UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AMANDA LARISSA GOMES

**Avaliação da micobiota da ração e da ocorrência de resíduos de
aflatoxinas nos tecidos de peixes redondos**

AMANDA LARISSA GOMES

**Avaliação da micobiota da ração e da ocorrência de resíduos de
aflatoxinas nos tecidos de peixes redondos**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

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

G633a Gomes, Amanda Larissa
Avaliação da micobiota da ração e da ocorrência de
resíduos de aflatoxinas nos tecidos de peixes
redondos / Amanda Larissa Gomes ; orientador
Andrezza Maria Fernandes. -- Pirassununga, 2019.
77 f.

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

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

AMANDA LARISSA GOMES

Avaliação da micobiota da ração e da ocorrência de resíduos de aflatoxinas nos tecidos de peixes redondos

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

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

Data de aprovação: 15/09/2019

Banca examinadora:

Dra. Andrezza Maria Fernandes
(USP)

Dr. Luiz Antônio Moura Keller
(UFF)

Dr. Nycolas Levy Pereira
(USP)

Dra. Eliana Setsuko Kamimura
(USP)

DEDICATÓRIA

Dedico essa obra a minha família,
por todo apoio dado ao longo do processo,
ao meu namorado Alan e
aos meus amigos por
nunca me deixarem desanimar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, pois, Ele é o sentido de tudo, obrigado pelas Graças concedidas, pela saúde, força e fé ao longo desta jornada.

Agradeço a meus pais, mesmo às vezes não compreendendo não deixaram de dar seu apoio, em especial, ao meu namorado Alan que moveria montanhas para eu realizar todos meus sonhos e projetos, a minha grande amiga Bruna, por sempre me motivar a crescer como pessoa e nunca me deixar desistir quando surgem as adversidades.

Vocês são mais que especiais, amo vocês!

Agradeço a minha orientadora Andrezza pela oportunidade da realização do mestrado, por todo conhecimento que adquiri através da pesquisa, da companhia nos congressos e também nos *city tour*. Muito obrigada!

Agradeço a Sílvia por toda ajuda ao longo do projeto e pela paciência, a Maria Fernanda pela amizade e pelos quilômetros rodados nas coletas e a Milena pela parceria no laboratório, nos congressos, viagens e cervejas! Sou muito grata a vocês!

Agradeço a toda equipe do Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica pela convivência, apoio e companhia no café:

Professor Ricardo Luiz Moro de Sousa, Thaís, Wal, Andréa, Carol, Samara, Loiane, Marcelo e Marina.

Aos membros da Comissão Julgadora pela participação e contribuições.

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

*“Todo o conhecimento humano
começou com intuições, passou daí
aos conceitos e terminou com
ideias.”*

Immanuel Kant.

RESUMO

GOMES, A. L. Avaliação da micobiota da ração e da ocorrência de resíduos de aflatoxinas nos tecidos de peixes redondos. 2019. 77f. Dissertação Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Entre as espécies de pescado mais consumidas no Brasil estão os peixes redondos. A presença de fungos potencialmente toxigênicos na ração, especialmente os produtores de aflatoxinas (AF), é relevante pelo fato dessas toxinas poderem ser ingeridas pelos animais e serem cumulativas nos tecidos dos peixes, alcançando os consumidores humanos. A legislação brasileira estabelece o limite máximo de 50 µg/kg para aflatoxinas totais em rações destinadas ao consumo animal, e não há limites para as aflatoxinas (exceto AFB₁) em produtos de origem animal. O estudo tem por finalidade avaliar a micobiota da ração e a ocorrência de resíduos de aflatoxinas em tecidos de peixes redondos provenientes de pisciculturas e propriedades pesque-pague. Foram coletadas 26 amostras de ração (200 g) e 30 amostras de peixes (aproximadamente 1 kg cada). O fígado e músculo foram submetidos à detecção e quantificação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nas rações avaliadas, a contagem fúngica obtida nas amostras variou de 2,00 a 4,70 log unidades formadoras de colônias (UFC)/g e os principais gêneros encontrados foram *Penicillium* (61,54%), *Aspergillus* (34,61%) e *Rhizopus* (11,54%). A AFB₁ foi detectada no fígado em 70% das amostras, com concentração média de 0,38 µg/kg, enquanto que AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram detectadas em 10%, 36,7% e 10% das amostras, respectivamente, com médias de 0,31 µg/kg, 0,16 µg/kg e 0,22 µg/kg, respectivamente. No músculo dos peixes foram encontradas AFB₁ em 43,3% das amostras, com média de 0,24 µg/kg, AFB₂ em 26,7%, com média de 0,11 µg/kg e AFG₁ em 16,7%, com valores médios de 0,20 µg/kg. Conclui-se que pode haver ocorrência de resíduos de aflatoxinas no fígado e músculo de peixes redondos e deve-se controlar a exposição dos peixes às aflatoxinas, a fim de evitar riscos aos consumidores.

Palavras-chave: AFB₁. Aquicultura. CLAE. Micotoxinas. Piscicultura.

ABSTRACT

GOMES, A. L. Evaluation of feed mycobiota and the occurrence of aflatoxins residues in round fish tissues. 2019. 77f. Dissertation (Master's) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The round fish is the most consumed fish among the fish species in Brazil. The presence of potentially toxigenic fungi in the diet, especially aflatoxin (AF) producers, is relevant because these toxins can be ingested by the animals and are cumulative in fish tissues, reaching human consumers. Brazilian legislation establishes the maximum limit of 50 µg/kg for total aflatoxins in feed intended for animal consumption, and there are no limits for aflatoxins (except AFB₁) in products of animal origin. The aim of this study was to evaluate the feed mycobiota and the occurrence of aflatoxin residues in round fish tissues from fish farms and fishery-pay properties. Twenty-six feed samples (200 g) and 30 fish samples (approximately 1 kg each) were collected. The liver and muscle were submitted to the detection and quantification of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by high performance liquid chromatography (HPLC). In the evaluated feed, the fungal count obtained in the samples varied from 2.00 to 4.70 log colonies counting units (CFU)/g and the main genera were *Penicillium* (61.54%), *Aspergillus* (34.61%) and *Rhizopus* (11.54%). AFB₁ was detected in the liver in 70% of the samples, with a mean concentration of 0.38 µg/kg, whereas AFB₂, AFG₁ and AFG₂ were detected in 10%, 36.7% and 10% of the samples, respectively, with averages of 0.31 µg/kg, 0.16 µg/kg and 0.22 µg/kg, respectively. In the fish muscle AFB₁ was found in 43.3% of the samples, with a mean of 0.24 µg/kg, AFB₂ in 26.7%, with a mean of 0.11 µg/kg and AFG₁ in 16.7%, with mean values of 0.20 µg/kg. It is concluded that there may be aflatoxin residues in the liver and round fish muscle, and the fish exposure to aflatoxins should be controlled in order to avoid risks to consumers.

Key-words: AFB₁. Aquaculture. Fish farming. HPLC. Mycotoxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Exemplar da espécie tambacu.....	20
Figura 2- Exemplar da espécie patinga.	21
Figura 3- Estrutura química da ocratoxina A	27
Figura 4- Estrutura química dos tricotecenos A e B.....	28
Figura 5- Estrutura química da zearalenona.	29
Figura 6- Estrutura química da fumonisina B ₁	31
Figura 7- Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	32
Figura 8- Estrutura química da aflatoxina B ₁ 8,9- epóxido.....	33
Figura 9- Ligação da AFB ₁ à N7 da guanina.	34
Figura 10- Localização das cidades das quais foram coletadas as amostras de ração e de peixes redondos.	42
Figura 11- Tambaqui aberto em método de janela com o fígado e músculo em destaque.....	43
Figura 12- Distribuição das contagens de bolores e leveduras e atividade de água das rações avaliadas	49
Figura 13- Armazenamento de ração em umas das propriedades.	50
Figura 14- Frequência dos gêneros de fungos encontrados na ração para peixes.	51
Figura 15- Crescimento fúngico em ágar DG18 e micrografia de um fungo do gênero <i>Aspergillus</i>	53
Figura 16- Cromatograma com os tempos de retenção na concentração de 0,5 µg/kg de cada aflatoxina.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das micotoxinas segundo seu potencial carcinogênico.	26
Tabela 2- Resultados dos Estudos sobre Micotoxinas na Aquicultura de 2014.	36
Tabela 3- Sinais clínicos da aflatoxicose e níveis prejudiciais de aflatoxina na ração para diversas espécies de peixes.	38
Tabela 4- Limite de Quantificação das amostras de fígado e músculo.	55
Tabela 5- Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.	57
Tabela 6- Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de músculo de peixes redondos.	58
Tabela 7- Nível de detecção de aflatoxinas no fígado do pescado.	59
Tabela 8- Nível de detecção de aflatoxinas no músculo do pescado.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Atividade de Água
ADB	<i>Aspergillus Differentiation Base</i>
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFPA	Ágar <i>Aspergillus flavus</i> e <i>parasiticus</i>
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
ATA	Aleucia Tóxica Alimentar
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DG18	<i>Dichloran Glicerol</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DON	Desoxinivalenol
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FB	Fumonisina
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂

FB ₃	Fumonisin B ₃
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LD	Limite de Detecção
LMT	Limite Máximo de Tolerância
LQ	Limite de Quantificação
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
ND	Não Detectado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTA	Ocratoxina A
PAT	Patulina
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
ppb	Partes por bilhão
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus <i>Celsius</i>
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrometros
g	Gramas
kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitro
n	Número de amostras
N ₂	Nitrogênio
R ²	Coeficiente de Determinação
Rf	Radiofrequência
v/v	Volume por Volume
λ	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Aquicultura brasileira.....	19
2.2. Fungos toxigênicos	21
2.2.1. <i>Aspergillus</i>	22
2.2.2. <i>Penicillium</i>	22
2.2.3. <i>Fusarium</i>	23
2.3. Micotoxinas	23
2.3.1. Ocratoxinas.....	26
2.3.2. Tricotecenos	27
2.3.3. Zearalenona	28
2.3.4. Fumonisinias	29
2.3.5. Aflatoxinas	31
2.4. Fungos e micotoxinas em rações para peixes	35
2.5. Efeitos das aflatoxinas nos peixes	37
2.6. Legislação brasileira para micotoxinas	38
3. OBJETIVO	41
3.1. Objetivo geral	41
3.2. Objetivos específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Amostragem	42
4.1.1. Amostragem da ração.....	42
4.1.2. Amostragem dos peixes	43
4.2. Atividade de água (Aa) da ração.....	43
4.3. Avaliação da micobiota da ração	44
4.5. Determinação das aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	44
4.5.1. Padrões e solventes utilizados	44
4.5.2. Curvas de calibração	44
4.5.3. Desempenho do método analítico	45
4.5.4 Limites de detecção e quantificação.....	45
4.5.5 Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de peixes.....	45
4.6. Comitê de Ética.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

5.1. Atividade de Água (Aa) da ração	48
5.2. Avaliação da microbiota da ração	49
5.3. Resultados do desempenho do método analítico	53
5.3.1. Curvas de calibração	54
5.3.2. Tempos de retenção.....	54
5.3.3. Avaliação do desempenho dos métodos analíticos	55
5.4. Determinação e Quantificação de Aflatoxinas nas amostras de peixes	59
5.4.1 Aflatoxinas no fígado e músculo de peixes redondos	59
6. CONCLUSÃO.....	64
7. BIBLIOGRAFIA	65

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta boas condições para o desenvolvimento da piscicultura, uma vez que, detêm cerca de 12% dos recursos hídricos do planeta, distribuídos em aproximadamente 7,4 mil km de costa marítima e 5,5 milhões de hectares de reservatórios de água doce (BRASIL, 2010). Apresenta mais de três mil espécies de peixes com potencial para a comercialização, além do clima favorável e o crescimento do consumo de pescado (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS- SEBRAE, 2015).

Em 2017, a aquicultura brasileira atingiu um valor de R\$ 4,7 bilhões, com produção de 691.700 toneladas de peixes cultivados, indicando um aumento de 8% em relação ao ano anterior, observando-se um aumento no consumo interno de pescado ao longo dos anos, atualmente na faixa de 9,5 kg por habitante/ano, embora ainda esteja abaixo das estimativas do consumo mundial que segundo o relatório sobre “O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2018”, também denominado SOFIA, apontaram em 2016 e 2017 um consumo de 20,3 kg e 20,5 kg por habitante/ano, respectivamente e prevê até 2030 que a América Latina e o Caribe devam registrar um crescimento de 33% na produção de pesca e aquicultura (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018; MEDEIROS et al., 2018).

Em relação à produção brasileira de peixes, os peixes redondos, também conhecidos como peixes nativos, ocupam a segunda posição, perdendo somente para a tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os peixes redondos mais produzidos e consumidos são o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pirapitinga (*Piaractus brachipomus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e seus híbridos, tais como a patinga, o tambacu e a tambatinga (IBGE, 2015; MENESES, 2017; MEDEIROS et al., 2018).

As rações comerciais na piscicultura intensiva são extremamente importantes, considerando que devem garantir as exigências nutricionais para o crescimento, ganho de peso, e menor incidência de doenças e morte. Para obter uma ração de qualidade é indispensável o controle sanitário, pois os insumos utilizados na fabricação das rações são suscetíveis à contaminação por fungos que podem produzir micotoxinas (HASHIMOTO et al., 2003).

Há uma grande preocupação com a presença de micotoxinas nos ingredientes usados no preparo de rações, uma vez que podem acarretar efeitos neurotóxicos, estrogênico,

nefrotóxicos, dermatotóxicos, imunossupressivos até efeitos carcinogênicos (KUBITZA, 2010). Além de reduzir o desempenho produtivo (redução no crescimento e uma piora na conversão alimentar), levando a uma significativa queda de produção e mortalidade dos animais, e gerando grandes prejuízos econômicos (VIEIRA *et al.*, 2006). Vale ressaltar que o principal problema da contaminação por fungos potencialmente toxigênicos na agricultura, são os produtores de aflatoxinas (RUDREW *et al.*, 2013).

As aflatoxinas constituem um grupo de toxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são identificadas como B₁, B₂, G₁ e G₂ (KUBITZA, 2010), sendo a aflatoxina B₁ mais prevalente, e a mais potente, apresentando efeitos variáveis de acordo com a espécie, idade, sexo e estado nutricional, podendo ocasionar efeitos hepatotóxicos, imunossupressores e carcinogênicos, já que tem sido identificada como fator associado ao câncer hepático, após a ingestão de alimentos contaminados, tanto em animais como no homem (CARDOSO FILHO *et al.*, 2011).

Deste modo, a presença de fungos potencialmente toxigênicos, principalmente das aflatoxinas, nas rações para peixes é relevante pelo fato das toxinas terem a capacidade de bioacumulação nos tecidos comestíveis, constituindo um risco para a saúde humana após o consumo destes peixes (ALMEIDA *et al.*, 2011).

A legislação brasileira estabelece 50 µg/kg como limite máximo tolerado para as aflatoxinas em matéria-prima ou ingredientes destinados a rações de consumo animal, sem diferenciar a espécie animal (BRASIL, 2013). Em relação aos produtos de origem animal, há legislação de limite máximo somente para aflatoxina M₁ (AFM₁) em leite fluido, em pó e queijos, excluindo deste modo a carne proveniente dos peixes (BRASIL, 2011).

Estudos revelam que há diferenças entre as espécies de peixes em relação à sensibilidade às micotoxinas, além da capacidade acumulativa desses resíduos no tecido muscular e hepático desses animais (ATAYDE *et al.*, 2014). O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) estabelece amostragens para analisar AFB₁ em fígado de suínos e aves, e AFM₁ em leite, todavia, pescados não têm sido analisados quanto às micotoxinas, mas somente quanto a contaminantes inorgânicos, antimicrobianos, substâncias com ação anabolizante, entre outros (BRASIL, 2017).

Estudos referentes à micobiota fúngica em rações provenientes de pisciculturas e propriedades pesque-pague são escassos, bem como a ocorrência desses metabólitos em tecido muscular e hepático de peixes de importância comercial, representando uma lacuna científica a ser preenchida, além de apresentar dados que possam evidenciar a exposição humana ao consumo de peixes contaminados por aflatoxinas. O presente estudo teve,

portanto, a finalidade de avaliar a micobiota de rações para peixes, identificando fungos toxigênicos, e avaliar a ocorrência de resíduos de aflatoxinas em tecidos de peixes redondos provenientes de pisciculturas e propriedades pesque-pague do Estado de São Paulo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aquicultura brasileira

O Brasil é considerado um país com elevado potencial para a aquicultura, especialmente, pelas condições ambientais favoráveis, clima tropical, extensão e riqueza de suas bacias hidrográficas e variedade de espécies de peixes, deste modo, tornou-se uma atividade com elevadas taxas anuais de crescimento, e uma grande oportunidade de agronegócio para os pequenos empreendedores com base na produção lucrativa, na preservação do meio ambiente e também no desenvolvimento social, sendo estes essenciais e inseparáveis para que se possa ter uma atividade duradoura e com geração de renda para a população. (VALENTI, 2000; ROUBACH et al., 2003).

A piscicultura é um dos ramos da aquicultura, tratando-se da produção de peixes, podendo ser praticada até em áreas inadequadas para a agricultura convencional, ou mesmo, conferindo uso a reservatórios de hidrelétricas (CYRINO et al., 2004).

No ano de 2017, a piscicultura brasileira obteve um aumento de 8% em relação ao ano anterior, indicando uma produção de 691.700 toneladas de peixes cultivados. O Paraná é o principal Estado produtor (112.000 toneladas), seguido por Rondônia (77.000 toneladas) e São Paulo (69.500 toneladas), o que levou o Brasil à 4ª colocação no *ranking* mundial de produção de tilápia (357.636 toneladas), estando entre os 15 maiores produtores mundiais de pescado (BRASIL, 2013; IBGE, 2015; MEDEIROS et al., 2018).

O aumento no consumo de peixes está vinculado, principalmente, à disponibilidade, acesso e preço, além de o pescado ser um alimento saudável. Os peixes apresentam alto valor nutricional, rico em proteínas de alta qualidade, vitaminas, como por exemplo a tiamina, niacina e a vitamina B12; minerais, tais como, fósforo, ferro, zinco e cálcio, além de possuir baixo teor de gorduras e alta proporção de ácidos graxos essenciais ou ômega 3, um tipo de gordura saudável (BRASIL, 2014).

A espécie mais produzida e consumida no Brasil é a tilápia (*Oreochromis niloticus*) com 51,7% do total de peixes em 2017, e a segunda posição não é uma espécie em particular, mas uma categoria de peixes: os nativos redondos, sobretudo o tambaqui (*Colossoma macropomum*), seguido de outras espécies de peixes redondos (variações de tambaqui, pirapitinga, patinga e pacu), que correspondem a 43,7% da produção brasileira, com aproximadamente 302.235 toneladas (IBGE, 2015; MEDEIROS et al., 2018).

A criação de peixes nativos é maior no Estado de Rondônia com produção em 2017 de 77 mil toneladas, seguidos por Mato Grosso com 60.134 toneladas, Amazonas com 28 mil toneladas, Maranhão com 6.500 toneladas e Pará com 20 mil toneladas. Estas produções somadas representam 69% da produção total de peixes nativos (MEDEIROS et al., 2018).

O Estado de São Paulo está voltado principalmente à produção de tilápias, segundo a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (2018). Entretanto, vem ocorrendo aumento do número de pescadores no Estado, diretamente ligados à pesca esportiva, atividade na qual peixes nativos, como o tambaqui, pacu, tambacu (Figura 1), patinga (Figura 2), tambatinga, são muito utilizados, destacando-se pelo tamanho e força, além de possuir alta aceitabilidade no consumo da carne (CASTRO et al., 2006; SCUSSEL, 2017).

Dentre os peixes nativos brasileiros, os peixes redondos são os mais produzidos no país, devido à grande rusticidade e às boas taxas de crescimento. Vale destacar que o tambaqui é uma espécie nativa da bacia Amazônica, pertencente à família *Serrasamidæ*, o qual possui a região das costelas amplas, possibilitando bons cortes para a indústria. É produzido principalmente no Norte, Nordeste e Centro-Oeste, e no Estado de São Paulo é mais comum encontrar sua espécie híbrida, o tambacu (MORO et al., 2013).

Figura 1- Exemplar da espécie tambacu.

Fonte: Própria autoria.

A patinga está entre as espécies de peixes redondos mais consumidos no Brasil, com produção de 13.276.299 kg, que correspondeu a 2,7% do total de peixes em 2015 (IBGE, 2015).

Segundo Meneses (2017) a espécie é resultante do cruzamento híbrido entre as espécies pacu e pirapitinga da Bacia Amazônica. Suas características envolvem a cor prateada

e o rabo avermelhado, e os mesmos hábitos onívoros do pacu, ou seja, alimentam-se desde frutos, rações, minhocas até de outros peixes, além de crustáceos e algas. Sua espécie híbrida com o tambaqui, a tambatinga, também é muito popular nas propriedades do tipo pesque-pague.

Figura 2- Exemplar da espécie patinga.

Fonte: Própria autoria.

Essas combinações entre espécies resultam em vantagens para o cultivo comercial, uma vez que a carne é menos gordurosa em comparação à do pacu, podendo conquistar consumidores que procuram uma alimentação saudável, além do fácil manejo e fácil adaptação à rotina de criação (MENESES, 2017).

2.2. Fungos toxigênicos

Os fungos englobam microrganismos de estruturas eucarióticas, os quais podem possuir filamentos, também conhecidos por hifas (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Algumas espécies de fungos filamentosos, principalmente os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* estão associados à produção de toxinas (FORSYTHE, 2002).

Existem em torno de 100 tipos de fungos toxigênicos, sendo microrganismos de grande relevância, pois a contaminação por fungos pode gerar inúmeras perdas econômicas, sobretudo nos produtos agrícolas. Estes podem ser contaminados por fungos toxigênicos na fase pré-colheita e também durante o armazenamento. Os grãos também podem ser danificados por insetos ou pela umidade, o que proporciona uma porta de entrada para a contaminação (SCUSSEL, 2002; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Os principais fungos toxigênicos produtores de micotoxinas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., são os contaminantes mais frequentes de insumos e ração animal, produtos que podem ser contaminados em vários estágios da cadeia de produção (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; PITT; HOCKING, 2009).

2.2.1. *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* destaca-se devido ao grande número de espécies conhecidas, além de serem considerados indicadores de contaminação de produtos agrícolas que são estocados (WEIDENBÖRNER, 2001).

As espécies da seção *Flavi*, tais como *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, possuem grande importância econômica, principalmente por produzirem as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e a ocratoxina A (OTA) em grãos como o milho, amendoim, algodão e alguns tipos de oleaginosas (CAST, 2003; SANTIN, 2005; REDDY et al., 2009).

As aflatoxinas são as toxinas com maior potencial carcinogênico em mamíferos, além de serem mutagênicas, teratogênicas, hepatotóxicas e causarem imunossupressão (SANTOS; LOPES; KOSSEKI, 2001; BENNETT; KLICH, 2003).

A temperatura do crescimento fúngico pode variar de 12 a 48°C, com pH entre 3,5 a 8,0. As altas temperaturas são as ideais, com atividade de água (Aa) em uma faixa entre 0,80 a 0,99 (SANTIN, 2005; HEDAYATI et al., 2007). Para a produção das aflatoxinas, a temperatura ideal varia de 25 a 30°C e a umidade por volta de 18% (OSWEILER, 1990; WEIDENBÖRNER, 2001). Para a produção da OTA, a temperatura varia de 12 a 37°C com pH mínimo de 2,2 e Aa em torno de 0,80 (SANTIN, 2005).

2.2.2. *Penicillium*

Os fungos do gênero *Penicillium* são encontrados amplamente distribuídos na natureza, principalmente no solo. Por serem nutricionalmente pouco exigentes, são contaminantes oportunistas, especialmente das plantas, e sua ocorrência nos alimentos é quase que acidental, sobretudo nos grãos (trigo, cevada) durante o armazenamento ou estocagem (DONATI, 2008; PITT; HOCKING, 2009).

Geralmente, esses fungos são produzidos em temperaturas frias, de -2 a 5°C, com Aa > 0,90, entretanto, para a produção das micotoxinas é necessária Aa em torno de 0,80 a 0,82 e temperatura de 20 a 30°C (WEIDENBÖRNER, 2001).

A espécie *P. expansum* é a maior produtora de patulina e citrinina, com crescimento sob temperatura de 3 a 35°C, com temperatura ótima em torno de 25°C (DABROWSKI; SIKORSKI, 2005). A OTA é produzida pelo *Penicillium verrucosum*, amplamente encontrado nos grãos (DONATI, 2008). Há também a rubratoxina, produzida por *P. rubrum*, que causa doenças hemorrágicas nos animais e conferindo uma pigmentação vermelha no milho (FRANCO; LANFGRAF, 2008).

2.2.3. *Fusarium*

As espécies do gênero *Fusarium* são patógenos de plantas, também atuando em sua decomposição, sobretudo nas culturas de cereais. A temperatura de crescimento deste fungo pode variar de 10° a 30°C, entretanto, a temperatura ótima é na faixa de 20° a 25°C (MARTELLETO; CASTILHO; GOES, 1998). Podem produzir as micotoxinas nas etapas de pré-colheita, imediatamente ou depois da colheita (PITT, 2000). As principais espécies deste gênero são *F. graminearum* e *F. verticillioides* (PITT; HOCKING, 2009).

Para as micotoxinas serem produzidas, é necessária uma temperatura ótima, que depende do tipo de micotoxina e também da origem geográfica em que estão inseridas. Assim, a zearalenona (ZEA) e a fumonisina B (FB) têm crescimento ótimo a 25°C, o deoxinivalenol (DON) possui temperatura de crescimento de 24 a 26°C e a toxina T-2 varia na faixa de 2 a 35°C (PITT et al., 2000; DABROWSKI; SIKORSKI, 2005).

Devido à preocupação em relação aos efeitos nocivos causados tanto aos humanos quanto aos animais, torna-se necessário o controle da qualidade dos alimentos fornecidos aos animais por meio das pesquisas dos fungos e suas toxinas, uma vez que causam prejuízos na cadeia produtiva (CARDOSO FILHO et al., 2013).

2.3. Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos toxigênicos e possuem como características baixo peso molecular, termoestabilidade, resistência às enzimas do sistema digestivo, ampla estabilidade química, não imunogenicidade e atuação em baixas

concentrações, além de serem agrupadas de acordo com o tipo e o grau de toxicidade (ASTOVISA; SUÁREZ, 2005; JAY, 2005, FERREIRA et al., 2006; CASTILLO, 2007; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; IAMANAKA et al, 2010).

A contaminação pelas micotoxinas na cadeia alimentar humana e animal ocorre de maneira direta ou indireta. Na direta, o crescimento do fungo toxigênico ocorre no próprio alimento de origem vegetal ou animal; em contrapartida, a contaminação indireta acontece quando as micotoxinas são incorporadas aos ingredientes dos alimentos (CARVALHO, 1995).

As micotoxinas são contaminantes naturais, assim, possuem difícil controle nos alimentos. Estima-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas do mundo estejam contaminados por micotoxinas (BENETT; KLICH, 2003).

O crescimento fúngico é facilitado principalmente devido ao clima tropical e subtropical, portanto, no Brasil existem condições favoráveis para o desenvolvimento de todo tipo de fungo produtor de micotoxinas (CARVALHO, 1995; MAZIVIEIRO; BERSOT, 2010).

Em vista disso, as micotoxinas podem contaminar, sob condições favoráveis, os alimentos desde antes da colheita, quando a planta está se desenvolvendo, durante a colheita, secagem, armazenamento por tempo prolongado sob altas temperaturas e umidade, transporte ou após a manufatura (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001; BHATNAGAR et al., 2006; BENNETT; KLICH, 2003; IAMANAKA et al., 2010; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014; KARLOVSKY, 2016).

O controle das micotoxinas é importante, visto que causam grandes prejuízos na economia, procedentes da perda de produtos vegetais, e queda na produção de alimentos de origem animal, em decorrência da interferência no crescimento, ganho de peso, fertilidade, produção de ovos; além de causar restrições comerciais para exportação de grãos (CARVALHO, 1995).

Nos países em desenvolvimento, os produtos de melhor qualidade são geralmente exportados, e aquelas *commodities* de qualidade inferior são vendidas e consumidas no mercado interno. Por essa razão, as micotoxicoses são mais comuns nesses países, nos quais a oferta de alimentos é limitada (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A inadequação dos métodos de manuseio e estocagem dos alimentos contribui para o aumento da prevalência das micotoxinas, principalmente onde há poucos regulamentos impostos, com níveis de micotoxinas superiores aos permitidos nos países importadores, ou

com a inexistência de legislações para proteger a população exposta, trazendo riscos evidentes para a saúde (DAWSON, 1991; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Quanto ao controle da formação das micotoxinas, inúmeros estudos realizados comprovam que a prevenção é o melhor controle, pois estas são quimicamente estáveis e termorresistentes. Assim, tratamentos como técnicas de detoxificação em sua maioria são economicamente inviáveis (SERRA, 2005; CARÃO et al., 2014).

As micotoxinas têm sido associadas a uma variedade de enfermidades em humanos e em animais, podendo se manifestar de forma aguda ou crônica. No quadro agudo, em que ocorre o consumo de doses moderadas ou altas de micotoxinas em um único período, podem se manifestar sintomas como hemorragias, hepatite, nefrite, necrose de mucosas digestivas e óbito (CARVALHO, 1995; CAST, 2005; JARDIM; CALDAS, 2009).

O quadro crônico ocorre quando há um consumo de moderado a baixo de micotoxinas por tempo prolongado, deste modo, podendo estar relacionado com o desenvolvimento de tumores (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Não obstante, algumas dessas substâncias possuem capacidade mutagênica, carcinogênica, teratogênica, enquanto outras possuem toxicidade específica a um órgão ou são tóxicas por outros mecanismos, podendo causar uma série de reações adversas, levando a várias patologias, tais como, neoplasias e imunossupressão (JAY, 2005; CAST, 2005; FERREIRA et al., 2006).

A imunossupressão ocorre através da quebra dos mecanismos de resistência, tais como depressão da fagocitose, produção de superóxidos por macrófagos ativados, queda na produção de complemento, tornando os indivíduos mais suscetíveis a doenças infecciosas (HINTON et al., 2003; JAKAB et al., 1994; CUSUMANO; SEMINARA, 1990).

Ocorre também por afetarem outros componentes importantes na ativação do sistema imune, como as interleucinas e a inibição de produção dos fatores de necrose tumoral, e por fim até induzir ao óbito, tanto em humanos quanto animais (MOON; RHEE; PYO, 1999).

Por esse motivo, o estudo das micotoxinas é de extrema relevância, visto que as doenças causadas pelas micotoxinas podem ser consideradas como problema de saúde pública. Desta forma, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*), que pesquisa e analisa a evidência de carcinogênese de vários agentes biológicos, químicos e físicos que ocasionam alterações no DNA, classifica algumas micotoxinas em grupos (Tabela 1) (PEREIRA; SANTOS, 2011).

Tabela 1- Classificação das micotoxinas segundo seu potencial carcinogênico.

Grupo	Classificação
1	Cancerígenos para humanos
2A	Provavelmente cancerígenos para humanos
2B	Possivelmente cancerígenos para humanos
3	Não classificado como cancerígeno para humanos
4	Provavelmente não cancerígeno para humanos
Micotoxinas	
1	Aflatoxinas
2B	Fumonisina, Ocratoxina
3	Tricoteceno, Zearalenona, Patulina

Fonte: Adaptado de IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Agents classified by the IARC monographs**, volumes 1-120, 1993. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>.

Os sintomas apresentados ou a gravidade depende do tipo de micotoxina, quantidade, duração e tempo de exposição, via de exposição. Devem-se considerar as características do indivíduo exposto, predisposições genéticas, idade, sexo e saúde. Algumas condições, como má nutrição, deficiência de vitamina, alcoolismo, doenças infecciosas e outras exposições a toxinas, podem agravar o efeito e gravidade da contaminação (BENNETT; KLICH, 2003; BANDO et al., 2007; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A presença de duas ou mais micotoxinas em uma mesma ração pode potencializar os efeitos tóxicos das mesmas (KUBITZA, 2015). A co-ocorrência pode resultar em três possíveis efeitos, a soma dos efeitos nocivos provocados por elas separadamente, efeitos sinérgicos, ou seja, ampliação das reações adversas, acarretando mais prejuízos ao animal, e os efeitos antagonistas, em que o primeiro elemento anula os efeitos do outro, embora este último não seja comum (GONÇALVES, 2016).

Dentre os mais de 300 tipos conhecidos de micotoxinas, somente 20 são frequentemente quantificadas em gêneros alimentícios, especialmente aquelas que foram comprovadamente tóxicas e/ou cancerígenas. As micotoxinas de maior malignidade e as mais disseminadas em alimentos para humanos e animais estão descritas a seguir (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; CAST, 2003, FERREIRA et al., 2006, BOSCO; MOLLEA, 2012).

2.3.1. Ocratoxinas

As ocratoxinas são produzidas por cepas de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., principalmente pelas espécies *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, muito comuns em alimentos e de distribuição global, em cereais (trigo, cevada, milho, soja e centeio), café,

vinho, sucos, uvas e cervejas e também em produtos de origem animal, tais como, leite e produtos a base de sangue de porco (SMITH; MOSS, 1985; PERAICA et al., 1999; CREPPY, 2002; CAST, 2003; RATOLA; MARTINS; ALVES, 2004; IAMANAKA et al., 2010).

O grupo das ocratoxinas se divide em A, B e C, entretanto a ocratoxina A (OTA) possui uma molécula de cloro em sua estrutura (Figura 3), aumentando seu potencial tóxico e também é a mais frequente (SIMIONATO; MENEZES, 2007). O crescimento do fungo e a produção de OTA dependem principalmente da atividade de água (Aa) e temperatura, entre 0,80 e abaixo de 30°C, respectivamente (CREPPY, 2002; MAGAN et al., 2003; LASGRAM et al., 2010).

A OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída através, principalmente, do sangue e rins (CREPPY, 2002), podendo apresentar efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos (BENNETT; KLICH, 2003; SERRA et al., 2004; PERAICA et al., 1999).

As espécies aquáticas, em especial os peixes, ao serem expostas à ração contaminada por ocratoxina, podem ter como efeito tóxico, lesões severas nos rins e fígado e baixa taxa de conversão alimentar, prejudicando o crescimento, além da alta mortalidade (KUBTIZA, 2010).

Figura 3- Estrutura química da ocratoxina A

Fonte: BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical of Microbiology Review*. Washington, v. 16, n. 3 p.497–516, jul, 2003.

2.3.2. Tricotecenos

Os tricotecenos são um grupo de mais de 100 micotoxinas, cuja estrutura química é composta por um anel com esqueleto tetracíclico 12, 13-epoxitricotecenos (Figura 4). São classificados em tipo A, em que se encontram as toxinas T-2, HT-2, 15-MAS, DAS, e em tipo B, com o desoxinivalenol (DON ou vomitoxina), sendo este o tricoteceno o mais encontrado (LARGSETH; RUNDBERGET, 1998; SANTIN et al., 2005).

Dentre os gêneros de fungos produtores, destacam-se *Fusarium* spp., *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys* e *Trichothecium*, sobretudo as espécies *Fusarium graminearum* e o *Fusarium roseum* (UENO, 1983; SWAMY, 2005). A produção de tricotecenos ocorre em climas moderados, com temperatura variando entre 6 a 24°C, em especial nas culturas de cereais, como trigo, cevada, aveia e centeio (KOTAL et al., 1999; DILKIN, 2002).

Os efeitos tóxicos característicos dos tricotecenos em humanos e animais incluem: dor de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia e hemorragias. Esses sintomas estão associados a uma doença em humanos denominada Aleucia Tóxica Alimentar, ou ATA (UENO, 1983; SNYDER, 1986).

Dentre os efeitos tóxicos, os tricotecenos também podem ocasionar imunossupressão, pois afetam a resposta imune ao atingir os órgãos linfoides primários (medula óssea e timo) e secundários (baço e linfonodos), podendo levar ao óbito (KIDD et al., 1997; DILKIN; MALLMANN, 2004).

Nos peixes, o consumo de ração contaminada por tricotecenos, resultou na redução do consumo de ração e a piora na conversão alimentar, consequentemente, houve a redução de crescimento, também apresentando baixa taxa de hematócrito e de hemoglobina (KUBTIZA, 2010).

Figura 4- Estrutura química dos tricotecenos A e B.

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

2.3.3. Zearalenona

A zearalenona é produzida principalmente pelo *Fusarium graminearum*, sendo encontrada no trigo e milho, mas também em outros cereais, inclusive em rações animais (PERAICA et al., 1999). Sua estrutura (Figura 5) assemelha-se ao estradiol, um hormônio

produzido no ovário feminino (BENNETT; KLICH, 2003). A zearalenona pode provocar sintomas em várias espécies, desde infertilidade, edema vulvar, prolapso vaginal, hipertrofia mamária em fêmeas, até feminização de machos (PERAICA et al., 1999), devido à capacidade desta toxina em estimular os receptores estrogênicos, especialmente em suínos (DILKIN; MALLMANN, 2004).

A zearalelona exerce as mesmas influências metabólicas nos peixes, ao receberem rações compostas de milho contaminadas com altos níveis desta micotoxina, deste modo, afetando a produção do pescado, sobretudo a reprodução (WOŮNY et al., 2013; PIETSCH et al., 2015).

No entanto, a toxina, embora biologicamente potente, é raramente tóxica, visto que há poucas evidências de toxicidade aguda ou carcinogenicidade (KUIPER-GOODMAN; SCOTT; WATANABE et al., 1987; BENNETT; KLICH, 2003), sendo classificada pela IARC como Grupo 3, ou seja, não classificável quanto a sua carcinogenicidade em seres humanos (IARC, 2017).

Figura 5- Estrutura química da zearalenona.

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

2.3.4. Fumonisin

São produzidas pelos fungos do gênero *Fusarium* (NELSON et al., 1991) e *Alternaria* (CHEN et al., 1992), principalmente as espécies *Fusarium verticillioides* (anteriormente conhecida como *F. moniliforme*), *F. proliferatum* e *F. nygamai*, além da *Alternaria*, *Alternata f. sp. lycopersici* (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

As fumonisinas são hidrossolúveis, ao passo que as outras micotoxinas são solúveis em solventes orgânicos (BEZUIDENHOUT et al., 1988). São amplamente produzidas em todo o mundo e frequentemente relacionadas ao cultivo do milho (PERAICA et al., 1999; TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

As fumonisinas FB₁ e FB₂ são de maior importância toxicológica do que as FB₃, FB₄, FA₁ e FA₂, já que estas são menos tóxicas (PERAICA et al., 1999). Entretanto, a FB₁ é a fumonisina mais abundante e tóxica (Figura 6), encontrada em cerca de 70% dos alimentos naturalmente contaminados e rações, seguida de FB₂ e FB₃. Todavia, evidências sugerem que FB₂ e FB₃ possuem as mesmas propriedades toxicológicas e cancerígenas do que a FB₁ (SHEPHARD et al., 1996).

A contaminação dos cereais ocorre devido ao armazenamento inadequado, com umidade acima de 15% e baixas temperaturas pós-colheita. As toxinas do *Fusarium* são normalmente produzidas em baixas temperaturas, o que leva a sugerir que o choque térmico é necessário para induzir sua biossíntese, além outros fatores, como estresse causado pela seca e danos nos grãos causados por insetos (MEIRELES et al., 1994).

Em humanos, ao consumir as fumonisinas, pode-se desencadear sintomas como dores abdominais e diarreia que se iniciam de meia hora a uma hora após a ingestão. Contudo, a presença de fumonisinas vem sendo associada à incidência de câncer de esôfago em regiões como sul da África, China e nordeste da Itália (PERAICA et al., 1999). Deste modo, a IARC classificou as toxinas produzidas pelo *F. verticillioides* no grupo 2B, como possíveis carcinogênicas (IARC, 1993).

Já em animais, a FB₁ é conhecida em por causar leucoencefalomalacia em equinos (LEME) e coelhos (MARASAS et al., 1988), edema pulmonar em suínos (KRIEK; KELLERMAN; MARASAS, 1981; OSWEILER, 1990); e diminuição de peso, aumento de órgãos como o fígado e vesícula biliar, diarreia e necrose hepática em frangos (LEDOUX et al., 1992). Em fígado de ratos apresentou efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos, além de induzir apoptose (GELDERBLUM et al., 1988).

Nos peixes, foram relatados baixo ganho de peso e de crescimento, piora da conversão alimentar, baixo valor de hematócrito, dentre outros efeitos deletérios, incluindo prejuízo das funções do sistema imunológico, lesões no fígado, pâncreas e rins, o que pode levar o animal à morte (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001; KUBITZA, 2010).

Figura 6- Estrutura química da fumonisina B₁.

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

2.3.5. Aflatoxinas

As aflatoxinas são um grupo de metabólitos secundários, cujos principais produtores são as espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, e também *A. nomius* (SHARMA, 2004). Essas espécies estão associadas ao solo e aos produtos agrícolas, como o amendoim, nozes, pistache, milho, semente de algodão, cereais, entre outros produtos alimentícios (TORRES, 2008).

As aflatoxinas são o principal problema de segurança de alimentos quando se trata da agricultura, uma vez que são produzidas em países nos quais a temperatura e a umidade são elevadas, predominantemente nos climas tropicais e subtropicais, com o crescimento e a proliferação do *Aspergillus* spp. (RUDREW et al., 2013).

A descoberta das aflatoxinas ocorreu na Inglaterra na década de 1960, devido ao surto conhecido como “Turkey- X disease”, que provocou a morte de milhares de perus, relacionado ao consumo de torta de amendoim, proveniente do Brasil, acrescentada na ração, sendo o *A. flavus* o principal fungo encontrado (WOGAN, 1992).

Em termos de ocorrência e toxicidade, as aflatoxinas mais importantes são a B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 7). Essa nomenclatura é dada com base na fluorescência sob luz ultravioleta (B=Blue, G=Green) (FREIRE et al., 2007; KARLOVSKY et al., 2016). As aflatoxinas M₁ e M₂ são metabólitos hidroxilados de AFB₁ e AFB₂, encontrados no leite e na urina de animais que ingeriram alimentos ou rações contaminados (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; KUMAR et al., 2017).

Figura 7- Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

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

Em saúde animal, há diversas espécies domésticas e de experimentação sensíveis aos efeitos tóxicos agudos das aflatoxinas, já que esses metabólitos são caracterizados por apresentar um elevado nível de toxicidade, com efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o principal órgão a ser atingido o fígado (OSWEILER, 1990). Deste modo, as aflatoxinas são classificadas pela IARC no Grupo 1: cancerígenos para humanos (IARC, 1993).

A aflatoxina que apresenta a maior toxicidade é a B₁ (AFB₁), seguida de G₁, B₂, e G₂. Como consequência da ingestão de alimentos contaminados, as aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos no desenvolvimento do câncer hepático no homem (BOSCH; PEERS, 1991).

Pesquisas foram realizadas para caracterizar os possíveis efeitos das aflatoxinas sobre a saúde humana, e para a identificação das concentrações que representariam risco significativo para o desenvolvimento do câncer hepático, com destaque para os experimentos da AFB₁ e sua atividade biológica nas células hepáticas (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Nota-se que há uma relação entre a toxicidade dessa aflatoxina e a carcinogenicidade causada no homem (MURRAY et al., 2006).

O quadro agudo de aflatoxicose se inicia após seis horas da ingestão da aflatoxina, podendo ocorrer óbito. Os sintomas variam de severa depressão, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, hipertemia chegando até 41°C e também pode se manifestar como hepatite aguda. Por outro lado, na aflatoxicose crônica ocorre uma série de alterações patológicas mais prolongadas, levando ao câncer e a imunossupressão (MURRAY et al., 2006).

Após serem absorvidas no trato gastrointestinal, as aflatoxinas são biotransformadas no fígado, mediante enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas. Estas enzimas, fazem parte da superfamília de enzimas do citocromo P-450, que compõem parte do processo de detoxificação de uma vasta variedade de xenobióticos no organismo. Devido a sua estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica, a AFB₁ é particularmente a toxina de maior interesse a ser estudada (BIEHL; BUCK, 1987; FORRESTER et al., 1990).

Há um consenso, atualmente, de que a partir da ativação metabólica, ocorre a manifestação dos efeitos tóxicos, o que acaba tornando a AFB₁ um potencial pró-carcinógeno (WOGAN, 1992).

A forma ativa é um composto, denominado de AFB₁ 8,9- epóxido ou AFB₁ epóxido (Figura 8), que tem origem por meio da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, e que na molécula de AFB₁ está presente na estrutura bi-furanóide, sendo que este composto age rapidamente por meio de ligações covalentes com o DNA, RNA e proteínas (BIEHL; BUCK, 1987).

Figura 8- Estrutura química da aflatoxina B₁ 8,9- epóxido.

Fonte: Adaptado de ROTTINGHAUS, G. E. **Physical and Chemical Properties of the Common Mycotoxins**. Slides. 2017.

Conforme, Pinheiro (2004) e Ferreira et al. (2006), a partir dessas ligações formam-se os chamados adutos, que são a lesão bioquímica primária produzida pela AFB₁ epóxido. Essa formação é originada pela da ligação das AFB₁ nas bases nitrogenadas guaninas na posição N7 das moléculas do DNA com o p53, que é um gene supressor de tumores, provocando assim, alterações no códon 249 dessa proteína, substituindo a guanina por timina (Figura 9). Esse códon faz parte do gene supressor de tumor p53, que depois dessa alteração tem sua atividade prejudicada, portanto, passa a acelerar a proliferação celular e o processo de formação de tumores. Em vários carcinomas, principalmente o hepático, é característico este tipo de alteração (PINHEIRO, 2004, FERREIRA et al., 2006).

Figura 9- Ligação da AFB₁ à N7 da guanina.

Fonte: ROTTINGHAUS, G. E. *Physical and Chemical Properties of the Common Mycotoxins*. Slides. 2017.

Após a proteína p53 ser comprometida, ela perde sua capacidade de regular a duplicação celular, gerando assim o tumor (SOUZA et al., 2009). Deste modo, o processo da neoplasia se inicia na mutação que gera alterações genéticas permanentes nas células afetadas, em que os adutos de RNA e de proteínas, no processo agudo, causam lesões bioquímicas que levam à inativação de macromoléculas essenciais a vida e, conseqüentemente, à morte celular (FERREIRA et al., 2006).

Entretanto, além da epoxidação, a hidroxilação está incluída no processo de biotransformação primária da AFB₁, em que são formadas a AFM₁ e também, AFQ₁, AFB_{2a}, e o-demetilação, para a formação da AFP₁. Dadas as suas características, estes compostos são conjugados com ácido glicurônico ou sulfatos, pois todos possuem grupos de hidroxila na molécula. Deste modo, estes compostos são extremamente solúveis em água, permitindo sua excreção através da urina, bile ou fezes (BIEHL; BUCK, 1987).

A formação destes derivados pode compor parte do processo de detoxificação da AFB₁, entretanto, alguns produtos em modelos experimentais, tais como a AFM₁, apresentaram uma toxicidade acentuada (HSIEH; ATKINSON, 1991). De tal modo, é possível observar a potência dos efeitos da AFB₁, bem como de seus derivados, sobre as células ou organismos. Contudo, isso depende de fatores que vão desde o balanço integrado entre as múltiplas vias, da ativação metabólica até a detoxificação (CALONI et al., 2006; UYSAL et al., 2005; MASSEY et al., 1995; McLEAN; DUTTON, 1995; FORRESTER et al., 1990).

Todavia, os padrões de biotransformação da AFB₁ possuem uma variação muito grande inter ou intra-espécie, o que explicaria os diferentes graus de suscetibilidade à AFB₁ (UYSAL et al., 2005; LOPES et al., 2005; BUSBY; WOGAN, 1984).

2.4. Fungos e micotoxinas em rações para peixes

Os grãos, como milho, trigo e soja, são os mais suscetíveis à contaminação por fungos. No entanto, alimentos como amendoim, amêndoas, sementes de algodão, frutas secas e/ou desidratadas, especiarias, carne, leite e derivados, café, cacau, cerveja, arroz e rações para animais, também podem apresentar contaminação, que pode ocorrer em qualquer ponto da cadeia produtiva (ISMAIL, 2000; ASTOVIZA; SUÁREZ, 2005). O milho é considerado o grão mais suscetível à contaminação e o arroz o menos acometido pelas micotoxinas (CHULZE, 2010).

A formulação das dietas oferecidas aos peixes deve atender às necessidades nutricionais para o crescimento e ganho de peso, garantindo menor ocorrência de doenças e morte (HASHIMOTO et al., 2003). Entretanto, os ingredientes da formulação das rações, possivelmente por mau acondicionamento, podem conter substâncias que interferem no organismo animal de forma negativa (RODRIGUES; BERGAMIN; SANTOS, 2013). As pisciculturas e pesque-pague, de fato, são locais propícios para o crescimento fúngico, pela chance de altas temperaturas e umidades (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; FERREIRA et al., 2006; PIETSCH et al., 2013).

Os peixes na piscicultura intensiva dependem completamente da alimentação fornecida pelo homem para suprir seu crescimento e garantir sua sobrevivência. A alimentação é feita através de rações que possuem alto valor nutricional que, no caso dos peixes, provém basicamente dos cereais, tais como, milho e soja, além de aditivos importantes, como, vitaminas, aminoácidos, sais minerais (HASHIMOTO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2009; PIETSCH et al., 2013).

Vale ressaltar que a qualidade dessas rações também depende do controle sanitário desde as matérias-primas utilizadas na fabricação, devido à suscetibilidade à contaminação fúngica (HASHIMOTO et al., 2003).

A contaminação pode ocorrer quando o grão armazenado não foi devidamente seco ou com a danificação do grão durante a colheita ou manipulação. Ao serem processados e utilizados na alimentação animal, esses grãos podem causar doenças e intoxicações devido à presença de micotoxinas (ARAÚJO et al., 2009).

Com a baixa qualidade das rações e dos insumos utilizados, os animais tornam-se mais suscetíveis aos efeitos adversos causados pela contaminação por fungos e/ou micotoxinas (HASHIMOTO et al., 2003).

A ocorrência de aflatoxinas em rações e insumos destinados à alimentação animal tem sido relatada em diversas regiões do Brasil (PEREIRA et al., 2005), o que gera muita preocupação devido aos seus efeitos nocivos à saúde humana e animal, além de gerar um impacto econômico negativo (KHALIL; EL-SAYED, 2008; CARDOSO FILHO et al., 2013).

Em pesquisas realizadas em Londrina, Paraná, foi reportada a presença de aflatoxinas e fumonisinas em rações extrusadas e peletizadas. Embora a concentração de aflatoxinas estivesse dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, a co-ocorrência com a fumonisina poderia resultar em um risco de sinergismo tóxico (HASHIMOTO et al., 2003).

Em estudo avaliando de 37 a 41 amostras de rações aquáticas para peixes e camarão em região asiática, Gonçalves (2016) reportou que três em cada quatro amostras avaliadas continham duas ou mais micotoxinas (Tabela 2). Na mesma pesquisa, foi constatada a co-ocorrência de micotoxinas, sendo que 76% continham mais do que uma micotoxina, 17% apenas uma micotoxina e em 7% das amostras não foram detectadas contaminações.

Tabela 2- Resultados dos estudos sobre micotoxinas em rações aquáticas na região asiática em 2014.

Micotoxinas	AF	ZEN	DON	FUM	OTA
Amostras testadas (n)	37	37	37	41	37
Amostras positivas (n)	22	22	25	21	21
Amostras positivas (%)	59%	59%	68%	51%	57%
Média de positivos (ppb)	49	71	162	637	2
Máximo (ppb)	221	306	413	7.534	5
Média (ppb)	29	42	109	326	1

Legenda: AF: aflatoxinas, ZEN: zearalenona, DON: desoxinivalenol, FUM: fumonisinas, OTA: ocratoxina A, n: número, ppb: partes por bilhão.

Fonte: Adaptado de GONÇALVES, R. Micotoxinas na Aquicultura: 8 coisas que você precisa saber. *Science & Solutions*, Getzersdorf, v. 30, p. 6-9, 2016.

Faz-se necessário compreender que a contaminação dos insumos da dieta dos peixes ocasionada pela produção de micotoxinas pode afetar a saúde dos peixes, com implicações que incluem a diminuição da eficiência produtiva, crescimento e desenvolvimento reduzido, diminuição da imunidade e até mortalidade (LIM; WEBSTER, 2001).

As pesquisas sobre a ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em rações para peixes ainda são insuficientes, embora o país possua um grande potencial na produção de peixes e grãos (ATAYDE et al., 2005).

Sabe-se, ainda, que pode ocorrer a bioacumulação em algumas espécies de peixes, o que pode acarretar na contaminação de humanos pelas micotoxinas, através do consumo da carne desses animais (PLAKAS et al., 1991; HASHIMOTO et al., 2003; AS MICOTOXINAS, 2009).

2.5. Efeitos das aflatoxinas nos peixes

Dentre os efeitos das micotoxinas nos peixes, podem ser citados a redução de apetite, anemia, menor ganho de peso, alterações renais, alterações hepáticas (deposição em excesso de gordura e lesões), redução de células sanguíneas, imunossupressão, mortalidade (principalmente relacionadas às infecções por outros patógenos), letargia e pigmentação amarelada relacionada à icterícia (ATAYDE et al., 2014; KUBITZA, 2015).

A importância das aflatoxinas se dá através da contaminação dos insumos utilizados na ração, que podem causar diversos efeitos deletérios no desenvolvimento dos peixes (Tabela 3), dependendo da espécie, concentração da aflatoxina e tempo de exposição (KUBITZA, 2010). A AFB₁ é a principal causadora de lesões hepáticas e do câncer hepático, devido ao fígado ser o primeiro órgão a ser atingido. No entanto, cabe ressaltar que em cada metabolismo há um papel essencial na determinação da toxicidade da aflatoxina B₁ (VITORINO, 2011).

Quanto aos efeitos imunotóxicos das aflatoxinas, estes podem incluir a diminuição dos fagócitos e a produção de superóxido por macrófagos ativados (HINTON et al., 2003, JAKAB et al., 1994; CUSUMANO; SEMINARA, 1990), inibição da produção de fator de necrose tumoral (TNF-alfa), interleucina- 1 (IL-1) e IL-6 por macrófagos estimulados por lipossacarídeos (MOON; RHEE; PYO, 1999).

Tabela 3- Sinais clínicos da aflatoxicose e níveis prejudiciais de aflatoxina na ração para diversas espécies de peixes.

Espécie	Sinais Clínicos	Nível de aflatoxina na ração	Tempo de exposição à aflatoxina	Fonte
Truta arco-íris (<i>Onchorhynchus mykiss</i>)	Redução de hemácias e tumores no fígado	0,5 µg/kg AFB ₁	4 a 6 meses	Halver (1969).
Truta arco-íris (<i>Onchorhynchus mykiss</i>)	Efeitos hepatocarcinogênicos	15,6 µg/kg AFB ₁	8 dias	Ngethe, Horsberg e Ingebrigtsen (1992).
Tilápia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Diminuição de crescimento	Ração com grande número de <i>A. flavus</i> , podendo sugerir a presença de aflatoxinas	12 semanas	Lim et al (2001).
Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	Redução de hematócrito, hemoglobina e glicose	<i>pool</i> de aflatoxinas (41µg/kg, 90 µg/kg e 204 µg/kg)	45 dias	Viera et al (2006).
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Redução de crescimento, pior conversão alimentar, letargia, olhos opacos e lesões hepáticas	> 250 µg/kg de AFB ₁	8 semanas	Tuan et al, (2010).
Catfish americano (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Redução de crescimento, hematócrito e hemoglobina, lesões no fígado	> 1000 µg/kg de AFB ₁	10 semanas	Kubitza (2010).

Legenda: AFB₁: Aflatoxina B₁, B₁: Aflatoxina B₁, B₂: Aflatoxina B₂, G₁: Aflatoxina G₁, G₂: Aflatoxina G₂, mg/kg: Miligrama por kilo.

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

2.6. Legislação brasileira para micotoxinas

Com o intuito de proteger a população dos efeitos adversos causados pelas micotoxinas, diversos países têm adotados legislações que incluem os alimentos *in natura*,

processados e as rações para animais, especialmente em relação às aflatoxinas. Estas são elaboradas a partir de pesquisas científicas que envolvem toxicidade, distribuição das micotoxinas nos alimentos e as metodologias empregadas, além, de englobar os interesses políticos, comerciais e econômicos (VAN EGMOND; JONKER, 2004).

O Brasil e os países que compõem o MERCOSUL (Argentina, Paraguai e Uruguai) aplicam limites comuns para as aflatoxinas totais ($B_1 + G_1 + B_2 + G_2$) em alimentos, como, amendoim, milho e seus derivados, e AFM_1 em leite fluído e em pó, além de incluir métodos oficiais de amostragem e análise. Todavia, o Brasil e o Uruguai ainda aplicam outros limites para algumas outras micotoxinas (FAO, 2003).

A legislação brasileira que dispõe sobre os Limites Máximos Toleráveis (LMT) para micotoxinas em alimentos para consumo humano é a resolução nº 7/2011 da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece que os níveis das micotoxinas — aflatoxinas totais ($B_1 + G_1 + B_2 + G_2$) e AFM_1 , fumonisinas (FBs), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), zearalelona (ZEA) e patulina (PAT) — sejam tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias em todas as fases da produção dos alimentos, com o objetivo de evitar sua contaminação e que este produto seja comercializado ou consumido (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013).

Contudo, não há uma legislação específica de LMT para micotoxinas na alimentação animal ou que diferencie as espécies animais, visto que algumas espécies de animais são mais resistentes a certas micotoxinas do que outras, como no caso dos ruminantes em relação aos monogástricos (GONÇALVES; JOBIM; SANTOS, 2001).

O Ministério da Agricultura, através da portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/88, estabelece como máximo para as aflatoxinas totais (soma das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 , G_2) o limite de 50 $\mu\text{g/kg}$ em qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal (FONSECA, 2013).

Em relação aos produtos de origem animal para consumo humano, como as carnes, a legislação brasileira (BRASIL, 2011), bem como a União Europeia, não estabelecem LMT para aflatoxinas, com exceção da AFM_1 em produtos lácteos (leite fluído, leite em pó e queijos) (UNIÃO EUROPEIA, CE. nº 1881, 2006). A legislação dos Estados Unidos contempla a soma das aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) com limite máximo de 20 $\mu\text{g/kg}$ para qualquer produto (FAO, 2004).

Assim, é necessário um maior rigor no cumprimento das legislações e portarias, pelo fato de as fiscalizações serem insuficientes ou ausentes, devido a laboratórios que carecem de material e pessoal especializado, com falhas nas técnicas de amostragem, que invalidariam os

resultados finais obtidos. Além disso, há necessidade de promover uma harmonização das legislações entre todos os continentes, especialmente em relação à redução dos LMT e às aflatoxinas (FREIRE et al., 2007).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar a microbiota de rações para peixes, identificando fungos toxigênicos, e avaliar a ocorrência de aflatoxinas em tecidos de peixes redondos provenientes de pisciculturas e propriedades pesque-pague.

3.2. Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar bolores em amostras de ração de pisciculturas e propriedades pesque-pague;
- b) Detectar e quantificar aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ em amostras de tecido muscular e hepático de peixes redondos provenientes de pisciculturas e propriedades pesque-pague.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Foram coletadas 26 amostras de ração e 30 amostras peixes no período de agosto de 2017 a dezembro de 2018. As amostras foram coletadas em cinco pisciculturas e em outras 15 propriedades pesque-pague localizadas no Estado de São Paulo, além de duas propriedades pesque-pague estabelecidas no Estado do Mato Grosso do Sul (Figura 10).

Figura 10- Localização das cidades das quais foram coletadas as amostras de ração e de peixes redondos.

Legenda: (A) Propriedades pesque-pague localizadas no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, (B) Pisciculturas e propriedades pesque-pague situadas no Estado de São Paulo.

Fonte: Autoria própria.

4.1.1. Amostragem da ração

Foram coletadas amostras de aproximadamente 200 g de ração do tipo extrusada em uso, provenientes de tambores e/ou estoque. Uma das propriedades não fazia uso de ração e algumas propriedades utilizavam diferentes tipos de rações, diferindo na quantidade de proteínas e no diâmetro da partícula.

As rações com 2,5 mm contêm 40% de proteína bruta, e são geralmente utilizadas para alevinos. As rações de 4 a 5 mm, com aproximadamente 36% de proteína bruta, são utilizadas

para peixes juvenis e adultos, e rações de 8 mm possuem 28% de proteína bruta em sua composição são, em geral, usadas para alimentação de peixes adultos.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-USP/Pirassununga. Na chegada ao laboratório, as amostras das rações foram armazenadas a -4°C até análises posteriores.

4.1.2. Amostragem dos peixes

Foram coletadas 30 amostras de peixes redondos com peso aproximado de 1 kg, entre eles um pacu e 29 híbridos de tambaqui, patinga e pacu nas propriedades descritas anteriormente, de acordo com a disponibilidade de doação dos proprietários. Em seguida, no laboratório, foi retirada parte do músculo e do fígado (Figura 11), que foram acondicionados em tubo cônico de 50 mL e armazenados a -20°C em freezer até o momento das análises.

Figura 11- Tambaqui aberto em método de janela com o fígado e músculo em destaque.

Fonte: Própria autoria.

4.2. Atividade de água (Aa) da ração

A determinação da atividade de água das amostras de ração foi realizada em equipamento AQUALAB 4TE (Decagon Services, Inc., Pullman, EUA), seguindo o protocolo de utilização indicado pelo fabricante.

4.3. Avaliação da microbiota da ração

Na câmara de fluxo foram pesados, em uma balança analítica, 25 g de cada amostra de ração previamente triturada, utilizando saco estéril e foram adicionados 225 mL de água peptonada (diluição 10^{-1}), homogeneizando por uma hora.

Em seguida, a partir dessa diluição, foram realizadas diluições até 10^{-5} , e posteriormente foram inoculados 0,1 mL das diluições no meio de cultivo DG18 (*Dicloran glicerol*), selecionado a partir do nível de atividade de água das amostras. As placas foram incubadas em estufa BOD com temperatura média de 25°C por cinco dias (PITT; HOCKING, 2009).

Após o período de incubação, foi realizado isolamento das colônias em ágar PDA (*Potato Dextrose Agar*), seguido de microcultivo, com incubação em estufa BOD de 3 a 5 dias, para posterior identificação através por microscopia ótica (RIDEELL, 1950).

A identificação do gênero foi realizada a partir das características macroscópicas e microscópicas (PITT; HOCKING, 2009). Após a identificação, os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram identificados através do Ágar *Aspergillus flavus* e *parasiticus* (AFPA) para triagem das espécies pertencentes à seção *Flavi*.

4.5. Determinação das aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.5.1. Padrões e solventes utilizados

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

4.5.2. Curvas de calibração

Para a curva de calibração das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, utilizou-se de cada padrão a concentração de 0,5, 1, 5, 10 e 15 µg/mL. Foram colocadas em vials as quantidades correspondente às concentrações e evaporadas até a secura sob fluxo de N₂. Em seguida, foram derivatizadas com 25 µg/mL de ácido trifluoracético, e ressuspensas com 975 µg/mL

de acetonitrila:água (2:8, v/v) e homogeneizadas durante um minuto em vórtex. Foram injetados no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 50 µg/mL de cada solução padrão.

4.5.3. Desempenho do método analítico

Foram realizados ensaios de recuperação que consistiam em contaminar artificialmente uma amostra de fígado e músculo com as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, nas concentrações de 5 e 20 µg de AF/kg, para avaliação do desempenho do método analítico. Antes da contaminação das amostras, quantificaram-se as mesmas, para a verificação da existência de algum resíduo, e somente em seguida foi feita a contaminação artificial, adicionando-se as concentrações pré-estabelecidas no momento da extração da amostra, na qual se pesa a amostra e adiciona-se a solução metanol:água (80:20. v/v).

As contaminações foram realizadas em triplicata, ou seja, três vezes, para cada concentração do composto, seguindo a metodologia descrita a seguir (4.6) e submetidas à derivatização e injetadas no sistema CLAE para obtenção de percentuais de recuperação e coeficientes de variação.

4.5.4 Limites de detecção e quantificação

Foram determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) com a injeção de quantidades decrescentes no sistema, até a menor concentração de detectada e quantificada de aflatoxinas nas amostras de fígado e músculo (VICAM, 2017).

4.5.5 Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de peixes

A determinação das aflatoxinas nas amostras de peixes foi efetuada de acordo com Michelin et al. (2017), com uso de colunas de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicom, Watertown, Estados Unidos da América) e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito resumidamente a seguir.

Foram utilizados o músculo e o fígado. Ambos foram homogeneizados e triturados. Para a amostra analítica do músculo foram utilizados 5 g, acondicionados em um frasco com 20 mL de solução metanol:água (80:20, v/v), e com o auxílio de um *mixer* homogeneizou-se durante 3 minutos. Em seguida, foi levado à centrífuga a 3.000 rpm por 10 minutos. Com auxílio do filtro de seringa PTFE 0,45µm (CHROMAFIL[®] Xtra) retirou-se o sobrenadante, e posteriormente adicionaram-se 4 mL do filtrado acrescidos de 25 mL de solução tampão fosfato 0,01 M em um tubo cônico. Na sequência, a solução passou pela coluna de imunoafinidade com fluxo de 1-2 gotas. Imediatamente a coluna foi lavada com 20 mL de solução tampão fosfato 0,01 M e depois com 1 mL de água ultrapura. Através da passagem de 1,5 mL de metanol pela coluna de imunoafinidade, foi realizada a eluição das aflatoxinas. O eluato foi recolhido em vial de 2 mL e evaporado até que estivesse seco, sob fluxo de N₂.

Para amostra analítica de fígado, foi utilizado 1 g, acondicionado em um frasco com 10 mL de solução metanol:água (80:20, v/v), e com o auxílio de um *mixer* foi homogeneizado durante 3 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Com auxílio do filtro de seringa PTFE 0,45µm CHROMAFIL[®] Xtra retirou-se o sobrenadante, e posteriormente foi adicionado 1 mL do filtrado acrescido de 25 mL de solução tampão fosfato 0,01 M em um tubo cônico.

Na sequência, a solução passou pela coluna de imunoafinidade com fluxo de 1-2 gotas. Imediatamente a coluna foi lavada com 20 mL de solução tampão fosfato 0,01 M e depois com 1 mL de água ultrapura. Através da passagem de 1,5 mL de metanol pela coluna de imunoafinidade, foi realizada a eluição das aflatoxinas, sendo que o eluato foi recolhido em vial de 2 mL, e evaporado até a secura, sob fluxo de N₂.

A derivatização foi efetuada com uso de ácido trifluoracético (TFA) (Neon, São Paulo, Brasil). O resíduo foi derivatizado utilizando 25 µL de TFA e ressuspendido com 975 µL de solução acetonitrila:água, na proporção 2:8 (v/v). As amostras apresentaram no total 1 mL de volume final.

Após a realização da derivatização, através de um injetor automático, 50 µL de cada amostra foram injetados em um cromatógrafo Shimadzu modelo Prominence vinculado ao software LabSolutions (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Foi utilizada uma fase móvel isocrática composta de água:acetonitrila:metanol (5,4:1:1 v/v/v) a um fluxo de 1 mL/min. com a finalidade de separar as aflatoxinas.

Ainda, foi utilizado um cartucho de pré-coluna Shim Pack GVP-ODS 10L X 4,6 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), além de uma coluna HyperClone BDS C18 (3µm) 100x 4,6 mm (Phenomenex[®], Califórnia, EUA) e por fim um detector de fluorescência RF-20^a

com excitação 350 nm e emissão de 450 nm. Deste modo, a quantificação das aflatoxinas nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, alcançados pelas amostras, na equação de regressão da curva de calibração.

4.6. Comitê de Ética

Para a realização do presente experimento, houve aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), sob o protocolo 5925140618.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade de Água (Aa) da ração

Na Figura 12 encontram-se os resultados de atividade de água (Aa) obtidos das amostras de ração analisadas. Nota-se uma baixa atividade de água obtida nas amostras, com valores entre 0,51 a 0,69 e média de 0,60. Deste modo, foi escolhido o meio de cultura ágar dicloran glicerol (DG18) para contagem de fungos filamentosos nas amostras de rações (PITT; HOCKING, 2009).

A atividade de água é a disponibilidade de água presente no alimento, podendo variar de 0 a 1, e está estritamente ligada à deterioração e o desenvolvimento de algumas espécies de microrganismos, das quais destacam-se os bolores e leveduras. Dada à elevada tolerância dos bolores a baixas Aa, podem causar alterações nos alimentos e nas rações com Aa menor que 0,60 (SCHMITZ; BRUM; TERRA, 1979).

Vale ressaltar que a umidade relativa interfere diretamente na atividade de água, uma vez que, ao armazenar alimentos de baixa Aa em locais com elevada umidade relativa, ocorrerá aumento da Aa do alimento, podendo favorecer a ação dos microrganismos (HOFFMAN, 2001).

Em estudos anteriores que avaliaram a atividade de água de rações para peixes e/ou matérias-primas para a alimentação dos mesmos, obtiveram resultados similares ao encontrados no presente estudo, Massocco (2016) obteve como resultado uma variação de 0,45 e 0,74 em rações provenientes de cinco pisciculturas do Estado de São Paulo, das quais 100% estavam contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo 84,2% das cepas isoladas capazes de produzir micotoxinas. Já Barbosa et al. (2013) relataram uma média na Aa de 0,598 em 60 amostras de rações em pisciculturas do Rio de Janeiro e ao avaliar a microbiota fúngica, também verificou-se a presença de fumonisinas (98%), traços de aflatoxinas (55%) e ocratoxinas (3,3%).

Jakić-Dimić et al. (2005), que analisaram amostras de matéria-prima na ração para peixes, constataram que quase a totalidade das amostras estavam contaminadas por fungos, sobretudo o milho.

Figura 12- Distribuição das contagens de bolores e leveduras e atividade de água das rações avaliadas

Legenda: Log UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias em logaritmo e Aa: Atividade de água

Fonte: Própria autoria.

5.2. Avaliação da microbiota da ração

Os resultados da contagem do crescimento fúngico das rações em log UFC/g estão expressos no Gráfico 1. Pode-se observar que aproximadamente 77% das amostras foram positivas, ou seja, houve crescimento em 20 amostras, e apenas seis não apresentaram crescimento, representando 23% do total de amostras avaliadas.

A contagem fúngica obtida das amostras ficou entre 2,00 e 4,70 log UFC/g, com média de 2,31 log UFC/g. Em estudos anteriores, realizados por Massocco (2016), foram observados resultados similares, com crescimento fúngico variando de 2,00 a 4,60 log UFC/g. O mesmo ocorreu no Rio de Janeiro, os resultados de Barbosa et al. (2013) apresentaram crescimento entre 2,0 a 4,43 log UFC/g, enquanto em pesquisa realizada em Manaus, Amazonas, por Atayde et al. (2008) foi observado crescimento fúngico com média de 1,45 log UFC/g.

Segundo Cardoso Filho et al. (2011), não existe legislação abrangente para contaminação por fungos na alimentação animal, entretanto, não são recomendadas contagens superiores a 4,00 log UFC/g em padrões utilizados em outros países no mundo para certificação de ração animal. Levando-se em consideração esse padrão, observou-se que 24

amostras (92,3%) estariam dentro do recomendado e duas (7,7%) excederiam o valor recomendado (ATAYDE, 2008; CARDOSO FILHO et al., 2011).

A alta contaminação fúngica pode acarretar a perda da palatabilidade da ração e, alteração na qualidade, afetando a produtividade, além da possibilidade desses produzirem micotoxinas. A contaminação pode indicar que possivelmente essas rações não foram armazenadas de maneira adequada, consequentemente causando prejuízos à saúde dos peixes cultivados e ao homem (ATAYDE, 2008; NUNES, 2009; CARDOSO FILHO et al., 2011; BARBOSA et al., 2013).

Em relação às condições de armazenamento das rações, foi observado no presente estudo que nenhuma propriedade estava de acordo com o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas intuito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa Nº 4, de 23 de fevereiro de 2007, pois as rações muitas vezes estavam diretamente no chão e encostadas na parede, as embalagens estavam abertas em locais sem qualquer controle de temperatura e umidade. Na Figura 13 pode ser observado o armazenamento de rações para peixes, com a presença de mofo nas paredes, indicando condições inadequadas de temperatura e umidade, além do acondicionamento das rações com outros produtos e materiais (BRASIL, 2007).

Figura 13- Armazenamento de ração em umas das propriedades.

Fonte: Própria autoria.

Vale ressaltar que a presença de fungos na ração não está diretamente relacionada à presença de aflatoxinas. Assim, as condições ótimas para o crescimento fúngico não são

necessariamente ótimas para a produção das toxinas, todavia, elevadas contagens de fungos podem ser um indicativo da presença de micotoxinas nos alimentos (HUSSEIN; BRASEL, 2001; PEREIRA et al., 2002).

Em estudos com rações destinadas a peixes, foram identificadas várias espécies de fungos, sendo as mais frequentes pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (CARDOSO FILHO, 2011; ALMEIDA et al., 2015). Contudo, as rações avaliadas no presente estudo apresentaram fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Verticillium*, *Fusarium* e *Curvularia*, como podem ser observados na Figura 14.

Figura 14- Frequência dos gêneros de fungos encontrados na ração para peixes.

Fonte: Própria autoria.

O gênero *Aspergillus* apresenta distribuição global e é mais abundante em regiões tropicais e subtropicais. Esses microrganismos podem contaminar os produtos agrícolas em etapas como a pré-colheita, colheita, processamento, manuseio, ou seja, em toda a cadeia de produção do alimento. Muitas espécies deste gênero são produtoras de micotoxinas, sendo as principais *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. alliaceus* (PERRONE et al., 2007).

Hashimoto et al. (2014) reportaram que a comercialização de ração no varejo em locais onde as rações ficam expostas pode contribuir para a contaminação por fungos, principalmente do gênero *Aspergillus*, os quais podem ser produtores de aflatoxinas. Entretanto, a presença da micotoxina pode depender de outros fatores antes mesmo da venda

dessas rações, como matéria-prima, condições de processamento e o manuseio ao longo da fabricação.

Em várias propriedades pesque-pague e pisciculturas as rações são armazenadas em baldes ou tambores tampados, hermeticamente ou não, próximos aos lagos e/ou tanques, sendo expostos ao ambiente por um longo período. Isto pode causar a fermentação ou até mesmo o apodrecimento, aumentando a proliferação dos microrganismos, inclusive os fungos (COELHO, 2014).

Em estudos similares no Irã, Alinezhad et al. (2011) avaliaram a ocorrência natural de fungos e aflatoxinas em rações e matérias-primas para trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e observou-se predominância do gênero *Aspergillus* (57,0%), *Penicillium* (12,84%), *Absidia* (11,01%) e *Pseudallescheria* (10,10%). O *A. flavus* foi a espécie mais frequentemente (60,66%) isolada de todos os ingredientes que compunham a ração, além de estes estarem contaminados por AFB₁ em níveis que variaram de 1,83 a 67,35 µg/kg, indicando um valor superior ao nível aceitável.

O gênero *Penicillium* também é de ampla distribuição na natureza e está relacionado com a deterioração de grãos armazenados em condições favoráveis ao crescimento fúngico, como alta umidade e altas temperaturas, sendo que essa espécie também é produtora de micotoxinas (PITT, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

A predominância dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* no presente estudo foram reportados em pesquisas realizadas por Nunes et al. (2009) dos quais identificaram oito gêneros fúngicos em amostras de ração e matérias-primas para rações de peixes no Estado do Piauí, com predominância de 50,9% de *Penicillium* e 29,3% do gênero *Aspergillus*. Calvet et al. (2015) avaliaram a micobiota e ocorrência de micotoxinas em rações de camarões, reportando contaminação por AFB₁ com valores máximos de 0,36 µg/kg, demonstrando também a presença de fungos toxigênicos.

Atayde (2008) avaliou em 30 amostras o potencial toxigênico a partir de isolados na ração para peixes fabricada no Estado do Amazonas, as quais apresentaram 15 espécies do gênero *Penicillium*. Araújo et al. (2010) identificaram a ocorrência de fungos em ingredientes e ração para tambaqui (*Colossoma macropomum*) no Estado de Alagoas, prevalecendo os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Curvularia*, de modo similar aos resultados encontrados na presente pesquisa.

Massocco (2016) avaliaram a micobiota de rações de pisciculturas do Estado de São Paulo, identificando fungos do gênero *Penicillium* em 100% das amostras, encontrando também fungos do gênero *Fusarium*, ambos produtores de micotoxinas, além da presença de

Cladosporium. Barbosa et al. (2013) identificaram na micobiota de rações provenientes de pisciculturas do Estado do Rio de Janeiro, a prevalência dos gêneros *Cladosporium* em 85% das amostras, seguido por *Aspergillus* em 68% e *Penicillium* em 60%, além de outros gêneros menos frequentes como *Wallemia*, *Eurotium*, *Aureobasidium*, *Mucor* e *Nigrospora*. Entre as micotoxinas identificadas, revelou-se uma co-ocorrência entre a FB₁, presente em 98% das amostras, AFB₁ em 55% e OTA em 3,3%.

Almeida et al. (2011) obtiveram crescimento fúngico em 40,2% das amostras de ração provenientes de pisciculturas de Portugal e os gêneros detectados foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*, sendo a espécie *A. flavus* a mais predominante, o que caracteriza o aumento do potencial risco de produção de aflatoxinas em ração durante o armazenamento.

No presente estudo, as colônias de *Aspergillus* (Figura 15) isoladas não foram pertencentes à seção *Flavi*, sendo negativas na triagem em ágar AFPA.

Figura 15- Crescimento fúngico em ágar DG18 e micrografia de um fungo do gênero *Aspergillus*.

Legenda: (A) Crescimento de bolores em Ágar DG18, (B) Micrografia de fungo, corado com Azul de Algodão e aumento de 400x.

Fonte: Própria autoria.

5.3. Resultados do desempenho do método analítico

As curvas de calibração e a avaliação do desempenho dos métodos analíticos foram realizadas para aflatoxinas nos tecidos hepático e muscular de diferentes espécies de peixes redondos e os resultados são apresentados a seguir.

5.3.1. Curvas de calibração

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas para as aflatoxinas AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂, foram, respectivamente, 0,997, 0,995, 0,997 e 0,995. Foram realizados cinco pontos com concentrações para cada aflatoxinas de 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 15,0 µg/kg, as curvas obtidas podem ser observadas a seguir (Figura 15).

Figura 15- Curvas de Calibração das aflatoxinas AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂.

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

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

5.3.2. Tempos de retenção

Na Figura 16 é possível verificar os tempos de retenção de cada aflatoxina. Foi realizada a derivatização pré-coluna utilizando o ácido trifluoracético (TFA) para aumentar a intensidade de fluorescência dessas aflatoxinas em análises de CLAE, assim, observa-se que as aflatoxinas AFG₁ e AFB₁ são convertidas em AFG_{2a} e AFB_{2a}, respectivamente.

Figura 16- Cromatograma com os tempos de retenção na concentração de 0,5 µg/kg de cada aflatoxina.

Legenda: Os tempos de retenção de cada aflatoxina são representados no cromatograma, sendo AFG_{2a} (AFG₁) 4.629 min, AFB_{2a} (AFB₁) 6.722 min, AFG₂ 10.287 min e para AFB₂ 15.987 min.

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

5.3.3. Avaliação do desempenho dos métodos analíticos

Na Tabela 4 é possível observar os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) do método.

Tabela 4- Limites de detecção e quantificação das amostras de fígado e músculo.

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

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

Fonte: Própria autoria.

Os ensaios de recuperação nas amostras de fígado e músculo foram efetuados em conjunto com os alunos Carolina Maria Bedoya Serna, Euder Cesar Michelin, Marina Martinêz Massocco e Sílvia Helena Seraphin de Godoy, os quais também avaliaram aflatoxinas em peixes, em diferentes experimentos.

Na Tabela 5 estão expressos os níveis e porcentagens dos valores obtidos para as amostras de fígado, considerando os dois níveis de toxina, sendo a recuperação média 104,4% para AFB₁, 112,6% para AFB₂, 91,5% para AFG₁ e de 104,5% para AFG₂.

Para as amostras de músculo os níveis e porcentagens obtidos considerando os dois níveis de toxina no músculo podem ser observados na Tabela 6, sendo a recuperação média para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ de 93,2%, 91%, 83% e 100,1%, respectivamente.

São recomendadas, para níveis de 1 a 10 µg/kg, recuperações de 70 a 110% para AFB₁ ou a somatória das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, enquanto que para níveis acima de 10 µg/kg é recomendado um nível de recuperação de 80 a 110% (UNIÃO EUROPEIA CE. n° 401, 2006). Quanto ao Coeficiente de Variação (CV), para níveis de 1 a 9,99 µg/kg é recomendado não exceder o valor de 30%, ou 20% para níveis entre 10 a 99,99 µg/kg (BRASIL, 2011).

No presente estudo foi possível observar que os resultados das porcentagens de recuperação e dos coeficientes de variações para todos os métodos analisados (fígado e músculo) revelam-se adequados e dentro da faixa de desempenho de método analíticos para análises de micotoxinas.

Tabela 5- Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.

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

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

Tabela 6- Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de músculo de peixes redondos.

AFB₁ Adicionada µg/kg	AFB₁ Observada µg/kg	AFB₁ Média µg/kg	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	5,3	4,8	96,0	10,4
	4,7			
	4,3			
20,0	18,9	18,1	90,5	4,7
	18,2			
	17,2			
AFB₂ Adicionada µg/kg	AFB₂ Observada µg/kg	AFB₂ Média µg/kg	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,6	4,8	96,0	10,0
	4,4			
	5,4			
20,0	18,9	17,2	86,0	9,8
	17,4			
	15,6			
AFG₁ Adicionada µg/kg	AFG₁ Observada µg/kg	AFG₁ Média µg/kg	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
5,0	4,6	4,8	96,0	27,0
	3,7			
	6,2			
20,0	13,9	14,1	70,5	9,2
	15,4			
	12,9			
AFG₂ Adicionada µg/kg	AFG₂ Observada µg/kg	AFG₂ 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.

5.4. Determinação e Quantificação de Aflatoxinas nas amostras de peixes

5.4.1 Aflatoxinas no fígado e músculo de peixes redondos

Na análise de aflatoxinas no fígado foram detectadas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, resultados apresentados na Tabela 7. Em 70% das amostras analisadas apresentaram positividade para AFB₁, sendo 43,33% traços e 26,67% quantificáveis, com mínimo de 0,05 µg/kg e máximo de 5,70 µg/kg e média 0,38 µg/kg. A AFB₂ foi detectada em 10% das amostras, com 6,67% traços e 3,33% quantificáveis, com nível de 0,07 µg/kg a 0,78 µg/kg e média de 0,31 µg/kg. Em 36,67% das amostras foi detectada AFG₁ (20% traços e 16,67% quantificáveis), com valores entre 0,06 µg/kg e 0,35 µg/kg e média de 0,16 µg/kg. Para AFG₂, 10% das amostras apresentaram positividade, sendo 6,67% traços e 3,33% quantificáveis com valores entre 0,12 µg/kg e 0,38 µg/kg e média de 0,22 µg/kg.

Tabela 7- Aflatoxinas detectadas e quantificadas no fígado dos peixes redondos.

Níveis no Fígado	ND (<LD)		Traços (entre LD e LQ)		Níveis Quantificáveis (>LQ)		Positivos (>LD)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
AFB₁	9	30	13	43,33	8	26,67	21	70
AFB₂	27	90	2	6,67	1	3,33	3	10
AFG₁	19	63,33	6	20	5	16,67	11	36,67
AFG₂	27	90	2	6,67	1	3,33	3	10

N = 30.

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

Fonte: Própria autoria.

Na análise do músculo dos peixes foram encontradas as aflatoxinas AFB₁, AFB₂ e AFG₁, que podem ser observadas na Tabela 8.

As amostras positivas para AFB₁ representaram em 43,33% das amostras (23,33% traços e 20% quantificáveis), com variação de 0,03 µg/kg a 1,14 µg/kg e média de 0,24 µg/kg. Para AFB₂, foram encontradas 26,67% de amostras positivas (20% traços e 6,67% quantificáveis), sendo que os níveis variaram de 0,16 µg/kg a 0,30 µg/kg com média de 0,11 µg/kg. Foram observados 16,67% de positividade para AFG₁ (10% traços e 6,67% quantificáveis) com valores de 0,06 µg/kg a 0,40 µg/kg com média de 0,20 µg/kg.

Tabela 8- Aflatoxinas detectadas e quantificadas no músculo dos peixes redondos.

Níveis no Músculo	ND (<LD)		Traços (entre LD e LQ)		Níveis Quantificáveis (>LD)		Positivos (>LD)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
AFB1	17	57	7	23	6	20	13	43
AFB2	22	73	2	7	1	3	3	10
AFG1	25	83	3	10	2	7	1	3
AFG2	30	100	0	0	0	0	0	0

N = 30.

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

Fonte: Própria autoria.

No presente estudo, não foi realizada a contaminação intencional da ração dos animais a fim de avaliar os resíduos e exposição dos mesmos, e sim a ocorrência natural das aflatoxinas nas propriedades (pisciculturas e pesque-pague). É possível observar que há presença de resíduos de todas aflatoxinas no fígado e de aflatoxinas B₁, B₂ e G₁ no músculo, com destaque para a AFB₁, que foi encontrada em 70% das amostras de fígado e 43,33% das amostras de músculo.

Em estudos que analisaram a ocorrência natural de resíduos aflatoxinas em fígado e músculo, foi reportada por GODOY (2018) nos tecidos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), a presença de AFB₁ em 85,72% das amostras de fígado (40,48% traços e 45,24% em níveis quantificáveis) e 7,14% de amostras positivas para AFG₁ (4,76% traços e 2,38% quantificáveis). No músculo apenas a AFB₁ foi detectada no estudo citado, com positividade de 19,05% (2,38% traços e 16, 67 quatificáveis) nas amostras. Todavia, estudos conduzidos por Mohamed et al. (2017) constatarem a presença de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂ e AFG₂) no músculo em 96% das amostras de tilápia com concentrações de 0,370 a 12,9 µg AFB₁/kg em 60% dos animais, deste modo, sendo similar aos resultados encontrados no presente estudo.

Nas 30 amostras testadas no presente estudo, foram encontradas 21 positivas para AFB₁ no fígado, enquanto no músculo 13 foram positivas, embora os resultados estejam em níveis inferiores aos preconizados pela legislação brasileira evidencia, portanto que os peixes são suscetíveis à acumulação de toxinas em seus tecidos, além de estarem expostos a uma alimentação contaminada por aflatoxinas.

A importância dada à AFB₁ deve-se ao fato de ser a aflatoxina mais tóxica em relação às demais, considerada também o mais potente composto cancerígeno natural para os animais, além de ser a causa de diversos outros efeitos deletérios em várias espécies de peixes e

camarões. Esses efeitos incluem injúrias na função do fígado, necrose e tumores, baixa eficiência na conversão alimentar, diminuição do ganho de peso, aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas secundárias, além de elevar a mortalidade (SANTACROCE et al., 2008, KUBITZA, 2010).

Os efeitos da AFB₁ em diferentes espécies de peixes podem ser demonstrados em estudos realizados através da contaminação proposital da ração, como Tuan et al. (2002) que avaliaram as respostas de tilápias quanto às concentrações de AFB₁ (0, 250, 2.500, 10.000 ou 100.000 µg/kg) durante oito semanas, constatando que dietas com níveis acima 2.500 µg/kg afetam negativamente o hematócrito e o crescimento, acima de 10.000 µg/kg apresentaram lesões hepatocelulares e redução no ganho de peso e acima de 100.000 µg/kg houve necrose hepática grave, além de mortalidade de 60% dos peixes neste tratamento. Entretanto, nenhum efeito adverso foi encontrado com níveis de 250 µg AFB₁/kg de dieta.

Deng et al. (2010) avaliaram os efeitos tóxicos e os resíduos de AFB₁ em tilápias alimentadas com seis dietas contendo diferentes níveis de AFB₁ (19, 85, 245, 638, 793 e 1641 µg/kg) durante 20 semanas. Foi observado que doses com níveis acima de 245 µg/kg induziram o distúrbio hepático, sendo detectados resíduos apenas no fígado.

O matrinxã (*Brycon cephalus*) foi estudado por Bedoya-Serna et al. (2018), com exposição durante 180 dias a dietas compostas de 10, 20 e 50 µg/kg de AFB₁. Ao final do período de exposição, apenas a AFB₁ foi detectada no fígado com variação de 0,15 a 0,61 µg/kg e no músculo foram detectados apenas traços. Deste modo, a não deposição significativa nos tecidos de matrinxã poderia sugerir uma resistência ao acúmulo de AFB₁. Entretanto, a exposição crônica às aflatoxinas indicou um efeito de suscetibilidade sobre o desempenho, sobretudo ao peso e comprimento dos animais.

Os resultados encontrados por Michelin et al. (2017) ao expor a espécie lambari (*Astyanax altiparanae*) a dietas com 10, 20, 50 µg/kg de AFB₁ durante 120 dias mostraram detecção de AFB₁ nos tecidos nos animais alimentados com 50 µg/kg após 90 dias de exposição. Ao final do experimento, os níveis de acúmulo de AFB₁ no fígado chegaram a 215,34 µg/kg e 58,47 µg/kg no músculo, demonstrando similaridade com a concentração que foi incorporada a ração durante os 120 dias de exposição.

Em outras espécies, como a carpa (*Carassius auratus gibelio*), a exposição por 24 semanas a dietas com 3,3, 22,3 e 1646,5 µg/kg de AFB₁ não demonstrou efeitos negativos no fígado ou no desempenho dos animais e o acúmulo no músculo foi abaixo de 5 µg/kg (Huang et al, 2014). Diferentemente de El-Sayed e Khalil (2009), que relataram deposição de 4,5

$\mu\text{g/kg}$ de AFB₁ no músculo de robalos (*Dicentrarchus labrax L.*) após 42 dias de exposição a uma dieta de 18 $\mu\text{g/kg}$.

É possível observar nesses estudos que os resíduos de aflatoxinas presentes no fígado são maiores do que os níveis encontrados no músculo, principalmente devido à via de metabolização e à lipossolubilidade das aflatoxinas (EL SAYED et al., 2009; DENG et al., 2010).

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e distribuídas ao músculo, rins, tecido adiposo, e principalmente ao fígado, pela sua função de detoxificação e excreção de toxinas. Isso explicaria os níveis mais elevados de AFB₁ encontrados no fígado e mais baixos em músculo (BATATINHA et al., 2008; EL SAYED et al., 2009; DENG et al., 2010; GODOY, 2018).

Todavia, vários autores vêm demonstrando que os padrões de biotransformação da AFB₁ possuem uma variação muito grande entre as espécies, o que explicaria os diferentes graus de suscetibilidade à AFB₁. Algumas espécies são sensíveis mesmo em doses baixas (BUSBY; WOGAN, 1984; UYSAL et al., 2005; LOPES et al., 2005; SANTACROCE et al., 2007; EL SAYED; KHALIL, 2009; MOHAMED et al., 2017).

No presente estudo, foram observadas concentrações de AFB₁, cujo valor máximo encontrado no fígado foi de 5,70 $\mu\text{g/kg}$ e 1,14 $\mu\text{g/kg}$ no músculo, apesar de estarem em níveis aparentemente baixos, Halver (1969) demonstrou em sua pesquisa os efeitos hepatocarcinogênicos ao expor trutas arco-íris a uma dieta com concentração de 0,5 μg AFB₁/kg durante seis meses. Deste modo, fica evidenciada a possibilidade de acúmulo das aflatoxinas no músculo dos peixes redondos a partir da exposição natural às rações oferecidas nas propriedades, principalmente se esta for a longo prazo.

Contudo, as espécies de peixes possuem diferentes mecanismos de metabolização, sendo que algumas das espécies têm maior facilidade de desintoxicação e excreção dos metabólitos menos tóxicos da AFB₁, já outras podem sofrer biotransformação para compostos mais tóxicos, como a forma ativada da AFB₁, a 8,9-epóxido. Isto, juntamente com a duração da exposição à toxina, bem como sua concentração, resultaria em acúmulos diferentes nos tecidos de cada espécie (WOGAN, 1992; SANTACROCE et al., 2008; HUANG et al., 2014).

A aflatoxicose nos peixes está diretamente relacionada à toxicidade da aflatoxina, ao tempo de exposição, estado nutricional e à concentração ingerida, consequentemente, os sintomas variam de intoxicação aguda, pela alta concentração de aflatoxinas, causando mortalidade e atrasos no crescimento e ganho de peso, à intoxicação crônica, geralmente em

concentrações baixas, levando as neoplasias e à morte (FERREIRA et al., 2006; BANDO et al., 2007).

Entretanto, a legislação brasileira não contempla limites máximos para aflatoxinas em produtos de origem animal, com exceção da AFM₁ em produtos derivados do leite. Deste modo, pode haver exposição dos consumidores aos efeitos tóxicos das aflatoxinas, sobretudo da AFB₁, ao consumirem a carne de peixes redondos. Vale destacar que há diferenças de sensibilidade às aflatoxinas apresentadas pelas diferentes espécies de peixes, desta maneira, os limites máximos tolerados não se aplicariam do mesmo modo (BRASIL, 2011).

Portanto, os limites máximos tolerados na ração e/ou matéria-prima na alimentação dos peixes, não protegem os animais de danos à saúde, além de poder causar inúmeros prejuízos na produtividade aos proprietários (MICHELIN et al., 2017; GODOY, 2018).

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, há ocorrência de crescimento fúngico na ração dos peixes, principalmente dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Houve ocorrência de resíduos de aflatoxinas, sobretudo AFB₁, no fígado e músculo de peixes redondos, com detecção em 70% e 43% das amostras e com valores máximos de 5,70 µg/kg e 1,14 µg/kg, respectivamente. A presença de resíduos de aflatoxinas indica o consumo de ração contaminada pelos animais em condições de criação. Desta maneira, deve-se controlar a contaminação por aflatoxinas da ração para peixes, a fim de evitar riscos e garantir a segurança dos consumidores.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALINEZHAD, S. et al. Mycobiota and aflatoxin B₁ contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed with emphasis to *Aspergillus* section *Flavi*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Iran, v. 10, n. 3, p. 363-374, 2011.
- ALMEIDA, I. F. M. et al. Mycobiota and Aflatoxin B1 in Feed for Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Toxins**, Lisboa, v. 3, n. 3, p.163-171, fev. 2011.
- ARAÚJO, A. G. S. de et al. **Ocorrência de fungos de campo e de armazenamento em ingredientes e ração para tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2009. 26f. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2009.
- ASTOVISA, M. B.; SUÁREZ, M. M. S. Micotoxinas y cáncer. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, Ciudadela Habana, v. 24, n. 1, jan/mar 2005.
- ATAYDE, H. M. et al. Fungos toxigênicos e micotoxinas na alimentação de peixes: uma revisão. **Scientia Amazonia**, Manaus, v. 3, n. 3, p. 59-71, 2014.
- ATAYDE, H. M. **Potencial de toxicidade de microfungos isolados de rações para peixes fabricadas no Estado do Amazonas**. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado de Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2008.
- ATAYDE, H.M. et al. Micobiota presente em pescado processado comercializado na cidade de Manaus, Amazonas. **Revista Higiene Alimentar**, Manaus, v. 19, n. 134, p. 89-93, 2005.
- BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Revista Brasileira de Patologia Médica**, Rio de Janeiro, v.43, n. 3, p. 175-180, jun 2007.
- BARBOSA, T. et al. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. **International Aquatic Research**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2013.
- BATATINHA, M. J. M. et al. Micotoxicoses In: SPINOSA, H.S, GÓRNIK, S. L, PALERMO-NETO, J., (Ed). **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole: 2008. p. 479–510.
- BEDOYA-SERNA, C. M. et al. Effects of dietary aflatoxin B1 on accumulation and performance in matrinxã fish (*Bryconcephalus*). **Plos One**, v. 13, n. 8, ago 2018.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical of Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p.497–516, jul, 2003.
- BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemistry of the Society of Chemical Community**, p. 743-745, 1988.
- BHATNAGAR, D. et al. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. **Mycopathologia**, n. 162, p. 155–166, set 2006.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **J. Food Protec**, Urbana, v. 50, n. 12, p. 1058-73, dez 1987.

BOSCH, F.X.; PEERS, F. Aflatoxins: data on human carcinogenic risk. In: O'NEILL, I.K.; CHEN, J.; BARTSCH, H., (Ed). **Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins**. Lyon, IARC: 1991. p. 48-53.

BOSCO, F.; MOLLEA, C, C. Mycotoxins in Food. **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**. Rijeka, Croatia, fev. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Diário Oficial da União. Brasília. DF, 22 fev. 2011. Seção 1, n. 37, p. 72-73.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013**. Diário Oficial da União – Seção 1. Nº 252, p. 756. 30 de dezembro de 2013.

BRASIL. Meio Ambiente. **Recursos Hídricos**. 2010. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2010/11/recursos-hidricos>>. Acesso em 09/05/2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 4, de 23 de fevereiro de 2007. **Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 mar. de 2007. Seção 1, p. 1-17.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal**. Instrução Normativa SDA Nº 09, de 21 de fevereiro de 2017. Diário Oficial em 08 de março de 2017. Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Aquicultura 2016**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/pesca-e-aquicultura/aquicultura>.> Acesso em 10/04/2017.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. (2013). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011. **Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília. 22 de Fev. de 2011; Seção 1, 72.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira**. – 2. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 156 p.

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

BUSBY, W. F; WOGAN, G. N. Aflatoxins. In: Searle, C.E.,ed. Chemical carcinogens. 2nd ed. Washington, **American Chemical Society**, Washington, v. 2, p. 945-1136, 1984.

CALONI, F et al. Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model, **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 409-15, mar 2006.

CALVET, R. M. et al .Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 6, p. 1021-1026, jun 2015.

CARÃO, A. C de P. et al. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 4, p. 699-705, abr 2014.

CARDOSO FILHO, F. das C. et al. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 305-311, set. 2013.

CARVALHO, E. C. Q. de. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 27-31, jan/abr 1995.

CAST, 2003. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems**. Report N° 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA.

CASTILLO, J, M, S. **Micotoxinas en Alimentos**. Diaz de Santos. Madrid, 2007.

CASTRO, P. M. G. et al. Perspectivas da Atividade de Pesqueiros no alto Tietê: Contribuição à Gestão de Usos Múltiplos da Água. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 1, n. 32, p. 1 – 14, 2006.

CHAVEZ, R. et al. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 413-433, jun 2006.

CHEN, J. et al. Production of the Mycotoxin Fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. **Appl Environ Microbiol**, v. 12, n. 58, p. 3928–3931, dez 1992.

CHULZE, S.N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: A review. **Food Addit. Contam**, n. 27, p. 651–657, mai 2010.

CIEGLER, A. Patulin. In: RODRICKS, J. V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAN, M. A. (Ed). **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South. Pathotox: 1977. p. 609-624.

CIEGLER, A.; DETROY, R. W.; LILLEJOJ, E. B. Patulin, penicillic acid and other carcinogenic lactones. In: CIEGLER, A.; KADIS, S.; AJL, S. J. (Ed.). **Microbial toxins**, New York: Academic Press, 1971. p. 409-434.

COELHO, W. M. D. **Contaminantes em cevsa, ração e peixes: Um grave problema ambiental e de saúde pública**. Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina (FCAA). 2014. Disponível em: <http://www.fea.br/Arquivos/FISMA/Cevas.pdf>. Acesso em 02/01/2017.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**. v.127, n. 1-3, p. 19–28, fev 2002.

CUSUMANO, V, C. G. B.; SEMINARA, S. Effects of aflatoxins on rat peritoneal macrophages, **Appl. Environ. Microbiol**, Messina, v. 56, n. 11, p. 3482–3484, 1990.

CYRINO, J. E. P. et al. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. 3ª ed. São Paulo: TecArt, 2004. p. 533.

DAWSON, R. J. A global view of the mycotoxin problem. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE FUNGI AND MYCOTOXINS IN STORED PRODUCTS, 1991. Bangkok. **Proceedings...** Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1991. p. 22-28.

DENG, S. X. et al. Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. **Aquaculture**, v. 307, n.3-4, p. 233–240, set 2010.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: Aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 187-191, jul/dez, 2002.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. Sinais Clínicos e Lesões Causadas por Micotoxinas. In: XI Encontro Nacional de Micotoxinas, Piracicaba, 2004. **Anais...** Piracicaba: 2004, p. 32-35.

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

FERREIRA, H. et al. Aflatoxinas: Um risco a saúde humana e animal. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**. Guarapuava, v. 2, n. 1, jun, 2006.

FONSECA, H. **Legislação Nacional e Internacional de Micotoxinas**. Piracicaba, 2013. Disponível em:

<http://www.micotoxinas.com.br/LEGISLA%C3%87%C3%83O%20SOBRE%20MICOTOXINAS.pdf>. Acesso em: 20/12/17.

FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Mycotoxin regulations in 2003 and current developments*. 2003. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003. Disponível em:

<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>>. Acesso 20/12/17.

_____. *The state of world fisheries and aquaculture 2018: meeting the sustainable development goals*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018.

_____. *Worldwide Regulations for Mycotoxins in food and feed in 2003*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. Disponível em:

<<http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e07.htm#bm07.3.5>>. Acesso em: 29/03/2019.

FORRESTER, L.M. et al. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 87, n. 21, p. 8306- 10, nov 1990.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 1 ed. Artmed. Porto Alegre, 2002.

FRANCO, B, D, G, M; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. 1 ed. Atheneu. São Paulo, 2005.

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

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, jul 1988.

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

GONÇALVES, R. Micotoxinas na Aquicultura: 8 coisas que você precisa saber. **Science & Solutions**, Getzersdorf, v. 30, p. 6-9, 2016.

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

HEDAYATI, M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, jun. 2007.

HALVER, J. E. Aflatoxicosis and trout hepatoma. In: GOLDBLATT, L. A. E., (Ed.) **Aflatoxin**: Scientific Background, Control, and Implications. New York, Academic Press: 1969. p. 265–306.

HINTON, D. M, et al. Immunotoxicity of aflatoxin B1 in inflammatory response in a chronic intermittent dosing study, **Toxicol. Sci**, v. 73,n. 2, p. 362–77, abr 2003.

HOPKINS, J. The toxicological hazards of patulin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 455–456, jun 1993.

HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Adv. Exp. Med. Biol.**, n. 283, p. 525-32, 1991.

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**, v. 428–429, p. 236-242, mai 2014.

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

IAMANAKA, B, T. et al. **Micotoxinas em alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, v. 7, p.138-161, 2010.

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Agents classified by the IARC monographs**, volumes 1-120, 1993. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>. Acesso em 19/07/2017.

_____. **Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins, and ultraviolet radiation**. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lion: IARC, 1985, v. 40. p. 92–93.

_____. **Toxins derived from *Fusarium moniliforme***: fumonisins B1 and B2 and fusarin C. In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lion : IARC, 1993. p.455-466. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, 56). Acesso em 20/12/17.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 43, p.1-49, 2015. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf. Acesso em 21/04/2017.

ISMAIL, M.A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-saharan tropical East African countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. **Mycopathologia**, New York, v. 150, p. 67-80, 2000.

JAKAB, G. J. et al. Respiratory aflatoxicosis: suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice, **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 125, n. 2, p. 198–205, abr 1994.

JAKIĆ- DIMIĆ, D. et al. The influence of mycotoxins in food on fish health status. **Proc. Nat. Sci**, Novi Sad, n.109, p. 73–79, 2005.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, 1898-1909, 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOBIM, C.; GONÇALVES, G. D; SANTOS, G. T. Qualidade Sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. **Anais do Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas**. p 242-261. 2001.

KARLOVSKY, P. et al. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. **Mycotoxin Research**, v. 32, n. 4, p. 179-205, ago 2016.

KHALIL, R.H.; EL-SAYED, Y.S. Toxicity of aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). **Minufiya Vet. Med. J.** v. 5, p. 529–540, jul 2008.

KIDD, M. T. et al. T-2 Tetraol is Cytotoxic to a Chicken Macrophage Cell Line. **Poultry Science**, v. 76, n. 2, p. 311-313, fev 1997.

KOTAL, F. et al. Determination of trichothecenes in cereals. **J. Chromatogr.**, v. 830, n. 1, p. 219-225, jan 1999.

- KRIEK, N. P. J.; KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F.O. A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep, and rats. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 48, p. 129-131, jun 1981.
- KUBITZA, F. Micotoxinas e seus efeitos sobre os peixes. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 121, p. 14-23, set/out, 2010.
- KUBITZA, F. Micotoxinas na ração: um inimigo silencioso na criação de peixes e camarões. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 14-23, mar/abr 2015.
- KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Reg. Toxicol. Pharmacol**, v. 7, n. 3, p. 253–306, set 1987.
- KUMAR, P. et al. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. **Frontiers In Microbiology**, v. 07, p. 1-10, jan 2017.
- LARGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **J.Chromatog.**,v. 815, n. 1, p. 103-121, jul 1998.
- LEDOUX, D.R. et al. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **J Vet Diagn Invest**, Davis, v. 4, p. 330-333, jul 1992.
- LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Nutrition and fish health**. New York: Food Products Press. 2001. p. 267-287.
- LIM, H.A. et al. Contamination of palm kernel meal with *Aspergillus flavus* affects its nutritive value in pelleted feed for tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 11, p. 895-905, nov 2001.
- LIN, M. T.; DIANESE, J. C.A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxina production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-69, dez 1976.
- LOPES, P. R. et al. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesq. agropec. Bras**, v. 10, n. 40, p. 1029-34, out 2005.
- MAGAN, N. et al. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 723–730, set 2003.
- MARASAS, W. F. O. et al. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort J. Vet. Res**, v. 55, p. 197-203, dez 1988.
- MARTELLETO, L. A. P.; CASTILHO, A. M. C.; GOES, A de. Influência de temperatura de incubação de crescimento micelial, na esporulação e na patogenicidade de *Fusarium subglutinans*, agente causal da fusariose do abacaxizeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, p. 242-248, set 1998.

MASSEY, T. E. et al. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. **Proc. Soc. Exp. Med.**, v. 208, p. 213-27, mar 1995.

MASSOCCO, M. M. Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em pisciculturas do Estado de São Paulo: rações e espécies comerciais de pescado de cultivo. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Pirassununga.

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

McLEAN M; DUTTON, M. F. Cellular interactions metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacol. Ther**, Durban, v. 65, n. 2, p.163-92, fev 1995.

MEDEIROS, F. et al. Brasil produziu 691.700 toneladas de peixes cultivados em 2017. **Associação Brasileira da Piscicultura**, p. 23-29, 2018.

MEIRELES, M. C. A. et al. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 127, p. 183-188, 1994.

MENESES, J. Como criar patinga. **Revista Globo Rural**. 2017. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/vida-na-fazenda/como-criar/noticia/2017/03/como-criar-patinga.html>. Acesso em 27/12/17.

MICHELIN, E. C. et al. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. **Food Additives & Contaminants**, p. 1-8, dez 2016.

MOHAMED, H. M. A. et al. Detection of Aflatoxin-Producing Fungi Isolate From Nile Tilapia and Fish Feed. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1308-1318, dez 2017.

MOON, E. Y; RHEE D. K; PYO, S. In vitro suppressive effect of aflatoxin B1 on murine peritoneal macrophage functions, **Toxicology**, v. 133, p. 171–9, abr 1999.

MORO, G. V. et al. Espécies de peixe para piscicultura. In: EMBRAPA et al. **Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos**. Brasília: Embrapa, 2013. p. 36-37.

MURRAY, P. et al. **Microbiologia Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NELSON, P.E. et al. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 8, p. 2410- 2412, ago 1991.

NGETHE, S.; HORSBERG, T.E.; INGEBRIGTSEN, K. The disposition of 3 H-aflatoxin B1 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after oral and intravenous administration. **Aquaculture**, v. 108, n.3-4, p. 323-332, dez 1992.

NUNES, E. M. C. G. et al . Screening of aflatoxin B1 and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. **Lat. Am. J. Aquat. Res.**, v. 43, n. 3, p. 595-600, jul 2015.

OLIVEIRA, C. A. F; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 4, n. 3, ago 1997.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO). **Novo relatório da FAO aponta que produção da pesca e aquicultura no Brasil deve crescer mais de 100% até 2025. 2016.** Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/423722/>>. Acesso em 21/04/2017.

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses?. **Vet. Med**, Ames, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.

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

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F dos. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. Ensaio e Ciência. **Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Valinhos, v. 15, n. 4, p. 147-165, abr 2011.

PEREIRA, M. M. G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, fev 2005.

PEREIRA, M.M.G., CARVALHO, E.P., PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. CEPPA**, v. 20, n. 1, jun 2002.

PEREIRA, V.L.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends Food Sci. Technol**, v. 36, p. 96–136, abr 2014.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies In Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PIETSCH, C. et al. Effects of Dietary Exposure to Zearalenone (ZEN) on Carp (*Cyprinus carpio* L.). **Toxins**, v. 7, n. 9, p. 3465-3480, ago 2015.

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

PINHEIRO, M. dos R. R. **Estudo de Variabilidade Genética de *Aspergillus flavus* como Base para o desenvolvimento de PCR Multiplex para Detecção de Fungos Produtores de Aflatoxinas em Castanha-do-brasil e Castanha-de-caju.** Março, 2004.

PITT, J. I; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3ed. New York: Springer, 2009.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 184-192, jan 2000.

PLAKAS S.M. et al. Tissue disposition and excretion of C14- labeled aflatoxin B1 after oral administration in Chanell catfish. **Food Chemistry. Toxicology**, Kidlington, v. 29, n. 12, p. 805-808, jan 1991.

PUEL, O.; GALTIER, P.; OSWALD, I.P. Biosynthesis and toxicological effects of Patulin. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 613– 631, abr 2010.

RATOLA, N.; MARTINS, L.; ALVES, A. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with results. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 1, p. 319-324, jun 2004.

REDDY, K.R.N. et al. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. **Food Control**, v. 20, n. 2, p. 173– 178, fev 2009.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 68, p. 2102– 2105, mai 2002.

RIBEIRO, S. A. L. et al. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, Recife, v. 26, n. 2, p. 223-229, jun 2003.

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

RODRIGUES, A. P.O; BERGAMIN, G. T; SANTOS, V. R. V. dos. Nutrição e alimentação de peixes. In: EMBRAPA et al. **Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos**. Brasília: Embrapa, 2013. p.171-213.

ROTTINGHAUS, G. E. **Physical and Chemical Properties of the Common Mycotoxins**. Slides. 2017.

ROUBACH, R. et al. Aquicultura brasileira. **World Aquaculture Society**, v. 34, n. 76, p. 34, mar 2003.

RUDREW, S.; CRAFT, J.; AIDOO, K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin in the west of Scotland. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 653-658, mai 2013.

SANTACROCE, M. P. et al. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. **Reviews In Fish Biology And Fisheries**, v. 18, n. 1, p. 99-130, jun 2007.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ, D. E. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 225-234.

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 153–157, 2001.

SCHMITZ, L. S.; BRUM, M. A. R. de.; TERRA, N. N. A atividade de água na conservação dos alimentos. **Rev. Centro Ciências Rurais**, v. 9, n. 1, p. 19-24, nov 1979.

SCUSSEL, F. Novos Números da Produção de Peixes no Brasil. *Aquaculture Brasil*. 2017. Disponível em: <<http://www.aquaculturebrasil.com/2017/04/04/novos-numeros-da-producao-de-peixes-no-brasil/>>. Acesso em 31/01/2019

SCUSSEL, V.M. **Fungos em grãos armazenados**. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V. M. Armazenagem de grãos. IBG: Campinas, 2002. p. 675-804.

SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **A evolução da Piscicultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.sebraemercados.com.br/a-evolucao-da-piscicultura-no-brasil/>>. Acesso em 09/05/2017.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO (SAA/SP). **SP: piscicultura ganha força e competitividade com incentivo a pesquisa e desburocratização das atividades**. (2018). Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/noticia/255017/piscicultura-ganha-forca-e-competitividade-com-incentivo-a-pesquisa-e-desburocratizacao-das-atividades>>. Acesso em 31/01/2019

SERRA, R. et al. Determination of ochratoxin in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 1, p. 41-47, jun 2004.

SERRA, R. **Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para ocratoxina A**. 2005. 399f. Tese (Doutorado). Universidade do Minho, Minho. 2005.

SHARMA. R.P. Mycotoxins in the food chain: a look at their impact on immunological responses. *Proc. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. **20º Annual Symposium Alltech**. p.306-314. 2004.

SHEPHARD, G.S. et al. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **JAssoc of Anal. Chem**, Arlington, v. 79, n. 3, p. 671-687, mai 1996.

SIMIONATO, E. M. R.S.; MENEZES, M. L. de Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta da amostra empregando uma coluna cromatografica IS-aniônica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, Bauru, v. 66, n. 3, p. 234-239, 2007.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. Mycotoxins: Formation, Analysis, and Significance. **John Wiley and Sons**, New York, 1985.

SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **J. Food Prot**, v. 49, n. 7, p. 544-569, jul 1986.

SOUZA, K. M. N. de et al. Estudo Químico-Quântico Semi empírico de Aflatoxinas. **Jepex–IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2009.

SWAMY, H.V.L.N. Mycotoxicoses in poultry: an overview from the Asia-Pacific region. In: LYONS, T. P.; JACQUES. K. A (Ed), *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*, Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium. **Nottingham University Press**, UK, 2005. p. 75-89.

TORRES, A. E. C. et al. **Temas de Higiene em los Alimentos**. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2008.

TRUCKNESS, M. W.; TANG, Y. Solid phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice, p. 205–213. In: TRUCKNESS, M. W; POHLAND, A (ed.), **Mycotoxin protocols**. Humana Press, Totowa, 2001. p. 261.

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

TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v. 443, n. 1-2, p. 81- 93, jul 1999.

UENO, Y. Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects, **Kodansha-Elsevier**, p. 313, 1983.

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

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

UYSAL, H. Agar G. Selenium Protective Activity Against Aflatoxin B1 Adverse Affects on *Drosophila melanogaster*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 227-33, mar 2005.

VALENTI, W. C. Introdução. In: VALENTI, W. C. et al. **Aquicultura no Brasil**. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. p. 25-26.

VAN EGMOND, H. P.; JONKER, M. A. World wide regulations on aflatoxins- the situation in 2002. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 23, n. 2/3, p. 273-293, jan 2004.

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

VITORINO, O. C. L. **Micotoxinas na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Zootécnica, Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

WEIDENBÖRNER, M. **Encyclopedia of Food Mycotoxins**. Springer: Germany, 2001.

WOGAN, G. N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Prog. Clin. Biol. Res**, Cambridge, v. 374, p. 123-37, fev 1992.

WOŹNY, M. et al. Zearalenone contamination in rainbow trout farms in north-eastern Poland. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 209-211, dez 2013.