UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

EUDER CESAR MICHELIN

**Efeitos da exposição crônica a aflatoxinas na dieta em peixes
Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

Pirassununga

2020

EUDER CESAR MICHELIN

**Efeitos da exposição crônica a aflatoxinas na dieta em peixes
Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

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: Ciência da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrezza Maria Fernandes

Pirassununga

2020

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

M86 Michelin, Euder Cesar
 Efeitos da exposição crônica a aflatoxinas na
 dieta em peixes Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) /
 Euder Cesar Michelin ; orientadora Profa. Dra.
 Andreza Maria Fernandes. -- Pirassununga, 2020.
 89 f.

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

 1. AFB1.. 2. Aquicultura.. 3. Micotoxinas.. 4.
 Desempenho. 5. Resíduos. I. Fernandes, Profa. Dra.
 Andreza Maria , orient. II. Título.

EUDER CESAR MICHELIN

**Efeitos da exposição crônica a aflatoxinas na dieta em peixes
Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

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: Ciência da Engenharia de Alimentos.

Data da Aprovação ____ / ____ / ____

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:

Dedicatória

*A DEUS
PELO DOM DA VIDA QUE É
A MAIOR VIAGEM DE TODAS.*

A MINHA FAMÍLIA PELO TOTAL APOIO, SEM ELES NÃO SERIA POSSÍVEL

*A MINHA ESPOSA,
SEM SEU AMOR E APOIO SERIA IMPOSSÍVEL*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo exemplo, amor incondicional por minha vida e pelo esforço imensurável para moldar meu caráter e educar a mim e minha irmã com valores morais.

À minha esposa Juliana Baldin pela compreensão nos momentos em que precisei.

Aos amigos do laboratório Marina, Marisa, Samara, Marcelo, Carolina, Anna e Lucas pelo convívio, compartilhando parte de seu tempo e conhecimento me ensinando tudo que precisava.

À Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes pelo acolhimento, pelo aceite de orientação, pela oportunidade de convívio e aprendizado diário, pelo exemplo e inspiração profissionais e pela paciência que sempre teve comigo.

À técnica de laboratório, Silvia H. S. Godoy pelo excelente auxílio, pela paciência e pelos conselhos.

Aos pesquisadores Cesar G. Lima, Paulo S. Ceccarelli, George S. Yasui, George E. Rottinghaus e Ricardo L. M. Sousa pela ajuda e atenção durante o projeto.

Aos pesquisadores e alunos do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental por sempre atenderem prontamente quando necessitamos de ajuda.

Aos funcionários da Biblioteca da FZEA pela ajuda e contribuição na Tese.

À todos os Professores e funcionários da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pelos ensinamentos durante toda caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pela verba para o referido projeto “Avaliação da transferência de aflatoxinas da ração para espécies comerciais de pescado de cultivo e ocorrência de aflatoxinas em pisciculturas do Estado de São Paulo”, sem a qual não teria sido possível seu desenvolvimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a qual permitiu desenvolver este projeto de Doutorado.

*“A MENTE QUE SE ABRE A UMA NOVA IDEIA JAMAIS VOLTARÁ AO
SEU TAMANHO ORIGINAL”*

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

MICHELIN, E. C. **Efeitos da exposição crônica a aflatoxinas na dieta em peixes Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2018. 89 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

O objetivo deste trabalho foi estudar a transferência de aflatoxinas da ração para os tecidos do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), avaliando a influência dos níveis de toxina na ração sobre o desempenho e parâmetros fisiológicos dos peixes. As aflatoxinas foram incorporadas à ração extrusada para Pacus sendo que as concentrações foram confirmadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O delineamento experimental compreendeu os seguintes tratamentos: Tratamento Controle - ração sem toxina; Tratamento A: ração extrusada + 10 µg AFB₁/kg; Tratamento B: ração extrusada + 20 µg AFB₁/kg e Tratamento C: ração extrusada + 50 µg AFB₁/kg. Os animais juvenis de Pacu foram alocados em tanques com densidade de um peixe por litro. O experimento foi realizado por 180 dias com amostragens mensais, sendo que aproximadamente dez peixes por tratamento foram utilizados para compor uma amostra. A cada 30 dias foram realizados levantamentos biométricos, incluindo peso e comprimento padrão, além de análises de bioquímica sanguínea e histologia do fígado. Também foram obtidos dados de taxa de sobrevivência. A determinação de aflatoxinas foi realizada por CLAE em músculo e fígado. Os resultados demonstraram deposição de AFB₁ no fígado ao longo do experimento em todos os tratamentos, mas apenas o tratamento C diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos demais a partir dos 150 dias, enquanto que no tecido muscular houve baixa deposição residual. Os peixes expostos cronicamente tiveram interferência negativa no peso e tamanho. A AFB₁ na dieta causou alterações no tecido hepático, como degeneração gordurosa e hidrópica, células mortas ou em processo de morte. Na análise bioquímica, as alterações foram discretas. Pode-se concluir que o Pacu não está entre as espécies de peixes mais suscetíveis a resíduos de aflatoxinas em seus tecidos. No entanto, a exposição crônica às aflatoxinas na dieta pode afetar a fisiologia e desempenho da espécie.

Palavras chave: AFB₁. Aquicultura. Desempenho. Fisiologia. Micotoxinas. Resíduos.

ABSTRACT

MICHELIN, E. C. **Effects of chronic exposure to aflatoxins in diet on Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2020. 89 f. Thesis (PhD) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2018.

The objective of this work was to study the bioretention of various levels of aflatoxins from the diet to Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tissues, and the effects on performance and physiological parameters. Aflatoxins were incorporated into the extruded Pacu feed and the concentrations were confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC). The experimental design comprised the following treatments: Control Treatment - feed without toxin; Treatment A: extruded feed + 10 µg AFB₁/ kg; Treatment B: extruded feed + 20 µg AFB₁/ kg and Treatment C: extruded feed + 50 µg AFB₁/ kg. juveniles Pacu (13,49 g BW and 8,35 cm SL) animals were allocated in tanks at density of one fish per liter. The experiment was carried out for 180 days with monthly sampling, and approximately ten fish per treatment were used to compose a sample. Body weight and standard length were measured at 30- days intervals, in addition of blood biochemistry and liver histology analysis were performed. Data on survival rate were also obtained. Aflatoxins were determined in muscle and liver by HPLC. Results showed AFB₁ deposition in the liver throughout the experiment in all treatments, but only treatment C differed significantly ($p < 0.05$) from the others after 150 days, while in muscle tissue there was low residual deposition. Chronically exposed fish had negative influence in weight and size. Dietary AFB₁ caused changes in liver tissue, such as fatty and hydropic degeneration, dead or dying cells. Regarding the biochemical analysis, the changes were discreet. It can be concluded that Pacu is not among the most susceptible fish species to aflatoxins residues in tissues. However, the chronic exposure to dietary aflatoxins may affect the physiology and performance and subsequent performance.

Keywords: AFB₁. Aquaculture. Performance. Physiology. Mycotoxins. Residues.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pacu – (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	22
Figura 2 - Estrutura química das principais aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	27
Figura 3 - Contaminação de aflatoxina nos grãos e várias etapas da.....	31
Figura 4 - Placa com inóculo de cepa padrão de <i>Aspergillus parasiticus</i>	38
Figura 5 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de secagem	39
Figura 6 - Fixação do fígado de uma unidade experimental em solução de Bouin.	47
Figura 7 - Curvas de calibração do HPLC obtidas para as soluções padrão de (a) AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ para ração.	49
Figura 8 - Curvas de calibração para o fígado e músculo obtido para as soluções padrão de (a) AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	50
Figura 9 - Cromatograma obtido para o padrão de aflatoxinas contendo 20 µg/L.	51
Figura 10 - Frequência de ocorrência de degeneração gordurosa em fígado de Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	73
Figura 11 - Fotomicrografia de fígado de Pacu.	74
Figura 12 - Fotomicrografia de fígado de Pacu.	74
Figura 13 - Fotomicrografia de fígado de Pacu.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação da dieta experimental ração comercial extrusada para peixes tropicais (Laguna Peixes Brasileiros – Ocialis, Invivo).....	41
Tabela 2 – Percentuais de recuperação e coeficientes de variação de análise de aflatoxinas em amostras de ração para peixes.	52
Tabela 3 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.	53
Tabela 4 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação da análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de Pacu.....	54
Tabela 5 - Níveis médios de aflatoxinas obtidas nas dietas experimentais utilizadas.	55
Tabela 6 - Parâmetros limnológicos da água aferidos no experimento da espécie Pacu.	56
Tabela 7 - Deposição de aflatoxina B ₁ no fígado de Pacu ao longo do período experimental.....	57
Tabela 8 - Deposição de aflatoxina B ₁ no músculo de Pacu ao longo do período experimental.....	59
Tabela 9 - Tamanho do Pacu (cm) durante o período experimental.	61
Tabela 10- Peso do Pacu (g) durante o período experimental.	62
Tabela 11 - Resultados referentes à enzima Aspartato Aminotransferase (AST) em sangue de Pacu.	65
Tabela 12 - Resultados referentes à enzima Fosfatase Alcalina no Pacu.	66
Tabela 13 - Resultados referentes às Proteínas Totais no Pacu.	67
Tabela 14 - Resultados referentes à Albumina no Pacu.	68
Tabela 15 - Resultados referentes às Globulinas no Pacu.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α : Alfa
%: Porcentagem
°C: Grau Celsius
 μg : Migrograma
 μL : Microlitro
 μm : Micrômetro
Aa: Atividade de água
AFB₁: Aflatoxina B₁
AFB₂: Aflatoxina B₂
AFG₁: Aflatoxina G₁
AFG₂: Aflatoxina G₂
AFLs: Aflatoxinas
AFM₁: Aflatoxina M₁
AFB: Aflatoxina P₁
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIA: Coluna de Imunoafinidade
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CAST: Conselho de Ciência e Tecnologia Agrícola
DON: Desoxinivalenol
EST: Esterigmatocistina
EUA: Estados Unidos da América
FAO – FIGIS: *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries Global Information System*
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FB₁: Fumonisina B₁
FBs: Fumonisinias B
FUMO: Fumonisina
g: Grama
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
IARC: *International Agency for Research on Cancer*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia
kg: Quilograma

LD50: Dose letal

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

Máx: Máximo

Min: Minuto

Mín: Mínimo

ND: Não detectado

NRRL: Northern Regional Research Lab - Laboratório de Pesquisa Regional do Norte

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

UE: União Europeia

USDA: United States Department of Agriculture

M: Molar

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg: Miligrama

min: Minuto

nm: Nanômetro

ONU: Organização das Nações Unidas

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPA: O-ftaldialdeído

OPS: Organização Panamericana da Saúde

OTA: Ocratoxina A

PT: Proteína total

Ppb: Partes por Bilhão

Ppm: Partes por milhão

Rpm: Rotação por Minuto

SAS: Statistical Analysis System

TFA: Trifluoroacetic acid

ZEA: Zearalenona

SUMÁRIO

1 COMITÊ DE ÉTICA	16
2 INTRODUÇÃO	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Piscicultura no Brasil e no mundo	20
3.2 Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	21
3.3 Aflatoxinas	24
3.3.1 Efeitos e prejuízos das aflatoxinas nos animais de produção e nos seres humanos	28
3.3.2 Aflatoxinas em rações para peixes	34
3.4 Regulamentação e vigilância de aflatoxinas em alimentos	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos Específicos	37
4.3 Hipótese	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 Produção de Aflatoxinas em Material de Cultura	38
5.2 Dietas experimentais	39
5.3 Condições experimentais e amostragem	42
5.4 Determinação de aflatoxinas	43
5.4.1 Determinação de aflatoxinas em amostras de ração	43
5.4.2 Determinação de aflatoxinas em amostras de fígado	44
5.4.3 Determinação de aflatoxinas em amostras de músculo	45
5.5 Análises bioquímicas	46
5.6 Análises histopatológicas	46

5.7 Avaliação dos índices de produtividade e desempenho dos peixes_	48
5.8 Análise dos resultados _____	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	48
6.1 Avaliação do desempenho do método analítico _____	48
6.1.1 Curvas de calibração para análise de aflatoxinas em ração _____	48
6.1.2 Curvas de calibração para análise de aflatoxinas em fígado e músculo	49
6.2 Dietas Experimentais _____	54
6.3 Parâmetros limnológicos da água _____	55
6.4 Resíduos de AFB₁ no fígado e músculo _____	56
6.5 Desempenho dos peixes _____	60
6.6 Parâmetros bioquímicos hepáticos _____	64
6.7 Histopatologia do fígado _____	71
7 CONCLUSÕES _____	76
REFERÊNCIAS _____	77

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.

2 INTRODUÇÃO

Segundo a Food and Agriculture Organization - FAO (1996), a segurança do alimento é alcançada quando os pilares alimentares, incluindo a disponibilidade, o acesso, a utilização dos alimentos e a estabilidade alimentar estão em níveis que permitam a toda população ter acesso físico e econômico a produtos acessíveis, seguros e nutritivos para atender pré-requisitos para uma vida digna e saudável. Sendo assim, a segurança do alimento é uma questão importante a nível mundial. Já a sua ausência, juntamente com a desnutrição, além de influenciar a saúde humana e o bem-estar, afetam também aspectos sociais, econômicos e políticos da sociedade, e uma das questões desse problema é a contaminação dos alimentos, presente desde a produção até a mesa do consumidor (UDOMKUN et al., 2017).

Em 2019, a produção mundial de pescado atingiu 172,6 milhões de toneladas, sendo que 66,6% dessa produção foram de peixes, desse total 89% destinou-se para o consumo humano e 11% para produção de produtos não comestíveis (tais como as farinhas de pescado). Aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas consomem cerca de 20% da ingestão média de proteína animal oriundas do pescado (FAO, 2019).

Das espécies de peixes produzidos no Brasil o cultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*, *O. aureus* e *O. mossambicus*) é o que mais apresentou destaque, seguida de outras espécies nativas como Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e híbridos da subfamília *Myleinae* - tambacu e tambatinga (PEIXE BR, 2019). No Brasil, a piscicultura apresentou aumento de 392,49 mil toneladas em 2013 para 483,24 mil toneladas de pescado em 2015 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2016). A produção brasileira apresentou aumento de 4,4% em 2016, se posicionando na oitava colocação mundial com uma produção de 507,1 mil toneladas de pescado (FAO, 2018; IBGE, 2017).

Por possuir condições climáticas favoráveis para o cultivo de peixes tropicais, o Brasil é um grande produtor no setor de piscicultura e esta é uma das atividades econômicas de grande importância no país (BRYDEN, 2012).

Com relação ao consumo de peixes, o Pacu está entre os mais consumidos no Brasil o *Piaractus mesopotamicus*, conhecido como Pacu,

espécie cultivada em países da América do Sul como Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina, e utilizada também para produção de híbridos como tambacu (Tambaqui x Pacu) e patinga (Pacu x Pirapitinga). É um peixe de carne firme, ótimo sabor e grande importância comercial. Apresenta também bom ganho de peso e é um peixe considerado rústico, adaptando-se facilmente aos ecossistemas aquaculturais (CASTAGNOLLI, 1992). A produção de Pacu e patinga, no ano de 2014, foi de 13 mil toneladas, ficando em sexto lugar na produção nacional (IBGE, 2016).

Com o aumento na produção de peixes, houve também o aumento no consumo de ração, sendo que esta fornece nutricionalmente suporte ao crescimento, manutenção, desempenho reprodutivo e qualidade da carne. Assim, com maior produção e consumo de produtos como cereais e grãos, considerados os principais ingredientes das rações oferecidas aos peixes, tornou-se uma preocupação crescente devido à possibilidade de contaminação desses ingredientes por fungos potencialmente toxigênicos e consequentemente por micotoxinas, como por exemplo, as aflatoxinas (MATEJOVA et al., 2017).

As espécies de peixes apresentam sensibilidades diferentes quanto à contaminação por micotoxinas e os resíduos dessas toxinas podem ser cumulativos nos músculos (ABDELHAMID et al., 2004). Os peixes podem sofrer desequilíbrios fisiológicos, redução do crescimento, alterações histológicas e morfológicas e caso ocorra a presença da toxina na sua musculatura isso acarreta riscos à saúde do consumidor (DENG et al., 2010; SELIM; EL-HOFY; KHALIL, 2014; PINHEIRO et al., 2015). O consumo de peixes contaminados por aflatoxinas pode causar efeitos carcinogênico, teratogênicos, hepatotóxicos, mutagênicos e imunossupressores. A exposição crônica a baixos níveis de aflatoxinas representa sério risco à saúde, sendo o fígado o principal órgão afetado (BENNETT; KLICH, 2003).

A legislação brasileira estabelece um nível máximo de aflatoxinas de 50 µg/kg na matéria-prima ou nos ingredientes utilizados para rações destinadas ao consumo animal, porém, sem diferenciar as espécies animais. Com relação aos níveis máximos de aflatoxinas para produtos de origem animal, somente é contemplada a aflatoxina M₁ em leite do tipo fluido, em pó e nos queijos (BRASIL, 1988; BRASIL, 2017). O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), somente as análises de fígado suíno e leite são

preconizadas, sendo que em pescado de cultivo somente é realizada análise de substâncias cloradas, antimicrobianos, corantes, presença de dioxinas, furanos, substâncias anabolizantes e contaminantes inorgânicas (ANVISA, 2013).

Pesquisas sobre os efeitos das aflatoxinas em diferentes espécies de peixes são escassas. Como há poucos relatos na literatura sobre diferenças de sensibilidade às micotoxinas e o acúmulo nos tecidos em peixes de importância comercial, o presente projeto teve como objetivo estudar a transferência de aflatoxinas das rações para tecidos de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), avaliando também a influência dos níveis de toxina na ração sobre o desempenho dos peixes, parâmetros fisiológicos e histopatológicos. Assim, os resultados deste trabalho poderão contribuir para discussão e adequação de níveis de tolerância para aflatoxinas na ração para animais, bem como para o consumo seguro desses peixes pelos consumidores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Piscicultura no Brasil e no mundo

A aquicultura continua a crescer mais rapidamente do que outros grandes setores de produção de alimentos (FAO, 2018a). A piscicultura e o consumo de peixes têm aumentado em todo o mundo, principalmente devido à disponibilidade, acesso e preço em relação a outros tipos de consumo de carne, como bovina, suína e de aves (OLADELE, 2014; RIJSBERMAN, 2014). Com isso, há também um aumento correspondente na produção de dietas formuladas para os animais aquáticos cultivados com o custo da alimentação na aquicultura de, podem chegar a 70% do custo de produção (NG, 2003; FAO, 2016).

A produção de pescado se divide em pesca extrativista: uma atividade baseada na retirada dos animais do seu ambiente natural; e a aquicultura: constituindo o cultivo de interesse econômico produtivo em um ambiente confinado e controlado, o qual está dividido em diferentes modalidades como a piscicultura (criação de peixes), ranicultura (rãs), malacocultura (moluscos, ostras e mexilhões), algicultura (algas), quelonicultura (tartarugas e tracajás) e jacarés (EMBRAPA, 2017).

No Brasil, os maiores produtores estão localizados na região Nordeste, participando com 26,8% da produção, com destaque para o estado do Ceará, produzindo principalmente a tilápia e o camarão marinho; seguido da região Norte participando com 25,7% da produção, destacando o estado de Rondônia, com a produção de tambaqui, pirarucu e pirapitinga e 24,2% da produção pertencente à região Sul, principalmente com os estados de Santa Catarina e Paraná, com as espécies carpa, tilápia, jundiá, ostra e mexilhão. Já a região Centro-oeste compreende apenas 12,6% da produção, destacando o estado do Mato Grosso produzindo tambaqui, Pacu e pintado, e por fim o Sudeste, com 10,7% da produção, sendo os maiores produtores os estados de São Paulo e Minas Gerais produzindo tilápia, Pacu e pintado (EMBRAPA, 2017; FAO, 2018b; IBGE, 2016).

As exportações brasileiras de peixes no ano de 2019 obtiveram uma receita de US\$ 11.983.581,00 com uma produção de 6.542 toneladas e o peixe da espécie Pacu é a quinta espécie com maior contribuição no mercado, com

1,67 toneladas e US\$ 3.591, essa espécie tem se mostrado promissora e está sendo cultivada em 14.562 localidades no Brasil (PEIXE BR, 2020). A carne de peixe é fonte essencial de proteínas e micronutrientes e representa 17% da ingestão de proteína animal no mundo, e principalmente nos países economicamente menos favorecidos a ingestão de proteína animal oriunda dos peixes contribui com 50% do total ingerido (ANATER et al., 2016; CARBONE; FAGGIO, 2016).

Até o ano de 2030, estima-se aproximadamente 62% dos peixes para consumo humano serão originários da aquicultura, e dadas as condições climáticas e o potencial hídrico. O Brasil possui potencial de protagonismo na produção aquícola, com uma produção esperada para 2030 de 20 milhões de toneladas ao ano. Entretanto, o país ainda não reflete esse potencial, 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, 2018b; IBGE, 2017). O maior produtor mundial, com mais de 45 milhões de toneladas ao ano, é a China, e na América Latina se considerarmos apenas a aquicultura, o Brasil se torna o segundo maior produtor, ficando atrás do Chile, que hoje apresenta a sexta posição de maior produtor mundial (FAO, 2018b).

Nas últimas décadas, a demanda global por proteínas derivadas do pescado tem aumentado, e esse aumento tende a ser contínuo devido à preferência por alimentos considerados saudáveis, o aumento da população e urbanização. Em vista da crescente demanda, a aquicultura deverá investir na criação da maneira mais correta e sustentável, visto que as pessoas se tornaram mais conscientes sobre as questões ambientais, passando a exigir produtos mais seguros (BACHER, 2015).

3.2 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Uma das espécies de produção em crescimento no Brasil é o *Piaractus mesopotamicus* popularmente conhecido como Pacu (Figura 1). A tilápia e os peixes redondos representam 83% da produção brasileira de peixes (IBGE, 2016). O Pacu pode ser encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai. É um peixe teleósteo com grande importância econômica e um alto valor de mercado na pesca e na piscicultura brasileira (URBINATI;

GONÇALVES, 2005), também conhecido como Pacu do pantanal, Pacu-guaçu, Pacu-caranha ou somente caranha, é uma espécie neotropical ocupando a seguinte posição sistemática:

Classe *Osteichthyes*

Subclasse *Actinopterygii*

Superordem *Ostariophysi*

Ordem *Characiforme*

Família *Characidae*

Subfamília *Myleinae*

Gênero *Piaractus*

Espécie *Piaractus*

mesopotamicus

Figura 1 - Pacu – (*Piaractus mesopotamicus*).

Fonte: Própria autoria.

Os peixes de maior valor comercial na pesca e piscicultura brasileira pertencem à superordem *Ostariophysi*. Um grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul é da ordem *Characiformes* e compreende formas herbívoras, onívoras, iliófagas e carnívoras. A família *Characidae* apresenta o maior número de espécies descritas dentro da ordem sendo a mais complexa, com grande número de subfamílias. O Pacu está incluso na subfamília *Myleinae*, representada por peixes herbívoros, preferencialmente frugívoros (URBINATI; GONÇALVES; TAKAHASHI, 2005).

O *Piaractus mesopotamicus* é um Caracideo nativo de rios, várzeas, lagos e florestas inundadas. O Pacu se tornou uma importante espécie a ser cultivada por apresentar uma taxa de crescimento rápido, fácil adaptação à alimentação artificial, alta apreciação do consumidor, bem como o seu valor ecológico e comercial (JOMORI et al., 2005; BILLER-TAKAHASHI et al., 2015). A espécie permanece naturalmente em ambientes rústicos com uma temperatura variando de 15 a 35°C, sendo a faixa ideal para cultivar a espécie de 20 e 28°C (MILSTEIN et al., 2000; URBINATI; GONÇALVES; TAKAHASHI, 2005).

Segundo Mateus et al. (2004), o Pacu é uma das principais espécies de peixes da planície do Pantanal do Mato Grosso, habitando os rios mais importantes da região como o Cuiabá, o Paraguai e o Teles Pires e grandes quantidades dessa espécie são desembarcados no mercado do porto de Cuiabá. No Pantanal Sul-Mato-Grossense essa espécie está presente em grande escala nos rios Miranda, Aquidauana e Vermelho. No entanto, Peixer e Pretere Jr. (2007) descobriram que a diminuição dos estoques desse peixe nesses rios se deve ao esforço exercido pela pesca.

No estado de São Paulo é encontrado em baixa quantidade no rio Paranapanema e grandes coleções de água como as dos rios Paraná, Mogi Guaçu, Paraíba e baixo Tietê (JOMORI et al., 2005; POVH et al., 2008; SOUZA et al., 2003). Esse peixe é importante para a aquicultura e representa uma das espécies mais cultivadas no Brasil, com produção anual estimada em cerca de 13.600 toneladas (IBGE, 2016).

Esses peixes apresentam grandes depósitos de gordura intravisceral e intramuscular, e é um dos mais calóricos em função do maior teor de lipídios totais (19,83%), e também foram determinados menores teores de ácidos graxos ômega-3 (1,13%) e ômega-6 (4,11%) no tecido muscular da espécie, que estão diretamente relacionados com a reprodução da espécie (RAMOS FILHO, 2008). Em vida livre, o desenvolvimento gonadal ocorre conforme os depósitos de gordura são consumidos com o decorrer do tempo, devido a uma restrição alimentar que se inicia junto com o período reprodutivo. Já na reprodução em cativeiro, é necessária a indução hormonal (GAZOLA; BORELA, 1997).

Devido ao seu rápido crescimento, boa adaptação e aceitação pelos consumidores essa espécie foi escolhida para o presente projeto.

3.3 Aflatoxinas

A alimentação animal e os ingredientes utilizados estão no início da cadeia alimentar, logo, ao se utilizar alimentos contaminados, ocorrerá um impacto negativo no restante dessa cadeia. Do mesmo modo, a qualidade dos alimentos empregados na alimentação desses animais afetará diretamente a produtividade animal e a sua saúde, e poderá ter efeitos desastrosos sobre os alimentos que serão utilizados como produtos finais na mesa do consumidor (CHIEWCHAN; MUJUMDAR; DEVAHASTIN, 2015).

De acordo com Shifa et al. (2016), a contaminação de alimentos ou rações por aflatoxinas é um problema mundial, sendo as regiões tropicais e subtropicais que apresentam, na maioria das vezes, temperaturas quentes e alta umidade, as de maior facilidade para o crescimento de fungos. Dessa forma, os fungos podem ser encontrados em uma variedade de alimentos, principalmente em cereais e a sua contaminação pode ocorrer no campo, no armazenamento e no transporte. Em razão disso, quando há contaminação de qualquer ingrediente, este pode contaminar o lote inteiro (LEWIS et al., 2005).

Nesse contexto, um dos problemas é a contaminação por aflatoxinas, compostos de peso molecular pequeno e produzidos principalmente, por duas espécies: *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, as quais ocorrem nas regiões mais úmidas e quentes do país (BANKOLE et al., 2010), habitualmente encontradas em alimentos fornecidos ao pescado, sendo as principais: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂) (WANG et al., 2016), as quais são compostos tóxicos que são produzidos naturalmente por certos tipos de fungos. De acordo com a International Agency for Research on Cancer - IARC (1993, 2002), as aflatoxinas são classificadas com base na sua fluorescência sob luz ultravioleta (azul ou verde) e fatores de retenção em cromatografia de camada delgada (Figura 2). A aflatoxina B₁, classificada no grupo 1, é um potente carcinógeno natural, sendo a principal aflatoxina produzida pelas cepas toxigênicas.

As AFB₁ e AFB₂ exibem fluorescência azul na luz ultravioleta, enquanto AFG₁ e AFG₂ apresentam fluorescência verde. As pertencentes a faixa de emissão da luz azul (B) são caracterizadas pela fusão de um anel de ciclopentanona ao anel de lactona da fração de cumarina, e aquelas que emitem

luz verde (G) contêm um anel de lactona fundido. As aflatoxinas B₁ e G₁ possuem uma ligação não saturada na posição 8,9 no anel de furano terminal e estudos demonstraram que a epoxidação nessa posição era crítica para a sua capacidade de causar câncer (GROOPMAN; KENSLER, 2005).

Dentre os 13 compostos até agora identificados, as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e os subprodutos metabólicos das aflatoxinas M₁ e M₂ são os mais importantes. O consumo prolongado, por extenso período, de pequenas doses desses compostos tóxicos ocasiona a chamada toxicidade crônica, sendo o fígado o principal órgão alvo dessa toxicidade, biotransformando diferentes metabólitos (DI GREGORIO et al., 2014).

Cerca de meio bilhão de pessoas, predominantemente aquelas que vivem em países em desenvolvimento, correm um risco significativo de exposição às aflatoxinas na dieta, com muitas pessoas cronicamente expostas às aflatoxinas ao longo de suas vidas (WILD; MILLER; GROOPMAN, 2015).

Os primeiros relatos de micotoxinas decorrem no século X, quando uma doença até então desconhecida afetou grande parte da população Europeia no ano de 943. Entre os principais sintomas da doença estavam: crises epiléticas, liberação de espuma pela boca, vômitos, crises de loucura e dores insuportáveis, tratava-se de um “fogo invisível” que desprendia a carne dos ossos e a consumia. Doença essa popularmente nomeada de “Fogo de Santo Antônio” uma vez que os enfermos recorriam ao santuário de Santo Antônio, localizado na França, com o intuito de obter a cura (FAO, 2003).

A detecção dessas micotoxinas, as quais são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, principalmente por espécies do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, produzidas numa grande variedade de substratos antes, durante e após a colheita de grãos e cereais, além de serem muito resistentes aos tratamentos tecnológicos também são difíceis de serem eliminadas (HAZEL; PATEL, 2004). Em rações e seus ingredientes na aquicultura ganhou destaque devido às perdas causadas na produção e na saúde animal, principalmente pela ocorrência de aflatoxinas B₁ (AFB₁). Nesse contexto, a contaminação dos alimentos para os seres humanos, bem como para os animais, por microrganismos conhecidos como fungos, os quais são produtores de micotoxinas, torna-se algo importante e de grande impacto.

Alguns relatos de contaminações são apresentados, como a farinha de semente de algodão com aflatoxinas associada a um surto de aflatoxicose em peixes truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) na década de 60 (KUMAR et al., 2013; WOLF; JACKSON, 1963). Várias espécies de peixes, tais como robalo, (*Dicentrarchus labrax* L.), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), dourada (*Sparus aurata*), híbrido juvenil esturjão (*Acipenser ruthenus* x *A. baeri*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), carpa de gibel (*Carassius auratus gibelio*) e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) foram envolvidos em pesquisas sobre a toxicidade das AFB₁ (CENTODUCATI et al., 2009; CHÁVEZ-SÁNCHEZ; PALÁCIOS; MORENO, 1994; EL-BANNA et al., 1992; EL-SAYED; KHALIL, 2009; HENDRICKS et al., 1993; HUANG et al., 2011; JANTRAROTAI; LOVELL, 1990; OLIVEIRA et al., 2013; RAJEEV RAGHAVAN et al. 2011; TUAN et al., 2002).

Para o diagnóstico da aflatoxicose nos animais é necessária a realização de testes para detecção dos efeitos bioquímicos tóxicos das aflatoxinas, que compreendem: diminuição das concentrações de proteína total, albumina, colesterol, glicose, ácido úrico, fósforo inorgânico e cálcio e aumento da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) (ROSA et al., 2001; SANTURIO et al., 1999).

As técnicas de processamento de alimentos, tais como assar, extrusar e cozinhar, não são suficientes para eliminar as aflatoxinas, que se mostraram estáveis e capazes de resistir a essas técnicas. Sendo assim, as aflatoxinas representam grande ameaça à saúde humana e dos animais e em todos os países fez-se necessário estipular limites máximos para essas toxinas em alimentos e rações animais (GARCÍA; HEREDIA, 2014).

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

Estruturas Químicas	Nome IUPAC	Efeitos na saúde	Órgão alvo	Referências
Aflatoxina B₁
(3S, 7R) -11-metoxi-6,8,19-trioxapentaciclo [10.7.0.02,9.03,7.013,17] nonadeca-1,4,9,11,13 (17) - pentaeno-16,18-diona	Hepatotóxico, carcinoma hepatocelular, mutagênico, genotóxico, teratogênico e imunossupressor	Fígado	Colakoglu (2012); Pierron (2016); Theumer et al.,2018; Di Gregorio et al. (2014); IARC (1993; 2002); Souza et al., (2018).
Aflatoxina B₂
(3S, 7R) -11-metoxi-6,8,19-trioxapentaciclo [10.7.0.02,9.03,7.013,17] nonadeca-1,9,11,13 (17) - tetraeno-16,18-diona	Hepatotóxica, imunossupressor, teratogênica, mutagênica	Fígado	Pierron (2016); Theumer et al. (2018); (Di Gregorio et al., 2014); IARC (1993; 2002); Souza et al., 2018
Aflatoxina G₁
11-metoxi-6,8,16,20-tetraoxapentaciclo [10.8.0.02,9.03,7.013,18] icosa- 1,4,9,11,13 (18) - pentaeno-17,19-diona	Hepatotóxica, imunossupressor, teratogênica, genotóxica, mutagênica	Fígado	Pierron (2016); Theumer et al.,2018; Di Gregorio et al. (2014); IARC (1993; 2002); Souza et al., 2018
Aflatoxina G₂
(3S, 7R) -11-metoxi-6,8,16,20-tetraoxapentaciclo [10.8.0.02,9.03,7.013,18] icosa-1,9,11,13 (18) - tetraeno-17,19-diona	Hepatotóxica, imunossupressor, teratogênica, mutagênica	Fígado	Pierron (2016); Theumer et al.,2018; Di Gregorio et al. (2014); IARC (1993; 2002).

FONTE: Adaptado de OMOTAYO, O. P. et al. Comparative study of aflatoxin contamination of winter and summer ginger from the North West Province of South Africa. **Toxicology Reports**, Amsterdam, v. 6, p. 489-495, 2019.

Estudos têm comprovado que a ingestão das micotoxinas, principalmente as aflatoxinas, pode causar diferentes doenças, levando até mesmo à morte dos envolvidos. Estes compostos foram descritos há muitas décadas, porém, ainda na década de 1960 eles foram quimicamente caracterizados devido à descoberta das aflatoxinas identificadas como agentes causadores da doença "*Turkey X disease*", uma epidemia envolvendo morte de grande quantidade de perus, alimentados com dietas contendo torta de farinha de amendoim originários da América do Sul (BLOUNT, 1961; GIRONA, 2011).

A intoxicação dos animais que ingerem alimentos contaminados por fungos é devido à maior e mais fácil comercialização dos ingredientes utilizados, juntamente com as rápidas mudanças climáticas, fato que torna difícil saber quando será a ocorrência das aflatoxinas, as quais podem acometer todos os animais de produção (PENG; MARCHAL; VAN DER POEL, 2018). Há diversas formas eficazes de gerenciar a contaminação por aflatoxinas na agricultura, uma delas é a instrução dos produtores e manipuladores de alimentos sobre como minimizar a contaminação por essas toxinas e incentivar a adoção de diretrizes baseadas em processos, tais como Boas Práticas Agrícolas antes da colheita e Boas Práticas de Fabricação pós-colheita (FEDDERN et al., 2013).

3.3.1 Efeitos e prejuízos das aflatoxinas nos animais de produção e nos seres humanos

A ingestão na dieta é o principal meio de exposição dos humanos e animal às aflatoxinas, devido à presença dessas toxinas nos ingredientes alimentares (Figura 3), sendo que a frequência, a fonte de ingredientes, a porcentagem de inclusão na alimentação, o período de exposição, a espécie animal e a idade são alguns dos fatores que influenciam na contaminação dos animais. Alguns componentes da dieta podem atuar positivamente por exclusão e redução da biodisponibilidade de AFB₁ no trato gastrointestinal (YELLAMANDA REDDY et al., 2003).

Dependendo do tipo, da dose aplicada e da duração da exposição às aflatoxinas, as vias dérmicas e de inalação também são consideradas importantes. Determinadas aflatoxinas podem causar desde doenças crônicas

ou agudas até mesmo insuficiência renal e câncer, podendo afetar vários órgãos e sistemas (AL-JAAL et al., 2019; KLICH, 2002).

As aflatoxinas são produzidas em inúmeros produtos alimentícios e têm efeitos sobre a saúde dos consumidores, bem como sobre o bem-estar dos seres humanos e animais. Por anos, a contaminação por aflatoxinas veiculadas por alimentos tem sido um problema sério e inevitável na aquicultura, esse problema é extensivamente agravado devido à substituição da farinha de peixe pela proteína vegetal, nesse caso a aflatoxina B₁ tem recebido muita atenção devido a sua prevalência em alimentos vegetais e seus efeitos prejudiciais nos animais (ZENG et al., 2019).

O consumo de peixe tem aumentado em todo o mundo, principalmente devido à disponibilidade, acesso e preço em relação a outros tipos de consumo de carne, como carne bovina, suína e de aves. Consequentemente, algumas preocupações começaram a surgir, principalmente em relação à qualidade dos peixes disponíveis no mercado (ANATER et al., 2016).

Com o surto de aflatoxicose em truta, a partir da década de 1960, pesquisadores têm realizados trabalhos nas espécies de aquicultura sobre os efeitos das aflatoxinas nos animais. Devido ao alto custo da farinha de peixe, tornou-se imprescindível adaptar fontes de proteína mais baratas, tais como proteína vegetal ou subprodutos comercialmente disponíveis, como grãos secos e solúveis (*Dried Distillers Grains and Soluble - DDGS*). Porém, para DDGS, o subproduto final pode apresentar, em relação aos grãos dos quais são derivados, concentrações de aflatoxinas mais elevadas (SCHAAFSMA et al., 2009).

O uso de alimentos contaminados por aflatoxinas na alimentação de peixes, aves, roedores e primatas provocou danos hepáticos nesses animais devido ao fígado ser o órgão alvo, no qual as micotoxinas são metabolizadas. Assim, todos os compostos transportados pela corrente sanguínea são armazenados e concentrados nos hepatócitos, que após longo período de exposição podem se modificar em câncer (EATON; GROOPMAN, 2013). Nos peixes dependendo da exposição essa contaminação da alimentação pode causar efeitos adversos à saúde, tais como taxas de crescimento e presença de lesões macro e microscópicas nos animais, ocasionando perdas econômicas por baixa produção, má qualidade dos peixes, morbidades e mortalidades (MAHFOUZ; SHERIF, 2015).

As aflatoxinas são consideradas ameaças crescentes à aquicultura sendo principal risco para os peixes criados em pisciculturas. Quando o alimento oferecido a esse animal está contaminado com aflatoxina, além dos efeitos negativos diretos sobre a saúde do peixe, há também aumento no risco desses contaminantes chegarem até os consumidores por meio da cadeia alimentar (ANATER et al., 2016).

É importante destacar que os efeitos das aflatoxinas são vivenciados por todos os participantes da cadeia de produção animal, incluindo desta forma os produtores, os manipuladores, os distribuidores de grãos e também os consumidores. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as mais encontradas nos alimentos oriundos da produção aquícola, porém AFB₁ produz patologias como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e imunotoxicidade e também se acumula na carne e nos órgãos dos peixes que foram expostos muito tempo a essa toxina, o que pode provocar no ser humano, desde intoxicação até mesmo tumores no fígado e morte decorrente do seu consumo (HUANG et al., 2011; OTTINGER; KAATTARI, 2000; RODRIGUES; HANDL; BINDER, 2011; SHEPHARD, 2008; SOUZA et al., 2018; WANG et al., 2016).

As reações biológicas após a ingestão de aflatoxinas variam de doenças agudas com alta morbidade e mortalidade, até doenças crônicas e insidiosas com baixa produtividade animal. Diferentes micotoxinas atingem variados órgãos, induzindo múltiplos efeitos tóxicos e em altas doses a exposição a essas toxinas proporciona a citotoxicidade geral, muitas vezes relacionada à inibição da síntese de macromoléculas (MARESCA; FANTINI, 2010).

A agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer classificou a AFB₁ como cancerígeno de classe 1, sendo um carcinógeno potente por bioativação do citocromo P₄₅₀ no fígado e AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), este último necessário para atividade cancerígena e tóxica (IOANNOU-KAKOURI et al., 2004; WU et al., 2016). Ao ser ingerido pelo gado leiteiro, a AFB₁ é transformada em AFM₁ no corpo do animal por hidroxilação enzimática de AFB₁ e segregado no leite. Também foi relatada a presença de AFB₁ em carne de aves e ovos quando esses animais foram alimentados com ração contaminada com aflatoxinas (IARC, 2012).

A suscetibilidade às aflatoxinas depende de espécie, idade, gênero e nutrição, e há variações individuais na taxa de ativação de aflatoxinas em várias espécies. O metabolismo da AFB₁ envolve reações oxidativas por membros da família CYP₄₅₀ de isoenzimas. Existe uma variedade de enzimas metabolizadoras em espécies animais. Nas espécies de aves poedeiras, CYP2A6, CYP3A37, CYP1A5 e CYP1A1 desempenham um papel significativo na biotransformação de AFB₁ (BLANKENSHIP et al., 1984; SANDERS et al., 1993).

Em humanos e animal, CYP3A4 no fígado e CYP2A13 no pulmão têm atividade significativa na metabolização de AFB₁ para AFBO, a taxa de formação de AFBO e sua conjugação com glutathione para reduzir a toxicidade pela glutathione-S-transferase parecem ser um parâmetro importante interespecies e em diferenças individuais (BANKOLE; SCHOLLENBERGER; DROCHNER, 2006), portanto, a AFB₁ pode causar carcinomas hepatocelulares. O envolvimento do Citocromo P450, 1A2 (responsável pela biossíntese AFM₁) e 3A4 resultam na formação de epóxidos que conduzem a oxidações não enzimáticas que transformam o DNA em um aduto de DNA propenso a ser mutagênico (abrangendo mutações de p53, levando a mutagenicidade). Em

última análise, o aduto de DNA é instável e sofre eliminação renal, por exemplo, através da conversão em *N*- acetilcisteína de aflatoxina (LAVKOR; VAR, 2017).

Nos animais suscetíveis e humanos, enzimas do citocromo P₄₅₀ convertem AFB₁ para AFB₁-exo-8,9-epóxido, uma forma reativa que se liga ao DNA e proteínas resultando em mutação e danos oxidativos a várias macromoléculas. Os metabólitos AFB₁ se ligam com a albumina e formam suplementos de aflatoxina e albumina sérica. Este aduto de aflatoxina no sangue periférico é usado como biomarcador para medir a exposição à aflatoxina em seres humanos. Os metabólitos de AFB₁ reagem com resíduos de guanina no DNA, resultando em adutos de AFB₁-n7-guanina. A AFB₁ induz transverso de G a T do gene 249 supressores de tumor P53, que tem sido fortemente associado ao carcinoma hepatocelular (figura 3) (KUMAR et al., 2016).

Quando há consumo exagerado de aflatoxinas, pode-se desenvolver a chamada aflatoxicose, a qual inclui também falência de órgãos, desenvolvimento de carcinogenicidade, neurotoxicidade, imunossupressão e toxicidade (KOLPIN et al., 2014). A aflatoxicose está em sexto lugar entre as dez mais importantes para os países em desenvolvimento identificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pode ser dividida em aguda e crônica, sendo a forma aguda responsável pela morte do indivíduo ou do animal e a forma crônica responsável por casos de câncer, toxicidade e supressão imune (WILLIAMS et al., 2004).

Nos peixes, as principais observações associadas à aflatoxicose incluem palidez das brânquias, anemia, taxas de crescimento reduzido ou prejuízo no ganho de peso com alimentação prolongada e baixa conversão alimentar, além de causar tumores no fígado, que se iniciam com lesões amareladas, as quais podem se alastrar para outros órgãos como o rim (DIRICAN, 2015; MANNING; LI; ROBINSON, 2005).

As pesquisas envolvidas nos efeitos das aflatoxinas em espécies aquáticas são escassas, e um dos motivos é a dificuldade em diagnosticar com precisão a aflatoxicose em peixes. Algumas das descobertas iniciais estão associadas às brânquias pálidas, danos no fígado, taxas de crescimento pobres e supressão imunológica. As toxinas que ocorrem nos produtos oferecidos aos animais, além de afetar o desempenho animal podem comprometer também a saúde humana (ARANA et al., 2002; CHÁVEZ-SÁNCHEZ; PALACIOS; MORENO, 1994; CONROY, 2000; LOPES et al., 2005).

Além de graves enfermidades, as aflatoxinas causam também impacto econômico de grande importância. Há efeitos diretos relacionados ao maior custo com cuidados veterinários e redução na produção pecuária, com prejuízos nas características dos alimentos e a preocupação com a saúde pública, devido à contaminação de produtos de origem animal (LAVKOR; VAR, 2017).

Segundo Anater et al. (2016), a prevenção ainda é a ferramenta mais apropriada para diminuir este tipo de contaminação, pois todos os produtos são suscetíveis à contaminação ao longo da cadeia de produção animal, não sendo nada simples identificar quais os produtos que se apresentam nesse estado.

O número de estudos que abordam os efeitos das aflatoxinas em espécies aquáticas é muito limitado. A dificuldade em diagnosticar com precisão a aflatoxicose em peixes pode explicar em parte a falta de informações sobre a incidência de aflatoxicose em espécies aquáticas de criação.

3.3.2 Aflatoxinas em rações para peixes

As aflatoxinas podem ser encontradas em todo o mundo em uma variedade de alimentos e rações, especialmente cereais; a contaminação com fungos produtores de aflatoxinas e a produção da toxina nos produtos podem ocorrer no campo, durante o armazenamento e o transporte em quase todas as etapas da cadeia produtiva e na alimentação animal acabada a contaminação de um ingrediente pode causar a contaminação de todo um lote de alimentos para os animais (GALLO et al., 2015).

A ração na aquicultura representa, aproximadamente, 60% dos custos operacionais (FAO, 2016), visto que uma porção de alimento que é fornecida aos animais, composta por diversos ingredientes e formulada de acordo com as exigências nutricionais de cada espécie, representa um dos principais custos operacionais na produção animal (CARDOSO-FILHO et al., 2013).

Na produção de peixes, a qualidade dos alimentos oferecidos a esses animais é um pré-requisito essencial, uma vez que o crescimento de fungos ocasiona redução da qualidade nutricional das matérias primas, contribuindo para a contaminação do produto final que será oferecido aos peixes e, consequentemente, aos consumidores (CAVAGLIERI et al., 2009; JAKIC-

DOMIC et al., 2005). Uma dieta contaminada com aflatoxina B₁ está intimamente relacionada à alta mortalidade dos animais e também tem sido vinculada a índices zootécnicos tais como: redução do crescimento, pior conversão alimentar e perda de peso (NOMURA et al., 2011; SELIM; EL-HOFY; KHALIL, 2014).

Dentre as micotoxinas reconhecidas, as aflatoxinas são constantemente pesquisadas devido ao seu potente efeito cancerígeno apresentado nos animais de laboratório e efeitos toxicológicos agudos exibidos nos seres humanos. Uma das formas de limitar essa exposição às aflatoxinas é a criação de legislações com limites regulamentados aos alimentos utilizados na alimentação humana e animal, visto que as duas espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas são encontradas em áreas com clima quente e úmido (LAVKOR; VAR, 2017). Essa umidade e temperatura elevada desempenham papel significativo no crescimento dos fungos e consequentemente na produção de aflatoxinas. O nível de umidade para contaminação durante a fase de pré-colheita no campo é mais elevado (20 a 25 g/ 100 g) do que durante o armazenamento (13 a 18g/100g) (KOOPRASERTYING et al., 2016).

Na pré-colheita, a produção de toxinas pelos fungos pode ter influência e ser potencializada por diversos fatores tais como genética das plantas e não adaptação às condições locais; já nas etapas de crescimento e colheita pode ser pelo uso de agrotóxicos, pelo uso de variedades de polinização aberta, contato com fungos produtores de aflatoxinas ou seus esporos, pelas condições climáticas adversas e os danos causados pelos insetos (OLADELE, 2014; RIJSBERMAN, 2014).

Os alimentos envolvidos na contaminação por aflatoxinas são: amendoim, milho, arroz, figos, uvas passas, dentre outros, especiarias e óleos vegetais, e essa contaminação pode ocorrer antes e após a colheita. Os fatores ambientais (localização geográfica, práticas agrícolas e agronômicas) influenciam na biossíntese e ocorrência de aflatoxinas. Contudo, a contaminação dos alimentos nos períodos pré-colheita, armazenamento ou processamento também são levadas em consideração (SANTINI; RITIENI, 2013).

3.4 Regulamentação e vigilância de aflatoxinas em alimentos

Muitos países têm legislação com limites máximos de concentração de micotoxinas nos alimentos para seres humanos e animais. Porém, ainda não há limites para todas as micotoxinas conhecidas. As que possuem regulamentação, como as aflatoxinas, alguns tricotecenos de tipo A e B, zearalenona, fumonisinas e ocratoxina, foram assim determinadas devido aos seus efeitos tóxicos demonstrados em animais e seres humanos.

Do ponto de vista toxicológico para o ser humano, que pode eventualmente ingerir produtos contaminados, é necessário o controle rigoroso das concentrações das micotoxinas nos alimentos, caracterizando o risco que podem representar para a saúde. Na União Europeia, há limites toleráveis ou aceitáveis que são baixos, enquanto nos países subdesenvolvidos há a possível subestimação de doenças e mortes ocorridas por aflatoxinas (VINEIS; XUN, 2009).

O consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas é considerado um problema de saúde pública. Sendo assim, os níveis máximos toleráveis para micotoxinas são regulamentados por vários países (VAN EGMOND, 2004). Diferentes alimentos têm limites definidos e, geralmente, são estipulados limites para aflatoxinas totais, AFB₁ e AFM₁ (CREPPY, 2002; RASTOGI et al., 2004).

Em fevereiro de 2017, entrou em vigor no Brasil uma nova legislação sobre os limites máximos de micotoxinas tolerados em alimentos. A RDC Nº 138, de 8 de fevereiro de 2017, estabeleceu limites para micotoxinas em 14 categorias de alimentos, como leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros, e de acordo com o risco sanitário envolvido para cada uma das micotoxinas e alimentos destinados ao consumidor infantil que são os mais suscetíveis.

Os limites máximos de 20 µg/kg estabelecidos incluem aflatoxinas (B₁ + B₂ + G₁ + G₂ e M₁), e também de 20 µg/kg para ocratoxina A (OTA), 3000 µg/kg para desoxinivalenol (DON), 5000 µg/kg para fumonisinas (FB₁), patulina (PAT) e 40 µg/kg para zearalenona (ZEA) em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas (BRASIL, 2017).

Os níveis máximos de micotoxinas contemplados para matéria prima ou ingrediente para rações destinadas ao consumo animal são de 50 µg/kg para

aflatoxinas, de maneira geral, sem especificar a espécie animal (BRASIL, 1988). A *Food and Drugs Administration* (FDA, 1995) e a FAO nos anos de 1997 e 2014 determinaram nos EUA o limite máximo de 20 µg/kg para ingredientes com milho. A *European Commission* assim a União Europeia, a Diretiva 100/2003/EC (EC, 2013) estabeleceu limites máximos de resíduos (LMR) de 10 µg/kg para micotoxinas em alimentação de animais de produção e animais de estimação.

Considerando as áreas de produção, saúde animal e saúde pública, há uma necessidade de investigação relacionando a micotoxicologia e a piscicultura, com o objetivo de melhorar a produtividade e a segurança dos alimentos, e possivelmente auxiliar no estabelecimento de novos limites na legislação sobre micotoxinas. Com base nestas informações e devido à carência de pesquisas na área, ressalta-se a importância do presente projeto.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar a transferência de aflatoxinas das rações para tecidos da espécie de peixe de cultivo Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), avaliando também a influência sobre a fisiologia e o desempenho produtivo da espécie.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a transferência de aflatoxinas da ração para tecido muscular e hepático do Pacu;
- b) Avaliar a influência das aflatoxinas sobre parâmetros biométricos do Pacu;
- c) Avaliar a bioquímica sérica e a histopatologia do fígado do Pacu;
- d) Inferir sobre a sensibilidade da espécie às aflatoxinas.

4.3 Hipótese

O consumo crônico de ração contaminada por aflatoxinas pode interferir no desempenho dos animais e no acúmulo de aflatoxina nos tecidos muscular e hepático, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Produção de Aflatoxinas em Material de Cultura

Foi utilizada cepa padrão de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (Figura 4), cedida da coleção de cepas do *ARS culture collection, United States Department of Agriculture (USDA)*. As aflatoxinas foram produzidas (Figura 5) de acordo com os protocolos do Dr. George E. Rottinghaus, do *Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, EUA* (ROTTINGHAUS, 2012). A concentração de aflatoxinas no material de cultura foi confirmada através de cromatografia de alta eficiência (CLAE).

Figura 4 - Placa com inóculo de cepa padrão de *Aspergillus parasiticus*.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de secagem

Fonte: Própria autoria.

5.2 Dietas experimentais

Como não havia conhecimento disponível sobre a dose letal (DL50) para a aflatoxina em peixes da espécie Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o presente trabalho seguiu literaturas já publicadas com outras espécies de peixes e os limites legais para aflatoxinas em rações animais estabelecidos no Brasil (BRASIL - Portaria MA/SNAD/SFA 07 de 09 de novembro de 1988), nos Estados Unidos da América (*Foods and Drugs Administration* – FDA, 1995) e na União Europeia (Diretivas CE 2002/32 e 2003/100). Foram utilizados para a definição dos tratamentos os seguintes níveis:

Controle – ração sem toxina;

A - Ração + 10 μg AFB₁/kg;

B - Ração + 20 μg AFB₁/kg;

C - Ração + 50 μg AFB₁/kg.

Todas as rações tropicais (Laguna Peixes Brasileiros – Ocialis, Invivo), utilizadas no trabalho foram previamente analisadas por CLAE para verificar se havia presença de aflatoxinas antes do início do experimento. Definidos os níveis a serem utilizados no experimento, a preparação das rações contaminadas foi

realizada em etapas, no decorrer do experimento. Nestas ocasiões, foram comprovados os níveis de aflatoxinas nas rações, retirando-se uma amostra de 100 g de cada ração preparada contendo a toxina. As análises foram realizadas por CLAE e as rações foram armazenadas a - 20°C até a sua utilização.

Para incorporação das aflatoxinas à ração, foi utilizado método de imersão em metanol (Synth, Brasil) contendo a toxina para dose final na ração de 10, 20 e 50 µg AFB₁/kg. Foi realizada uma solução de metanol 70% e toxina com a dose correspondente para cada tratamento a ser utilizado. A ração ficou submersa nessa solução por 24 horas, a temperatura ambiente (25°C); após essa etapa foi disposta para secagem para remoção do metanol em estufa sob temperatura de 60°C por 6 horas ou até não apresentar presença de líquidos. Uma vez seca, a ração foi analisada por CLAE para confirmação dos níveis esperados.

Após a secagem da ração, as amostras foram analisadas por CLAE para confirmação dos níveis pretendidos e armazenadas a -20°C até a utilização. Foi utilizada ração comercial extrusada para peixes tropicais (Laguna Peixes Brasileiros – Ocialis, Invivo), de 4 mm e contendo 32% de proteína bruta (Tabela 1).

Tabela 1 - Formulação da dieta experimental ração comercial extrusada para peixes tropicais (Laguna Peixes Brasileiros – Ocialis, Invivo).

Ingredientes	Níveis de garantia por kg
Proteína bruta (min)	320 g
Extrato etéreo (min)	50 g
Fibra bruta (max)	50 g
Matéria mineral (max)	140 g
Cálcio (min)	15 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

*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 Propiônico, Hidróxido de Amônia.

Fonte: Laguna Peixes Brasileiros – Ocialis, Invivo, Informação do rótulo.

5.3 Condições experimentais e amostragem

A criação dos peixes foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental – ICMBio - CEPTA, localizado à Rodovia SP-201 (Pref. Euberto Nemésio Pereira de Godoy), Km 6,5, Pirassununga, SP.

A espécie avaliada foi o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). O experimento foi conduzido em sistema de criação fechado com recirculação de água e contou com quatro caixas de água de 1.000 litros cada, além de três caixas de 500 litros cada com função de filtro biológico, aquecedor e bomba de recirculação de água.

Foi utilizado um aquecedor de resistência (6 KW, diâmetro 3”) para garantir a temperatura adequada da água e favorecer o crescimento dos peixes e bomba submersível (Rayma 950fire, Brasil) que distribuía a água para todas as caixas.

Juvenis de Pacus oriundos da Piscicultura Polettini, localizado na Rodovia Agricultores km 9,5 em Moji-Mirim/SP, foram alocados em cada caixa de água com densidade inicial de 120 peixes por m³ para um total de 480 peixes. Cada unidade experimental representou um tratamento, conforme descrito no item 5.2.

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

Para as análises bioquímicas e histopatológicas, foi realizada a cada 30 dias uma coleta de cinco exemplares de Pacu por tratamento para coleta de sangue e tecido hepático, totalizando 40 amostras por mês. No final do experimento, obtiveram-se 240 amostras, das quais 120 amostras de sangue e 120 de fígado, para avaliação bioquímica e histopatológica, respectivamente.

Para as análises, os peixes foram mantidos em jejum de 24 horas. Após o jejum foram coletados para as biometrias. A captura dos animais foi efetuada

utilizando-se puçás de malha fina (1 mm) para não comprometer a integridade física dos animais (remoção de escamas, muco etc).

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com 5% da biomassa, de acordo com a recomendação do fabricante da ração. O ajuste da taxa de arraçoamento foi realizado após biometria realizada a cada 30 dias.

Diariamente foi efetuada a limpeza dos tanques, com a retirada de água por registros instalados nas caixas, removendo os resíduos existentes nas mesmas e sendo contabilizada a eventual mortalidade. A troca diária de água foi na ordem de 50%, anotando-se o consumo diário e realizando-se pesagem das sobras para verificar o consumo médio de ração.

Os parâmetros de qualidade da água, como pH, temperatura e oxigênio dissolvido, foram monitorados com pH-metro microprocessado (Gehaka, PG 1800, Brasil), termômetro digital (Thermocouple Thermometer Comark KM28/P7, Reino Unido) e medidor de oxigênio dissolvido (YSI modelo 57, USA), respectivamente.

O procedimento de eutanásia foi efetuado por imersão dos animais em água com cloridrato de benzocaína ($C_9H_{11}NO_2$) com 250 mg/L, imediatamente após a captura, e realizado em tanques com capacidade para 20 litros de água. O tempo de eutanásia foi caracterizado pela perda total do equilíbrio, pela ausência de movimento das nadadeiras e de natação, pelos movimentos operculares reduzidos e pelas respostas apenas aos estímulos táteis mais intensos.

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

5.4 Determinação de aflatoxinas

5.4.1 Determinação de aflatoxinas em amostras de ração

Uma amostra de 12,5 g de ração para peixe previamente moída foi misturada a 2,5 g de cloreto de sódio (NaCl) (Synth, Brasil) e 50 mL de metanol (80%) (Panreac – AppliChem, Espanha). Esta mistura foi agitada em mesa de agitação (Lucadema, Brasil) por 30 minutos a 250 rpm para extrair as toxinas presentes na ração. Após, o extrato foi filtrado em papel filtro e o filtrado foi recolhido. Uma amostra de 0,5 mL do filtrado foi diluída com 10 mL de solução tampão fosfato-salino (*do inglês* PBS) 0,01M (Sigma-Aldrich, USA) e agitada em vortex (Biomixer, QL-901, Brasil).

A suspensão foi submetida a coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (VICAM) com fluxo de 1–2 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 microtubo de 2 mL (Allcrom, LBSV012C, Brasil) e evaporado em concentrador de ar comprimido (Tecnal, TE-019, Brasil).

O resíduo foi derivatizado com 25 µL de TFA (Sigma-Aldrich, Brasil) e ressuspendido com 975 µL de acetonitrila 20% (Panreac – AppliChem, Espanha). Um volume de 50 µL da amostra derivatizada e ressuspendida foram injetados no sistema CLAE, utilizando como fase móvel água/metanol:acetonitrila nas proporções de 540:100:100 respectivamente, com fluxo constante de 1 mL/min (ROTTINGHAUS, 2012).

5.4.2 Determinação de aflatoxinas em amostras de fígado

Uma amostra de fígado de Pacu (1 g), previamente homogeneizada foi misturada com 10 mL de metanol (80%) (Panreac – AppliChem, Espanha) por 5 minutos e homogeneizada novamente com a ajuda de um mixer por três minutos. Depois a amostra foi colocada em centrífuga (Hermle, Z326K, Alemanha) a 3000 rpm por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro PTFE 0,45 µm (Allcrom, Brasil). Uma alíquota do filtrado (1 mL) foi diluída com 25 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) 0,01M (Sigma-Aldrich, USA) e homogeneizada em vortex (Biomixer, QL-901, Brasil).

A solução então passou através da coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (VICAM) com fluxo de 2 gotas/segundo. A eluição das aflatoxinas foi feita pela passagem de 1,5 mL de solução acetonitrila:metanol (3:2) pela coluna de

imunoafinidade. O eluato foi recolhido em um microtubo de 2 mL (Allcrom, LBSV012C, Brasil) e evaporado em concentrador de ar comprimido (Tecnal, TE-019, Brasil).

O resíduo foi derivatizado com 30 µL de TFA (Sigma-Aldrich, Brasil) e ressuspendido com 970 µL de acetonitrila 20% (Panreac – AppliChem, Espanha). Uma alíquota de 50 µL da amostra derivatizada e ressuspendida foi injetada no sistema CLAE, utilizando como fase móvel água:metanol:acetonitrila nas proporções de 540:100:100 respectivamente, com fluxo constante de 1 mL/min (ROTTINGHAUS, 2012).

5.4.3 Determinação de aflatoxinas em amostras de músculo

Uma amostra de músculo de Pacu (5 g) previamente homogeneizada foi misturada com 20 mL de metanol (80%) (Panreac – AppliChem, Espanha) por 5 minutos e homogeneizada novamente com a ajuda de um mixer por três minutos. Depois a amostra foi centrifugada (Hermle, Z326K, Alemanha) a 3000 rpm por 10 minutos e, passado o tempo, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro PTFE 0,45 µm (Allcrom, Brasil). Uma alíquota do tecido (4 mL) foi diluída com 25 mL de PBS 0,01M (Sigma-Aldrich, USA) e homogeneizada em vortex (Biomixer, QL-901, Brasil). A solução anterior passou através da 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) pela coluna de imunoafinidade. O eluato foi recolhido em um microtubo de 2 mL (Allcrom, LBSV012C, Brasil) e evaporado em concentrador de ar comprimido (Tecnal, TE-019, Brasil). O resíduo foi derivatizado com 30 µL de TFA (Sigma-Aldrich, Brasil) e ressuspendido com 970 µL de acetonitrila 20% (Panreac – AppliChem, Espanha). A alíquota de 50 µL da amostra derivatizada e ressuspendida foi injetada no sistema CLAE, utilizando como fase móvel água:metanol:acetonitrila nas proporções de 540:100:100 respectivamente, com fluxo constante de 1 mL/min (ROTTINGHAUS, 2012).

5.5 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 Universidade de São Paulo *campus* de Pirassununga, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – SP, na Unidade Didática Clínico Hospitalar. 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).

5.6 Análises histopatológicas

Após a coleta de sangue, os mesmos animais foram utilizados para remoção do tecido hepático e, posteriormente, foram realizadas as análises histopatológicas dos tecidos hepáticos. O fígado foi seccionado nas seções transversais e longitudinal, sendo colocados em frascos e fixados por 24 horas com solução Bouin contendo ácido pícrico P.A., álcool etílico 96% ou 99%, formaldeído P.A. e ácido acético glacial (Figura 6). Foi realizada identificação e caracterização de possíveis lesões hepáticas macro e microscópicas nos peixes. Foi correlacionado o nível de AFB₁ na ração com os resultados de função hepática e as possíveis ocorrências de lesões no fígado destes animais.

Figura 6 - Fixação do fígado de uma unidade experimental em solução de Bouin.

Fonte: Própria autoria.

Passado o tempo de fixação em solução Bouin, essa solução foi retirada dos frascos e os tecidos foram clarificados com álcool 70%. Para ocorrer este processo foi necessário efetuar troca diária do álcool das amostras por meses, até a solução Bouin ser eliminada por completo e os tecidos se apresentarem clarificados permitindo assim a confecção das lâminas de histologia.

Para confecção das lâminas, as amostras do tecido hepático foram desidratadas em solução de álcool nas concentrações de 80, 95 e 100%, envolvidas em parafina - (Paraplast®, Sigma-Aldrich), cortadas em tamanhos de 5,0 µm em um micrótomo automático (Microtom Semiautomat Slee, model Cut 5062) e coradas com hematoxilina e eosina. 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 e todas as amostras foram analisadas em microscópio. 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.

5.7 Avaliação dos índices de produtividade e desempenho dos peixes

Para a avaliação dos índices de produtividade e desempenho dos peixes foram determinados o peso corporal e o tamanho (MELO et al., 2002).

Foram utilizados 10 peixes de cada caixa, totalizando 30 peixes por tratamento. As variáveis analisadas durante os experimentos foram: peso final, calculado através da diferença entre os pesos médios das parcelas inicial e final; ganho médio, obtido através da diferença entre o peso médio inicial, peso médio final e número total de indivíduos de cada tratamento, comprimento total, medida entre a parte anterior da cabeça até o final da nadadeira caudal; e sobrevivência, obtida pela diferença entre as contagens final e inicial nos tratamentos. Foi utilizado paquímetro digital (STARFER DIGITAL 150 X 0,02), para medir o comprimento total e para pesagem foi utilizada balança de precisão (ACCULAB V-1200).

5.8 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 5 níveis), em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. A escolha da melhor estrutura de covariâncias baseou-se nos critérios de informação de Akaike (AIC) e Bayesiano (BIC). Posteriormente, as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Tukey (5%). Em todas as análises utilizou-se o proc mixed do SAS 9.3 e o nível de significância de 5% (SAS, 2011).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do desempenho do método analítico

6.1.1 Curvas de calibração para análise de aflatoxinas em ração

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram 0,992, 0,993, 0,990 e 0,988, respectivamente. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7 - Curvas de calibração do HPLC obtidas para as soluções padrão de (a) AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ para ração.

*Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão de (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.

6.1.2 Curvas de calibração para análise de aflatoxinas em fígado e músculo

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁ foram, 0,997, 0,997, 0,997, 0,998 e 0,998 respectivamente. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 8.

Figura 8 - Curvas de calibração para o fígado e músculo obtido para as soluções padrão de (a) AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂.

*Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão de (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 $r = 0,999$).

Fonte: Própria autoria.

Os tempos de retenção para AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂, foram de 4,61, 6,92, 10,37 e 16,27 minutos, respectivamente. O cromatograma obtido para os padrões de aflatoxina contendo 20 µg/L pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma obtido para o padrão de aflatoxinas contendo 20 µg/L.

Fonte: Própria autoria.

A recuperação média para os dois níveis de toxina na ração foi de 85% para AFB₁, 92,9% para AFB₂, 81,4% para AFG₁ e de 88,4% para AFG₂. Os níveis e porcentagens obtidas podem ser observados na Tabela 2. O limite de detecção do método na ração foi de 0,03 µg/kg e o limite de quantificação foi 0,09 µg/kg.

Os níveis e porcentagens obtidos para as amostras de fígado podem ser observados na Tabela 3. As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no fígado, foram de 104,0%, para AFB₁, 112,6% para AFB₂, 91,5% para AFG₁ e de 104,5% para AFG₂. As recuperações e os coeficientes de variação obtidos foram adequados. O limite de detecção do método foi de 0,05 µg/kg e o limite de quantificação foi 0,15 µg/kg.

As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no músculo de Pacu (Tabela 4) foram de 94,6%, para AFB₁, 97,4% para AFB₂, 101,4% para AFG₁, e de 100,1% para AFG₂. As recuperações e os coeficientes de variação obtidos foram adequados. O limite de detecção do método foi de 0,03 µg/kg e o limite de quantificação foi 0,09 µg/kg.

Tabela 2 – Percentuais de recuperação e coeficientes de variação de análise de aflatoxinas em amostras de ração para peixes.

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

Fonte: Própria autoria.

Tabela 3 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.

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

Fonte: Própria autoria.

Tabela 4 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação da análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de Pacu.

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

Fonte: Própria autoria.

6.2 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. As aflatoxinas utilizadas nos experimentos foram produzidas de acordo com a necessidade do experimento no Laboratório Multiusuário de Microbiologia da FZEA/USP.

As dietas experimentais foram ajustadas para conter aproximadamente 10 µg AFB₁/kg (tratamento A), 20 µg AFB₁/kg (tratamento B) e 50 µg AFB₁/kg (tratamento C).

As rações produzidas e incorporadas com as aflatoxinas foram analisadas previamente aos respectivos usos e os níveis obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Níveis médios de aflatoxinas obtidas nas dietas experimentais utilizadas.

Tratamento	Aflatoxina (µg/kg)				
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AF Total
Controle	ND	ND	ND	ND	ND
A	10,42 ± 3,79	2,07 ± 2,95	0,6 ± 1,17	1,13 ± 1,99	14,30 ± 1,13
B	25,71 ± 5,60	2,75 ± 2,16	0,43 ± 0,33	0,23 ± 0,19	29,12 ± 2,52
C	56,47 ± 14,04	5,92 ± 0,91	1,18 ± 1,20	0,17 ± 0,13	63,75 ± 6,39

A: 10,42 µg AFB₁/kg; B: 25,71 µg AFB₁/kg; C: 56,47 µg AFB₁/kg.

*Resultados expressos como média ± desvio padrão.

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Fonte: Própria autoria.

6.3 Parâmetros limnológicos da água

Na Tabela 6 estão descritos os resultados dos parâmetros limnológicos da água. Durante o período experimental (180 dias) foram aferidos diariamente os parâmetros físico-químicos da água, no qual houve uniformidade das condições ambientais e os parâmetros apresentaram os resultados recomendados pela legislação, dessa forma os parâmetros medidos estavam dentro dos valores recomendados pelo manual de qualidade da água para aquicultura e pela

legislação vigente. As variáveis medidas não influenciaram o experimento (BRASIL, 2005; CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005), e as variáveis registradas não influenciaram no ganho de peso, na conversão e no consumo alimentar. Os valores estão de acordo com aqueles recomendados para a criação de peixes de clima tropical (BOYD, 1990; TAVARES, 1995).

Tabela 6 - Parâmetros limnológicos da água aferidos no experimento da espécie Pacu.

Parâmetros	Mínimo	Máximo	Média
Temperatura da água (°C)	26	28	27,0
pH	5,0	7,0	6,0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,2	6,8	6,0
Amônia total (mg/L)	>0,2	0,3	0,3

Fonte: Própria autoria.

Para melhor crescimento e sobrevivência do peixe é ideal que o pH da água esteja entre 6,0 e 9,0, pois valores distantes dessa faixa prejudicam o crescimento dos animais. Valores abaixo de 4,5 ou acima de 9,0 podem ocasionar mortalidade (SILVA; FERREIRA; LOGATO, 2007). No presente experimento, o valor médio foi 6,0, considerado ideal, demonstrando que esse parâmetro não foi responsável pela mortalidade de peixes.

6.4 Resíduos de AFB₁ no fígado e músculo

Os efeitos dos níveis de aflatoxina B₁ no fígado e no músculo dos peixes após exposição de 180 dias podem ser observados nas Tabelas 7 e 8 respectivamente. As aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ não foram detectadas no fígado e no músculo da espécie estudada.

Na Tabela 7 pode-se observar que, embora tenha apresentado aumento na deposição de aflatoxinas no fígado ao longo dos 180 dias em todos os tratamentos, apenas o tratamento C diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos A e B a partir dos 150 dias.

De acordo com os resultados encontrados, pode-se inferir que a AFB₁ passa pelo processo de biotransformação hepática das aflatoxinas, com a

hidroxilação das moléculas. Os compostos que contêm o grupo hidroxila são bastante solúveis em água, possibilitando sua excreção através da urina, bile e fezes. Pode-se considerar que, em doses elevadas e por período grande, o fígado e os rins retêm resíduos por mais tempo, reduzindo a taxa de biotransformação e contribuindo fortemente para a susceptibilidade desses evidenciada pelos valores encontrados.

Tabela 7 - Deposição de aflatoxina B₁ no fígado de Pacu ao longo do período experimental.

Tratamento	Aflatoxina B ₁ (µg/kg)					
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	0,31 ^{aA}	0,19 ^{aA}	0,51 ^{aA}	0,31 ^{aA}	0,86 ^{aAB}	0,48 ^{aB}
B	0,23 ^{aA}	0,18 ^{aA}	0,51 ^{aA}	0,48 ^{aA}	0,50 ^{aB}	0,32 ^{aB}
C	0,70 ^{abA}	0,49 ^{abA}	0,61 ^{abA}	0,78 ^{abA}	1,16 ^{aA}	1,07 ^{abA}
Erro padrão	0,11	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----					
Tratamento	< 0,0001					
Tempo	0,0027					
Interação	0,5773					

A: 10,42 µg AFB₁/kg; B: 25,71 µg AFB₁/kg; C: 56,47 µg AFB₁/kg.

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

*Limite de detecção (LOD): 0,05 µg AFB₁/kg; Limite de quantificação (LOQ): 0,15 µg

*AFB₁/kg. ND: não detectado.

Fonte: Própria autoria.

Alguns trabalhos avaliaram a deposição de aflatoxinas no fígado de peixes. De acordo com Deng et al. (2010), durante um experimento com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), observou-se que níveis de 85 µg de AFB₁ kg⁻¹ poderiam levar a um acúmulo significativamente alto de AFB₁ no fígado após 20

semanas de ingestão da aflatoxina, após esse tempo o acúmulo chegou a 30 $\mu\text{g AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$, e os mesmos encontraram bioacumulação de aflatoxinas no músculo e no fígado.

No trabalho de Lopes et al. (2005), uma deposição residual de AFB_1 no fígado (1,6 $\mu\text{g/kg}$, 4,0 $\mu\text{g/kg}$ e 12,9 $\mu\text{g/kg}$) de alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de toxina (350 $\mu\text{g/kg}$, 757 $\mu\text{g/kg}$ e 1177 $\mu\text{g/kg}$) ao longo de cinco semanas foi observada. Da mesma forma, Rahman, Abdellatief e Mahboub (2017) relataram que em períodos curtos (30 dias de exposição à aflatoxina) a ingestão de 200 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina B_1 em tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ocasionaram resultados no fígado de 5,0 $\mu\text{g/kg AFB}_1$ e no músculo de 3,7 $\mu\text{g/kg AFB}_1$. Os autores concluíram que isso pode sugerir uma certa incapacidade de metabolizar as aflatoxinas em períodos curtos.

Por outro lado, Michelin et al. (2017) relataram peixes da espécie lambari (*Astyanax altiparanae*) como altamente propensos à deposição de aflatoxinas no fígado e músculo. Após serem alimentados com 20 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas pelo período de 120 dias, a deposição de aflatoxinas no fígado foi de 265 $\mu\text{g/kg}$, já nos animais alimentados com 50 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina na ração os fígados foram encontrados com um acúmulo de 243 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina. Porém, os animais apresentaram pouca ou nenhuma deposição de AFB_1 nas partes comestíveis da espécie estudada não representando assim risco à saúde do consumidor.

Na Tabela 8 pode-se observar que foi detectado acúmulo de AFB_1 no músculo, porém inferior ao limite de quantificação, uma das hipóteses pode ser devido ao período de exposição de apenas 180 dias, sendo necessário mais estudos para outras conclusões.

Tabela 8 - Deposição de aflatoxina B₁ no músculo de Pacu ao longo do período experimental.

Tratamento	Aflatoxina B ₁ (µg/kg)					
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	0,11	traços	0,13	traços	traços	traços
B	traços	traços	ND	traços	traços	traços
C	ND	traços	traços	traços	traços	traços

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

Fonte: Própria autoria.

Em espécies aquícolas, ainda está sendo documentada a bioacumulação de aflatoxinas em tecidos, tendo sido apresentados poucos estudos avaliando a presença de tecidos com aflatoxinas em peixes alimentados com dietas contendo micotoxinas. As aflatoxinas possuem efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos nos seres humanos e em várias espécies animais, sendo que essas toxinas interferem no metabolismo das vitaminas, proteínas e aminoácidos, lipídios e carboidratos, além de alterar a estrutura química do material genético, agindo sobre coenzimas ou complexos enzimáticos, principalmente no fígado (KIESSLING, 1986; WYATT, 1991). Os tecidos animais podem reter resíduos de aflatoxina, levando à suspeita de riscos para a saúde pública, devido ao consumo humano de alimentos possivelmente contaminados (PUSCHNER, 2002).

Suzy et al. (2017) verificaram que, após a alimentação de Bagre-africano (*C. gariepinus*) com 10, 17 e 20 µg/kg de AFB₁, por três meses, foram encontrados no músculo níveis de 0,05, 0,08 e 0,08 µg/kg de AFB₁, respectivamente. Em outro trabalho, Selim, El-Hofy e Khalil (2014) relataram, em 10 semanas de experimento, o acúmulo de 90 µg/kg AFB₁ no músculo após a alimentação de tilápia (15 ± 2 g) com 200 µg/kg AFB₁.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando, assim, intoxicação aguda e crônica. As síndromes tóxicas ocorrem pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxinas,

sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo (ROSMANINHO; OLIVEIRA; BITTENCOURT, 2001). Segundo Anater et al. (2016), os efeitos tóxicos dependem de alguns fatores como quantidade e tipos de micotoxinas nos alimentos, duração da exposição, espécies de peixes e indivíduos, sexo e idade.

El-Sayed e Khalil (2009) estudaram os efeitos das aflatoxinas em robalo e os níveis de resíduos de AFB₁ na musculatura e encontraram valores variando de 0,29 µg/Kg após a primeira semana de ingestão, até 4,25 µg/Kg após a 42^a semana de ingestão de AFB₁.

Wozny et al. (2013) analisaram outra micotoxina, a zearalenona (ZEN), em trutas arco-íris de fazendas localizadas na região nordeste da Polônia e as micotoxinas estavam presentes em níveis não quantificáveis <2,0 µg kg⁻¹ na maioria dos tecidos analisados (intestino, fígado, músculo, vesícula biliar, parte caudal do intestino e ovário). Entretanto, as maiores concentrações de ZEN, até 7,1 µg kg⁻¹, foram encontradas nos ovários dos peixes e as análises adicionais de água do sistema (superfície) e amostras de ração de peixes das fazendas indicaram que a ração animal pode ter sido uma possível fonte de contaminação por ZEN (concentração de até 81,8 µg kg⁻¹). Os autores concluíram que o acúmulo dessa micotoxina nos ovários pode representar uma preocupação para a indústria da aquicultura.

6.5 Desempenho dos peixes

Os resultados para tamanho e peso dos peixes estão apresentados nas Tabelas 9 e 10 respectivamente. De acordo com os resultados encontrados, houve efeito das concentrações de aflatoxinas sobre o tamanho e o peso dos peixes Pacu em relação ao tratamento controle. Os resultados apresentaram diferença (P<0,05) no 180º dia de tratamento no grupo controle, tanto em relação ao dia 0 como em comparação aos demais tratamentos, demonstrando que no grupo controle os animais apresentaram tamanho e peso maiores em relação aos animais dos tratamentos com aflatoxinas.

Tabela 9 - Tamanho do Pacu (cm) durante o período experimental.

Tratamento	Tamanho (cm)						
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	8,70 ^{Fab}	10,97 ^{Ea}	13,75 ^{Da}	14,93 ^{DCa}	15,88 ^{BCa}	17,50 ^{Ba}	21,46 ^{Aa}
A	8,96 ^{Ea}	9,43 ^{Eb}	11,96 ^{Db}	11,18 ^{CDb}	13,04 ^{BCb}	14,50 ^{ABb}	16,38 ^{Ab}
B	8,42 ^{Fab}	9,64 ^{Eb}	11,28 ^{Db}	11,68 ^{CDb}	12,92 ^{BCb}	14,31 ^{ABb}	15,35 ^{Ab}
C	8,06 ^{Eb}	9,58 ^{Db}	11,25 ^{Cb}	11,16 ^{BCb}	12,57 ^{Bb}	14,87 ^{Ab}	16,23 ^{Ab}

Fonte de ----- *P* valor (nível descritivo do teste) -----
 variação

Tratamento < 0,0001
 Tempo 0,0001
 Interação 0,0001

A: 10,42 µg AFB₁/kg; B: 25,71 µg AFB₁/kg; C: 56,47 µg AFB₁/kg.

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

*Limite de detecção (LOD): 0,05 µg AFB₁/kg; Limite de quantificação (LOQ): 0,15 µg

A: 10,42 µg AFB₁/kg; B: 25,71 µg AFB₁/kg; C: 56,47 µg AFB₁/kg.

Fonte: Própria autoria.

Assim como relatado por Newman (2000) e Whitlow e Hagler (1999), animais como as aves e suínos, afetados por micotoxinas, podem apresentar perda de peso, baixa eficiência alimentar, falta de apetite e ocasionalmente a morte.

Com relação à taxa de sobrevivência, ao final do experimento foram obtidos os valores de 99,33%; 98,0%; 96,67% e 89,33% nos tratamentos controle, 10 mg/kg, 20 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. A mortalidade no tratamento controle pode ser explicada pelas características da espécie, como a rusticidade e altamente competitiva pelo território, sendo até escolhida para a pesca esportiva (DIAS; MORAIS, 2010). Todos os tratamentos (A, B e C)

contendo aflatoxinas apresentaram maior mortalidade em relação ao controle, sendo que o tratamento com 50ppb apresentou o maior índice de mortalidade.

Tabela 10- Peso do Pacu (g) durante o período experimental.

Tratamento	Peso (g)						
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	14,53 ^G	31,08 ^F	52,08 ^E	79,66 ^D	103,53 ^C	140,63 ^B	228,46 ^A
A	15,33 ^E	21,09 ^D	34,68 ^C	36,78 ^C	54,58 ^{BC}	71,25 ^{BA}	108,85 ^A
B	13,71 ^E	19,75 ^D	31,25 ^C	38,12 ^{BC}	51,07 ^{BA}	71,87 ^{BA}	88,92 ^A
C	10,4 ^F	19,50 ^E	30,00 ^D	39,72 ^{DC}	19,28 ^{BC}	83,75 ^{BA}	123,85 ^A
Fonte de variação		----- P valor (nível descritivo do teste) -----					
Tratamento		< 0,0001					
Tempo		0,0001					
Interação		0,0001					

* Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

*Limite de detecção (LOD): 0,05 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$; Limite de quantificação (LOQ): 0,15 $\mu\text{g A}$:10,42 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$; B: 25,71 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$; C: 56,47 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$.

Fonte: Própria autoria.

De acordo com os resultados apresentados para o crescimento do Pacu (peso e tamanho) ao longo do período experimental e comparando-o com o consumo de ração, pode-se concluir que a presença de aflatoxinas na ração causou um efeito prejudicial nos peixes.

Zychowski et al. (2013) submeteram peixes Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) a níveis de 100 – 5000 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$ por sete semanas e encontraram diminuição no ganho de peso e na taxa de sobrevivência. Assim como Gonçalves, Naehrer e Santos (2018), que alimentaram pangassius (*Pangasius hypophthalmus*) com níveis crescentes de AFB_1 (50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/kg}$)

por 12 semanas e reportaram redução no ganho de peso em peixes alimentados com 50 µg/kg, sendo maior a redução conforme aumentava a concentração de aflatoxina.

Segundo Akter, Rahman e Hasan (2010), a exposição de alevinos de carpa (*Cyprinus carpio*) a 100 µg/kg AFB₁ reduziu significativamente o desempenho de crescimento e ganho de peso. No trabalho de Deng et al. (2010), foram observados os efeitos tóxicos da AFB₁ em tilápia (*Oreochromis aureus*) expostas por 20 semanas usando alimentos contendo 0,019, 0,085, 0,245, 0,638, 0,793 e 1,641 mg/kg de AFB₁, sendo os impactos tóxicos observados na dieta com 0,245 mg/kg ou maior, entre as 10^a e 20^a semanas, sendo que nos níveis de 0,245 mg/kg de AFB₁ houve uma redução na taxa de crescimento e as dietas contendo 0,793 e 1,641 mg/kg de AFB₁ levaram à degeneração no fígado.

Jantrarotai e Lovell (1990) observaram redução no crescimento do bagre-de-canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com rações com concentração de 10 µg/kg de AFB₁ durante 10 semanas. Segundo Arana et al. (2002), concentrações a partir de 80 µg/kg de aflatoxinas já podem causar retardo no crescimento de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Em uma pesquisa realizada por Tuan et al. (2002), foram analisados peixes da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis tend*) por oito semanas e o efeito de dietas contendo 0,25, 2,5, 10 e 100 mg/kg de AFB₁. As dietas contendo 2,5 mg/kg e 10 mg/kg de AFB₁ tiveram um efeito negativo no desempenho de crescimento e as dietas contendo 100 mg/kg de AFB₁ causaram perda de peso, necrose hepática grave e mortalidade.

A presença de AFB₁ na dieta a um nível de 0,2 mg/kg ou mais afetaram negativamente o crescimento e desempenho em bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) após 12 semanas (Wang et al., 2016). Já no trabalho de Manning et al. (2011), aflatoxinas em alimentos naturalmente contaminados em uma concentração de 0,16 mg/kg não apresentaram efeitos adversos nas variáveis de produção de ganho de peso, consumo de ração e taxa de eficiência alimentar no bagre do canal (*I. punctatus*). Isso demonstra a importância de vários estudos com diversas espécies aquáticas com micotoxinas. Segundo Nunes et al. (2019), alevinos de tambaqui (*Colossoma macroporum*) que consumiram ração contaminada com AFB₁ em concentrações superiores a 500 µg/kg apresentaram diminuição no crescimento e redução no ganho de peso.

No trabalho de Lopes et al. (2005), no Brasil, em estudo sobre a deposição de aflatoxinas no tecido de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*), foi demonstrado que concentrações de aflatoxina superiores a 350 µg/kg de ração acarretaram deposição residual no fígado e na carcaça desses animais. Segundo os autores, o potencial bioacumulador das aflatoxinas no organismo torna o peixe mais suscetível a estresses e doenças em geral, exercendo efeito também sobre o sistema imunológico, contribuindo para ocorrência de infecções virais e bacterianas. Já a resistência às aflatoxinas depende da espécie de peixe. As intoxicações podem ser agudas ou crônicas e o seus efeitos tóxicos dependem do tempo de exposição e da dose administrada.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar que as aflatoxinas exerceram efeito negativo sobre o desempenho do Pacu. Corroborando com estes resultados, Bedoya-Serna et al. (2019) verificaram que a presença de aflatoxinas na ração afeta negativamente o desempenho do matrinxã (*Brycon cephalus*) exposto por seis meses às concentrações de 10, 20 e 50 mg AFB₁/kg, tornando-o uma espécie suscetível neste aspecto.

Com relação aos resultados revelados anteriormente, os estudos demonstrados têm uma ampla variação na suscetibilidade à aflatoxina B₁ e são necessários mais estudos sobre o tema para que permitam a padronização das variáveis como as doses de aflatoxinas e tempo de exposição e assim garantir uma resposta dos efeitos destas toxinas em espécies aquáticas.

6.6 Parâmetros bioquímicos hepáticos

Como a toxicidade da aflatoxina pode enfraquecer o sistema imunológico de peixes e aumentar sua vulnerabilidade a patógenos, torna se importante a investigação da influência das aflatoxinas em enzimas hepáticas, como indicadores de hepatotoxicidade. Em peixes, a exposição a AFB₁ está associada a um desempenho ruim, hepatotoxicidade, aumento da mortalidade, redução da resposta imunológica e imunossupressão (FALLAH et al., 2014; GONÇALVES; NAEHRER; SANTOS, 2018).

Com relação à enzima aspartato aminotransferase (AST), os animais foram submetidos a diferentes concentrações de AFB₁ na ração durante o período experimental de 180 dias e não houve efeito ($P>0,05$) do tratamento

para essa enzima, como pode ser verificado na Tabela 11. Para a enzima fosfatase alcalina (FA), foi observado um aumento dos níveis de FA no tratamento B (20 µg/kg) com 60 dias e após 90 dias houve uma redução significativa nesses valores, como apresentado na Tabela 12. Foi observado efeito do tempo de exposição às aflatoxinas para os dois parâmetros. Os peixes possuem essa enzima no hepatopâncreas com função de desintoxicação de substâncias, nesse propósito quando o hepatopâncreas metaboliza grandes quantidades de substâncias tóxicas o resultado é uma quantidade maior e uma atividade mais alta dessa enzima (THRALL et al., 2007).

Tabela 11 - Resultados referentes à enzima Aspartato Aminotransferase (AST) em sangue de Pacu.

Tratamento	AST (U/L)					
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	176,25 ^a	76,40 ^{ab}	103,00 ^{ab}	91,40 ^{ab}	52,00 ^{b AB}	38,40 ^{b A}
A	68,75 ^{ab}	84,75 ^{ab}	132,80 ^a	51,00 ^b	28,60 ^{b B}	71,60 ^{ab A}
B	146,00 ^a	154,67 ^a	94,60 ^a	77,00 ^a	72,80 ^{a A}	101,00 ^{a A}
C	125,00 ^{ab}	126,75 ^a	78,60 ^{ab}	76,60 ^{ab}	45,20 ^{ab AB}	32,20 ^{b A}
Erro padrão	18,88	14,48	8,40	9,04	6,03	10,56
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----					
Tratamento	0,1236					
Tempo	< 0,0001					
Interação	0,1064					

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

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente (P<0,05).

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 12 - Resultados referentes à enzima Fosfatase Alcalina no Pacu.

Tratamento	FA (U/L)					
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	41,33 ^{a A}	22,40 ^b	7,67 ^b	22,20 ^{b A}	16,00 ^{b B}	17,40 ^{b AB}
A	34,25 ^{a AB}	38,75 ^a	9,67 ^c	11,67 ^{c A}	26,00 ^{ab A}	21,40 ^{bc AB}
B	26,75 ^{ab B}	38,00 ^a	16,50 ^b	22,20 ^{ab A}	24,80 ^{ab A}	23,40 ^{ab A}
C	32,00 ^{a AB}	31,75 ^{ab}	15,60 ^b	19,40 ^{b A}	21,40 ^{ab AB}	15,20 ^{b B}
Erro padrão	1,83	3,05	B1,98	1,52	1,09	1,08
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----					
Tratamento	0,3244					
Tempo	< 0,0001					
Interação	0,0088					

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

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

As Tabelas 13, 14 e 15 se referem às proteínas totais, albuminas e globulinas no Pacu, respectivamente. Pode-se notar que houve efeito do tratamento ($P < 0,05$) somente para globulinas, com diferença entre os grupos aos 90, 150 e 180 dias. Aos 90 dias, os valores para o controle e o tratamento A foram similares e diferiram dos demais grupos. Com 150 dias de experimento, o controle foi similar ao tratamento C, diferindo apenas do tratamento B, sendo que este apresentou maior valor. Já aos 180 dias, houve diferença apenas entre os tratamentos B e C, como observado na Tabela 15. Para os três parâmetros houve efeito do tempo de exposição ($P < 0,05$) às aflatoxinas.

Tabela 13 - Resultados referentes às Proteínas Totais no Pacu.

Tratamento	PT (U/L)					
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	3,12 ^{ab}	3,00 ^b	3,60 ^{a A}	2,66 ^b	2,67 ^{b C}	2,81 ^b
A	2,88 ^a	3,03 ^a	3,33 ^{a AB}	2,98 ^a	2,89 ^{a AB}	3,00 ^a
B	3,14 ^a	2,90 ^a	3,08 ^{a BC}	2,51 ^a	2,97 ^{a A}	2,81 ^a
C	3,08 ^a	2,62 ^a	2,73 ^{a C}	2,65 ^a	2,72 ^{a BC}	2,86 ^a
Erro padrão	0,14	0,08	0,06	0,08	0,03	0,04
<hr/>						
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----					
Tratamento	0,0621					
Tempo	< 0,0001					
Interação	0,0040					

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

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente (P<0,05).

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 14 - Resultados referentes à Albumina no Pacu.

Tratamento	Albumina (U/L)					
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia180
Controle	0,82 ^b	0,89 ^{b A}	1,25 ^{a A}	0,82 ^{b A}	0,83 ^{b B}	0,83 ^b
A	0,76 ^c	0,84 ^{bc AB}	1,13 ^{a AB}	1,02 ^{ab A}	0,95 ^{ab A}	0,89 ^{ab}
B	0,79 ^{bc}	0,78 ^{c B}	1,18 ^{a AB}	0,78 ^{bc A}	0,93 ^{ab A}	0,90 ^{abc}
C	0,84 ^a	0,87 ^{a AB}	0,94 ^{a B}	0,93 ^{a A}	0,88 ^{a AB}	0,71 ^a
Erro padrão	0,07	0,01	0,04	0,04	0,01	0,04
Fonte de variação	----- <i>P valor (nível descritivo do teste)</i> -----					
Tratamento	0,5060					
Tempo	< 0,0001					
Interação	0,0070					

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

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente (P<0,05).

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente (P<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 15 - Resultados referentes às Globulinas no Pacu.

Tratamento	Globulina (U/L)					
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
Controle	2,30 ^{aA}	2,15 ^{abA}	2,36 ^{aA}	1,85 ^{bcA}	1,83 ^{cB}	1,98 ^{bcAB}
A	2,12 ^{abA}	2,19 ^{abA}	2,26 ^{aA}	1,95 ^{abA}	1,93 ^{bAB}	2,06 ^{abAB}
B	2,33 ^{aA}	2,12 ^{abA}	1,83 ^{bB}	1,75 ^{bA}	2,02 ^{bA}	1,91 ^{bB}
C	2,31 ^{aA}	1,76 ^{bA}	1,86 ^{bB}	1,72 ^{bA}	1,83 ^{bB}	2,16 ^{abA}
Erro padrão	0,03	0,07	0,03	0,07	0,02	0,03
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----					
Tratamento	0,0405					
Tempo	< 0,0001					
Interação	< 0,0001					

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

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

De acordo com Jha et al. (2007), as proteínas séricas, dentre elas a albumina e a globulina auxiliam na manutenção do equilíbrio osmótico e no transporte de substâncias químicas exógenas, metabólitos endógenos e alguns parâmetros imunológicos contra infecções.

No presente trabalho, a AFB₁ não ocasionou reduções significativas ($P > 0,05$) nas proteínas séricas totais, albumina e globulina. Esses resultados podem ser atribuídos a metabólitos de aflatoxinas que não se ligaram a macromoléculas celulares e com isso não houve a inibição da síntese de proteínas no fígado, como relatado no trabalho de Cagauan et al. (2004).

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).

Diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos nas diversas espécies de peixes vêm tendo seus intervalos padronizados como ferramenta para monitorar aspectos fisiológicos e patológicos. Fatores exógenos como manejo (SVOBODOVA et al., 2008), doenças (CHEN; JIN; GUO-LIANG, 2005) e estresse (CNAANI et al., 2004) sempre impactam em mudanças na composição do sangue, enquanto que a alimentação e densidade populacional influenciam certos parâmetros bioquímicos (COZ-RAKOVACET et al., 2005). Dessa forma, a padronização dos diversos índices encontrados dentro da patologia clínica laboratorial deve ser estudada de maneira espécie-específica, dando assim suporte aos mais variados diagnósticos dentro do sistema de produção, como os relacionados aos aspectos clínicos e zootécnicos.

Além dos poucos experimentos visando a padronização de intervalos para parâmetros bioquímicos e hematológicos em peixes, os estudos disponíveis demonstram grandes intervalos de normalidade, como o intervalo de 64 a 215 U/L, com média de $114,1 \pm 7,1$ para a AST em um experimento envolvendo 42 peixes *Rhamdia quelen* (Jundiá) machos (BORGES et al., 2004). Em outro estudo, em que peixes Jundiá foram expostos ao herbicida Clomazone, os peixes do grupo controle apresentaram média da enzima AST em torno de 200 U/L (CRESTANI et al., 2006).

Embora não tenha sido possível até o presente momento encontrar um padrão de referência para a AST na literatura para *Piaractus mesopotamicus*, em um experimento utilizando-se 29 peixes do mesmo gênero (*Piaractus brachypomus*) – Pacu Vermelho, estabeleceu-se um intervalo de normalidade para a AST que varia de 0 – 125, sendo a média 49,1 U/L (SAKAMOTO; LEWBART; SMITH, 2001).

Existem poucas referências encontradas na literatura referenciando os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas em peixes e os seus intervalos de normalidade. Os dados encontrados para ALT e AST em *Brycon cephalus* na maioria das vezes se encontram demonstrados em UI/mg de proteína, por meio de metodologias adaptadas de Bergmeyer (1983), que envolvem a cinética de homogeneizados do fígado a ter a atividade enzimática analisada.

6.7 Histopatologia do fígado

Com métodos rápidos, sensíveis e confiáveis para avaliar danos em tecidos vitais de peixes expostos a toxinas, o estudo de alterações patológicas e histopatológicas podem fornecer evidência dos efeitos tóxicos das aflatoxinas nos peixes. A aflatoxicose pode ter um significado econômico em efeitos na produção de peixes de viveiro e o fígado é o órgão alvo mais importante em peixes suscetíveis a essa intoxicação (ZYCHOWSKI et al., 2013).

Foram realizadas observações macro e microscópicas das características histológicas de fígado de Pacu expostos a diferentes concentrações de AFB₁ por 180 dias e as características observadas estão de acordo com aquelas encontrados em outros peixes.

Não estiveram presentes as tríades portais, que são caracterizadas por ramificações de uma artéria hepática, de um ducto biliar e de uma veia porta. Uma característica do fígado de mamíferos é a tríade portal, portanto na maioria dos teleósteos elas estão ausentes ou indistinguíveis (BRUSLÈ; ANADON, 1996). Os teleósteos possuem também um tecido pancreático exócrino junto ao tecido hepático conhecido como hepatopâncreas, que é importante para produção de enzimas que estão ligadas à digestão de alimentos no intestino delgado (GONZÁLEZ et al., 1993; HINTON; POOL, 1976).

Na espécie *Piaractus mesopotamicus*, os hepatócitos apresentam arranjo cordonal, nucléolo evidente, núcleo central e citoplasma róseo com grânulos de glicogênio (SOUZA et al., 2001). Portanto, nos tratamentos expostos à aflatoxina observaram-se lesões hepáticas, a espécie, a concentração e o período de exposição ao agente agressor, sendo que a idade e o sexo podem influenciar diretamente no aparecimento de lesões hepáticas nos animais (BARNI; BERNOCCHI; GERZELI, 1985; BERNET et al., 1999).

As hepatopatias de origem tóxica acometem mais os peixes do que os mamíferos, devido ao fluxo sanguíneo lento dos peixes comparativamente com o débito cardíaco, os mamíferos possuem um fluxo biliar mais rápido que os peixes em até 50 vezes, sendo que os peixes apresentam uma taxa de depuração de xenobióticos mais lenta do que os mamíferos (GINGERICH,

1982). Portanto, os peixes estarão expostos aos efeitos da hepatotoxicidade por um tempo maior comparado aos mamíferos, quando entrar em contato com um agente tóxico.

Nos tratamentos com AFB₁ nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/kg verificou-se degeneração gordurosa, degeneração hidrópica, focos de morte celular caracterizada por células sem núcleo, ou em processo de morte celular, evidenciado por picnose nuclear, cariorrexe ou cariólise e pode-se observar também desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos.

A degeneração gordurosa foi notada aos 30 dias de tratamento com a toxina na espécie *Piaractus mesopotamicus* conforme demonstrado na figura 10 respectivamente, já as outras alterações começaram a ser observadas aos 60 dias de tratamento com as aflatoxinas. Segundo Treinen-Moslen (2001), a esteatose hepática, uma alteração benigna e reversível dos hepatócitos injuriados, é uma resposta do fígado às substâncias tóxicas ingeridas e é provocada pela ingestão de AFB₁, que acomete mais o fígado que outros órgãos (ESPADA et al., 1992).

Em todos os tratamentos com aflatoxinas houve a presença de degeneração hidrópica, a qual indica um aumento do volume celular por meio do acúmulo de água e eletrólitos no seu interior, ocasionados por defeitos nas bombas dependentes de adenosina trifosfato e é uma das primeiras respostas de dano celular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989).

Todos os tratamentos e o grupo controle apresentaram congestão de vasos e sinusóides, os fígados pertencentes aos tratamentos com 10, 20 e 50 µg/kg, apresentaram aspecto friável e sinais de icterícia aos 150 e 180 dias. Devido à consistência friável, houve dificuldade na amostragem do fígado e observou-se desprendimento dos seus fragmentos ao tentar utilizar a pinça anatômica, o que pode ser atribuído à severa degeneração gordurosa, microscopicamente observada em todos os tratamentos com a toxina. No grupo controle também se observou degeneração gordurosa em alguns momentos do experimento o que pode ser atribuído a casos de superalimentação. A Figura 10 apresenta a frequência de ocorrência de degeneração gordurosa em fígado de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Figura 10 - Frequência de ocorrência de degeneração gordurosa em fígado de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Fonte: Própria autoria.

Observou-se nos fígados do Pacu (Figuras 11, 12 e 13) a ocorrência de degeneração hidrópica, hepatócitos em processo de morte celular, bem como hepatócitos já mortos, indicando que os processos degenerativos mencionados, degeneração gordurosa e hidrópica, estão atrelados ao processo de morte celular, embora sejam enquadrados como processos passíveis de reversão, caso os fatores de agressão sejam removidos, nesse caso, a aflatoxina B₁. Essas alterações histológicas passaram a ser observadas após 60 dias de tratamento. A degeneração gordurosa foi notada já aos 30 dias de tratamento com a toxina no Pacu.

Figura 11 - Fotomicrografia de fígado de Pacu.

Observa-se grande quantidade de vacúolos de lipídeos (seta dupla) denotando esteatose, assim como hepatócitos em degeneração hidrópica (seta). H&E, 400X.

Fonte: Própria autoria.

Figura 12 - Fotomicrografia de fígado de Pacu.

Observa-se grande quantidade de hepatócitos mortos ou em processo de morte, assim como em degeneração hidrópica e gordurosa. H&E, 400X.

Fonte: Própria autoria.

Figura 13 - Fotomicrografia de fígado de Pacu.

Observa-se grande quantidade de vacúolos de lipídeos, caracterizando um quadro de esteatose. H&E, 400X.

Fonte: Própria autoria.

De acordo com Tuan et al., (2002), diferentes alterações histopatológicas foram observadas em outras espécies de peixes expostos às aflatoxinas e os fígados dos peixes alimentados com dietas com 10 mg AFB₁/kg continham excesso de lipofuscina e núcleos hepatocelulares de tamanho irregular; por sua vez, dietas contendo 100 mg AFB₁/kg causaram necrose hepática grave. Estudo realizado por Sepahdari et al., (2010) com exposição de beluga (*Huso huso*) a 25 e 1.000 mg/kg de aflatoxinas por três meses revelou alterações progressivas de deposição de gordura, degeneração dos hepatócitos e necrose.

Nos estudos de Nunes et al., (2019), que avaliaram alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), o consumo de alimentos contaminados com 1.000 e 2.000 µg/kg de AFB₁ causou severa deterioração nos tecidos hepático e renal. Em outro estudo foi relatado que alterações histopatológicas severas foram observadas em Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) expostos a concentrações de 3.000 e 5.000 mg AFB₁/kg por sete semanas (ZYCHOWSKI et al., 2013). Já no trabalho de Huang et al., (2014), não foram observadas alterações histopatológicas em fígado de carpas gibel (*Carassius auratus gibelio*) com doses de 22,3 e 1.646,5 mg AFB₁/kg por um período de 24 semanas. Bedoya-Serna et al., (2019) relatam a toxicidade da AFB₁ para matrinxã, ocasionando danos no tecido hepático, como degeneração gordurosa e hidrópica e células mortas.

7 CONCLUSÕES

Apesar de ter havido acúmulo de resíduos de AFB₁ em baixos níveis no fígado e apenas discreto acúmulo no músculo dos peixes, deve-se destacar que existe acúmulo na espécie Pacu exposta cronicamente a dietas com níveis de aflatoxinas permitidos pelas legislações.

A AFB₁ nas dietas dos peixes expostos cronicamente interferiu negativamente no peso e no tamanho dos animais. Além disso, a presença de AFB₁ na dieta dos peixes causou alterações histopatológicas no tecido hepático dos animais. Com isso, pode-se concluir que a ingestão crônica pelos peixes de dieta contaminada com AFB₁ pode causar prejuízos econômicos aos produtores desses animais.

Assim, pode-se inferir que o Pacu não está entre as espécies de peixes mais suscetíveis a resíduos de aflatoxinas em seus tecidos. No entanto, a exposição crônica às aflatoxinas na dieta pode afetar a fisiologia e desempenho da espécie.

REFERÊNCIAS

- 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 Sciences (Mansoura University)**, Mansoura, v. 29, p. 6175-6196, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 30 ago. 2013. Seção 1, p. 33-35.
- AKTER, A.; RAHMAN, M.; HASAN, M. Effects of aflatoxin B₁ on growth and bioaccumulation in common carp fingerling in Bangladesh. **Asia-Pacific Journal of Rural Development**, Bangladesh, v. 20, n. 2, p. 1-14, 2010.
- AL-JAAL, B. A. et al. Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: a systematic literature review, 2001–2018. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 129, p. 211-228, 2019.
- ALVARADO, A. M.; ZAMORA-SANABRIA, R.; GRANADOS-CHINCHILLA, F. A focus on aflatoxins in feedstuffs: levels of contamination, prevalence, control strategies, and impacts on animal health. In: ABDULRA'UF, L. (Ed.) **Aflatoxin: control, analysis, detection and health risks**. London: IntechOpen, 2017. cap. 6, p. 115-152.
- ANATER, A. et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 451, p. 1-10, 2016.
- ARANA, S. et al. Differential effect of chronic aflatoxin B₁ intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 34, n. 2, p. 253-263, 2002.
- AZZIZ-BAUMGARTNER, E. et al. Case–control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 113, n. 12, p. 1779-1783, 2005.
- BACHER, K. **Perceptions and misconceptions of aquaculture: a global overview**. Rome: FAO, 2015. (GLOBEFISH Research Programme, v. 120).
- BANKOLE, S.; SCHOLLENBERGER, M.; DROCHNER, W. Mycotoxins in food systems in Sub Saharan Africa: a review. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 22, n. 3, p. 163-169, 2006.
- BANKOLE, S. A. et al. Occurrence of aflatoxin B₁ in food products derivable from 'egusi' melon seeds consumed in southwestern Nigeria. **Food Control**, London, v. 21, n. 7, p. 974-976, 2010.
- BARNI, S.; BERNOCCHI, G.; GERZELI, G. Morphohistochemical changes in hepatocytes during the life cycle of the European eel. **Tissue and Cell**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 97-109, 1985.

BEDOYA-SERNA, C. M. et al. Correction: Effects of dietary aflatoxin B1 on accumulation and performance in matrinxã fish (*Brycon cephalus*). **PloS One**, San Francisco, v. 14, n. 4, e0216194, 2019.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 3th ed. Basel: Weinhein Durfield Beach, 1983.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. et al. The immune system is limited by oxidative stress: dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in Pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 47, n. 1, p. 360-367, 2015.

BLANKENSHIP, P. D. et al. Effect of geocarposphere temperature on pre-harvest colonization of drought-stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 85, n. 1, p. 69-74, 1984.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, Washington, v. 9, n. 2, p. 52-55, 1961.

BORGES, A. et al. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 21-25, 2004.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Auburn: Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1990.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09 novembro de 1988. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 09 nov. 1988. Seção 1, p. 21.968.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. **Legislação sobre micotoxinas**. 2002. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em: 28 out. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017**. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966>. Acesso em: 03 out. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Resolução-RDC Nº 357, 17 de março 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

BRUSLÉ, J.; ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. **Fish Morphology**, S.I., v. 76, p. 545-551, 1996.

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, n. 1, p. 134-158, 2012.

CAGAUAN, A. G. et al. Effect of aflatoxin-contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE (ISTA 6), 6., 2004, Manila, Philippines. **Abstract...** Manila, 2004. p. 16.

CARBONE, D.; FAGGIO, C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants: effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 54, p. 172-178, 2016.

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.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: Funep, 1992.

CAVAGLIERI, L. R. et al. Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 147-150, 2009.

CENTODUCATI, G. et al. Characterization of the cellular damage induced by aflatoxin B1 in sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) hepatocytes. **Italian Journal of Animal Science**, Pavia, v. 8, suppl. 2, p. 848-850, 2009.

CHEN, Y.E.; JIN, S.; GUO-LIANG, W. Study on blood physiological and biochemical indices of *Vibrio alginolyticus* Disease of *Lateolabrax japonicus* [J]. **Journal of Oceanography in Taiwan Strait**, Beijing, n. 1, p. 104-108, 2005.

CHAVEZ-SANCHEZ, M. C.; PALACIOS, C. A. M.; MORENO, I. O. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 49-60, 1994.

CHIEWCHAN, N.; MUJUMDAR, A. S.; DEVAHASTIN, S. Application of drying technology to control aflatoxins in foods and feeds: a review. **Drying Technology**, New York, v. 33, n. 14, p. 1700-1707, 2015.

CNAANI, A. et al. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 15, p. 1434-1440, 2004.

COLAKOGLU, F.; DONMEZ, H. H. Effects of aflatoxin on liver and protective effectiveness of esterified glucomannan in merino rams. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2012, e 462925, 2012.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins' pathologic basis of disease**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1989.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução-RDC Nº 357, 17 de março (2005). Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e as diretrizes para seu enquadramento, bem como para as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 53, p. 58-63, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2019.

CONROY, G. Alteraciones asociadas con dos alimentos comerciales en tetrahíbridos de tilapia roja cultivados en Venezuela. **Boletín Informativo**, Caracas, p. 1-33, set. 2000.

COZ-RAKOVAC, R. et al. Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 29, n. 8, p. 677-687, 2005.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 19-28, 2002.

CRESTANI, M. et al. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 48-55, 2006.

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

DIAS, M. T.; MORAES, F. R. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus* X *C. macropomum*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 363-368, 2010.

DI GREGORIO, M. C. et al. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxin Reviews**, London, v. 33, n. 3, p. 125-135, 2014.

DIRICAN, S. A review of effects of aflatoxins in aquaculture. **Applied Research Journal**, Arak, v. 1, p. 192-196, 2015.

EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Eds.). **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. Amsterdam: Elsevier, 2013.

EL-BANNA, R. et al. Performance and tissue residue of tilapias fed dietary aflatoxin. **Veterinary Medical Journal**, Giza, v. 40, n. 3, p. 17-23, 1992.

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**, Exeter, v. 47, n. 7, p. 1606-1609, 2009.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Pesca e aquicultura. Brasília Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>>. Acesso em: 01 jan. 2019.

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, p. 364/5-365/24, 20 Dec. 2006

ESPADA, Y. et al. Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B1 in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, London, v. 53, n. 3, p. 275-279, 1992.

FALLAH, A. A. et al. Mycoflora, aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in fish feed. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 419-424, 2014.

FEDDERN, V. et al. Aflatoxins importance on animal nutrition. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. (Ed.) **Afltoxins: recent advances and future prospects**. London: InTechOpen, 2013. cap. 8, p. 171-195.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **FAO Yearbook: fishery and aquaculture statistics 2016**. Rome: FAO, 2016a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas**. Rome: FAO, 2003. (Estudio FAO Alimentación Nutrición, 73).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -FAO. **Rome declaration on world food security and world food summit plan of action**. Rome: FAO, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2016: opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2016b. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2019

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2018: meeting the sustainable development goals**. Rome: FAO, 2018a. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Fishery and aquaculture statistics**. Rome: FAO, 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the sustainable development goals**. Rome: FAO, 2018b.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Section 555.400: Foods — adulteration with aflatoxins**. 1995. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074555.htm>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

GALLO, A. et al. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. **Toxins**, Basel, v. 7, n. 8, p. 3057-3111, 2015.

GARCÍA, S.; HEREDIA, N. L. Aflatoxins: an overview. In: DIXON, J. B.; BARRIENTOS VELÁZQUEZ, A. L.; DENG, Y. (Eds.) **Aflatoxin control: safeguarding animal feed with calcium smectite**. Madison: ASA/SSSA, 2014. p. 1-10.

GAZOLA, R.; BORELLA, M. I. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 12, p. 1485-1487, 1997.

GINGERICH, W.H. Hepatic toxicology of fishes. In: WEBER, L. F. (Ed.) **Aquatic toxicology**. New York: Plenum, 1982. p. 55-105.

GIRONA, A. J. R. **Micotoxinas y micotoxicosis**. Madrid: AMV Ediciones, 2011.

GONÇALVES, R. A.; NAEHRER, K.; SANTOS, G. A. Occurrence of mycotoxins in commercial aquafeeds in Asia and Europe: a real risk to aquaculture? **Reviews in Aquaculture**, Richmond, v. 10, n. 2, p. 263-280, 2018.

GONÇALVES, R. A. et al. Aflatoxin B1 (AFB 1) reduces growth performance, physiological response, and disease resistance in Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*). **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 921-936, 2018.

GONZÁLEZ, G. et al. Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. **Journal of Fish Biology**, British Isles, v. 43, p. 363-373, 1993.

GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 206, n. 2, p. 131-137, 2005.

HAZEL, C. M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 153, n. 1, p. 51-59, 2004.

HENDRICKS, J. D. et al. Carcinogenicity of aflatoxins in nonmammalian organisms. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Eds.) **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 103-136.

HINTON, D. E.; POOL, C. R. Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Biology**, British Isles, v. 8, n. 3, p. 209-219, 1976.

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, v. 428-429, p. 236 – 242, 2014.

HUANG, Y. et al. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B1. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 319, n. 1-2, p. 89-97, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2016**. Rio de Janeiro, v. 44, p. 34, 2017.

_____. **Produção da Pecuária Municipal 2015 e 2016**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 17/setembro/2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **Some naturally occurring substances**: food items and constituents, heterocyclic aromatic amine and mycotoxins. Lyon: Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **The rubber industries**. Lyon: WHO, 2002. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 28)

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

IOANNOU-KAKOURI, E. et al. **An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe**. Amsterdam: Kluwer, 2004.

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

JANTRAROTAI, W.; LOVELL, R. T. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 2, n. 4, p. 248-254, 1990.

JHA, A. K. et al. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ω -3 fatty acid and β -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 23, n. 5, p. 917-927, 2007.

JOMORI, R. K. et al. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 243, n. 1, p. 175-183, 2005.

KIESSLING, K.-H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 58, n. 2, p. 327-338, 1986.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002.

KOLPIN, D. W. et al. Mycotoxins: diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 470, p. 669-676, 2014.

KOOPRASERTYING, P. et al. Exposure assessment of aflatoxins in Thai peanut consumption. **Cogent Food & Agriculture**, Abingdon, v. 2, n. 1, e1204683, 2016.

KUMAR, P. et al. Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, e2170, 2016.

KUMAR, V. et al. Importance of mycotoxins in aquaculture feeds. **Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 18, p. 25-29, 2013.

LAVKOR, I.; VAR, I. The control of aflatoxin contamination at harvest, drying, pre-storage and storage periods in peanut: the new approach. In: ABDULRA'UF, L. (Ed.) **Aflatoxin: control, analysis, detection and health risks**. London: IntechOpen, 2017. cap. 3, p. 45-65.

LEWIS, L. et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 113, n. 12, p. 1763, 2005.

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.

MAHFOUZ, M. E.; SHERIF, A. H. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, Berlin, v. 71, p. 48-59, 2015.

MAMUR, S. et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. **Drug and Chemical Toxicology**, New York, v. 43, n. 2, p. 149-157, 2020.

MANNING, B. B.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Aflatoxins from moldy corn cause no reductions in channel catfish *Ictalurus punctatus* performance. **Journal of the World Aquaculture Society**, Malden, v. 36, n. 1, p. 59-67, 2005.

MANNING, B. B. et al. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing aflatoxin from moldy corn do not experience increased mortality after challenge with *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Malden, v. 42, n. 4, p. 598, 2011.

MARESCA, M.; FANTINI, J. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 282-294, 2010.

MATEJOVA, I. et al. Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: a review. **Journal of the World Aquaculture Society**, Malden, v. 48, n. 2, p. 186-200, 2017.

MATEUS, L. et al. Fishing resources in the rio Cuiabá basin, Pantanal do Mato Grosso, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 2, n. 4, p. 217-227, 2004.

MELO, J. F. B. et al. Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 323-327, 2002.

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.

MILSTEIN, A. et al. Low temperature tolerance of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 58, n. 4, p. 455-460, 2000.

NEWMAN, K. Y. L. E. The biochemistry behind esterified glucomannans—titrating mycotoxins out of the diet. In: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A. (Eds.) **Biotechnology in the feed industry**: proceedings of Alltech's 16th Annual Symposium. Nottingham: Nottingham University Press, 2000. p. 369-382.

NG, W-K. The potential use of palm kernel meal in aquaculture feeds. **Aquaculture Asia**, Singapore, v. 8, n. 1, p. 38-39, 2003.

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**, Easton, v. 59, n. 9, p. 5150-5158, 2011.

NUNES, E. M. C. G. et al. Effects of aflatoxin B 1 on performance and health of tambaqui fingerlings (*Colossoma macropomum*). **International Aquatic Research**, Iran, v. 11, n. 1, p. 73-83, 2019.

OLADELE, D. The effects of aflatoxins on animals: partnership for aflatoxin control in Africa (Meridian Institute, Washington, DC). **Aflatoxin Partnership Newsletter**, Washington, v. 2, p. 1-4, 2014.

OLIVEIRA, S. T. L. et al. *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after the intake of aflatoxins. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 4, p. 400-406, 2013.

OMOTAYO, O. P. et al. Comparative study of aflatoxin contamination of winter and summer ginger from the North West Province of South Africa. **Toxicology Reports**, Amsterdam, v. 6, p. 489-495, 2019.

OTTINGER, C. A.; KAATTARI, S. L. Long-term immune dysfunction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed as embryos to aflatoxin B1. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 10, n. 1, p. 101-106, 2000.

PEIXE BR. **Anuário**. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2019. p. 12-42.

PEIXE, BR. **Anuário**. Peixe Br da Piscicultura 2020. 2020. **Acesso em 10/05/2020**, v. 28, 2019.

PEIXER, J.; PETRERE JR, M. Hook selectivity of the Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the Pantanal, the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 67, n. 2, p. 339-345, 2007.

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

PIERRON, A.; ALASSANE-KPEMBI, I.; OSWALD, I. P. Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. **Animal Nutrition**, Beijing, v. 2, n. 2, p. 63-68, 2016.

PINHEIRO, R. E. E. et al. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. **Nutritime Revista Eletrônica**, Viçosa, v. 12, n. 5, p. 4268-4279, 2015.

POVH, J. A. et al. Diversidade genética de Pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 201-206, 2008.

PUSCHNER, B. Mycotoxins. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 32, p. 409-419, 2002.

RAHMAN, A. N. A.; ABDELLATIEF, S. A.; MAHBOUB, H. H. H. Protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* from aflatoxin B1 toxicity by dietary supplementation with Fennel essential oil and *Saccharomyces cerevisiae*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, Alexandria, v. 43, n. 3, p. 235-240, 2017.

RAJEEV RAGHAVAN, P. et al. Low levels of Aflatoxin B1 could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♂ × *A. baeri* ♀. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 17, n. 2, p. e39-e47, 2011.

RAMOS FILHO, M. M. et al. Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 361-365, 2008.

RASTOGI, S. et al. Detection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. **Food Control**, London, v. 15, n. 4, p. 287-290, 2004.

RIJSBERMAN, F. PACA (Partnership for Aflatoxin Control in Africa) presents at the global forum for innovations: middle east and Africa focus. **Aflatoxin Partnership Newsletter**, Addis Ababa, v. 2, 2014.

RODRIGUES, I.; HANDL, J.; BINDER, E. M. Mycotoxin occurrence in commodities, feeds and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. **Food Additives and Contaminants: Part B**, London, v. 4, n. 3, p. 168-179, 2011.

ROSA, C. A. R. et al. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **Poultry Science**, Urbana, v. 80, n. 2, p. 139-144, 2001.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 107-114, 2001.

ROTTINGHAUS, G. E. **Aflatoxin culture production**. Missouri: Toxicology Laboratory Methods, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, 2012.

SAKAMOTO, K.; LEWBART, G. A.; SMITH, T. M. Blood chemistry values of juvenile Red Pacu (*Piaractus brachipomus*). **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 30, n. 2, p. 50-52, 2001.

SANDERS, T. H. et al. Aflatoxin contamination of peanuts from plants drought stressed in pod or root zones. **Peanut Science**, Raleigh, v. 20, n. 1, p. 5-8, 1993.

SANTINI, A.; RITIENI, A. Aflatoxins: risk, exposure and remediation. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. (Ed.) **Afloxins: recent advances and future prospects**. London: InTechOpen, 2013. cap. 16, p. 343-376.

SANTURIO, J. M. et al. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 40, n. 1, p. 115-119, 1999.

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

SCHAAFSMA, A. W. et al. Mycotoxins in fuel ethanol co-products derived from maize: a mass balance for deoxynivalenol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 89, n. 9, p. 1574-1580, 2009.

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, n. 2, 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.

SHEPHARD, G. S. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 10, p. 1246-1256, 2008.

SHIFA, H. et al. Biological control of pre-harvest aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Bacillus subtilis* G1. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 49, n. 5-6, p. 137-148, 2016.

SILVA, V. K.; FERREIRA, M. W.; LOGATO, P. V. R. **Qualidade da água na piscicultura**. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras, 2007.

SOUZA, C. F. et al. Is monoterpene terpinen-4-ol the compound responsible for the anesthetic and antioxidant activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) in silver catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 486, p. 217-223, 2018.

SOUZA, V. L. et al. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 19-28, 2003.

SOUZA, V. L. et al. Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 15-20, 2001.

SUZY, S. K. et al. Effect of aflatoxin B1 on growth performance of *Clarias gariepinus* Fry (Burchell, 1822) in West Cameroon. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, Bangladesh, v. 10, p. 33–41, 2017.

SVOBODOVA, Z. et al. Haematological profile of common carpspawners of various breeds. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, p. 55–59, 2008.

TAVARES, L. H. S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep, 1995.

THEUMER, M. G. et al. Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 287, p. 100-107, 2018.

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**. São Paulo: Roca, 2007.

- TREINEN-MOSLEN, M. Toxic responses of the liver. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons. Columbus: McGraw Hill, 2001. p. 471-489.
- UDOMKUN, P. et al. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application - a review. **Food Control**, London, v. 76, p. 127-138, 2017.
- URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Orgs.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. cap. 10, p. 225-255.
- VAN EGMOND, H. P. Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, p. 1152-1160, 2004.
- VINEIS, P.; XUN, W. The emerging epidemic of environmental cancers in developing countries. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 205-212, 2009.
- WANG, X. et al. Response of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) to different dietary concentrations of aflatoxin B1 and evaluation of an aflatoxin binder in offsetting its negative effects. **Ciencias Marinas**, Ensenada, v. 42, n. 1, p. 15-29, 2016.
- WHITLOW, L. W.; HAGLER, W. M. An association of mycotoxins with production, health and reproduction in dairy cattle and guidelines for prevention and treatment. In: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A. (Eds.) **Biotechnology in the feed industry: proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium**. Nottingham: Nottingham University Press, 1999. p. 401.
- WILD, C. P.; MILLER, J. D.; GROOPMAN, J. D. (Eds.). **Mycotoxin control in low-and middle-income countries**. Lyon, France: IARC, 2015.
- WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.
- WOLF, H.; JACKSON, E. W. Hepatomas in rainbow trout: descriptive and experimental epidemiology. **Science**, New York, v. 142, n. 3593, p. 676-678, 1963.
- WOŹNY, M. et al. Zearalenone contamination in rainbow trout farms in north-eastern Poland. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 416, p. 209-211, 2013.
- WU, L. X. et al. Aflatoxin contamination of peanuts at harvest in China from 2010 to 2013 and its relationship with climatic conditions. **Food Control**, London, v. 60, p. 117-123, 2016.
- WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Eds.) **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 553-605.
- YELLAMANDA REDDY, T. et al. Influence of weather, dryspells and management practices on aflatoxin contamination in groundnut. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 56, n. 3, p. 262-265, 2003.
- ZENG, Z.-Z. et al. Dietary aflatoxin B1 decreases growth performance and damages the structural integrity of immune organs in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 500, p. 1-17, 2019.

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.