/L, temperaturas entre 18 e 30°C, pH entre 5,0 e 8,6 e amônia entre 0,35 e 0,37 mg/L, considerados adequados na criação desta espécie (ARBELÁEZ-ROJAS; FRACALOSS; FIM, 2002; BRANDÃO et al., 2005; FRASCÁ-SCORVO; CARNEIRO; MALHEIROS,

2001; IZEL et al., 2004; MARQUES et al., 2004). Portanto, é possível dizer que os valores de pH, OD, amônia e temperatura obtidos neste estudo foram adequados para criação e o bom desenvolvimento do matrinxã, o que permitiu avaliar o efeito real das aflatoxinas na ração sobre o desempenho de matrinxã.

Tabela 8 – Parâmetros de qualidade de água.

Parâmetros limnológicos	Tratamentos			
	A	B	C	D
Temperatura (°C)	26,83 ± 0,60	27,12 ± 0,67	27,06 ± 0,58	27,35 ± 0,48
pH	5,81 ± 0,43	5,8 ± 0,76	6,07 ± 0,62	5,78 ± 0,46
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,25 ± 0,44	6,17 ± 0,43	6,38 ± 0,46	6,18 ± 0,59
Amônia total (mg/L)	0,3			

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg. Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: Própria autoria.

Ao longo do experimento (180 dias), foi avaliado o efeito das aflatoxinas na ração sobre os parâmetros de peso, comprimento e consumo diário de ração, sendo estes mensurados a cada 30 dias para todos os tratamentos. Na Tabela 9 e Figura 9 estão apresentados, respectivamente, os valores de peso médio e comprimento médio dos matrinxãs submetidos às diferentes concentrações de aflatoxinas.

Tabela 9 – Peso médio dos matrinxãs sob o efeito de diferentes concentrações de aflatoxinas na ração durante o período experimental.

Tempo (dias)	Tratamento			
	A	B	C	D
0	50,80 ± 3,03 ^{Ea}	42,57 ± 3,14 ^{Fa}	43,07 ± 3,03 ^{Da}	45,87 ± 3,03 ^{Ea}
30	63,39 ± 3,37 ^{DEa}	53,50 ± 3,61 ^{EFa}	51,58 ± 3,30 ^{Da}	57,52 ± 3,53 ^{DEa}
60	79,72 ± 4,59 ^{Da}	59,44 ± 4,59 ^{DEbc}	48,89 ± 4,59 ^{Dc}	66,88 ± 4,86 ^{CDab}
90	107,33 ± 6,77 ^{Ca}	80,00 ± 7,27 ^{CDb}	81,92 ± 7,27 ^{Cab}	86,92 ± 7,27 ^{Cab}
120	162,31 ± 11,21 ^{Ba}	109,70 ± 12,79 ^{BCb}	110,00 ± 12,19 ^{BCb}	129,62 ± 11,21 ^{Bab}
150	190,00 ± 11,56 ^{Ba}	139,37 ± 11,56 ^{Bb}	143,75 ± 11,56 ^{ABb}	131,25 ± 11,56 ^{Bb}
180	282,00 ± 19,93 ^{Aa}	225,91 ± 18,99 ^{Aab}	197,50 ± 19,93 ^{Ab}	223,50 ± 19,93 ^{Aab}
Fonte de variação		P valor		
Tratamento		< 0,0001		
Tempo		< 0,0001		
Interação		0,0111		

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão.

Valores seguidos por mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Valores seguidos por mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Nos resultados de peso médio foi possível observar diferenças significativas nas variáveis tratamento e tempo, assim como na interação ($P < 0,05$).

No desdobramento da interação, nos primeiros 30 dias, não se evidenciou efeito das doses de aflatoxinas sobre o peso do matrinxã. A partir do 60º dia observou-se que o tratamento controle e o tratamento com 20 µg AFB₁/kg (C) diferiram entre si; no entanto, a partir do 90º dia, o tratamento C foi igual ao controle. Já no caso do tratamento B, ele diferiu do tratamento controle nos dias 60 e 150, mas no 180º dia não se observou diferença entre estes tratamentos.

Estas situações podem indicar uma tentativa por parte dos peixes em recuperar o peso, possivelmente por condições ambientais adequadas ou pela capacidade que esta espécie tem de recuperação compensatória do peso (LANDINES; RODRÍGUEZ; RODRÍGUEZ, 2011).

Um caso especial aconteceu no dia 150, em que não houve diferença entre os tratamentos B, C e D, mas quando comparados com o tratamento controle se evidencia efeito no peso pela presença das aflatoxinas independente da dose das mesmas.

No geral, o peso dos peixes, foi influenciado pelas concentrações de aflatoxinas na ração e pelo tempo de exposição, visto que o tratamento controle apresentou maiores valores que os tratamentos B, C e D. Quando comparados os tratamentos contendo 10, 20 e 50 µg AFB₁/kg; observa-se que não houve diferença durante o período experimental, indicando que efeito prejudicial sobre o peso de matrinxã foi pela presença de aflatoxinas na ração e não pela concentração das mesmas.

Figura 9 – Comprimento total médio do matrinxã sob o efeito de diferentes concentrações de aflatoxinas na ração durante o período experimental.

A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg.

Fonte: Própria autoria.

No comprimento, houve diferença para os fatores tratamento ($P < 0,0001$) e tempo ($P < 0,0001$); no entanto, não houve diferença na interação ($P = 0,2393$), o que indica que não existe dependência entre os fatores.

Os resultados obtidos indicam que simplesmente a presença de aflatoxinas na ração afeta o desenvolvimento do matrinxã independente da concentração das mesmas. No fator tempo, observou-se o comportamento esperado, pois os peixes aumentaram o comprimento com o transcorrer do tempo experimental; no entanto, entre os dias 30 e 60 não houve crescimento significativo, isto pode se dever a vários fatores como condições ambientais ou diminuição do apetite por parte dos peixes.

A Figura 10 apresenta o consumo diário individual de ração de matrinxã submetido à alimentação com diferentes concentrações de aflatoxinas durante 180 dias experimentais.

Figura 10 – Consumo individual diário de ração de matrinxã sob o efeito de diferentes concentrações de aflatoxinas na ração.

A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg.

Fonte: Própria autoria.

Quando analisado o crescimento do matrinxã (peso e comprimento) ao longo do período experimental e comparando-o com o consumo de ração, evidencia-se que a presença de aflatoxinas na ração causou um efeito prejudicial nos peixes. O consumo foi semelhante em todos os tratamentos até o dia 120 e, mesmo assim, o tratamento controle apresentou os maiores valores em peso e comprimento, indicando que os peixes deste tratamento aproveitaram melhor os nutrientes fornecidos pela ração, situação que não aconteceu nos tratamentos B, C e D. Nos dias 150 e 180, observou-se que o consumo de ração diminuiu no tratamento com 50 µg AFB₁/kg, situação que poderia ser mais evidente se o tempo de alimentação fosse maior que 180 dias. Segundo Caguan et al. (2004), uma das causas de que a ração contaminada com aflatoxinas não seja completamente consumida pode dever-se à diminuição do apetite dos peixes ou porque estes alimentos perdem palatabilidade.

A respeito da taxa de sobrevivência, ao final do experimento, apresentaram-se valores de 95,83%; 97,5%; 99,17% e 90,83% nos tratamentos controle, 10 µg/kg, 20 µg/kg e 50 µg/kg, respectivamente. A mortalidade no tratamento controle pode ser explicada pelas características de agressividade da espécie e possíveis formações de hierarquias entre peixes dominantes e subordinados (ARBELÁEZ-ROJAS; FRACALOSSO; FIM, 2002). Nos

tratamentos B, C e D pode observar-se o efeito das concentrações de aflatoxinas na ração, sendo maior a mortalidade no tratamento com 50 µg AFB₁/kg. Apesar da perda de alguns indivíduos, no geral, houve uma alta taxa de sobrevivência.

Segundo Santacroce et al. (2008), o prejuízo causado pelas aflatoxinas em peixes depende de fatores como a concentração de toxina presente na ração, o tempo de exposição e a suscetibilidade de cada espécie à aflatoxina.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os resultados encontrados por Ayyat et al. (2018), em que tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração contendo 2 mg/kg de AFB₁ por 14 semanas apresentaram redução no peso corporal, ganho de peso, piora na conversão alimentar e taxa de sobrevivência, quando comparados com o tratamento controle. Deng et al. (2010) encontraram que tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a concentrações elevadas de AFB₁ (245, 638, 793 e 1641 µg/kg) por 20 semanas, apresentaram menor ganho de peso, sendo que as tilápias expostas à maior concentração de AFB₁ foram as mais prejudicadas. O consumo de ração foi dependente da dose de AFB₁ na dieta, sendo menor a medida em que aumentou a concentração de AFs. Nesse estudo os autores obtiveram elevadas taxas de sobrevivência (> 98%) (DENG et al., 2010).

Lopes et al. (2005) submeteram alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) a diferentes concentrações de aflatoxinas na ração por 45 dias e observaram que os peixes alimentados com 204 µg/kg de aflatoxinas apresentaram redução em tamanho e peso.

Gonçalves et al. (2018) alimentaram pangassius (*Pangasius hypophthalmus*) com níveis crescentes de AFB₁ (50, 100, 250, 500 e 1000 µg/kg) por 12 semanas e reportaram redução no ganho de peso em peixes alimentados com 50 µg/kg, sendo maior a redução quando aumentava a concentração de aflatoxina. Em experimento conjunto, bagres alimentados com ração controle e 50, 100 e 250 µg AFB₁/kg foram expostos a *Edwardsiella ictaluri*, bactéria Gram negativa que causa septicemia entérica nesta espécie, apresentaram taxas de sobrevivência de 50, 42, 32 e 8%, respectivamente, os autores concluíram que a presença de AFB₁ afeta o seu desempenho e a resistência à doenças.

Zychowski et al. (2013) submeteram peixes Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) a níveis de 100 – 5000 µg AFB₁/kg por sete semanas e encontraram diminuição no ganho de peso e na taxa de sobrevivência, assim como piora na conversão alimentar.

O contrário ocorreu em tilápias do Nilo submetidas a concentrações de 5,0 – 115,34 ppb de aflatoxinas por 90 dias, pois os autores não encontraram efeito significativo das

aflatoxinas sobre o peso, tamanho e ganho de peso; no entanto, tilápias submetidas às maiores concentrações apresentaram taxas de mortalidade acima de 50% (CAGUAN et al., 2004). Raghavan et al. (2011) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de aflatoxinas na ração (1, 5, 10, 20, 40 e 80 µg/kg) sobre juvenis de esturjão e após 35 dias de exposição não observaram diferença na taxa de crescimento específico; no entanto, depois de 25 dias, os peixes alimentados com 20, 40 e 80 µg/kg apresentaram taxas de sobrevivência de 86%, 80% e 50%, respectivamente. Por último, Huang et al. (2014) não observaram diferenças significativas em peso e mortalidade em carpas gibel (*Carassius auratus gibelio*) alimentadas com 0, 20 e 2000 µg AFB₁/kg durante 24 semanas.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar que as aflatoxinas exerceram efeito negativo sobre o desempenho do matrinxã sem importar a concentração destas toxinas na ração.

Com relação ao exposto anteriormente, as diversas espécies estudadas mostraram uma ampla variação na suscetibilidade à aflatoxina B₁; no entanto, são necessários mais estudos sobre o tema que permitam padronizar variáveis como as doses de aflatoxinas e tempos de exposição, e assim garantir uma resposta dos efeitos destas toxinas em espécies aquáticas.

5.3. DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

5.3.1. Avaliação do desempenho do método analítico

As curvas de calibração e a avaliação do desempenho dos métodos analíticos foram efetuados para aflatoxinas nas rações, fígado e tecido muscular.

A Figura 11 mostra as curvas de calibração para ração de peixe. Os coeficientes de determinação (R^2) das curvas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram 0,992; 0,993; 0,990 e 0,988, respectivamente.

Figura 11 – Curvas de calibração para ração.

(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.

Na Figura 12, observam-se as curvas de calibração em fígado e músculo de peixe, com os coeficientes de determinação (R^2) de 0,997; 0,997; 0,997; 0,998 e 0,998 para as curvas de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁, respectivamente.

Figura 12 – Curvas de calibração para o músculo e fígado.

(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.

Com base nas curvas de calibração foi possível determinar os tempos de retenção das aflatoxinas avaliadas. Obtiveram-se os tempos de retenção para AFM₁ de 2,609 min, AFG₁ de 4,656 min, AFB₁ de 6,720 min, AFG₂ de 10,133 min e AFB₂ de 15,696 min (Figura 13).

Figura 13 – Cromatograma para soluções padrão de aflatoxinas (20 µg/mL).

Fonte: Própria autoria.

Na validação do método foram realizados testes de recuperação para os níveis de 5 e 20 µg/kg de toxina na ração, no músculo e no fígado, assim como a determinação do limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) para os três quesitos avaliados. As Tabelas 10, 11 e 12 mostram as porcentagens de recuperação para ração, músculo e fígado, respectivamente.

Tabela 10 – 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	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Aflatoxina adicionada 5,0 (µg/kg)				
Aflatoxina recuperada (µg/kg) *	4,1	4,5	4,1	4,5
Recuperação média (%)	81,2	90,6	82,3	90,2
Coeficiente de variação (%)	9,3	7,4	7,7	8,9
Aflatoxina adicionada 20 (µg/kg)				
Aflatoxina recuperada (µg/kg)	18,2	19,0	17,9	17,3
Recuperação média (%)	91,2	95,1	89,4	86,6
Coeficiente de variação (%)	13,4	5,9	15,8	5,9

*Valores médios (n=3)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 – Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise para AFM₁ em amostras de músculo de matrinxã.

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁
Aflatoxina adicionada	5,0 (µg/kg)				
Aflatoxina recuperada (µg/kg)*	4,3	4,5	4,3	4,6	4,5
Recuperação média (%)	85,8	90,4	86,6	92,3	89,1
Coeficiente de variação (%)	14,0	12,3	24,9	21,0	18,4
Aflatoxina adicionada	20 (µg/kg)				
Aflatoxina recuperada (µg/kg)	16,1	18,0	14,6	16,5	22,1
Recuperação média (%)	80,5	89,9	73,2	82,6	110,7
Coeficiente de variação (%)	12,0	9,3	8,7	6,7	6,9

*Valores médios (n=3)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 12 – Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁
Aflatoxina adicionada	5,0 (µg/kg)				
Aflatoxina recuperada (µg/kg)*	5,5	6,4	4,2	5,5	4,5
Recuperação média (%)	109,9	123,0	85,3	110,4	90,8
Coeficiente de variação (%)	8,4	8,3	11,6	13,7	21,1
Aflatoxina adicionada	20 (µg/kg)				
Aflatoxina recuperada (µg/kg)	19,5	20,4	19,5	19,7	23,0
Recuperação média (%)	98,0	102,2	97,6	98,5	115,3
Coeficiente de variação (%)	9,6	7,3	13,4	9,8	11,8

*Valores médios (n=3)

Fonte: Própria autoria.

Para a ração, obtiveram-se LOD de 0,03 µg/kg e LOQ de 0,09 µg/kg. Para músculo de matrinxã, os limites de detecção e quantificação foram 0,03µg/kg e 0,09µg/kg, respectivamente. Para fígado, o limite de detecção foi de 0,05 µg/kg e o limite de quantificação foi 0,15 µg/kg. Os valores de recuperação e seus correspondentes coeficientes de variação foram adequados na validação dos métodos de ração, músculo e fígado.

5.3.2. Determinação de aflatoxinas em amostras de fígado e músculo de matrinxã

A suscetibilidade dos peixes à AFB₁ está baseada principalmente na predisposição genética da espécie, a qual depende da expressão de diferentes genes codificadores de enzimas envolvidas no processo de biotransformação (SANTACROCE et al., 2008).

Por sua característica lipossolúvel, a aflatoxina B₁ é facilmente absorvida no trato gastrointestinal e conduzida ao sistema circulatório, e ali se liga as lipoproteínas do sangue, sendo distribuída a diferentes órgãos, principalmente ao fígado, onde permanece por longos períodos aderida aos hepatócitos antes de ser excretada (PLAKAS et al., 1991; SANTACROCE et al., 2008).

A Tabela 13 apresenta a transferência de AFB₁ para o fígado de matrinxã. As aflatoxinas B₂, G₁, G₂, e M₁ não foram detectadas no fígado e no tecido muscular de matrinxã.

Tabela 13 – Deposição de AFB₁ em fígado de matrinxã durante o tempo experimental.

Tempo (dias)	AFB ₁ (µg/kg)			
	A	B	C	D
30	ND	Traços	Traços	0,407 ± 0,03 ^B
60	ND	Traços	Traços	0,167 ± 0,03 ^D
90	ND	Traços	0,175 ± 0,04 ^{Ba}	0,257 ± 0,03 ^{CDa}
120	ND	0,180 ± 0,03 ^{ABa}	0,267 ± 0,03 ^{ABa}	0,310 ± 0,04 ^{BCDa}
150	ND	0,320 ± 0,03 ^A	0,393 ± 0,03 ^A	0,400 ± 0,03 ^{BC}
180	ND	0,153 ± 0,03 ^{Bb}	Traços	0,605 ± 0,04 ^{Aa}
Fonte de variação			P valor	
Tratamento			0,0001	
Tempo			< 0,0001	
Interação			< 0,0001	

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão.

Valores seguidos por mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente (P<0,05). Valores seguidos por mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente (P<0,05).

Limite de detecção (LOD): 0,05 µg AFB₁/kg; Limite de quantificação (LOQ): 0,15 µg AFB₁/kg; ND: não detectado; Traços: detectado, porem inferior ao limite de quantificação.

Fonte: Própria autoria

Para o fígado, houve diferença tanto no fator tratamento quanto no fator tempo e na interação ($P < 0,05$). Apesar das concentrações de aflatoxina B₁ no fígado serem baixas, é possível evidenciar que o acúmulo foi maior à medida em que aumentou a quantidade de AFB₁ na ração.

O acúmulo de aflatoxina foi estatisticamente igual em todos os dias de exposição, exceto no dia 180, no qual os tratamentos B e D apresentaram diferença, sendo maior em matrinxãs alimentados com 50 µg AFB₁/kg. Durante o período experimental, observou-se que no tratamento B houve diferença entre o dia 150 e 180, caracterizado por uma diminuição no acúmulo. No tratamento C, evidencia-se aumento no acúmulo para os dias 90, 120 e 150, apresentando-se diferença entre os dias 90 e 150, no qual o aumento foi maior. No tratamento D observou-se diferença entre os dias 30 e 150 quando comparados com o dia 180. Neste tratamento é possível evidenciar um aumento na transferência a partir do dia 90.

O comportamento nos três tratamentos (B; C e D) de aumento e diminuição do acúmulo de AFB₁ no fígado de matrinxã indicam a ocorrência dos processos metabólicos da toxina, como biotransformação e a subsequente excreção.

Segundo Huang et al. (2011) e Gallagher e Eaton (1995), elevadas concentrações de AFB₁ aceleram a biotransformação da toxina, portanto, peixes alimentados com altas doses de AFB₁ podem apresentar maior habilidade de eliminação, pois excretam mais rapidamente a toxina, ao passo que em peixes alimentados com baixas concentrações de aflatoxina B₁ a eliminação pode ser mais lenta.

No entanto, no presente estudo matrinxãs alimentados com 10 µg AFB₁/kg apresentaram menor acúmulo de toxina e, portanto, possivelmente maior capacidade de excreção. Peixes expostos a 20 µg AFB₁/kg tiveram um acúmulo maior e só foi possível evidenciar diminuição da toxina na última fase experimental. Nos peixes submetidos à maior concentração (50 µg AFB₁/kg), o acúmulo foi maior quando comparado com as outras doses, além disso, foi crescente a partir do dia 90. É possível, portanto, afirmar que a habilidade dos peixes na eliminação de toxinas depende da espécie e não necessariamente da concentração de AFB₁ fornecida.

O aumento contínuo no acúmulo de AFB₁ no tratamento D, poderia implicar em aumento na chance de formação do metabólito AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), o que aumentaria o efeito carcinogênico da aflatoxina B₁ (SANTACROCE et al., 2008).

A Tabela 14 apresenta a transferência de AFB₁ para o músculo de matrinxã. As aflatoxinas B₂, G₁, G₂, e M₁ não foram detectadas no fígado e no tecido muscular de matrinxã.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que não houve acúmulo de aflatoxina B₁ no tecido muscular de matrinxãs em todas as concentrações testadas durante o período experimental.

Tabela 14 – Deposição de AFB₁ em músculo de matrinxã durante o tempo experimental.

Tempo (dias)	AFB ₁ (µg/kg)			
	A	B	C	D
30	ND	Traços	ND	Traços
60	ND	ND	ND	ND
90	ND	ND	ND	Traços
120	ND	ND	ND	ND
150	ND	Traços	Traços	Traços
180	ND	ND	ND	Traços

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg.

Limite de detecção (LOD): 0,03µg AFB₁/kg; Limite de quantificação (LOQ): 0,09µg AFB₁/kg; ND: não detectado; Traços: detectado, porem inferior ao limite de quantificação.

Fonte: Própria autoria.

Diversos estudos têm reportado acúmulo de aflatoxinas em vários tecidos de peixes. Ngethe; Horsberg; Ingebrigtsen (1992) determinaram a deposição de aflatoxina B₁ por administração oral e intravenosa em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*); após oito dias encontraram altos níveis de AFB₁ na bile seguido por rim caudal e fígado em peixes com administração intravenosa e em bile seguido por fígado e rim caudal quando oferecido oralmente. Além disso, foi possível detectar o acúmulo no rim cranial, baço, sangue, cérebro, gordura abdominal, músculo, ceco pilórico, trato uveal e roseta olfatória, de acordo com os resultados obtidos nos dois grupos avaliados, os autores indicaram que aflatoxina B₁ apresenta um alto grau de absorção gastrointestinal.

Plakas et al. (1991) encontraram resíduos de AFB₁ na bile, fígado, rim caudal e sangue de bagre de canal nas concentrações de 1445, 44, 15 e 6 ppb, respectivamente, após 96 horas de exposição a 250 µg AFB₁/kg. Os autores concluíram que a deposição de AFB₁ no bagre de canal é caracterizada pela rápida absorção e posterior eliminação o que faz com que o potencial de acúmulo nos tecidos seja muito baixo.

El-Sayed e Khalil (2009) encontraram deposição de AFB₁ no músculo de robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) exposto a 0,018 mg/kg por 42 dias. A transferência de toxina

aumentou com o passar do tempo alcançando uma concentração de 4,25 ppb ao final do experimento.

Deng et al. (2010) afirmaram que a tilápia do Nilo é uma espécie bastante tolerante à exposição dietética de AFB₁; no entanto, uma exposição a 85, 245, 638, 793 e 1641 µg AFB₁/kg por 20 semanas resultou no acúmulo de 30,4 até 43,2 µg/kg no fígado. Estes autores não detectaram acúmulo no músculo. Selim; El-Hofy; Khalil (2014) encontraram resíduos de AFB₁ no músculo de tilápias do Nilo alimentadas com 200 µg/kg por 10 semanas, e o acúmulo aumentou com o passar do tempo, pois obtiveram concentrações entre 23 ppb e 94 ppb no tecido. A mesma espécie submetida a 2 ppm de AFB₁ por 14 semanas apresentou transferência da toxina de 21,18 ppb no músculo (AYYAT et al., 2018).

Carpas gibel (*Carassius auratus gibelio*) foram submetidas a dietas contendo 20 e 2000 µg AFB₁/kg durante 24 semanas e os autores reportaram aumento do acúmulo de toxina no transcorrer do experimento em ovários (4,12 e 5,32 µg/kg) e no músculo (3,11 e 4,0 µg/kg) (HUANG et al., 2014).

Trutas arco-íris alimentadas com 115, 347 e 1190 µg AFB₁/kg por 21 dias apresentaram acúmulo de aflatoxina B₁ no músculo, sendo crescente nos primeiros 14 dias de alimentação. Do dia 14 ao 21 os peixes tiveram uma diminuição na transferência obtendo concentrações finais de 0,06 µg/kg, 0,17 µg/kg e 0,26 µg/kg para as três concentrações avaliadas. Em experimento simultâneo, trutas arco-íris foram submetidas a concentrações de 219 e 6276 µg AFB₁/kg por sete dias, apresentando resíduos de AFB₁ de 0,15 e 4,1 µg/kg, respectivamente. Nos peixes alimentados com 6.276 µg AFB₁/kg, também foram detectadas concentrações de 0,05 µg/kg para AFM₁ e 2,1 µg/kg para AFL (NAMOURA et al., 2011).

No Brasil, Lopes et al. (2005) alimentaram jundiás com 41, 90 e 204 µg AFB₁/kg por 45 dias (experimento 1) e com 350, 757 e 1177 µg AFB₁/kg por 35 dias (experimento 2). No experimento 1, encontraram resíduos de AFB₁ no músculo dos peixes alimentados com as maiores concentrações (90 e 204 µg AFB₁/kg) sendo 1,0 µg/kg e 6,1 µg/kg, respectivamente. No experimento 2, obtiveram transferência da toxina tanto no fígado quanto no músculo para as três concentrações avaliadas, e detectaram valores de 1,6 e 1,8 µg/kg para fígado e músculo, respectivamente, em peixes submetidos a 350 µg AFB₁/kg; jundiás alimentados com 757 µg AFB₁/kg tiveram acúmulo de 4,0 e 3,1 µg/kg para fígado e músculo, respectivamente; os peixes alimentados com a maior concentração de toxina apresentaram resíduos de AFB₁ de 12,9 µg/kg para fígado e de 6,7 µg/kg para músculo.

Michelin et al. (2017) avaliaram a transferência de AFB₁ em fígado e músculo de lambaris alimentados com 10, 20 e 50 µg AFB₁/kg por 120 dias e encontraram deposição da toxina no fígado a partir do dia 60, com acúmulo crescente. Ao final do experimento obtiveram valores de 264,73 e 242,75 µg/kg nos peixes alimentados com 20 e 50 µg AFB₁/kg, respectivamente. No músculo, o acúmulo também foi crescente e se evidenciou a partir do dia 90; no final do experimento foram detectadas concentrações de AFB₁ quase iguais às fornecidas na ração, obtendo-se valores de 18,76 µg/kg, 19,69 µg/kg e 49,92 µg/kg para as rações com 10, 20 e 50 µg AFB₁/kg, respectivamente.

A ampla diferença nas reações das espécies aquáticas à presença de AFB₁ pode ser explicada pelo fato de que os efeitos tóxicos desta aflatoxina e sua consequente suscetibilidade estão sujeitos à eficiência da biotransformação da toxina, seja na fase de ativação ou na fase de detoxificação do animal. Assim, a variação do metabolismo das aflatoxinas depende principalmente de fatores como espécie, sexo, idade, estado de saúde do animal e alimentação (HUSSEIN; BRASEL, 2001; SANTACROCE et al., 2008).

As informações fornecidas pelos diferentes estudos realizados sobre os níveis de acúmulo de AFB₁ e seus metabólitos em peixes, principalmente em tecido muscular, elucidam um panorama preocupante a respeito do risco significativo de transmissão de AFB₁ aos humanos, uma vez que muitos países estabeleceram um limite de 5 µg/kg em alimentos para consumo humano com base na avaliação de risco que esta toxina representa (GILBERT, 1991; VAN EGMOND, 1991). Da mesma forma, a presença de aflatoxinas em rações para espécies aquáticas é um tema que requer atenção na aquicultura, pois além de causar efeitos tóxicos nas diferentes espécies, ainda não existem níveis de tolerância de resíduos destes compostos na legislação (ANATER et al., 2016).

Diante destas situações, existe a necessidade de concentrar os estudos sobre o efeito das aflatoxinas na ração sobre as diferentes espécies aquáticas, além de quantificar os níveis de transferência que ajudem a determinar o impacto na saúde pública.

5.4. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA DE MATRINXÃ

5.4.1. Avaliação do perfil bioquímico

A análise do perfil bioquímico em peixes contribui na compreensão das variações nas características sanguíneas. Estas variações dependem principalmente da espécie aquática, idade, sexo, alimento e ambiente a que estão expostos (LOPES et al., 2010).

O fígado é o principal órgão nos processos de metabolização de xenobióticos, promovendo a biotransformação e a subsequente eliminação da substância tóxica (MURRAY, 1998). Alterações no metabolismo hepático devido a diversos agentes tóxicos podem gerar mudanças no perfil bioquímico (MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

A atividade das enzimas hepáticas, como alanina aminotransferase (ALT); aspartato aminotransferase (AST); fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT), é utilizada como biomarcador na determinação da presença ou ausência de lesões no fígado. O aumento da atividade destas enzimas no sangue pode indicar a ruptura dos hepatócitos, que ocorre por processos de necrose celular ou por processos de agressão por agentes tóxicos (THRALL et al., 2007).

Cabe ressaltar que em peixes não foram documentados intervalos de referência para atividade das enzimas hepáticas, o que tornou difícil a interpretação dos valores obtidos neste estudo. Além disso, devido à baixa detecção durante as análises, as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (GGT) não puderam ser consideradas neste trabalho.

A Tabela 15 mostra a concentração de aspartato aminotransferase (AST) em matrinxã submetido à diferentes concentrações de AFB₁ na ração durante o período experimental de 180 dias.

Para AST, houve diferença nos fatores tratamento e tempo, assim como na interação ($P < 0,05$). No desdobramento da interação, no dia 90 foram observadas diferenças entre os três tratamentos (B, C e D) quando comparados ao controle (A). No dia 120, foi possível observar que os tratamentos C e D foram diferentes do controle (A).

Tabela 15 – Atividade do aspartato aminotransferase (AST) em sangue de matrinxã (*Brycon cephalus*).

Tempo (dias)	AST (U/L)			
	A	B	C	D
30	321,00 ± 55,73 ^{CD}	382,50 ± 48,27 ^A	359,00 ± 48,27 ^B	409,75 ± 48,27 ^A
60	661,00 ± 66,41 ^{Aa}	535,75 ± 74,25 ^{Aa}	814,00 ± 85,74 ^{Aa}	528,00 ± 74,25 ^{Aa}
90	619,20 ± 38,46 ^{Aa}	327,60 ± 38,46 ^{Ab}	466,80 ± 38,46 ^{Bb}	324,00 ± 42,99 ^{Ab}
120	556,00 ± 39,47 ^{ABa}	424,50 ± 39,47 ^{Aab}	394,40 ± 35,31 ^{Bb}	362,25 ± 39,47 ^{Ab}
150	414,00 ± 39,12 ^{BC}	298,20 ± 39,12 ^{AB}	344,60 ± 39,12 ^B	344,20 ± 39,12 ^A
180	224,00 ± 18,24 ^D	178,00 ± 16,31 ^B	161,20 ± 16,31 ^C	174,20 ± 16,31 ^B
Fonte de variação			P valor	
Tratamento			0,0017	
Tempo			< 0,0001	
Interação			0,0017	

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão.

Valores seguidos por mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente (P<0,05). Valores seguidos por mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Em relação ao comportamento de AST durante o período experimental, é possível observar que nos tratamentos A e C houve um incremento nas concentrações do dia 30 para o dia 60; no entanto, nos tratamentos B e D não houve diferença para os mesmos dias. Nos tratamentos A e C foi observada diminuição contínua nos valores de AST a partir do dia 90, já nos tratamentos B e D essa redução contínua se apresentou a partir do dia 120. No dia 180 foram registrados os valores mais baixos de AST em todos os tratamentos.

Em geral, as enzimas ALT e AST apresentam aumento dos níveis no sangue devido à lesão hepática. O aspartato aminotransferase e a alanina aminotransferase aumentam rapidamente com a primeira necrose celular e continuam elevados enquanto o dano celular continua. Por isso, a quantificação dessas enzimas é considerada um bom método para avaliar o estado do fígado em quadros de hepatite. No início da lesão hepática os níveis destas enzimas no sangue aumentarão proporcionalmente à gravidade do dano, enquanto a doença progride, e diminuirão à medida que a lesão diminui (CMA, 1957; THRALL et al., 2007).

Para fosfatase alcalina (FA), foi observada diferença no fator tratamento (P 0,0438) e tempo ($P < 0,0001$); no entanto, não houve significância na interação (P 0,0648), indicando independência entre os fatores. As Figuras 14 e 15 mostram a concentração de FA em sangue de matrinxã, para os tratamentos A, B, C e D e para cada dia experimental (30, 60, 90, 120, 150 e 180), respectivamente.

Figura 14 – Atividade de fosfatase alcalina (FA) em sangue de matrinxã (*Brycon cephalus*) para cada tratamento.

A: Controle; B: 10 μg AFB₁/kg; C: 20 μg AFB₁/kg; D: 50 μg AFB₁/kg.

Fonte: Própria autoria.

Figura 15 – Atividade de fosfatase alcalina (FA) em sangue de matrinxã (*Brycon cephalus*), para cada período experimental.

30; 60; 90; 120; 150 e 180: Tempo em dias

Fonte: Própria autoria.

Observou-se que o tratamento C foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos, apresentando a concentração mais baixa de FA (68,98 U/L). Em relação ao período experimental, no dia 90 foi observada a menor concentração de FA (55,25 U/L), sendo diferente aos outros dias experimentais. No dia 60 se observou a maior concentração de FA (91,62 U/L). Os dias 60, 120 e 150 não apresentaram diferença, e da mesma forma não houve diferença estatística entre os dias 30 e 180.

Segundo Thrall et al. (2007), a fosfatase alcalina é uma enzima de indução, sintetizada no fígado, nos osteoblastos, nos epitélios do intestino e dos rins e na placenta. O aumento de produção de FA e sua atividade no sangue deve-se à maior atividade osteoblástica, colestase, indução por medicamentos e várias doenças crônicas.

Para um diagnóstico mais confiável de doença hepatobiliar (colestase), faz-se necessária a determinação das atividades séricas de FA e GGT. No entanto, devido a falta dos resultados da atividade enzimática de GGT no sangue de matrinxã, não foi possível confirmar a hipótese da presença de colestase.

Diante à situação anterior, cabe dizer que em animais jovens, em fase de crescimento, o aumento na atividade sérica da fosfatase alcalina se deve a uma maior atividade osteoblástica (THRALL et al., 2007). Deste modo, tendo em conta que para este trabalho foram utilizados juvenis de matrinxã e que os tratamentos A, B e D apresentaram os valores

mais altos em comprimento, peso e atividade sérica de FA, é possível afirmar que as concentrações desta enzima no sangue são de origem óssea devido ao crescimento dos peixes.

Por outro lado, a função hepática é determinada pela mensuração da concentração sérica de substâncias que são sintetizadas pelo fígado e metabolizadas pelo sistema biliar; alterações na concentração destas substâncias no sangue podem indicar lesões, doenças e insuficiência hepática (THRALL et al., 2007). As Tabelas 16, 17 e 18 mostram as concentrações de proteínas totais (PT), albumina (ALB) e globulina (GLOB) no sangue de matrinxãs expostos a 10, 20 e 50 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$. Nos três parâmetros avaliados (PT, ALB e GLOB), foram observados efeitos do fator tempo e interação ($P < 0,05$), mas não houve efeito do fator tratamento.

Tabela 16 – Atividade de proteínas totais (PT) em sangue de matrinxã (*Brycon cephalus*).

Tempo (dias)	PT (U/L)			
	A	B	C	D
30	3,0117 ± 0,94 ^{AB}	2,8641 ± 0,94 ^A	3,0830 ± 0,94 ^{AB}	2,9298 ± 0,94
60	3,9691 ± 0,23 ^{Aa}	3,8320 ± 0,21 ^{Aab}	3,7523 ± 0,24 ^{ABab}	3,0984 ± 0,23 ^b
90	4,1000 ± 0,27 ^{Aab}	3,6100 ± 0,26 ^{Ab}	4,6716 ± 0,28 ^{Aa}	3,4340 ± 0,31 ^b
120	3,3460 ± 0,11 ^{AB}	3,0620 ± 0,09 ^A	2,9986 ± 0,11 ^B	3,0209 ± 0,11
150	3,5820 ± 0,18 ^{AB}	2,9600 ± 0,27 ^A	3,2446 ± 0,27 ^{AB}	3,5595 ± 0,27
180	2,9961 ± 0,11 ^{Bb}	3,6620 ± 0,10 ^{Aa}	3,2368 ± 0,10 ^{ABb}	3,2403 ± 0,10 ^b
Fonte de variação			P valor	
Tratamento			0,5672	
Tempo			< 0,0001	
Interação			0,0021	

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão.

Valores seguidos por mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente (P<0,05). Valores seguidos por mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 17 – Atividade de albumina (ALB) em sangue de matrinxã (*Brycon cephalus*).

Tempo (dias)	ALB(U/L)			
	A	B	C	D
30	0,8350 ± 0,24 ^B	1,0700 ± 0,24 ±	0,9755 ± 0,24 ^A	0,9400 ± 0,24
60	1,3198 ± 0,11 ^B	1,3380 ± 0,11 ±	1,2167 ± 0,13 ^A	1,4200 ± 0,13
90	2,4721 ± 0,20 ^{Aa}	1,3780 ± 0,20 ^b	1,7050 ± 0,20 ^{Ab}	1,5700 ± 0,20 ^b
120	1,2479 ± 0,04 ^{Ba}	1,1720 ± 0,04 ^a	1,0860 ± 0,04 ^{Aa}	1,1220 ± 0,03 ^a
150	1,2903 ± 0,05 ^{Ba}	1,0800 ± 0,05 ^c	1,2624 ± 0,05 ^{Aab}	1,2020 ± 0,05 ^{bc}
180	1,0705 ± 0,04 ^{Bb}	1,2780 ± 0,04 ^a	1,2029 ± 0,04 ^{Aab}	1,1640 ± 0,04 ^{ab}
Fonte de variação			P valor	
Tratamento			0,1436	
Tempo			< 0,0001	
Interação			0,0003	

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão.

Valores seguidos por mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente (P<0,05). Valores seguidos por mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 18 – Atividade de globulina (GLOB) em sangue de matrinxã (*Brycon cephalus*).

Tempo (dias)	GLO (U/L)			
	A	B	C	D
30	2,2408 ± 0,53 ^{ABC}	1,9347 ± 0,53 ^A	2,1230 ± 0,53 ^{AB}	2,1352 ± 0,53
60	2,6563 ± 0,15 ^{Aa}	2,4940 ± 0,14 ^{Aab}	2,5218 ± 0,16 ^{Aab}	2,0485 ± 0,16 ^b
90	2,6092 ± 0,19 ^{AB}	2,2320 ± 0,21 ^A	2,7399 ± 0,22 ^A	2,4080 ± 0,22
120	2,0876 ± 0,08 ^{BC}	1,8900 ± 0,08 ^A	1,9091 ± 0,08 ^B	1,9028 ± 0,08
150	2,4349 ± 0,15 ^{ABC}	1,8800 ± 0,27 ^A	2,0308 ± 0,25 ^{AB}	2,3479 ± 0,25
180	1,9371 ± 0,08 ^{Cb}	2,3840 ± 0,08 ^{Aa}	2,0450 ± 0,08 ^{ABb}	2,0655 ± 0,08 ^b
Fonte de variação		P valor		
Tratamento		0,5066		
Tempo		< 0,0001		
Interação		0,0248		

Tratamentos: A: Controle; B: 10 µg AFB₁/kg; C: 20 µg AFB₁/kg; D: 50 µg AFB₁/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão.

Valores seguidos por mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente (P<0,05). Valores seguidos por mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Diversas espécies de peixes têm demonstrado suscetibilidade à presença de aflatoxinas na ração, apresentando alterações no perfil hematológico e bioquímico, o que pode indicar diversos tipos de lesões em tecidos.

Robalos submetidos a 0,018 mg AFB₁/kg por 42 dias apresentaram aumento significativo nas atividades séricas de transaminases e fosfatase alcalina e diminuição das proteínas plasmáticas ao longo do período experimental (EL-SAYED; KHALIL, 2009).

Pangassius (*Pangasius hypophthalmus*) expostos a 50, 100 e 150 µg AFB₁/kg por 8 e 12 semanas tiveram aumento nas atividades de AST e ALT à medida que aumentou a concentração de aflatoxina. No entanto, quando a quantidade de toxina na ração foi aumentada, a atividade destas enzimas diminuiu e os peixes apresentaram diminuição de eritrócitos e aumento de leucócitos (GONÇALVES et al., 2018).

Jundiás alimentados com 150, 250 e 350 µg AFB₁/kg por 90 dias exibiram redução significativa de hemoglobinas e taxa de hematócrito quando comparado ao controle, atingindo reduções de 46 e 52 %, respectivamente. O número total de eritrócitos, o volume corpuscular médio, a hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média, não foram afetados pela presença de AFB₁ (LOPES et al., 2010). A mesma espécie exposta à contaminação por AFB₁ (41, 90 e 204 µg/kg) demonstrou redução nos valores de hematócritos, hemoglobina e glicose sanguínea à medida em que aumentaram as concentrações de AFB₁, apresentando diferença significativa ao serem comparados com os peixes controle (VIEIRA et al., 2006).

Carpas (*Labeo rohita*) foram alimentadas com rações contaminadas com 10, 20 e 40 µg AFB₁/kg durante 60 dias e ao final do experimento os peixes mostraram redução significativa no número total de eritrócitos e hemoglobina e aumento do número total de leucócitos quando comparados ao controle (MOHAPATRA et al., 2011). A mesma espécie exposta a 1,25; 2,50 e 5,0 mg AFB₁/kg por 90 dias apresentou diminuição nos teores de proteína total, albumina e globulina quando comparado ao tratamento controle (SAHOO; MUKHERJEE, 2001).

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a 200 mg AFB₁/kg durante 10 semanas mostraram valores mais baixos de eritrócitos, hemoglobina e leucócitos que as tilápias controle (SELIM; EL-HOFY; KHALIL, 2014).

Diferentes estudos têm avaliado os efeitos tóxicos de alguns xenobióticos em matrinxã, como nitrito ambiental (AVILES et al., 2004a; AVILES et al., 2004b; AVILES et al., 2013; MORAES et al., 2002) e fenol (AVILES et al., 2008; HORI et al., 2008), sendo que

foram encontrados diversos efeitos prejudiciais por parte destes agentes sobre a espécie. O nitrito ambiental pode causar anemia funcional e hemolítica, interferindo na continuidade do metabolismo antioxidativo e gerando distúrbios osmóticos que são cumulativos, o que determina a alta sensibilidade do matrinxã ao nitrito. O fenol pode comprometer a capacidade do peixe para obter respostas metabólicas a um agente estressante.

Aguiar et al. (2004) avaliaram o efeito de um pesticida organofosforado (Folidol 600) sobre matrinxã, com os peixes submetidos à exposição por 96 horas e recuperação por 24, 48, 96 e 192 horas. Foram observadas a inibição da atividade de acetilcolinesterase (AChE) no plasma e cérebro, a alanina aminotransferase (ALT) diminuiu 59,4 % em fígado e aumentou 94,2% em plasma, atribuíram o comportamento de ALT, em conjunto com a diminuição de glutamato-desidrogenase (GDH), ao comprometimento do metabolismo de aminoácidos e ao dano hepático. Além disso, sugeriram que o aumento de aspartato aminotransferase (AST) em coração e plasma se deve a lesão no tecido e a diminuição de malato-desidrogenase (MDH) em fígado denota falha no metabolismo oxidativo no tecido. Concluíram que o Folidol 600 afeta o metabolismo intermediário de matrinxã e que a análise destas enzimas pode funcionar como bons biomarcadores de contaminação por este tipo de pesticida.

A exposição por tempo prolongado à aflatoxina B₁ causa inúmeros efeitos prejudiciais nas diferentes espécies de peixes, afetando a integridade e o funcionamento do indivíduo. O perfil hematológico dos peixes, como eritrócitos, hematócritos, hemoglobina e linfócitos são severamente afetados por AFB₁ (LUMBERTDACHA et al., 1995; TUAN et al., 2002).

O aumento das atividades séricas de AST, ALT e FA sugere alterações na estabilidade lisossomal, levando a desordem na permeabilidade dos hepatócitos e mudanças no fígado (VARIOR; PHILIP, 2012) e no metabolismo proteico dos tecidos, como consequência do estresse químico e possível toxicidade renal (EL-SAYED; KHALIL, 2009), além de necrose das células do fígado, rim e coração (ABDELHAMID et al., 2004).

A hepatotoxicidade de AFB₁ causa alterações na integridade celular do fígado devido à ligação de adutos de AFB₁ e macromoléculas celulares. Estas ligações refletem na redução das proteínas totais e da albumina no soro. A diminuição dos níveis de globulina pode ocorrer devido a casos de toxicidade em rim e baço e lise de linfócitos (SAHOO; MUKHERJEE, 2001). A supressão da liberação de lisozimas causa redução na atividade bactericida no organismo, aumentando assim a suscetibilidade dos peixes a infecções e mortalidade. A redução de proteínas totais e albumina, com o consequente aumento da relação A:G (albumina – globulina) são indicadores do grau de imunossupressão causado pela AFB₁ (SAHOO; MUKHERJEE, 2001; 2003).

Os resultados de aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina e globulina obtidos neste trabalho apresentaram alterações muito discretas. Além disso, não foi observado o comportamento padrão em casos de lesões hepáticas, fato que dificultou na identificação do tipo de dano provocado pela presença de AFB₁ na ração, e por isso foi de grande importância a avaliação histológica do fígado.

5.4.2. Avaliação histopatológica

Foram realizadas observações macroscópicas e microscópicas das características histológicas de fígado de matrinxãs expostos a diferentes concentrações de AFB₁ por 180 dias.

Na observação macroscópica do fígado dos tratamentos B, C e D foi possível evidenciar o tecido hepático com aspecto friável e sinais de icterícia. A partir do dia 150, a coleta foi dificultada devido ao aspecto do tecido hepático, percebendo-se desprendimento de fragmentos quando em contato com a pinça anatômica. Esta situação pode ser atribuída à degeneração gordurosa severa observada microscopicamente nas amostras.

A observação microscópica do fígado de matrinxã do tratamento controle (A) estava de acordo com o encontrado por Aviles (2008). Os hepatócitos exibiram formato hexagonal, levemente arredondado, em arranjo cordonal, com núcleo central e basófilo, citoplasma acidófilo e com grânulos de glicogênio (Figura 16).

A Figura 17 apresenta a frequência de degeneração gordurosa observada em fígado de matrinxãs submetidos a 10, 20 e 50 µg AFB₁/kg, indicando o início da esteatose aos 60 dias. Nos tratamentos B, C e D foram observadas alterações no tecido como degradação gordurosa e hidrópica, focos de morte celular ou em processo de morte celular. Estas afecções podem ser observadas nas Figuras 18 – 21.

Em alguns momentos do período experimental, foi observada degeneração gordurosa nos peixes controle, isto pode ser atribuído a episódios de superalimentação. Também foi observada desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos nos peixes expostos à aflatoxina B₁, evidenciada a partir do dia 90.

Figura 16 – Fígado de matrinxã do tratamento controle. O traço indica arranjo cordonal dos hepatócitos. H&E 400X

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 – Frequência de ocorrência de degradação gordurosa em fígado de matrinxã (*Brycon cephalus*).

Fonte: Própria autoria.

Figura 18 – Degeneração gordurosa severa em fígado de matrinxã. H&E 400X

Fonte: Própria autoria.

Figura 19 – Degeneração gordurosa moderada em fígado de matrinxã. H&E 400X

Fonte: Própria autoria.

Figura 20 – Degeneração hidrópica e morte celular em fígado de matrinxã (seta). H&E 400X.

Fonte: Própria autoria.

Figura 21 – Degeneração hidrópica e vacúolos de lipídeo em fígado de matrinxã (seta). H&E 400X

Fonte: Própria autoria.

Diversas alterações histopatológicas têm sido observadas em outras espécies de peixes expostos às aflatoxinas. Chávez-Sánchez; Martínez-Palacios e Osorio-Moreno (1994) observaram fígado gorduroso e alterações neoplásicas características, como hipertrofia celular e nuclear, aumento de nucléolos, infiltração celular, hiperemia, basofilia celular e necrose, em

tilápias do Nilo expostas a 0,94 – 3,0 mg AFB₁/kg por 25 dias. Na mesma espécie, Tuan et al. (2002) encontraram que os fígados dos peixes alimentados com dietas contendo 10 mg AFB₁/kg continham excesso de lipofuscina e núcleos hepatocelulares de tamanho irregular; por sua vez, dietas contendo 100 AFB₁/kg causaram necrose hepática grave.

Um estudo com exposição de beluga (*Huso huso*) a 25 e 1000 µg/kg de aflatoxinas por três meses, mostrou alterações progressivas de deposição de gordura, degeneração dos hepatócitos e necrose (SEPAHDARI et al., 2010).

Alterações histopatológicas severas foram observadas em Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) expostos a concentrações de 3000 e 5000 µg AFB₁/kg por sete semanas (ZYCHOWSKI et al., 2013).

Huang et al. (2014) não observaram alterações histopatológicas em fígado de carpas gibel (*Carassius auratus gibelio*) expostas a 22,3 e 1646,5 µg AFB₁/kg por 24 semanas.

Devido às múltiplas funções metabólicas do fígado, existe uma ampla gama de causas que danificam este órgão, podendo trazer sérios problemas ao metabolismo do peixe (ROBERTS; RODGER, 2012). A suscetibilidade dos peixes a agentes tóxicos deve-se ao fluxo sanguíneo relativamente lento comparado ao débito cardíaco. A taxa de fluxo biliar nos peixes é 50 vezes menor que nos mamíferos, situação que também contribui para suscetibilidade aos efeitos prejudiciais por xenobióticos. A depuração destas substâncias e metabólitos no fígado é mais lenta em peixes do que nos mamíferos (GINGERICH, 1982 apud ROBERTS; RODGER, 2012¹⁰).

¹⁰GINGERICH, W. H. Hepatic toxicology of fishes. In: Weber, L. F (Ed.). **Aquatic Toxicology**, Plenum Press, New York, p. 55 – 105, 1982.

6. CONCLUSÕES

A presença de aflatoxinas na ração afeta negativamente o desempenho do matrinxã (*Brycon cephalus*), tornando-o uma espécie suscetível neste aspecto.

Matrinxãs expostos por seis meses às concentrações de 10, 20 e 50 µg AFB₁/kg apresentaram pouca ou nenhuma deposição de AFB₁ nas partes comestíveis, por tanto, não representam risco à saúde do consumidor.

A presença de AFB₁ nos peixes causou alterações no tecido hepático, como degeneração gordurosa e hidrópica, células mortas ou em processo de morte, assim como desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos.

O presente trabalho contribui para o estabelecimento de limites mais específicos de aflatoxinas para diferentes espécies de peixes, considerando-se a suscetibilidade diferencial entre elas às aflatoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAMID, A. M.; KHALIL, F. F.; RAGAB, M. A. Problem of mycotoxins in fish production. **Egyptian Journal of Nutrition and Feeds**, Cairo, v. 1, p.63 – 71, 1998.

ABDELHAMID, A.M. et al. An attempt to alleviate aflatoxicosis on Nile tilapia fish by dietary supplementations with chicken-hatchery by-products (egg shells) and shrimp processing wastes (shrimp shells). 2-On clinical, blood and histological parameters. **Journal of Agricultural Science, Mansoura University**, Mansoura, v. 29, p. 6175 – 6196, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RDC nº 07 de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção I, n. 37, p. 72 – 73.

_____. Resolução RDC nº 138 de 08 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 fev. 2017. Seção I, n. 40, p. 74.

AGUIAR, L. H. et al. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, Maryland Heights, v. 95, p. 224 – 230, 2004.

ALBERTS J. F. et al. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v. 109, p.121 – 126, 2006.

ALMEIDA, I. F. M. et al. Mycobiota and aflatoxina B1 in feed for farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Toxins**, Basel, v. 3, p. 163 – 171, 2011.

ANATER, A. et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 451, p. 1 – 10, 2016.

ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 37, p. 120 – 126, 2016.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALOSSO, D. M.; FIM, J. D. I. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa v. 31, n. 3, p.1059 – 1069, 2002.

AVILES, I. M. et al. Hematological responses of the neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Philadelphia, v. 139, p. 135 – 139, 2004a.

AVILES, I. M. et al. Acute toxicity of nitrite to matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869), (Teleostei-Characidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1753 – 1756, 2004b.

AVILES, I. M. **Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix & Agassiz, 1829, Characidae) exposto ao fenol**. Tese. Universidade Federal de São Carlos, p. 73 – 76, 2008.

AVILES, I. M. et al. Effect of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei-Characidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Philadelphia, v. 148, p. 136 – 142, 2008.

AVILES, I. M. et al. Metabolic responses of matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), exposed to environmental nitrite. **Aquaculture Research**, Chinchester, v. 44, p. 596 – 603, 2013.

AYYAT, M. S. et al. Effect of some safe feed additives on growth performance, blood biochemistry, and bioaccumulation of aflatoxin residues of Nile tilapia fed aflatoxin-B₁ contaminated diet. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 495, p. 27 – 34, 2018.

BAPTISTA, A. S. et al. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, Curitiba, n.1, p.1 – 14, 2004.

BARBOSA, B. T. S. et al. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. **International Aquatic Research**, Heidelberg, v. 5, n. 3, p. 2 – 9, 2013.

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

BOONYARATPALI, 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**, Chinchester, v.32, p.388 – 398, 2001.

BOTERO-TORO, A.; LONDOÑO-SANIN, M.; NAVAS, M. C. Epidemiología y factores de riesgo de carcinoma hepatocelular. **IATREIA**, Medellín, v. 20, n. 1, p. 64 – 73, 2007.

BRANDÃO, F. R., et al. Densidade de estocagem durante a recria do matrinxã em tanque-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n.3, p.299 – 303, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07 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.

CAGUAN, A. G. et al. Effect of aflatoxin-contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). In: REMEDIOS, R. B.; IMIR, G. C.; FITZSIMONS, K. (Eds.). **Proceeding of the 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture**, Manila, p. 172 – 178, 2004.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n. 3, p. 319 – 323, 2002.

- CALORI-DOMINGUES, M. A. et al. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 181 – 185, 2007.
- CAMARGOS, S. M. et al. Fumonisin in corn cultivars in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 225 – 229, 2000.
- CAMPOS DA ROCHA, C. M. et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.4 – 6, 2013.
- CARDOSO-FILHO, F. C. **Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil**. Dissertação. Universidade Federal do Piauí. p. 33, 2011.
- CARDOSO-FILHO, F.C. et al. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 14, n. 3, p. 305 – 311, 2013.
- CANADIAN MEDICAL ASSOCIATION – CMA. Transaminases. **Journal of Canadian Medical Association**, v. 76, p. 775, 1957.
- CARVAJAL, M. Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB₁-ADN. **TIP: Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, Ciudad de México, v. 16, n. 2, p. 109 – 120, 2013.
- CARVALHO, E. S. Respostas fisiológicas e de desempenho de matrinxãs (*Brycon amazonicus*) criadas em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. **Embrapa Amazônia Ocidental – Documentos 50**, Manaus, p. 59, 2006.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021 – 1030, 2009.
- CHÁVEZ-SÁNCHEZ, M. C.; MARTÍNEZ-PALACIOS, C. A.; OSORIO-MORENO, I. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B₁. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 127, p. 49 – 60, 1994.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY – CAST. **Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems**, Ames, Task Force Report, n. 139, p. 136 – 142, 2003.
- CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Editora UFSM, Santa Maria, cap. 1, p. 24; 27; 32, 2005.
- 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.

EIZENDEHER, L.B.; FREITAS, R.J.S.; CANÇADO, R.A. Incidência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em doces de amendoim e amendoim in natura comercializados no Estado do Paraná. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 101 – 104, 2005.

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

ERKMEN, O.; BOZOGLU, T. F. **Food Microbiology: Principles into practice**. First Edition, John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, p. 193, 2016.

EUROPEAN COMMISSION – EC. Directive (EC) n° 100/2003 of 31 october 2003. Undesirable substances in animal feed. **Official Journal of the European Union**, Luxembourg, 01 nov. 2003, p. 285/33 – 37.

EUROPEAN COMMISSION – EC. Commission Regulation (EC) n° 1881/2006, of 19 december 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, Luxembourg, 20 dec. 2006, p. 364/5-365/24.

FINK-GREMMEIS, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, Oxford, v. 21, p. 115 – 120, 1999.

FONSECA, H. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região araraquarense, do estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 23, p. 7 – 19, 1975.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003**, Roma, 2004.

_____. **El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura: Oportunidades y Desafíos**, Roma, 2014.

_____. **FAO Yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics 2014**, Roma, 2016.

_____. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the sustainable development goals**, Roma, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Action levels for aflatoxins in animal feeds. **Compliance Policy Guides, Chapter 6: Veterinary Medicine, Subchapter 600: Animal feed, Section 683.100**. 2015. Disponível em: <<https://www.fda.gov/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm074703.htm>>. Acesso em: 12. fevereiro. 2018.

FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 1 – 5, 2001.

GADELHA, E. S.; ARAÚJO, J. C. Criação de Matrinxã em cativeiro. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 5, ed. 228, art. 1507, 2013.

GALLAGHER, E. P.; EATON, D. In vitro biotransformation of aflatoxin B₁ (AFB₁) in channel catfish liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Maryland Heights, v. 132, p. 82 – 90, 1995.

GILBERT, J. Regulatory aspects of mycotoxins in the European community and USA. In: CHAMP, B. R.; HIGHLEY, E.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. (Eds.), **Fungi and mycotoxins in stored products ACIAR Proceedings**, v. 36, p. 194 – 197, 1991.

GIMENO, A., MARTINS, M.L. **Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos**. 3º Edición, Special Nutrients Inc., Miami, FL, 2011.

GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Editora UFSM, Santa Maria, cap. 7, p. 149 – 150; 157 – 164, 2005.

GOMPERTZ, O. F. et al. Características gerais dos fungos. **Microbiologia**. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, p. 760, 2008.

GONÇALEZ, E. et al. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 435 – 438, 2005.

GONÇALEZ, E. et al. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, p. 184 – 190, 2008.

GONÇALVES, R. A. et al. Aflatoxin B₁ (AFB₁) reduces growth performance, physiological response, and disease resistance in Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*). **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 26, p. 921 – 936, 2018.

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

GUIMARÃES, S. F.; STORTI FILHO, A. Preliminary observations on the effect of sudden changes of temperature on survival of young matrinxã (*Brycon cephalus*) under laboratory conditions. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 4, p. 719 – 722, 2003.

HAMILTON, P. Problems with mycotoxins persist, but can be lived with. **Feedstuffs**, Bloomington, v. 62, p. 22 – 23, 1990.

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

HESELTIME, C. W. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods feeds. In: RODRICKS, J. V. (Ed.), **Mycotoxins other fungal related foods problems**, American Chemical Society, Washington, v. 149, p. 1 – 22, 1976.

HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Produção comercial de alevinos de matrinxã na Amazônia ocidental. **Embrapa Amazonia Ocidental, circular técnica 33**, Manaus, 2009.

HORI, T. S.F. et al. Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Philadelphia, v. 147, p. 416 – 423, 2008.

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

HUANG, Y. et al. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B1. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 319, n. 2, p. 89 – 97, 2011.

HUANG, Y. et al. Effect of dietary aflatoxin B1 on growth, fecundity and tissue accumulation in gibel carp during the stage of gonad development. **Aquaculture**, Amsterdam, n.428-429, p.236 – 242, 2014.

IAMANAKA, B. T. et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. **Food Control**, Oxford, v.18, p. 454 – 457, 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **Improving public health through mycotoxin control**. World Health Organization, Lyon, IARC Scientific Publication, n. 158, 2012a.

_____. **Chemical agents and related occupations: A review of human carcinogens**. World Health Organization, Lyon, IARC Monographs, v. 100F, p. 225 – 248, 2012b.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2013**, Rio de Janeiro, v. 41, p.34, 2014.

_____. **Produção da Pecuária Municipal 2014**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 23, 2015.

_____. **Produção da Pecuária Municipal 2015**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 33, 2016.

_____. **Produção da Pecuária Municipal 2016**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 34, 2017.

_____. **Produção da Pecuária Municipal 2015 e 2016**. Tabelas 4 e 5. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 27/agosto/2018.

IZEL, A.C.U.; PERIN, R.; MELO, L.A.S. Desempenho de matrinxã *Brycon cephalus* submetidos a dietas com diferentes níveis proteicos na Amazônia Central. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Fortaleza, p.258 – 259, 1996.

IZEL, A. C. U.; MELO, L. A. S. Criar matrinxã: atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense. **Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos 31**, Manaus, p.22, 2004.

IZEL, A. C. U. et al. Avaliação de níveis proteicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p.179 – 184, 2004.

JANTRAROTAI, W., LOVELL, B. T. Subchronic toxicity of aflatoxina B1 to channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, New York, v. 2, p.248 – 275, 1991.

KING, B. Outbreak of ergotism in Wollo, Ethiopia. **The Lancet**, Londres, June 30, p. 1411, 1979.

LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S. A.; SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade e São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 32 – 35, 2006.

LANDINES, M.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, D. Estrategias de alimentación para cachama y yamú a partir de prácticas de restricción de alimentación. **Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – Universidad Nacional de Colombia – Acuíoriente**, Bogotá D.C., 2011

LEITE, R.G., ARAUJO-LIMA, C.A.R.M. Feeding of the *Brycon cephalus*, *Triportheus elongatus* and *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes, Characiformes) larvae in Solimões/Amazonas river and floodplain areas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 32, n. 3, p. 499-515, 2002.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: REIS, R. E.; KULANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (Orgs). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDPURCS, Porto Alegre, p. 174 – 181, 2003.

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.

LOPES, P. R. S. et al. Efeitos das aflatoxinas sobre os parâmetros eritrocitários de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 17, n.1, p. 1 – 13, 2010.

LUMBERTDACHA, S. et al. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 130, p. 201 – 218, 1995.

MACHINSKI, M. JR. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 81, p. 1001 – 1007, 2001.

MALLMANN, C. A. et al. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 41 – 45, 2001

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 60, p. 218 – 237, 2013.

MARQUES, N. R. et al. Influência da densidade de estocagem no cultivo de alevinos de matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em condições experimentais. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 55 – 59, 2004.

- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89 – 99, 2010.
- MELO, K. S. G. **Extração e uso de corantes vegetais da Amazônia no tingimento do couro de Matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix e Agassiz, 1819)**. Dissertação. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, p. 79, 2007.
- MICHELIN, E. C. et al. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 34, n. 2, p. 265 – 272, 2017.
- MOHAPATRA, S et al. Haemato-immunology and histo-architectural changes in *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary aflatoxin and mould inhibitor. **Fish Physiology & Biochemistry**, Dordrecht, v. 37, p. 177 – 186, 2011.
- MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes – Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 18, p. 1 – 58, 2012.
- MORAES, G. et al. Biochemical effects of environmental nitrite in matrinxã (*Brycon cephalus*). In: Aquatic Toxicology: Mechanisms and Consequences. **International Congress on the Biology of Fish. Symposium Proceedings**, Vancouver, p. 15 – 26, 2002.
- MUÑOZ, A. E. P. et al. Aquicultura: atividade em ascensão. **Boletim Ativos da Aquicultura**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) e Embrapa Pesca e Aquicultura, Brasília, 1º edição, p.1 – 4, 2015.
- MUÑOZ, A. E. P.; FLORES, R. M. V.; PEDROZA FILHO, M. X. Perfil da produção aquícola do Brasil. **Anais 53º Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER): Agropecuária, Meio Ambiente e Desenvolvimento**, João Pessoa, 2015.
- MURCIA-RODRÍGUEZ, H. W. Micotoxinas y aflatoxina B₁, un problema en salud animal. **Revista Teoría y Praxis Investigativa**, Bogotá DC, v. 5, n. 2, p. 71 – 78, 2010.
- MURPHY, P.A. et al. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.71, n.5, p.51 – 65, 2006.
- MURRAY R. K. Metabolismo de xenobióticos. In: MURRAY, R. K; GRANER, D. K; MAYES, P. A; RODWELL, V. W. (Eds.). **Harper: Bioquímica**. 8 ed. Atheneu Editora São Paulo Ltda, São Paulo. p. 750, 1998.
- NIERMAN, W. C. et al. Mycotoxin production and prevention of aflatoxin contamination in food and feed. In: GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. **The aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods**, CRC Press, Boca Raton, cap. 27, p.457 – 472, 2008.

NGETHE, S.; HORSBERG, T. E.; INGEBRIGTSEN, K. The disposition of 3H-aflatoxin B, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after oral and intravenous administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 108, p.323 – 332, 1992.

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

NUNES, I. et al. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190 – 164, 2003.

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

OLIVEIRA, A. Q.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E. Survey of deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol and T2 toxin in popcorn hybrids panted in the state of São Paulo and in popcorn commercialized in the city of Campinas, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 330 – 333, 2001.

OLIVEIRA, C. A. F.; FERRAZ, J. C. O. Occurrence of aflatoxina M1 in pasteurized, UHT milk and milk powder from goat origin. **Food Control**, Oxford, v. 18, p. 375 – 378, 2007.

OLIVEIRA, F. et al. Principais micotoxinas que afetam a produção de alimentos. **Revista de Agronomia e Medicina Veterinária IDEAU (RAMVI)**, Getúlio Vargas, v. 2, n. 3, p. 1 – 12, 2015.

OLORUNFEMI, M. F. et al. Multi-mycotoxin contaminations in fish feeds from different agro-ecological zones in Nigeria. In: Conference Tropentag 2013 International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development, **Annals Agricultural Development within the Rural–Urban Continuum**, Stuttgart-Hohenheim, 2013.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – OPS. Criterios de la salud ambiental 11: Micotoxinas. **Publicación científica 453**, Organización mundial de la salud – OMS, Washington, 1983.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1190 – 1198, 2008.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, Ginebra, v. 77, n. 9, p. 754 – 766, 1999.

PIER, A. C.; RICHARD, J.L.; CYSEWSKI, S. J. Implications of mycotoxins in animal disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 176, p. 719 – 724, 1980.

- PLAKAS, S. M. et al. Tissue disposition and excretion of ^{14}C -labelled aflatoxin B₁ after oral administration in channel catfish. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 805 – 808, 1991.
- PRADO, G. et al. Aflatoxin M1 in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte – Minas Gerais/ Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 398 – 400, 2000a
- PRADO, G. et al. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 20, n. 2, p. 192 – 196, 2000b
- RAGHAVAN, P. R. et al. Low levels of aflatoxin B₁ could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♂ X *A. baeri* ♀. **Aquaculture Nutrition**, Chinchester, v. 17, p. e39 – e47, 2011.
- RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE JR, R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, London, v. 89, p.325 – 331, 2010.
- REIMER, G. The influence of diet on the digestive enzymes of the Amazon fish Matrinchã, *Brycon cf. melanopterus*. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 21, p.637 – 642, 1982.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771 – 180, 2004.
- RIBEIRO, S. C. A.; TOBINAGA, S. Avaliação sensorial de filés de matrinxã (*Brycon cephalus*) processados por métodos combinados. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, João Pessoa, v. 4, n. 2, p. 101 – 106, 2002.
- RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 3 – 10, 2007.
- ROBERTS, R. J.; RODGER, H. D. The Pathophysiology and Systematic Pathology of Teleosts. In: ROBERTS, R. J. (Ed.). **Fish Pathology**, Fourth Edition, John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, p. 100 – 105, 2012.
- ROCHA, M. E. B. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, Oxford, v. 36, p. 159 – 165, 2014.
- SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Immunosuppressive effects of aflatoxin B₁ in Indian major carp (*Labeo rohita*). **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Londres, v. 24, p. 143 – 149, 2001.
- SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B₁- immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Londres, v. 26, p. 65 – 76, 2003.

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

SANTOS, V. R. V. et al. O matrinxã como alternativa para enlatamento: Avaliação da aceitação e da intenção de compra. **Embrapa Pesca e Aquicultura – Documentos 12**, Palmas, p. 20, 2015.

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

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT® 9.3 User's Guide: the MIXED Procedure**. Cary NC: SAS Institute Inc., 2011.

SCHOENTAL, R. Mycotoxins and the bible. **Perspectives in Biology and Medicine**, Baltimore, v. 28, n. 1, p. 117 – 120, 1984.

SEKIYAMA, B. L. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 289 – 294, 2005.

SELIM, K. M.; EL-HOFY, H.; KHALIL, R. H. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B₁-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 22, p. 523 – 540, 2014.

SEPAHDARI, A. et al. Effects of different dietary levels of AFB₁ on survival rate and growth factors of Beluga (*Huso huso*). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Tehran, v. 9, p. 141 – 150, 2010.

SHOTWELL, O. L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 14, n. 3, p. 425 – 428, 1966.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 421 – 463, 2012a.

SIDONIO, L. et al. Experiências internacionais aquícolas e oportunidades de desenvolvimento da aquicultura no Brasil: proposta de inserção do BNDES **Setorial**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 170 – 218, 2012b.

SILVA, A. P. et al. Criação intensiva de matrinxã em tanques de terra na região Centro-Oeste. **Revista Eletrônica Interdisciplinar – UNIVAR**, v. 14, n. 2, p. 55 – 60, 2015.

SILVA, C. D. M. et al. Avaliação sensorial de matrinxã (*Brycon amazonicus*) enlatada com cobertura de óleo vegetal. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v. 3, n. 3, p. 161 – 169, 2016.

SORIANO DEL CASTILLO, J. M. **Micotoxinas en alimentos**. Ed. Diaz de Santos, España, p. 3 e 17, 2007

TUAN, A. N. et al. Growth and hepatic lesions of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B1. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, p.311 – 319, 2002.

THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1ª edição. Ed. Roca Ltda, São Paulo, p. 335 – 387, 2007.

VAN EGMOND, H. P. Regulatory aspects of mycotoxins in Asia and Africa. In: CHAMP, B. R.; HIGHLEY, E.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. (Eds.), **Fungi and mycotoxins in stored products ACIAR Proceedings**, v. 36, p. 198 – 204, 1991.

VARIOR, S., PHILIP, B. Aflatoxin B1 induced alterations in the stability of the lysosomal membrane in *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852). **Aquaculture Research**, Chinchester, v. 43, n. 8, p. 1170 – 1175, 2012.

VIEIRA, V. L. P. et al. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 49 – 55, 2006.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, Amsterdam, v. 15, p. 129 – 144, 2011.

ZANIBONI FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género Brycon en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p.233 – 240, 2006.

ZYCHOWSKI, K. E. et al. The effect of aflatoxin-B₁ on Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of novasil for the prevention of aflatoxicosis. **Toxins**, Basel, v. 5, p. 1555 – 1573, 2013.