UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

EUDER CESAR MICHELIN

Transferência de aflatoxinas da ração para lambaris (*Astyanax altiparanae*) cultivados em piscicultura

Pirassununga

2016

EUDER CESAR MICHELIN

Transferência de aflatoxinas da ração para lambaris (*Astyanax altiparanae*) cultivados em piscicultura

"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 Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Andrezza Maria
Fernandes

Pirassununga

2016

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

M623t MICHELIN, EUDER CESAR
Transferência de aflatoxinas da ração para
lambaris (*Astyanax altiparanae*) cultivados em
piscicultura / EUDER CESAR MICHELIN ; orientadora
Andrezza Maria Fernandes. -- Pirassununga, 2016.
82 f.

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

1. AFLATOXINAS. 2. AQUICULTURA. 3. PEIXES. 4.
MICOTOXINAS. 5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA. I. Fernandes, Andrezza Maria, orient.
II. Título.

EUDER CESAR MICHELIN

Transferência de aflatoxinas da ração para lambaris (*Astyanax altiparanae*) cultivados em piscicultura

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 Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal.

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Presidente da Banca Examinadora

Nome completo do 2º Examinador

Nome completo do 3º Examinador

Dedico esta obra aos meus pais que me deram a vida e foram meus primeiros professores na escola da vida. O lar é uma escola, os pais os professores, o primeiro dia de vida, é o primeiro dia de aula do filho.

À minha querida namorada Juliana, pela paciência e compreensão, companheira dedicada em todos os momentos de minha vida, que tanto ajudou-me nesta vida de pós graduando, em busca de um sonho que nem ousava sonhar.

Aos Professores que ajudaram no meu crescimento e conhecimento, pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado deles que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela suas serenidades, e pelo seu Dom no ensino da Ciência, os meus sinceros
OBRIGADO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, inteligência suprema, causa primária de todas as coisas, criador do Universo, Deus obrigado.

À minha orientadora Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandez pela paciência, amizade e convívio que tivemos ao longo desta jornada, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

A minha família que em todos os momentos de minha vida, sempre demonstrou ser a família ideal, agradeço a todos pelo apoio incondicional, pelo carinho, pelas palavras de força e incentivo.

À minha namorada Juliana que deixou muitas vezes seus afazeres para auxiliar nas tarefas mais difíceis da condução do experimento.

Ao Dr. George Shigueki Yasui, por ter cedido o espaço para a pesquisa, nos auxiliado incondicionalmente em tudo que precisamos para o desenvolvimento do experimento e pela amizade que se formou.

Ao Dr. George Rottinghaus pela ajuda e supervisão na produção de aflatoxina, nas análises cromatográficas.

Aos Funcionários e diretor do ICMBio - CEPTA - Centro Nacional De Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais pelo apoio e toda ajuda.

À técnica do laboratório Silvia pela ajuda e ensinamento desde o início do estágio obrigatório até o fim do trabalho, muito obrigado.

Agradecimento com muito carinho para os colegas da pós-graduação, Anna, Marina, Marisa, Samara, Marcelo, que se revelaram grandes amigos, por ter participado ativamente das etapas desse projeto e da convivência do dia – dia deste experimento, dividindo as dificuldades e as tarefas do dia a dia, contribuindo de forma decisiva para que chegássemos ao término do trabalho proposto.

Professor Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Souza pela ajuda, amizade, confiança, consideração, disposição, incentivo e respeito durante o mestrado.

Aos alunos do CEPTA por sempre atender prontamente que necessitávamos de ajuda.

Aos funcionários da Biblioteca pela ajuda e contribuição na Dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos oferecida, através de seu programa de demanda social, sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fornecimento da verba para auxílio pesquisa para o projeto, sem a qual não teria sido possível seu desenvolvimento.

Dedico por fim, este trabalho a todos que buscam e amam o saber e a todos que não se acomodam. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, deixo meu agradecimento e o desejo de sucesso, independente do caminho que tenham escolhido.

ENFIM MEU MUITO OBRIGADO DE CORAÇÃO...

THE FUTURE BELONGS TO THOSE WHO BELIEVE IN THE BEAUTY OF THEIR DREAMS.

Anna Eleanor Roosevelt

RESUMO

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

O objetivo deste trabalho foi estudar a transferência de aflatoxinas da ração para peixes lambari (*Astyanax altiparanae*), avaliando a influência dos níveis de toxina na ração sobre o desempenho dos peixes. As aflatoxinas foram incorporadas à ração extrusada para peixes tropicais, previamente testada para a presença de aflatoxinas, e as concentrações foram confirmadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os tratamentos foram constituídos por: Controle - ração sem toxina; A. Ração + 10 µg AFB₁/kg; B. Ração + 20 µg AFB₁/kg e C. Ração + 50 µg AFB₁/kg. Os juvenis de lambari foram alocados em aquários com densidade de 1 peixe por litro. O experimento foi realizado por 120 dias, com três repetições. A cada 30 dias foram realizados levantamentos biométricos e avaliação do desempenho (taxa de crescimento, sobrevivência, ganho de peso). A determinação de aflatoxinas nas amostras foi realizada por CLAE em músculo e fígado. Mensalmente, dez peixes por aquário foram utilizados para compor uma amostra, totalizando 48 amostras de músculo e 48 amostras de fígado analisadas ao final do experimento. As aflatoxinas na dieta prejudicaram o desempenho dos lambaris, observando-se menor peso e tamanho dos peixes nos tratamentos com aflatoxinas em relação ao controle. Houve também menor consumo de ração pelos peixes do tratamento C no período final do experimento. De modo geral, observou-se que, principalmente a partir dos 90 dias de experimento, houve acúmulo de aflatoxinas no fígado e no músculo dos animais. A concentração de aflatoxina B₁ observada no músculo dos lambaris ao final do período de exposição foi semelhante aos níveis empregados na dieta. Os resultados mostraram que o lambari é uma espécie sensível, havendo efeito das aflatoxinas sobre o desempenho e acúmulo de aflatoxinas no músculo e fígado. Assim, quando da exposição diária e prolongada de lambaris às aflatoxinas, conclui-se que os limites atuais das legislações para aflatoxinas em ração animal não garantem segurança à produção e à saúde dos consumidores.

Palavras chave: AFB₁, Aquicultura, HPLC, Micotoxinas, Peixes.

ABSTRACT

MICHELIN, E. C. **Transfer of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) in fish farming.** 2016. 82 p. Dissertation (Masters' Degree) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The aim of this study was to evaluate the transfer of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*), assessing the influence of toxin levels on fish performance. Aflatoxins were incorporated into extruded feed for tropical fish, previously tested for aflatoxins, and the concentrations were confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The treatments were: Control - feed without toxin; A. Feed + 10 µg AFB₁/kg; B. Feed + 20 µg AFB₁/kg and C. Feed + 50 µg AFB₁/kg. Juveniles of lambari fish were placed in aquariums with density of 1 fish per liter. The experiment was conducted for 120 days, with three replications. Every 30 days biometric surveys were performed, including weight and standard length. Feed intake, feed conversion, growth rate and survival were also evaluated. Determination of aflatoxins was carried out by HPLC in muscle and liver. Monthly, a pool of 10 fish were used to make a sample, adding up to 48 samples of muscle and 48 samples of liver analyzed at the end of the experiment. Aflatoxins in the diet impaired the lambari performance, with lower weight and size of fish from aflatoxins treatments compared to control. There was also lower feed intake by fish from treatment C in the final period of the experiment. In general, it was observed that, mainly from 90 days of experiment, there was accumulation of aflatoxins in the liver of lambari fish and consequently in the muscle. Aflatoxin B₁ concentration observed in the muscle of lambari fish at the end of the exposure period was similar to the levels used in the diet. Results showed that lambari fish is sensitive specie, with effects of aflatoxins on performance and accumulation of aflatoxins in muscle and liver. Therefore, when daily and prolonged exposure of lambaris to aflatoxins, it is concluded that the current regulation limits for aflatoxins in animal feed do not guarantee safety production and consumer health.

Keywords: AFB₁, Aquaculture, HPLC, Mycotoxins, Fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Lambari-do-rabo-amarelo (<i>Astyanax altiparanae</i>).	22
Figura 2 - Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	27
Figura 3 - Metabolismo da aflatoxina B ₁ no fígado.	28
Figura 4 - Placa com inóculo de cepa padrão de <i>Aspergillus parasiticus</i>	40
Figura 5 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de secagem.	40
Figura 6 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de secagem.	40
Figura 7 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de moagem.	40
Figura 8 - Representação esquemática do experimento: distribuição dos aquários para os tratamentos, repetições e amostragem.	44
Figura 09 - Instrumentos utilizados para avaliar tamanho e peso dos peixes.	45
Figura 10 - Curvas de Calibração para Ração. Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão de (a) AFB ₁ (coeficiente de correlação $r = 0,996$), (b) AFB ₂ (coeficiente de correlação $r = 0,997$), (c) AFG ₁ (coeficiente de correlação $r = 0,995$), (d) AFG ₂ (coeficiente de correlação $r = 0,994$).	50
Figura 11 - Curvas de Calibração para o Fígado. Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão de (a) AFB ₁ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (b) AFB ₂ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (c) AFG ₁ (coeficiente de correlação $r = 0,998$), (d) AFG ₂ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (e) AFM ₁ (coeficiente de correlação $r = 0,999$).	51
Figura 12 - Cromatograma obtido para o padrão de aflatoxinas contendo 20 µg/L.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Captura de peixes da pesca extrativa continental nos anos de 2009 a 2011.	21
Tabela 2 - Produção de lambaris no período de 01/01/2013 a 31/12/2013, participações no total da produção e os 20 municípios com as maiores produções no Brasil.	24
Tabela 3 - Classificação das principais micotoxinas pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC).	29
Tabela 4 - Composição da ração	42
Tabela 5 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de ração para peixes.	53
Tabela 6 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de fígado de peixe.	54
Tabela 7 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de lambari.	55
Tabela 8 - Níveis médios de afltoxinas obtidas nas dietas experimentais utilizadas.	56
Tabela 9 - Parâmetros limnológicos da água aferidos no experimento.	56
Tabela 10 - Comprimento do lambari durante o período experimental.	57
Tabela 11 - Peso do lambari durante o período experimental.	58
Tabela 12 - Consumo mensal* de ração do lambari durante o período experimental.	58
Tabela 13 - Níveis de aflatoxina B ₁ no fígado do lambari durante o período experimental.	61
Tabela 14 - Níveis de aflatoxina B ₂ no fígado do lambari durante o período experimental.	62
Tabela 15 - Níveis de aflatoxina G ₁ no fígado do lambari durante o período experimental.	62
Tabela 16 - Níveis de aflatoxina G ₂ no fígado do lambari durante o período experimental.	63

Tabela 17 - Níveis de aflatoxina M ₁ no fígado do lambari durante o período experimental.....	64
Tabela 18 - Níveis de aflatoxina B ₁ no músculo do lambari durante o período experimental.....	65
Tabela 19 - Níveis de aflatoxina B ₂ no músculo do lambari durante o período experimental.....	66
Tabela 20 - Níveis de aflatoxina G ₁ no músculo do lambari durante o período experimental.....	67
Tabela 21 - Níveis de aflatoxina G ₂ no músculo do lambari durante o período experimental.....	67
Tabela 22 - Níveis de aflatoxina M ₁ no músculo do lambari durante o período experimental.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Porcentagem

°C: Grau Celsius

µg: Migrograma

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

AFB₁: Aflatoxina B₁

AFB₂: Aflatoxina B₂

AFG₁: Aflatoxina G₁

AFG₂: Aflatoxina G₂

AFLs: Aflatoxinas

AFM₁: Aflatoxina M₁

AFB: Aflatoxina P₁

AFH: Aflatoxicol H1

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CIA: Coluna de Imunoafinidade

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CAST: Conselho de Ciência e Tecnologia Agrícola

DON: Desoxinivalenol

EST: Esterigmatocistina

EUA: Estados Unidos da América

FAO – FIGIS: *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries Global Information System*

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FB₁: Fumonisina B₁

FBs: Fumonisinias

FUMO: Fumonisina

g: Grama

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia,

kg: Quilograma

M: Molar

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg: Miligrama

min: Minuto

MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura

nm: Nanômetro

ONU: Organização das Nações Unidas

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPA: O-oftaldialdeído

OTA: Ocratoxina A

PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

ppb: Partes por Bilhão

rpm: Rotação por Minuto

ZEA: Zearalenona

ZON: Zearalenona

α: Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A Piscicultura no Brasil	20
2.2 A espécie Lambari (<i>Astyanax altiparanae</i>)	22
2.3 Micotoxinas	25
2.4 Aflatoxinas	26
2.5 Contaminação da Ração Utilizada em Piscicultura.....	31
2.6 Efeitos das Aflatoxinas no Desempenho dos Peixes	34
2.7 Resíduos de Aflatoxinas em Peixes.....	36
2.8 Legislação para Micotoxinas no Brasil e outros Países	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
3.3 Hipótese.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Produção de Aflatoxinas em Material de Cultura	39
4.2 Dietas Experimentais	41
4.3 Alojamento e Manejo dos Peixes.....	41
4.4 Avaliação dos Índices de Produtividade e Desempenho dos Peixes.....	45
4.5 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Ração	46
4.6 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Fígado	47
4.7 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Músculo	48
4.8 Análise dos Resultados	48
4.9 Comitê de Ética	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Avaliação do Desempenho do Método Analítico	49
5.1.1 Curvas de Calibração para Análise de Aflatoxinas em Ração	49
5.1.2 Curvas de calibração para análise de aflatoxinas em fígado de peixe ..	50
5.2 Dietas Experimentais	56
5.3 Parâmetros Limnológicos da Água	56
5.4 Avaliação dos Índices de Produtividade e Desempenho dos Peixes.....	57
5.5 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Fígado	61
5.6 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Músculo	65
6 CONCLUSÕES	69
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
8 REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande potencial para a piscicultura por suas condições climáticas e abundância de água que favorecem a implantação de cultivos de peixes tropicais, uma das atividades econômicas de grande importância no país. O pescado consumido no Brasil é, em sua maioria, oriundo da pesca extrativista, na qual se tem registrado incremento anual na produção de 2 a 5% (PAVANELLI et al., 2002). Em 2010, a aquicultura nacional, continental e marinha, fechou em alta em relação a 2009, com acréscimo de 16,9% e 9,0%, respectivamente, demonstrando o potencial brasileiro para a produção de peixes em criatórios (BRASIL, 2011).

O pescado é um alimento saudável, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2013, o consumo médio por habitante/ano no Brasil foi de 14,5 kg, atendendo FAO (*Food and Agriculture Organization*), que é de 12 kg/habitante/ano. No entanto, o consumo continua a crescer mundialmente (BRASIL, 2014).

Dentre as espécies criadas, o lambari-de-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), espécie nativa do Brasil, apresenta interessantes atributos de desempenho zootécnico e nichos de mercado específicos a serem explorados. O gênero *Astyanax* vem despertando interesse por parte dos produtores, devido a sua rusticidade, rápido crescimento e carne saborosa (EIGENMANN, 1921).

Os peixes da piscicultura intensiva dependem exclusivamente da alimentação exógena, exigindo uma melhor qualidade dos alimentos fornecidos a esses animais. Isso depende do controle sanitário dos insumos utilizados na sua fabricação, devido à suscetibilidade à contaminação por fungos, inclusive os toxigênicos (GRAÇA e PAVANELLI, 2002). De fato, o crescimento dessa atividade tem gerado preocupações por parte dos pesquisadores, com relação à qualidade dos produtos utilizados na alimentação dos peixes, pois estes alimentos têm os substratos ideais para o desenvolvimento de fungos e em condições ótimas podem favorecer a produção de micotoxinas, que podem se acumular nos tecidos animais (CARDOSO FILHO, 2013).

Na legislação brasileira, o nível máximo de aflatoxinas permitido para a matéria prima ou ingredientes para rações destinadas ao consumo animal é de 50 µg/kg, sem especificar a espécie animal (BRASIL, 2014). Não há, na legislação, níveis máximos para micotoxinas em produtos de origem animal, com exceção dos limites para aflatoxina M₁ (AFM₁) em leites fluido e em pó e queijos.

Sabe-se que há diferenças de sensibilidade entre as espécies de peixe e que em algumas espécies há ocorrência de micotoxinas no tecido muscular, sendo que estes resíduos são cumulativos. O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

(PNCRC) prevê análises de aflatoxinas apenas em fígado suíno e leite, contemplando em pescado de cultivo somente substâncias cloradas, contaminantes inorgânicos, antimicrobianos, corantes, dioxinas, furanos e substâncias de ação anabolizante (BRASIL, 2013).

Há uma carência de estudos sobre os efeitos das aflatoxinas na criação de peixes, tornando-se necessária a avaliação em espécies utilizadas na piscicultura nacional. Considerando que não há dados referentes às diferenças de sensibilidade às micotoxinas e acúmulo nos tecidos em várias espécies de importância comercial, o presente projeto teve como objetivo avaliar a transferência de aflatoxinas da ração para o lambari (*Astyanax altiparanae*), avaliando também a influência dos níveis de toxina na ração sobre o desempenho desta espécie. Estes dados oferecerão subsídio para a discussão e embasamento de possíveis níveis de tolerância na legislação. Ressalta-se, portanto, a importância do presente projeto, com implicações para a produção, saúde animal e saúde pública.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Piscicultura no Brasil

O Brasil é rico em recursos pesqueiros, com diversas espécies nativas e grande potencial para aquicultura. Segundo a FAO (2014) - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, a aquicultura é um dos ramos mais promissores, fornecendo proteína animal de qualidade. A aquicultura apresentou um aumento na produção total em 2012 de 66,63 milhões de toneladas, enquanto que em 2011 a produção total foi 63,6 milhões de toneladas. As espécies nativas mais encontradas nas bacias hidrográficas brasileiras são peixes do gênero *Astyanax*, pertencente à família *Characidae* (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

O Brasil apresenta grande potencial para a piscicultura marinha, devido aos seus 8,5 mil km de litoral, e continental, por possuir 5,5 milhões de hectares de reservatórios de águas doces e rios, representando, aproximadamente, 8% da água disponível no planeta (NUNES, 2009). Além disso, também é visto no contexto internacional como um dos países com grande potencial para a piscicultura por suas condições climáticas que favorecem a implantação de cultivos de peixes tropicais (PAVANELLI et al., 2002). Atualmente, a aquicultura é o setor de produção com crescimento mais rápido do mundo e o Brasil alcançou a terceira posição na produção da aquicultura dentre os países da América, sendo que aquicultura continental é de 80% e marinha de 20% consumido no Brasil. (FAO, 2011; MPA, 2011).

De acordo com os últimos relatórios da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, o Brasil ocupa o 12º lugar com uns dos maiores produtor mundial em aquicultura. A produção mundial de pescado em 2012 foi de 158 milhões de toneladas, dos quais 136,2 milhões de toneladas foram utilizados para consumo humano (FAO, 2012). Os peixes foram os organismos aquáticos mais cultivados, com uma produção de 44,1 milhões de toneladas. Segundo os dados oficiais do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção brasileira de pescado em 2013 foi de 1.241.807 toneladas, sendo a região Nordeste a maior produtora em 2013, com 140.748 toneladas de pescado (BRASIL, 2015).

Em relação ao consumo, na última década tem-se notado um aumento no consumo nacional de pescado, registrando-se o consumo médio per capita próximo a 14,5 kg habitante/ano em 2013, atendendo ao recomendado pela FAO que é de 12 kg (2013). O Brasil produz, aproximadamente, dois milhões de toneladas de pescado, sendo 40% cultivados. A atividade gera um produto interno bruto (PIB) pesqueiro de R\$ 5 bilhões de reais, mobiliza 800 mil profissionais, entre pescadores e aquicultores, e proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura

(MPA), o Brasil pode se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado devido ao seu enorme potencial (BRASIL, 2014).

Neste contexto, o crescimento da aquicultura transformando esta atividade em um segmento importante do agronegócio mundial (ALVARADO, 2003). Assim, a proteína do pescado tem seu mérito reconhecido como a mais sustentável das proteínas de origem animal, pois durante o processo de produção libera menos nitrogênio e fósforo para o ambiente, além de proporcionar uma melhor conversão alimentar da proteína ingerida (HALL et al., 2011). Há vários desafios enfrentados pelos agricultores, dentre eles, o aumento na taxa de crescimento com diminuição dos surtos de doenças. No entanto, houve mudanças das práticas de aquicultura: os sistemas extensivos mudaram para sistemas semi-intensivo e intensivo, e neste último houve maior disseminação de doenças (CHEN et al., 2014).

De acordo com o MPA, o consumo e a produção de peixes vêm se mantendo como um hábito alimentar da população brasileira (BRASIL, 2014). A produção de peixes de pesca extrativa continental está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Captura de peixes da pesca extrativa continental nos anos de 2009 a 2011.

Espécies	Produção por ano (toneladas)		
	2009	2010	2011
Jundiá	338,8	352,1	354,7
Jurupoca	12,0	12,5	12,6
Lambari	1.056,4	1.097,9	1.068,3
Linguado	3,1	3,2	3,2
Mandubé	2.158,6	1.908,3	2.071,8
Mapará	9.211,0	9.573,2	9.622,9
Matrinxã	4.901,5	5.027,7	5.094,7
Mistura	385,0	400,1	403,1
Muçum	33,1	34,4	34,7
Pacamão	548,9	570,5	574,7
Pacu	10.624,2	11.042,0	11.123,9
TOTAL	233.972,9	243.174,7	243.820,7

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura** (2011).

Para aproximadamente 1 bilhão de pessoas no mundo (17% da população mundial), a principal fonte de proteína animal é originária do pescado. Essas proteínas são essenciais na dieta alimentar de populações de alguns países, no qual a ingestão total de proteínas

tende a ser baixa. A aquicultura está entre as formas mais eficazes e sustentáveis que podem garantir proteína animal suficiente para a população mundial, em constante crescimento (SORVIG, 2007).

Nas áreas rurais do Brasil, o consumo de pescado de água doce foi mais expressivo que o consumo de pescado de água salgada, representando 6,47 kg/habitante e 2,10 kg/habitante, respectivamente. Entre as espécies de peixes discriminadas observa-se que nas áreas rurais as espécies mais apreciadas, com maior consumo anual per capita foram o Acará fresco (*Geophagus* sp.) com consumo de 0,47 kg/habitante, o Lambari fresco (*Astyanax* sp.) com 0,46 kg/habitante e o Tucunaré (*Cichla* spp.) com 0,45 kg/habitante (IBGE, 2003).

2.2 A espécie Lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*)

Dentre as várias espécies de peixes, muitas são conhecidas popularmente como lambaris (Figura 1). Estes peixes povoam pequenos riachos, lagos e os grandes rios formadores das bacias hidrográficas de toda a região neotropical. Os lambaris (*Astyanax altiparanae*) são espécies nativas com potencial zootécnico e apresentam características desejáveis para o cultivo, tais como: rusticidade, fácil aceitação de dietas artificiais, alta prolificidade, curto ciclo de produção e rápida adaptação a sistemas intensivos de cultivo (METZENER et al., 2004).

Figura 1 - Lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*).

Fonte: Própria autoria.

O lambari é uma espécie de pequeno porte, que atinge de 10 a 15 cm de comprimento, podendo chegar a 60 gramas de peso. Possui hábito alimentar onívoro e seu crescimento é rápido, atingindo a maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade em condições de cultivo, normalmente com 7 a 9 cm de comprimento para os machos e 12 a 15 cm de comprimento para as fêmeas (PORTO-FORESTI et al., 2001).

Os peixes do gênero *Astyanax* spp. são conhecidos como lambari, tabuão, tambiú, piaba, piabinha, matupiris, mojarra, entre outros. Dentre as mais de 100 espécies expostas, o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), espécie escolhida para este estudo, apresenta grande destaque (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

O lambari-do-rabo-amarelo (GARUTTI, 1995) é uma espécie nativa, de pequeno porte, que aceita alimentação artificial com bastante facilidade e apresenta bom potencial para a aquicultura. É muito apreciado como petisco, além de ser muito requisitado como isca viva para a pesca esportiva de peixes carnívoros. Alguns aspectos de sua reprodução já são conhecidos e, na literatura, há alguns estudos envolvendo nutrição e manejo (SOARES et al., 1999).

É um peixe oportunista, ou seja, adapta-se facilmente ao ambiente e aceita uma variedade vasta de alimentos, desova mais de uma vez por ano e sua reprodução pode ser induzida, resultando em alta fecundidade e elevada taxa de crescimento (FÁVARO, 2002). Com um rendimento de carcaça entre 70 e 85%, os lambaris além de serem importantes na cadeia alimentar dos rios brasileiros, se destacam por essa característica vantajosa para criação comercial (TAVARES, 2011; PONTES, 2013; FERREIRA et al., 2014).

O lambari, no sistema de criação em cultivo, demonstra viabilidade econômica, principalmente quando considerada a sua comercialização. Os custos de produção, retorno do investimento e indicadores de rentabilidade podem ser ainda mais atrativos para a comercialização de lambaris com a adoção de preços de vendas mais elevados, como é usual no mercado de iscas vivas e fábricas de rações (BRASIL, 2011).

Existe, ainda, outro mercado que poderá dar espaço ao cultivo do lambari, que é a indústria da farinha de peixe, nas quais há exigências de produção de um alimento de boa qualidade no mercado mundial. De acordo com a FAO (2004), a aquicultura consome 35% da farinha de peixe obtida no mundo todo. Em 2006, foram produzidas seis milhões de toneladas de farinha de peixe e um milhão de tonelada de óleo de peixe (SORVIG, 2007).

Segundo a FAO-FIGIS (2014) *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries Global Information System*, no Brasil no ano de 2012 foram produzidas 439 toneladas de lambaris. Em 2013, apenas no estado de São Paulo, foram produzidas mais de 50 milhões de unidades de lambaris, com previsão de aumento para 600 milhões. Desta forma, o cultivo de lambaris em cativeiro é uma alternativa à piscicultura brasileira. Na Tabela 2 estão apresentadas a produção de lambaris nos Estados brasileiros.

Tabela 2 - Produção de lambaris no período de 01/01/2013 a 31/12/2013, participações no total da produção e os 20 municípios com as maiores produções no Brasil.

Unidades da Federação	Quantidade de lambaris (toneladas)	Participação no total da produção	
		Relativa (%)	Acumulada (%)
Brasil	256	100	
São Paulo	74	29	29
Rio Grande do Sul	61	24	52,9
Minas Gerais	41	16,1	69
Goiás	34	13,4	82,4
Paraná	19	7,4	89,7
Mato Grosso	10	4	93,7
Santa Catarina	8	3,2	96,9
Tocantins	4	1,4	98,3
Espírito Santo	2	0,7	98,9
Rio de Janeiro	1	0,5	99,4
Rondônia	1	0,3	99,7
Acre	1	0,2	99,9
Pará	0	0,1	100
Municípios com as maiores produções			
Araguari - MG	31	11,9	11,9
Teodoro Sampaio - SP	24	9,4	21,3
Caçu - GO	18	6,9	28,2
Cosmorama - SP	11	4,3	32,5
Itapeva - SP	10	3,9	36,4
Santa Isabel do Ivaí - PR	10	3,9	40,3
Nossa Senhora do Livramento - MT	10	3,9	44,3
Ribeirão Branco - SP	8	3,1	47,4
Erebango - RS	7	2,7	50,1
Marabá Paulista - SP	7	2,6	52,7
Rio Preto - MG	6	2,3	55,1
Mirante do Paranapanema - SP	5	2	57
Lages - SC	5	2	59
Terezópolis de Goiás - GO	5	2	60,9
São Jorge - RS	4	1,6	62,5
Goianésia - GO	4	1,6	64,1
Almas - TO	4	1,4	65,5
Euclides da Cunha Paulista - SP	3	1,2	66,6
Barão de Cotegipe - RS	3	1,2	67,8
Monte Belo do Sul - RS	3	1,2	69

Fonte: IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Pesquisa da Pecuária Municipal** 2013.

2.3 Micotoxinas

As micotoxinas são um grupo de compostos de baixo peso molecular, produzidos pelo metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos, em condições de temperatura e umidade adequadas (DINIS et al., 2007). Podem se desenvolver em vários alimentos e rações, causando sérios riscos à saúde humana e animal. A presença de micotoxinas em alimentos constitui um problema de saúde pública em nível mundial (ROCHA et al., 2008; OLCER et al., 2014, YUE et al., 2014).

Segundo Mallmann et al. (1994), atualmente há mais de 400 micotoxinas identificadas. Vários fungos são produtores de micotoxinas, principalmente espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As micotoxinas mais importantes em alimentos são as aflatoxinas (AF), produzidas por espécies de *Aspergillus*; a ocratoxina A, produzida por *Aspergillus* e *Penicillium*; os tricotecenos (tipo A: HT-2 e toxina T-2, e do tipo B: deoxinivalenol), a zearalenona e as fumonisinas B₁ e B₂, produzidas por *Fusarium*; e toxinas produzidas pelo gênero *Alternaria* (BOTTALICO e LOGRIECO, 1998; BARKAI-GOLAN, 2008).

Para a produção de micotoxinas pelos fungos, fatores relacionados à fisiologia e à bioquímica dos fungos toxigênicos e à interação com o ambiente (umidade, composição química do substrato, temperatura, pH, interação microbiana e outros) estão envolvidos. O conhecimento destes fatores pode contribuir para o manejo da prevenção de micotoxinas nos alimentos (IAMANAKA, 2013).

As micotoxinas podem apresentar manifestações toxicológicas, efeitos imunológicos, teratogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos em algumas espécies animais e podem ser associados à doenças crônicas e agudas nos animais domésticos (peixes, suínos e aves) (LINDNER, 1995; LOPES et al., 2005). As micotoxicoses são doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas, que podem causar danos no crescimento, prejudicar o metabolismo do organismo, ocasionar lesões no fígado, rins, tecido epitelial e sistema nervoso central bem como causar desenvolvimento de tumores nos animais. Os sintomas dependem do tipo de micotoxina, duração da exposição, idade, saúde e sexo da pessoa exposta, além de efeitos envolvendo genética, estado alimentar e interações com outras toxinas (FITZPATRICK, 1990; SCUSSEL, 1998; BENNETT e KLICH, 2003).

2.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram descobertas na Inglaterra, em 1960, devido ao surto que provocou alta mortalidade em perus, conhecido como “*turkey - X disease*”. Neste surto, as aves consumiram ração adicionada de torta de amendoim proveniente do Brasil e contaminada com o fungo *Aspergillus flavus* (WOGAN, 1992), que produziu um composto identificado como aflatoxina. Após este incidente, os efeitos das micotoxinas para a saúde humana e animal despertaram a atenção da comunidade científica (SOARES et al., 2013).

As aflatoxinas são compostos de natureza cristalina, termoestáveis e não são afetadas pelo frio. São solúveis em solventes polares como clorofórmio e metanol e insolúveis em gorduras e óleos. São instáveis quando expostas à luz, particularmente à radiação ultravioleta, e são destruídas na presença de amônia, hipoclorito ou soluções fortemente alcalinas (OPAS, 1983).

As denominações das aflatoxinas B (*blue*) e G (*green*) são devido às fluorescências azul e verde que emitem quando expostas à luz ultravioleta (UV) de ondas longas. Assim, as micotoxinas fluorescem nas seguintes colorações: azul para B₁ e B₂, verde para G₁ e verde azulada para G₂ (SMITH e ROSS, 1991; JAY, 2005).

As aflatoxinas são produzidas principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (SANTACROCE et al., 2008; SILVEIRA, 2009). No grupo desta toxina, são conhecidos aproximadamente 18 compostos, porém somente as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 2) são frequentemente avaliadas em alimentos (COULOMBE, 1991; PAPP 2002; JINAP, 2012). Deve-se destacar que a AFB₁ é o composto tóxico mais importante e considerado o de maior risco para a saúde animal, enquanto que a toxicidade aguda das aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ perfaz cerca de 50, 20 e 10% da AFB₁, respectivamente (ALINEZHAD et al., 2011).

Figura 2 - Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

Fonte: RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE Jr., R. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolismo and prevention. **Research in Veterinary Science**, London, v. 89, p. 325-331, 2010.

Os efeitos tóxicos e carcinogênicos das aflatoxinas estão intimamente ligados na sua biotransformação nos correspondentes 8,9-epóxidos. A enzima envolvida na biotransformação de aflatoxina B₁ em animais, pássaros e peixes é o citocromo P450 do fígado (SINNHUBER et al., 1970; CANTON et. al., 1975). Uma alternativa à biotransformação de aflatoxina B₁ para aflatoxicol é mediada por uma redutase, e o produto pode ser reconvertido em aflatoxina B₁ por uma desidrogenase. O aflatoxicol pode desempenhar um papel de reservatório de aflatoxina B₁ em alguns organismos (DE LONGH et. al., 1964).

Figura 3 - Metabolismo da aflatoxina B₁ no fígado.

Fonte: Adaptado MALLMANN, A. G.; SANTURIO, J. M.; WENTZ, I. Aflatoxinas - aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, p. 635-643, 1994.

Após ser ingerida pelo animal, a AFB₁ passa pelo processo de biotransformação primária no fígado. Neste processo ocorre a hidroxilação da molécula, resultando na formação de metabólitos tóxicos, como a AFM₁ (Figura 3). Esta toxina é transportada pelo sangue, podendo se ligar às células ou às proteínas plasmáticas, podendo estar presentes no leite, ovos, urina, fezes, músculos e outros tecidos. Este composto pode ser detectado entre 12 e 24 horas após a primeira ingestão de aflatoxina B₁ (LÓPEZ et al., 2001). Entretanto, estes compostos, por conterem o grupo hidroxila, são bastante solúveis em água, o que possibilita sua rápida excreção através da urina, bile, fezes e leite, constituindo um processo de detoxicação da AFB₁ (HUSSEIN e BRASEL, 2001; CREPPY, 2002).

A capacidade do animal de biotransformar a AFB₁ em compostos menos reativos interfere na suscetibilidade às aflatoxinas. Espécies com capacidade de formar maiores quantidades de aflatoxicol tendem a ser mais sensíveis à intoxicação aguda, uma vez que esse composto pode ser facilmente revertido em AFB₁ (SPINOSA et al., 2008). Purchase (1963) e Sinnhuber et al. (1970) relataram carcinogenicidade semelhante para aflatoxinas em fígado de truta. A AFM₁ em ratos é tão tóxica como AFB₁ (PONG e NOGAN, 1971).

Lafont et al. (1989) também observaram que AFM₁ tem alta atividade genotóxica. As aflatoxinas são consideradas as micotoxinas causadoras dos danos mais severos à saúde dos seres humanos e animais, devido à alta toxidez e alta ocorrência em alimentos, apresentando propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras (LAZO, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a redução do consumo a um mínimo, de modo a reduzir riscos potenciais de AFM₁, uma vez que considera que não existe informação suficiente para estabelecer um nível de exposição razoável. As aflatoxinas são consideradas potentes agentes cancerígenos em vários animais, como ratos, camundongos, *hamsters*, patos, macacos e peixes, afetando vários órgãos, mas tendo como alvo principal o fígado (IARC, 2002).

As aflatoxinas são compostos genotóxicos e estudos toxicológicos levaram a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) a considerar que havia provas suficientes da carcinogenicidade em humanos pelas principais aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) para classificá-las como pertencentes ao Grupo 1 (Tabela 3). Entretanto, não há provas suficientes em animais experimentais referentes a carcinogenicidade de AFM₁ (potencial cancerígeno estimado em cerca de 10 vezes menor que AFB₁), sendo então classificado como possivelmente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 2B) (IARC, 1993; 2002).

Tabela 3 - Classificação das principais micotoxinas pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC).

Grupo	Definição	Micotoxinas
1	A micotoxina é cancerígena para os seres humanos	AFs
2 ^a	A micotoxina é provavelmente cancerígena para os seres humanos	AFM ₁
2 ^B	A micotoxina é possivelmente cancerígena para os seres humanos	FBS, OTA e AFM ₁
3	As micotoxinas não são classificáveis quanto à carcinogenicidade para seres humanos	DON, NIV, PAT, T-2 / HT-2, ZEN, citrinina, fusarenona-X
4	A micotoxina é provavelmente não carcinogênico para humanos	-

Fonte: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.** (1993, 2002 e 2010).

AFs: Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂; AFM₁: Aflatoxina M₁; FBS: Fumonisin B; OTA: Ocratoxina A; DON: Deoxinivalenol; NIV: Nivalenol; PAT: Patulina; T-2/Ht-2: Toxinas T-2 e HT-2; ZEN: Zearalenona.

A toxicidade das aflatoxinas distingue-se entre aguda e crônica. A intoxicação aguda acontece com a ingestão do alimento que está contaminado com altas concentrações de aflatoxinas. Isso ocorre ocasionalmente em países em desenvolvimento, como o grave surto de aflatoxicose aguda humana no Quênia em 2004, em que ocorreram 317 casos e 125 óbitos (39,4% de mortalidade). Neste caso, o milho destinado ao consumo humano foi contaminado com níveis de aflatoxinas que variaram de 20 a 8.000 µg/kg (LEWIS et al., 2005; PROBST et al., 2007).

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

A intoxicação crônica é a forma mais comum da toxicidade das aflatoxinas e ocorre pelo consumo de pequenas quantidades destes compostos tóxicos durante um longo período de tempo. Estes efeitos tóxicos nos humanos são dependentes de fatores como idade, espécie, gênero, estado nutricional, dose e tempo de exposição (MARIN et al., 2013). Os principais efeitos crônicos registrados no ser humano são o desenvolvimento de câncer, lesão renal, depressão do sistema imune, propriedades alergênicas, teratogênicas e mutagênicas (PAPP, 2002; ALINEZHAD et al., 2011; JINAP et al., 2012; CARDOSO FILHO, 2013).

Segundo Wu e Santella (2012), várias doenças estão associadas ao consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas nos seres humanos. Aflatoxinas exercem efeitos reprodutivos adversos em humanos do sexo masculino, como desenvolvimento testicular retardado, degeneração testicular, diminuição do potencial reprodutivo, alterações morfológicas, redução do tamanho e peso dos testículos, diminuição do índice de meiose, declínio no percentual de espermatozoides vivos, esperma com aumento de anormalidades, degeneração do epitélio seminífero, e a concentração plasmática reduzida de testosterona (CAST, 2003).

Efeitos sobre o sistema imunológico são decorrentes do fato de que aflatoxinas atuam como imunomoduladores, causando uma diminuição na resistência às infecções secundárias por fungos, bactérias e parasitas. A resposta celular é particularmente sensível as aflatoxinas, como evidenciado pela diminuição da atividade T ou linfócitos B, diminuição da imunidade para a vacinação, e comprometimento da função imune em desenvolvimento (JIANG et al., 2008). Outras doenças incluem encefalopatia com degeneração gordurosa

das vísceras, assemelhando-se a síndrome de Reye (DVORÁCKOVÁ et al., 1977), e fibrose intersticial pulmonar, sendo que um possível risco de exposição ocupacional através do trato respiratório é sugerido (DVORÁCKOVÁ e PÍCHOVÁ, 1986).

Nos animais de produção a toxicidade das micotoxinas pode ser influenciada por alguns fatores, como espécie e raça; nível e duração da contaminação; nutrição e saúde; idade e sexo; infecções bacterianas, virais ou parasitárias; condições inadequadas do ambiente (temperatura, umidade e ventilação); presença de várias micotoxinas e sinergismos entre elas; e tipos e variedades de matérias primas (GIMENO, 2000). Os sintomas não são muito específicos, o que pode complicar o diagnóstico. Porém, usualmente os sintomas incluem diminuição nos parâmetros de produção, como redução do ganho de peso, conversão alimentar inferior, diminuição na produção de ovos ou leite e aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas. Dentre os animais, as aves e os peixes são os mais sensíveis e os ruminantes os mais resistentes, à ação de aflatoxinas (MARIN et al., 2013).

2.5 Contaminação da Ração Utilizada em Piscicultura

A ração animal é uma porção de alimento que é fornecida aos animais, composta de diversos ingredientes e formulada de acordo com as necessidades nutricionais de cada indivíduo, considerando fatores como a idade e a espécie. A ração representa um dos principais custos operacionais na produção animal (CARDOSO FILHO et al., 2013), sendo que aproximadamente 60% dos custos operacionais na aquicultura são devido à alimentação de peixes (FAO, 2014).

Nos últimos anos, tem-se notado uma evolução na piscicultura brasileira, evidenciada pelos aspectos nutricionais e de manejo e alimentar nas diferentes fases de criação dos peixes. Uma das formas de evitar prejuízos nessa produção é o aprimoramento na formulação e elaboração de dietas para peixes, as quais devem ser equilibradas, detectando-se assim os fatores que afetam negativamente a qualidade da ração animal (CONROY, 2000).

A principal via de exposição dos animais às micotoxinas é a ingestão de alimentos contaminados (TRISTAN, 2002). Os alimentos destinados aos humanos e animais podem ser contaminados de forma direta ou indireta. Na contaminação direta os produtos são contaminados pelo fungo toxigênico com subsequente produção de micotoxinas. Já na contaminação indireta, ocorre a contaminação de qualquer ingrediente usado nos alimentos e rações pelo fungo toxigênico e, embora o fungo tenha sido eliminado pelo processamento do produto, as micotoxinas permanecem no produto final (FRISVAD E SAMSON, 1991). De fato, as micotoxinas apresentam estabilidade química, o que permite sua permanência nos

alimentos mesmo após a remoção dos fungos por processos de industrialização e embalagem (TRISTAN, 2002).

Estudos relataram a contaminação fúngica de rações para pescado colocar sobre contaminação fúngica e ração de pescado, contaminação das rações comerciais por fungos tem causado perdas econômicas associadas à redução do seu valor nutricional (Silva et al., 2008), redução da palatabilidade e presença de micotoxinas (Scussel, 2002).

A utilização de matéria - prima contaminada, transporte inadequado e partículas aderidas às máquinas são alguns dos fatores que podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos (GIMENO, 2000; DANTIGNY et al., 2005). Os alimentos podem ser comumente afetados por micotoxinas e estas podem aparecer no campo antes e após a colheita ou durante o processamento ou armazenamento, o que afeta diretamente a qualidade final do alimento (SFORZA, DALL'ASTA, e MARCHELLI, 2006). Uma das formas de desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas é o armazenamento das rações em temperaturas elevadas ($> 27^{\circ}\text{C}$), umidade ambiente maior que 62% e conteúdo intrínseco de umidade superior a 14% (YANONG, 2003; FEDDERN et al., 2013).

Cereais e produtos derivados de cereais constituem uma parte importante da dieta diária das populações humanas e animais. As últimas previsões da FAO para a produção mundial de cereais em 2015 são de 2.540 milhões de toneladas (FAO, 2015). Nos cereais, geralmente há substratos altamente nutritivos para o desenvolvimento de fungos, possibilitando seu crescimento e proliferação (AMARAL et al., 2006). A forma de penetração do fungo no cereal pode ser facilitada por lesões provocadas por insetos e problemas na cutícula dos grãos na colheita (ROSSETTO et al., 2003; AMARAL et al., 2006). O excesso de umidade, temperaturas extremas, danos causados por insetos, sistemas de cultivo e práticas agrônômicas podem causar estresse e predispor as plantas no campo para determinar a gravidade da contaminação pelas micotoxinas (TELLER et al., 2012). As perdas na agricultura devido à contaminação por micotoxinas situam-se ao redor de 25% dos grãos produzidos (GIMENO, 2000).

Os cereais que constituem as rações dos peixes representam a maior fonte de transmissão de fungos e micotoxinas para estes animais e, conseqüentemente, para os humanos (GUILLAMONT et al., 2005). Dentre as matérias-primas suscetíveis à contaminação por aflatoxinas e que compõem a ração para pescados, podem-se citar farinha de osso, farelo de semente de algodão, grãos, milho, farinha de milho, farelo de milho, farelo de amendoim, farelo de girassol, sorgo, trigo, óleo de milho, óleo de amendoim, produtos lácteos, farelo de arroz, soja, camarão, peixe seco e farinhas de peixes (ABDELHAMID, 2008; SANTACROCE et al., 2008; HUANG et al., 2011).

Cerca de 60% dos custos operacionais na aquicultura são devido à alimentação de peixes (FAO, 2014). Como forma de redução de custos, houve uma redução nos níveis de

farinha de peixe e de ingredientes vegetais nos alimentos dos peixes. Com isso, há grande exposição dos animais a uma alimentação que possa conter níveis significativos de micotoxinas, podendo levar a perdas econômicas expressivas (CAST; 2003; LEUNG et al., 2006; RANA et al., 2009; TACON et al., 2009).

. Almeida et al. (2011) observaram a presença de fungos em 35 amostras (40,2%) de ração para peixe em Portugal, com níveis variando de 1 a 3,3 log unidades formadoras de colônias (UFC) /g. Seis gêneros foram encontrados, sendo que *Aspergillus flavus* foi o mais frequentemente encontrado nas amostras positivas. No Brasil, especificamente na região amazônica, foi observada contaminação de 85% das amostras de farinha de peixe avaliadas por *Aspergillus* spp. toxigênicos e 20% das amostras contaminadas com aflatoxinas totais, com média de 15,5 µg/kg e máximo de 20,8 µg/kg (KLUCZKOVSKI e KLUCZKOVSKI JUNIOR, 2013). Ainda na região Norte do Brasil, no Piauí, Santos (2006) reportou a contaminação por fungos em 136 (94,4%) amostras de ração para camarão, estocadas e em uso, com a ocorrência dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Mucor*, sendo o *Aspergillus* o mais frequentemente (86,11%) isolado. No mesmo Estado, Cardoso Filho (2013) encontrou contagens fúngicas entre 2,96 e 4,00 log UFC/g em rações utilizadas em piscicultura, tendo sido identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*.

Recentemente, Gonçalves-Nunes et al. (2015) verificaram a presença de aflatoxina B₁ no Piauí/ Brasil, nas quantidades de 5,8 µg/kg em farelo de soja, 1,1 µg/kg em farelo de milho, 7,4 µg/kg em outros cereais e 3,8 µg/kg em alimentos para peixes, com uma frequência de 40, 33,3, 60 e 16,7%, respectivamente. Embora nesse estudo a detecção de AFB₁ tenha sido em níveis abaixo dos limites recomendados (20 µg/kg), é importante ressaltar que a ingestão de alimentos com micotoxinas em baixas concentrações por longo período de tempo pode produzir efeitos deletérios crônicos na produção animal. Bautista et al. (1994) pesquisaram nas Filipinas criações de camarão comercial e relataram contaminações por AFB₁ na ração. No Egito, Abdelhamid et al. (1998) detectaram altos níveis de aflatoxinas (> 1000 ppb) em ração comercial utilizada para a produção de peixe. Os efeitos adversos em peixes de viveiro atribuídos a essas contaminações por micotoxinas naturais não são suficientemente bem elucidados.

A contaminação das rações por micotoxinas pode reduzir o desempenho e afetar o estado geral de saúde do animal, causando diminuição da produtividade, problemas reprodutivos, vulnerabilidade a infecções, aumento da morbidade e até mortalidade (MANDARINO, 1989; CARDOSO FILHO, 2013). O primeiro caso registrado de mortalidade em peixes causado por micotoxinas ocorreu no começo da década de 60, na Califórnia, em que peixes da espécie truta arco-íris consumiram ração com farelo de algodão contaminado por aflatoxinas (HALVER, 2001). Lopes et al. (2005) verificaram que há risco de os

ingredientes utilizados nas rações animais apresentarem níveis elevados de toxinas, e há carência de estudos sobre os efeitos das aflatoxinas nas diversas espécies de peixes, fazendo-se necessária uma avaliação em espécies de valor econômico utilizadas na piscicultura e destinadas à alimentação humana. A presença de micotoxinas na ração prejudica os animais, que ingerem rações contaminadas, e o homem, pela ingestão de produtos de origem animal com as micotoxinas (CARDOSO FILHO, 2013). Assim, os resíduos das aflatoxinas podem ser retidos nos tecidos, originando potenciais riscos para a saúde pública (SANTACROCE et al., 2008).

O impacto das micotoxinas na saúde e na economia, considerando a sazonalidade de contaminação para as diferentes toxinas, inclui perda de produção agrícola, eliminação de alimentos contaminados, produção de gado reduzida, aumento dos custos de cuidados de saúde humana e animal, perda de vidas humana e animal, custos analíticos e regulamentares, e investimento em pesquisa (WU, 2007). Os custos econômicos e impacto sobre o comércio internacional associado à contaminação por micotoxinas são difíceis de avaliar. Estimativas quantitativas dos prejuízos econômicos associados à contaminação por micotoxinas em *commodities* pode variar de centenas de milhões a bilhões de dólares por ano (BRYDEN, 2012; WU, 2015).

2.6 Efeitos das Aflatoxinas no Desempenho dos Peixes

Os efeitos tóxicos das micotoxinas variam de acordo com o tipo e quantidade de toxina e período de exposição. Dentre os efeitos que acometem a saúde dos animais estão danos renais, problemas gastrointestinais, reprodutivos, supressão do sistema imunológico e carcinogenicidade (SHANE, 1993; CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 1994; KENNEDY et al., 1998; HUSSEIN e BRASEL, 2001; SANTACROCE et al., 2008; ANATER et al., 2016).

As micotoxinas podem ser responsáveis pela indução de muitas doenças em peixes, tais como alterações celulares e de órgãos, efeitos funcionais e morfológicos e ocasionar a morte em casos graves (SAHOO e MUKHERJEE, 2001; CAGAUAN et al., 2004; DENG et al., 2010). Os peixes podem ter redução do crescimento e regressão do seu sistema imune devido ao acúmulo de micotoxinas em seus tecidos (VIEIRA et al., 2006).

As micotoxinas, principalmente as aflatoxinas, são as principais responsáveis pela maioria das mortes de animais intoxicados por alimentos contaminado naturalmente (BATH e VASANTHI, 1999). As aflatoxinas nos alimentos contaminados são responsáveis por causar danos às espécies cultivadas na piscicultura, provocando desequilíbrios fisiológicos, diminuição no crescimento, alterações histo-morfológicas, principalmente no fígado (icterícia e lesões). Assim, causam prejuízos econômicos, reduzindo desempenho produtivo e

ocasionando mortalidade dos peixes (BOONYARATPALI et al., 2001; KUBITZA, 2010; GOPINATH et al., 2012).

Dependendo das concentrações ingeridas, as aflatoxinas podem apresentar efeitos agudos nos animais, com sintomas clínicos ou alterações patológicas características. Nos efeitos crônicos, a detecção dos sintomas é mais complexa, pois não há um quadro de sintomas típicos, mas reflexos negativos na saúde do animal, representado por perdas econômicas (LOPES, 2008).

A dose efetiva da ingestão de AFB₁ que induz a formação de tumores hepáticos varia entre as espécies. Para as aves, as quais são extremamente sensíveis, a dose para indução de hepatomas é 10 a 30 µg AFB₁/kg na dieta, similarmente ao que acontece com a toxicidade aguda nos peixes (WOGAN, 1992). Desta forma, em intoxicações por aflatoxinas encontra-se geralmente diminuição da taxa de crescimento e redução na eficiência alimentar, sendo influenciadas pela redução do metabolismo proteico e absorção de gorduras. As aflatoxinas interferem nos vários sistemas enzimáticos, tais como, amilase, pancrease, tripsina, lipase, RNase e DNase, interferindo na digestão de amidos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Nas intoxicações crônicas, as aflatoxinas interferem na resposta imune, tornando os animais suscetíveis a doenças infecciosas e parasitárias e também a falhas vacinais (DILKIN, 2002).

Alguns estudos avaliaram os efeitos das aflatoxinas em peixes. Halver (1988), estudando truta arco-íris alimentadas com dietas contendo 80 ppb de aflatoxinas ou mais, observaram síndrome tóxica aguda, necrose hepática severa, edema branquial e generalização de hemorragia nas células.

Jantrarotai e Lovell (1991) encontraram lesões no fígado e no rim de catfish (*Ictalurus punctatus*) alimentados com uma dieta com concentração de 10 mg AFB₁/kg por 10 semanas, o que ocasionou a redução da taxa de crescimento e hematócrito, mas não houve mortalidade. Ao avaliar duas dietas comerciais diferentes para tilápia vermelha, em um período de 135 dias, Conroy (2000) observou que o fígado dos animais apresentou áreas de necrose de coagulação aguda, particularmente nas zonas entre o fígado e o pâncreas; no rim observou-se necrose epitelial aguda formando cilindros proteicos abundantes. O baço, estômago e intestino também apresentaram alterações diversas. Ainda, o mesmo autor considera que tilápias devem consumir níveis inferiores a 5 ppb de aflatoxinas, por considerar que níveis superiores a este valor são prejudiciais aos peixes, causando baixo desempenho de crescimento.

Arana et al. (2002) observaram que a AFB₁ reduziu a taxa de crescimento e o ganho de peso de trutas arco-íris diploides. Para jundiás alimentados com níveis crescentes de aflatoxinas na dieta, houve redução proporcional nos valores de hematócrito, hemoglobina e glicose sanguínea dos peixes (LOPES et al., 2005). Sahoo e Mukherjee (2001) analisaram

o efeito da AFB₁ sobre a carpa indiana (*Labeo rohita*), utilizaram diferentes níveis de AFB₁ injetados intraperitoneal em alevinos (30 ± 5 g), observados por um período de 90 dias. Os peixes apresentaram resistência a AFB₁ em dose igual ou inferior a 1,25 mg AFB₁/kg de peso corporal, concluindo que doses superiores são prejudiciais aos peixes.

De acordo com Tuan et al. (2002) algumas espécies de peixes apresentam sensibilidade aos efeitos tóxicos da aflatoxina, com reflexos na fisiologia dos mesmos. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta redução no peso corpóreo, nas taxas de crescimento, na conversão alimentar e na taxa de sobrevivência, os quais investigaram a resposta a diferentes níveis de concentração de AFB₁ em condições laboratoriais, usando alevinos de 31 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e observaram que no tratamento com 100 mg de AFB₁/kg na dieta ocorreu a maior mortalidade e reduzido ganho de peso em relação ao tratamento controle. Foi observado que o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) é mais resistente à aflatoxicose do que as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), enquanto que outros estudos mostraram que a tainha é altamente sensível à AFB₁, seguida da carpa, tilápia vermelha e tilápia do Nilo, nota-se, portanto, que o metabolismo de aflatoxinas em peixes é diferente para cada espécie (ABDELHAMID, 2008).

2.7 Resíduos de Aflatoxinas em Peixes

Os resíduos de aflatoxinas podem ficar retidos nos tecidos animais e ocasionar riscos à saúde pública devido ao consumo de alimentos contaminados (Wu, 1998; Boonyaratpalin et al., 2001; Püschner 2002; Murjani 2003). Desta forma, os músculos de peixes alimentados com aflatoxinas podem ser uma grande fonte de exposição humana às mesmas, devido à estabilidade química da molécula. Os ingredientes utilizados nas rações devem ser monitorados para verificar a presença de aflatoxinas, pois, uma vez contaminada, esta proteína animal passa a ser um importante veiculador para pessoas que utilizam o peixe como prato principal da sua dieta (FARABI et al., 2006; LOPES et al., 2009).

A deposição de aflatoxinas em peixes é residual e cumulativa, sendo observados efeitos no músculo e fígado (PLAKAS et al., 1991). No entanto, devido ao diferente metabolismo, sabe-se que há diferenças na sensibilidade à aflatoxina nas diferentes espécies (NAKATSURU et al., 1990; NGETHE et al., 1993; OMAR et al., 1996; ABDELHAMID, 2008).

Algumas pesquisas verificaram a deposição de aflatoxinas em algumas espécies de peixes. El-Sayed e Khalil (2009) encontraram altos níveis de AFB₁ (≈ 5 ppb) no músculo de Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), concluindo que a espécie é sensível à AFB₁. Relataram também alta concentração de AFB₁ (4,25 ppb) no músculo de robalos, sugerindo um risco

significativo para a contaminação de humanos. HUANG (2011) reportou que os resíduos de aflatoxina foram detectados em diferentes tecidos do camarão, sendo o músculo o tecido com maior acúmulo: 14,2 ppb quando alimentado com 100 ppb de AFB₁ por quatro semanas.

Deng et al. (2010) detectaram resíduos de AFB₁ no fígado de tilápias após exposição a doses inferiores a 2 mg/kg. Abdelhamid et al. (2004) relataram que resíduos de AFB₁ na carne manifestaram um efeito acumulativo com base na dieta, nível e duração da exposição. O efeito da aflatoxina na ração (50 ou 100 ppb) sobre a morbidade e resíduos na musculatura de badejo foi estudada por Hussain et al. (1993), revelando aflatoxinas B₁, G₁ e G₂ na musculatura de ambos os grupos em concentrações de 5, 10, 15 e 20 ppb, respectivamente.

Estudos demonstraram que resíduos de aflatoxinas em files de bagre do canal de cativeiro (*Ictalurus punctatus*) podem atingir 400 ppb (LOVELL, 1984). Os autores encontraram correlações entre níveis de AFB₁ na dieta e tecido. Por exemplo, níveis de 5 ppb foram detectados em tecido muscular de *Dicentrarchus labrax* L. após a administração por 42 dias de 180 ppb de AFB₁ (EL-SAYED e KHALIL, 2009). Além disso, observou-se que há correlação positiva entre concentração de AFB₁ na ração consumida e os níveis da toxina nos tecidos (RAGHAVAN et al., 2011).

Resultados negativos também foram encontrados quanto ao acúmulo de aflatoxinas no tecido de tilápias vermelhas (EL-SAYED e KHALIL, 2009) e camarões (BAUTISTA et al. 1994; DIVAKARAM e TACON, 2000). Plakas et al. (1991) observaram que o bagre possui um baixo potencial para acúmulo de AFB₁ na carne.

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

2.8 Legislação para Micotoxinas no Brasil e outros Países

Do ponto de vista toxicológico, para o ser humano, que pode eventualmente ingerir produtos contaminados, é necessário o controle rigoroso das concentrações das micotoxinas nos alimentos, caracterizando o risco que podem representar para a saúde (PAIVA, 2013). Na União Europeia há limites baixos, enquanto que nos países subdesenvolvidos há a possível subestimação de doenças e mortes ocorridas por aflatoxinas (VINEIS e XUN, 2009).

O consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas é considerado um problema de saúde pública. Sendo assim, os níveis máximos toleráveis para micotoxinas são

regulamentados por vários países (VAN EGMOND, 2004). Diferentes alimentos têm limites definidos e, geralmente, são estipulados limites para aflatoxinas totais, AFB₁ e AFM₁ (CREPPY, 2002 e RASTOGI et al., 2004).

No Brasil, a Resolução 274, de 15 de outubro de 2002 do Ministério da Saúde, estabeleceu limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho (BRASIL, 2002). As aflatoxinas eram as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estavam previstos na legislação. O limite máximo permitido de 20 ppb, em alimentos destinados ao consumo humano, para a soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, foi estabelecido pelo Ministério da Agricultura em 1996 e pelo Ministério da Saúde, em 2002.

Em fevereiro de 2011, entrou em vigor no Brasil uma nova legislação sobre os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. A RDC nº 7 de 2011 estabeleceu limites para micotoxinas em 14 categorias de alimentos, como leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros e prazos de acordo com o risco sanitário envolvido para cada uma das micotoxinas e alimentos destinados ao consumidor infantil, que são mais suscetíveis. Os limites máximos estabelecidos incluem aflatoxinas (B₁ + B₂ + G₁ + G₂ e M₁), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1), patulina (PAT) e zearalenona (ZEA) em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas (ANVISA, 2011).

A RDC nº 7 de 2011 estabelece o limite de 0,5, 5 e 2,5 µg/kg de AFM₁ no leite fluido, leite em pó e queijos, respectivamente, e de 1 a 20 µg/kg para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em diversos tipos de alimentos, como milho e seus derivados (20 µg/kg), amendoim e alguns derivados (20 µg/kg), cereais e seus produtos (5 µg/kg), castanhas (10 µg/kg) entre outros, sendo esses limites de aplicação imediata (ANVISA, 2011).

Os níveis máximos de micotoxinas contemplados para matéria prima ou ingrediente para rações destinadas ao consumo animal são de 50 µg/kg para aflatoxinas, de maneira geral, sem especificar a espécie animal (MAPA, 1988). A *Food and Drugs Administration* (FDA, 1995) e a FAO, nos anos de 1997 e 2014 determinaram nos EUA o limite máximo de 20 µg/kg para ingredientes com milho. A *European Commission* (EC, 2013) estabeleceu limites máximos de resíduos (LMR) de 10 µg/kg para micotoxinas em alimentação de animais de produção e animais de estimação.

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

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a transferência de aflatoxinas das rações para a espécie de peixe Lambari (*Astyanax altiparanae*), avaliando também a influência dos níveis de toxina na ração sobre o desempenho dos peixes.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a transferência de aflatoxinas da ração para músculo e fígado;
- b) Avaliar a influência das aflatoxinas sobre parâmetros biométricos da espécie citada;
- c) Inferir sobre a sensibilidade da espécie às aflatoxinas.

3.3 Hipótese

O consumo de ração contaminada por aflatoxina por longo período acarreta problemas zootécnicos, como morte dos animais e prejuízos financeiros aos produtores, e acúmulo de toxinas no músculo e fígado dos peixes, podendo trazer consequências à saúde dos consumidores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Produção de Aflatoxinas em Material de Cultura

Foi utilizada cepa padrão de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (Figura 4), cedida da coleção de cepas do *ARS culture collection, United States Department of Agriculture* (USDA). As aflatoxinas foram produzidas (Figuras 5, 6 e 7) de acordo com os protocolos do Dr. George E. Rottinghaus, do *Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri*, Columbia, EUA (ROTTINGHAUS, 2012). A concentração de aflatoxinas no material de cultura foi confirmada através de cromatografia de alta eficiência (CLAE).

**Figura 4 - Placa com inóculo de cepa padrão de *Aspergillus parasiticus*.
Figura 5 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de secagem.**

Fonte: Própria autoria.

**Figura 6 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de secagem.
Figura 7 - Material de cultura com aflatoxinas, após etapa de moagem.**

Fonte: Própria autoria.

4.2 Dietas Experimentais

Como não havia conhecimento da dose letal (DL50) para a aflatoxina em peixes da espécie lambari (*Astyanax altiparanae*), o presente trabalho seguiu as diretrizes da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) para o teste de classe de toxicidade aguda (OECD, 2001), as indicações da Portaria 116/96 do Ministério da Saúde para avaliação da toxicidade aguda oral de substâncias químicas e estudos de toxicidade de dose única de novas drogas, além de se enquadrar nas exigências da RDC 14, de 31 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde ANVISA/MS (BRASIL, 2010).

De acordo com a DL50 obtida e com os limites legais para aflatoxinas em rações animais no Brasil, Estados Unidos da América e Europa, foram estabelecidos os seguintes níveis para compor os tratamentos:

Controle – ração sem toxina,

A - Ração + 10 µg AFB₁/kg;

B - Ração + 20 µg AFB₁/kg;

C - Ração + 50 µg AFB₁/kg.

Todas as rações foram previamente analisadas por CLAE para verificar se havia a presença de aflatoxinas antes do início do experimento. Definidos os níveis a serem utilizados no experimento, a preparação das rações contaminadas foi realizada em etapas, no decorrer do experimento. Nestas ocasiões, foram comprovados os níveis de aflatoxinas nas rações, retirando-se uma amostra de 100 g de cada ração preparada contendo a toxina. As análises foram realizadas por CLAE e as rações foram armazenadas a - 20°C até a sua utilização. Explicar como foi feito

Para incorporação das aflatoxinas à ração, foi utilizado método de imersão em metanol contendo a toxina para dose final na ração de 10, 20 e 50 µg AFB₁/kg. Após a secagem da ração para remoção do metanol, as amostras foram analisadas por CLAE para confirmação dos níveis pretendidos e armazenadas a - 20°C até a utilização.

4.3 Alojamento e Manejo dos Peixes

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

A espécie avaliada foi o lambari (*Astyanax altiparanae*) e o experimento foi conduzido em 12 unidades experimentais em aquários de vidro com capacidade para 125 litros de água, com medidas de 50 x 50 x 50 cm. A densidade foi de 0,5 peixe por m³ e cada

aquário totalizando 50 peixes. Foram utilizados juvenis de lambari com média de 3,6 cm de comprimento e peso inicial de aproximadamente 3,15 gramas. O período de aclimação foi de 21 dias.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9h e 15h) com 5% da biomassa. O ajuste da taxa de arraçoamento foi realizado após biometria mensal.

A dieta dos peixes foi baseada na fórmula descrita na Tabela 4, com ração micro extrusada flutuante, para alevinos de 0,6 até 5,0 gramas de peso vivo (Guabi®). As rações foram empregadas nas 12 unidades experimentais conforme o tratamento, resultando então em quatro tratamentos com três repetições cada (Figura 8).

Tabela 4- Composição da ração

Ingredientes	Níveis de garantia por kg
Proteína Bruta (Mín)	450 g
Extrato Etéreo (Mín)	80 g
Fibra Buta	28 g
Matéria Mineral (Máx)	170 g
Cálcio (Mín)	25 g
Cálcio (Max)	42 g
Fósforo (Mín)	15 g
Sódio (Mín)	185 mg
Vitamina A (Mín)	35.000 UI
Vitamina E (Mín)	120 UI
Vitamina K3 (Mín)	13 mg
Vitamina D3 (Mín)	2.000 UI
Vitamina C (Mín)	800 mg
Umidade (máx.)	100 g/kg

Milho Integral Moído, Farelo De Soja, Farelo De Glúten De Milho, Farinha De Carne, Farinha De Visceras, Farinha De Peixe, Farinha De Penas Hidrolisadas, Farinha De Sangue, Óleo De Soja Refinado, Calcário Calcítico, Cloreto De Sódio (Sal Comum), Cloreto De Colina, Inositol, Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina C, Vitamina K3, Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Piridoxina (B6), Vitamina B12, Ácido Fólico, Biotina, Niacina, Pantotenato De Cálcio, Sulfato De Cobre, Sulfato De Ferro, Óxido De Zinco, Monóxido De Manganês, Selenito De Sódio, Proteinato De Cobre, Proteinato De Zinco, Proteinato De Selênio, Alumino silicato De Cálcio E Sódio, Ácidos Propionico, Aditivo Prebiótico, B.H.T (Hidróxido De Tolueno), B.H.A. (Butil Hidroxianisol) e Propilgato.

Diariamente foi efetuada a limpeza dos aquários, através de sifão, retirando-se os resíduos existentes nas mesmas, sendo contabilizada a eventual mortalidade. A troca diária de água foi na ordem de 70%, anotando-se o consumo diário e realizando-se pesagem das sobras para verificar o consumo médio.

A água de abastecimento dos aquários era proveniente do sistema de tratamento de água da cidade de Pirassununga - SP, com neutralização do cloro utilizando-se tiossulfato de sódio (Êxodo científica, São Paulo, Brasil) e aquecida por meio de resistências elétricas com controlador de temperatura mantida a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. A temperatura foi controlada com

termostatos (HOPAR H-606, China) e aferida duas vezes ao dia (8h e 16h) com termômetro digital. A qualidade da água foi monitorada utilizando-se um medidor de pH (pHmetro Digital Microprocessado Gehaka, modelo PG 1800, Brasil), a amônia tota foi utilizado (Kit Spectro Amônia Água Doce), um termômetro digital (Thermocouple Thermometer Comark KM28/P7, NORFOLK UK), e um medidor de oxigênio dissolvido (YSI MODEL 57, USA) com a finalidade de monitorar os parâmetros da qualidade da água.

O período experimental foi 120 dias sendo que a cada 30 dias foram realizados levantamentos biométricos e recalculada a taxa de arraciamento. Inicialmete dez animais por aquário foram eutanasiados e utilizados para compor uma amostra para quantificação de aflatoxinas nos peixes. Em cada amostragem foram tomadas 12 amostras (constituídas por um *pool* de 10 peixes), perfazendo 48 amostras ao final do experimento (4 tratamentos, 3 repetições), sendo 48 amostras de músculo e 48 amostras de fígado.

Os animais foram mantidos em jejum 24horas antes da biometria e coleta do material (fígado e tecido muscular). Após o jejum foram selecionados para as biometrias iniciais e alojados em densidade de 10 juvenis por aquário. A captura dos animais foi efetuada utilizando-se puçás de malha fina (1 mm), para não comprometer a integridade física dos animais (remoção de escamas, muco, etc). O procedimento de eutanásia foi efetuado por imersão dos animais em água com cloridrato de benzocaína com 250 mg/L, imediatamente após a captura, e realizado em aquários de vidro com capacidade para 50 litros de água. O tempo de eutanásia foi caracterizado pela perda total do equilíbrio, pela ausência de movimento das nadadeiras e de natação, pelos movimentos operculares reduzidos e pelas respostas apenas aos estímulos táteis mais intensos.

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

Figura 8 - Representação esquemática do experimento: distribuição dos aquários para os tratamentos, repetições e amostragem.

4.4 Avaliação do Desempenho dos Peixes

Para a avaliação dos índices de produtividade e desempenho dos peixes, foram determinados o ganho de peso corporal, o percentual de mortalidade e o consumo de ração (MELLO et al., 2002).

No final de cada período de 30 dias, os peixes foram submetidos à biometria (tamanho e pesagem) após jejum de 24 horas, obtendo-se o peso total dos peixes de cada unidade experimental e calculando-se a média do ganho de peso e comprimento total médio.

Foram utilizados 10 peixes de cada aquário, totalizando 30 peixes por tratamento. As variáveis analisadas durante os experimentos foram: peso final, calculado através da diferença entre os pesos médios das parcelas inicial e final; ganho médio, obtido através da diferença entre o peso médio inicial, peso médio final e número total de indivíduos de cada tratamento, comprimento total, medida entre a parte anterior da cabeça até o final da nadadeira caudal; e sobrevivência, obtida pela diferença entre as contagens final e inicial nos tratamentos. Foi utilizado paquímetro digital (STARFER DIGITAL 150 X 0,02) para medir o comprimento total e para pesagem foi utilizada balança de precisão (ACCULAB V-1200) (Figura 9).

Figura 09 - Instrumentos utilizados para avaliar tamanho e peso dos peixes.

Fonte: Própria autoria.

4.5 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Ração

A determinação de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) nas amostras foi efetuada de acordo com a metodologia utilizada no *Toxicology Laboratory, University of Missouri*, sob coordenação do Dr. George Rottinghaus (ROTTINGHAUS, 2012), utilizando-se colunas de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicam, Watertown, EUA) e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A amostra foi previamente homogeneizada e triturada, em seguida a amostra analítica (25 g) foi colocada em tubo de ensaio juntamente com 5 g de NaCl e 100 mL de metanol: água (na proporção 80:20). Após a agitação manual por 3 minutos a mistura foi filtrada em papel de filtro e recolhida em um frasco, em um tubo falcon foram adicionados 10 mL de solução tampão fosfato 0,01 M acrescidos de 0,5 mL do filtrado e a solução foi aplicada por meio da coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicam) com fluxo de 1-2 gotas/segundo.

Após esse procedimento a coluna foi lavada com 15 mL de solução tampão fosfato 0,01 M. A eluição da micotoxina foi realizada com a passagem de 1,5 mL de metanol pela coluna de imunoafinidade, o eluato foi recolhido em um vial de 2 mL, posteriormente, o eluato foi evaporado até a secura sob fluxo de N_2 . O resíduo foi derivatizado com 25 μ L de ácido trifluoroacético, e ressuspendido com 975 μ L de acetonitrila: água (2:8), totalizando um volume final de 1 mL e a solução foi agitada em vortex por 1 minuto e 50 μ L do extrato derivatizado foi injetado no sistema CLAE.

A separação e a quantificação das aflatoxinas foram conduzidas em um sistema CLAE Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com bomba LC-20A e detector de fluorescência Shimadzu SPD-20A (excitação: 350 nm e emissão: 450 nm) e coluna HyperClone® BDS C18 (3 μ m) 4,6 x 100 mm (Phenomenex, Torrance, EUA), precedida de pré-coluna (5 μ m) 4 x 10 mm. Foram injetados 50 μ L da amostra no sistema, utilizando-se como fase móvel água: metanol: acetonitrila (540: 100: 100), com fluxo de 1,0 mL/minuto. A quantificação das aflatoxinas nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos obtidos nas amostras na equação de regressão da curva de calibração.

Os padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (Mix de aflatoxina Oekanal® 20 μ g/mL B_1 , G_1 , B_2 , G_2 em acetonitrila; Aflatoxina M₁ em acetonitrila), e preparados para obtenção da concentração exata das toxinas. Para a curva de calibração, foram utilizadas concentrações de 1, 5, 10 e 20 ng/mL de cada padrão. As quantidades correspondentes a cada concentração foram colocadas em um vial e evaporadas até a secura sob fluxo de N_2 . Em seguida, foi derivatizado com 25 μ L de ácido trifluoroacético, e ressuspendido com 975 μ L de acetonitrila: água (2:8), totalizando um

volume final de 1 mL e a solução foi agitada em vortex por 1 minuto e 50 µL de cada solução padrão foram injetados no sistema CLAE.

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de AF, foram realizados ensaios de recuperação em amostras artificialmente contaminadas com as toxinas, de maneira a obter níveis de contaminação de 5,0 e 20,0 µg AF/kg. As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata para cada nível de toxina, e submetidas ao método descrito, com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

4.6 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Fígado

Para as amostras de fígado foram determinadas as concentrações de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁) utilizando-se colunas de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicom, Watertown, EUA), e sistema CLAE (ROTTINGHAUS, 2012). A amostra de fígado foi previamente homogeneizada e triturada e a amostra analítica (1 g) foi colocada em um frasco juntamente com 10 mL de metanol: água (80: 20) homogeneizada com o auxílio de um *mixer* por 3 minutos.

A mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos, depois transferido o sobrenadante para outro tubo cônico de 50 mL filtrado com filtro PTFE 0,45 µm, e filtrado novamente em papel filtro. Foram adicionados 25 mL de solução tampão fosfato 0,01 M, acrescidos de 1 mL do filtrado e a solução foi aplicada por meio da coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (VICAM) com fluxo de 1-2 gotas/segundo, após esse procedimento a coluna foi lavada com 20 mL de solução tampão fosfato 0,01 M e com 1 mL de água ultra pura (MilliQ). A eluição da micotoxina foi realizada com a passagem de 1,5 mL de metanol: acetonitrila (2:3) pela coluna de imunoafinidade e o eluato então recolhido em um vial de 2 mL e evaporado até a secura sob fluxo de N₂ e o resíduo foi derivatizado com 30 µL de ácido trifluoroacético por 10 minutos e ressuspendido com 970 µL de acetonitrila: água (2:8), totalizando um volume final de 1 mL, a solução foi agitada em um vortex por 1 minuto e 50 µL do extrato derivatizado foram injetados no sistema CLAE. A separação e a quantificação das aflatoxinas foram conduzidas em um sistema CLAE equipado com detector de fluorescência (excitação: 350 nm e emissão: 450 nm) e coluna 4,6 x 150 mm, precedida de pré-coluna (5 µm) 4 x 10 mm, foram injetados 50 µL da amostra no sistema, utilizando-se, como fase móvel, água: metanol: acetonitrila (540: 100: 100), com fluxo de 1,0 mL/minuto. A curva de calibração foi preparada de acordo com o descrito no item 4.5.

4.7 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Músculo

A determinação de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 e M_1) no tecido muscular foi efetuada utilizando-se colunas de imunoafinidade Aflatest WB® (Vicom, Watertown, EUA) e sistema CLAE (ROTTINGHAUS, 2012). O tecido muscular foi previamente homogeneizado, triturado e a amostra analítica (5 g) foi colocada em um frasco juntamente com 20 mL de metanol: água (80: 20), homogeneizada com o auxílio de um *mixer* por 3 minutos e a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. Em um tubo cônico de 50 mL foram adicionados 25 mL de solução tampão fosfato 0,01 M e acrescidos de 4 mL do filtrado e a solução foi aplicada por meio da coluna de imunoafinidade Aflatest WB® (VICAM) com fluxo de 1-2 gotas/segundo, posteriormente, a coluna foi lavada com 20 mL de solução tampão fosfato 0,01 M e com 1 mL de água ultra pura. A eluição da micotoxina foi realizada com a passagem de 1,5 mL acetonitrila: metanol (3:2) pela coluna de imunoafinidade e o eluato então recolhido em um vial de 2 mL e evaporado até a secura sob fluxo de N_2 , o resíduo foi derivatizado com 25 μ L de ácido trifluoroacético por 5 minutos e ressuspendido com 975 μ L de acetonitrila: água (2:8) totalizando um volume final de 1 mL, a solução foi agitada em um vortex por 1 minuto e 50 μ L do extrato derivatizado foram injetados no sistema CLAE. A separação e a quantificação das aflatoxinas foram conduzidas em um sistema CLAE equipado com detector de fluorescência (excitação: 350 nm e emissão: 450 nm) e coluna 4,6 x 150 mm, precedida de pré-coluna (5 μ m) 4 x 10 mm. Foram injetados 50 μ L da amostra no sistema, utilizando-se, como fase móvel, água: metanol: acetonitrila (540: 100: 100) com fluxo de 1,0 mL/minuto. A curva de calibração foi preparada de acordo com o descrito no item 4.5.

4.8 Análise dos Resultados

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando um modelo de medidas repetidas, com um fator de tratamento (dose, com 4 níveis) e um fator longitudinal (tempo, com 5 níveis), em um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições.

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

4.9 Comitê de Ética

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do Desempenho do Método Analítico

5.1.1 Curvas de Calibração para Análise de Aflatoxinas em Ração

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram 0,992, 0,993, 0,990 e 0,988, respectivamente. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 10.

Figura 10 - Curvas de Calibração para Ração. Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão de (a) AFB₁ (coeficiente de correlação $r = 0,996$), (b) AFB₂ (coeficiente de correlação $r = 0,997$), (c) AFG₁ (coeficiente de correlação $r = 0,995$), (d) AFG₂ (coeficiente de correlação $r = 0,994$).

5.1.2 Curvas de calibração para análise de aflatoxinas em fígado de peixe

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁ foram, 0,997, 0,997, 0,997, 0,998 e 0,998 respectivamente. As curvas obtidas podem ser observadas na Figura 11.

Figura 11- Curvas de Calibração para o Fígado. Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão de (a) AFB₁ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (b) AFB₂ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (c) AFG₁ (coeficiente de correlação $r = 0,998$), (d) AFG₂ (coeficiente de correlação $r = 0,999$), (e) AFM₁ (coeficiente de correlação $r = 0,999$).

Os tempos de retenção para AFM₁, AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂, foram de 2,65, 4,61, 6,92, 10,37 e 16,27 minutos, respectivamente. O cromatograma obtido para os padrões de aflatoxina contendo 20 $\mu\text{g/L}$ pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Cromatograma obtido para o padrão de aflatoxinas contendo 20 µg/L.

A recuperação média para os dois níveis de toxina na ração foi de 85% para AFB₁, 92,9% para AFB₂, 81,4% para AFG₁ e de 88,4% para AFG₂. Os níveis e porcentagens obtidas podem ser observados na Tabela 5. Nota-se que as recuperações e os coeficientes de variação obtidos foram adequados. O limite de detecção do método na ração foi de 0,2 µg/kg e o limite de quantificação foi 0,8 µg/kg.

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

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

Os níveis e porcentagens obtidos para as amostras de fígado podem ser observados na Tabela 6. As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no fígado foram de 104,0%, para AFB₁, 112,6% para AFB₂, 91,5% para AFG₁ e de 104,5% para AFG₂ e 103,0% para AFM₁. As recuperações e os coeficientes de variação obtidos foram adequados. O limite de detecção do método foi de 0,5 µg/kg e o limite de quantificação foi 2,0 µg/kg.

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

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

As recuperações médias considerando os dois níveis de toxina no músculo de lambari (Tabela 7) foram de 94,6%, para AFB₁, 97,4% para AFB₂, 101,4% para AFG₁, de 100,1% para AFG₂ e de 93,1% para AFM₁. As recuperações e os coeficientes de variação obtidos foram adequados. O limite de detecção do método foi de 0,5 µg/kg e o limite de quantificação foi 2,0 µg/kg.

Tabela 7 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de tecido muscular de lambari.

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

AFM ₁ Adicionada (µg/kg)	AFM ₁ Observada (µg/kg)	AFM ₁ Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coefficiente de Variação (%)
5,0	5,7	4,6	91,3	23,1
	3,6			
	4,4			
20,0	19,5	19,0	94,9	14,3
	21,4			
	16,1			

5.2 Dietas Experimentais

As aflatoxinas utilizadas nos experimentos foram produzidas de acordo com a necessidade, no Laboratório Multiusuário de Microbiologia da FZEA/USP. As dietas experimentais foram ajustadas para conter 10 µg AFB₁/kg (tratamento A), 20 µg AFB₁/kg (tratamento B) e 50 µg AFB₁/kg (tratamento C). As rações produzidas e incorporadas com as aflatoxinas foram analisadas previamente à utilização e os níveis obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Níveis médios de afltoxinas obtidas nas dietas experimentais utilizadas.

Tratamento	Aflatoxinas (µg/kg)				
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AF Total
Controle	ND	ND	ND	ND	ND
A	10,36 ± 0,56	ND	ND	ND	10,36 ± 0,56
B	20,00 ± 1,87	1,19 ± 0,26	0,82 ± 0,38	ND	22,18 ± 1,74
C	50,18 ± 1,79	3,16 ± 0,91	1,05 ± 0,17	ND	54,39 ± 0,92

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

*Resultados expressos como média ± desvio padrão.

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção

5.3 Parâmetros Limnológicos da Água

Durante todo o período experimental foram aferidos diariamente os parâmetros físico-químicos da água, os quais se encontram na Tabela 9. Destaca-se que as condições ambientais foram uniformes entre os tratamentos.

Tabela 9 - Parâmetros limnológicos da água aferidos no experimento.

Parâmetros	Mínimo	Máximo	Média
Temperatura da água (°C)	25	28	26,5
pH	6,8	7,1	6,95
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,6	6,2	5,9
Amônia total (mg/L)	>0,2	0,3	0,3

Os valores encontrados podem ser considerados como ideais para a criação de lambaris (GARUTTI, 2003 e PORTO-FORESTI et al., 2010). Sendo assim, os parâmetros observados para a qualidade físico-química da água durante o período experimental não influenciaram no desempenho dos lambaris. O sistema de troca de água e de aeração por equipamento possibilitou o controle da temperatura e da aeração dos tratamentos durante o período experimental. A concentração de amônia também apresentou valores abaixo das concentrações tóxicas para peixes neotropicais para todos os aquários (MARTINEZ et al., 2006).

5.4 Avaliação Desempenho dos Peixes

O efeito das aflatoxinas sobre o comprimento, o peso e o consumo de ração pelos lambaris foi significativo ($P < 0,05$), conforme pode ser observado nas Tabelas 10, 11 e 12 respectivamente. Houve também efeito do tempo e interação entre tratamento e tempo para estes parâmetros. Desta forma, pode-se notar que aos 120 dias de experimento os peixes do tratamento controle foram significativamente maiores e apresentaram maior peso corpóreo em relação aos demais tratamentos onde o consumo de ração no tratamento controle foi maior em relação aos tratamentos com toxinas até o 88º dia. O consumo de ração do tratamento C no último mês de experimento foi menor ($P < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos.

Tabela 10 - Comprimento do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Comprimento(cm)					Erro padrão
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	3,46 ^{dC*}	3,87 ^{cA}	4,06 ^{cA}	4,95 ^{bA}	9,19 ^{aA}	0,050
A	3,68 ^{cAB}	3,86 ^{bcA}	3,88 ^{bB}	3,84 ^{bcB}	4,58 ^{aC}	0,061
B	3,64 ^{bB}	3,79 ^{bA}	3,79 ^{bB}	3,89 ^{bB}	5,14 ^{aC}	0,025
C	3,77 ^{bA}	3,77 ^{bA}	3,71 ^{bB}	3,91 ^{bB}	6,81 ^{aB}	0,028
Erro padrão	0,048	0,048	0,048	0,048	0,050	
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----					
Tratamento	< 0,0001					
Dia	< 0,0001					
Tratamento*Dia	< 0,0001					

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

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

Tabela 11 - Peso do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Peso (g)					Erro padrão
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	2,99 ^{dB*}	3,19 ^{dA}	3,71 ^{cA}	4,27 ^{bA}	9,34 ^{aA}	0,070
A	3,42 ^{bA}	3,36 ^{bA}	3,49 ^{abA}	3,34 ^{bB}	3,78 ^{aC}	0,071
B	3,09 ^{bAB}	2,77 ^{bB}	3,07 ^{bB}	3,04 ^{bB}	4,80 ^{aB}	0,070
C	3,17 ^{bAB}	3,04 ^{bAB}	2,87 ^{bB}	3,03 ^{bB}	4,47 ^{aB}	0,070
Erro padrão	0,053	0,055	0,053	0,053	0,053	
Fonte de variação	----- <i>P valor (nível descritivo do teste)</i> -----					
Tratamento	< 0,0001					
Dia	< 0,0001					
Tratamento*Dia	< 0,0001					

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

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

Tabela 12 - Consumo mensal* de ração do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Consumo (kg)				Erro padrão
	0 – 28 dias	30 – 58 dias	60 – 88 dias	90 – 120 dias	
controle	0,54 ^{cA*}	0,59 ^{bA}	0,64 ^{aA}	0,69 ^{aA}	0,005
A	0,51 ^{dB}	0,56 ^{cAB}	0,61 ^{bAB}	0,71 ^{aA}	0,005
B	0,51 ^{cB}	0,51 ^{cB}	0,60 ^{bAB}	0,69 ^{aA}	0,005
C	0,51 ^{bB}	0,52 ^{abB}	0,57 ^{aB}	0,58 ^{aB}	0,005
Erro padrão	0,003	0,007	0,007	0,008	
Fonte de variação	----- <i>P valor (nível descritivo do teste)</i> -----				
Tratamento	< 0,0001				
Dia	< 0,0001				
Tratamento*Dia	0,0014				

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

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

A taxa de crescimento específico foi de 5,29%, 0,30%, 1,43% e 1,08% para os tratamentos controle, A, B e C, respectivamente. Portanto, nota-se que a exposição crônica às aflatoxinas piorou a taxa de crescimento de lambaris.

A taxa de mortalidade dos peixes foi de 0,5% no tratamento controle, 2% no tratamento A, 2,8% no tratamento B e 4,3% no tratamento C. Além da maior mortalidade observada, após 90 dias de experimento os peixes do tratamento C apresentaram desorientação, executando movimentos de rotação em torno do grande eixo corpóreo, diminuição do trabalho das nadadeiras e opérculos, comportamento de busca de ar atmosférico, discreta alteração na coloração, descamação e produção de muco.

Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, no estudo realizado por Raghavan et al. (2011), que analisaram esturjão híbrido alimentados com ração contendo 10 ug AFB₁/ kg, observando diminuição da ingestão da ração pelos peixes. No entanto, no trabalho de Zaki et al. (2008) realizado no Egito, o qual peixes da espécie *Tilapia zillii* foram alimentadas com rações contaminadas por AFB dosagem e os resultados encontrados pelos autores foram diminuição do crescimento e redução da eficiência alimentar.

Diversas espécies de peixes estudadas demonstraram ser sensíveis aos efeitos tóxicos da aflatoxina, com reflexos na fisiologia dos mesmos. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta redução no peso corpóreo, nas taxas de crescimento, na conversão alimentar e na taxa de sobrevivência (TUAN et al., 2002; ABDELHAMID, 2007). Zychowski et al. (2013) reportaram que a tilápia do Nilo foi influenciada pelos efeitos deletérios da AFB₁ em concentrações de 1,5 e 3,0 ppm durante 10 semanas, havendo diminuição de ganho de peso e na eficiência da alimentação.

Mahfouz e Sherif (2015) também avaliaram os efeitos da toxicidade da aflatoxina B₁ sobre o estado de saúde da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os peixes foram alimentados com uma dieta com 20 e 100 ppb de AFB₁ durante 6 e 12 semanas, respectivamente. A exposição a 100 ppb de AFB₁ reduziu significativamente ($p < 0,05$) os índices de crescimento, incluindo ganho de peso total, ganho médio diário e taxa de crescimento relativo, mas não a capacidade de sobrevivência, quando comparado ao tratamento com 20 ppb de AFB₁. Foi observado que o bagre é mais resistente à aflatoxicose do que a tilápia, enquanto que outros estudos mostraram que a tainha é altamente sensível à AFB₁, seguida da carpa, tilápia vermelha e tilápia do Nilo, respectivamente (ABDELHAMID, 2007).

ARANA et al. (2002) mostraram que a AFB₁ reduziu a taxa de crescimento e o ganho de peso de trutas arco-íris diploides (*Oncorhynchus mykiss*). No trabalho de Lopes et al. (2005) em peixes jundiá, a ração contendo 204 ppb de aflatoxinas causou redução de peso, comprimento padrão, comprimento total e ganho médio diário, sendo que na dose de 350,

757 e 1.177 ppb ocorreram alterações no fígado e tecidos, sem comprometer o crescimento, durante os 35 dias. Jantrarotai e Lovell (1991) observaram redução no crescimento de bagre-de-canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com rações contendo 10 ppb de AFB₁. Pullin e Lowe-McConnell (1982) descreveram que tilápias alimentadas com altos níveis de aflatoxinas B₁ e B₂ apresentaram baixo crescimento, síndrome hemorrágica caracterizada por hemorragias severas dentro da musculatura branquial, na abertura opercular e amplas hemorragias internas.

Há também na literatura trabalhos com outras micotoxinas influenciando a produção de peixes. Ramires et al. (2016), ao avaliarem diferentes níveis de fumonisinas (20, 30 e 40 mg/kg) na ração para alevinos de jundiá (*Ramdhia quelen*), observaram diferença significativa ($P < 0,05$) no ganho de peso médio diário dos alevinos. Braga et al. (2016) reportaram que a toxina T-2 na dieta de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*), nas doses acima de 10 mg/kg reduziram o crescimento dos peixes.

Segundo Pelyhe et al. (2016) peixes da espécie carpa (*Cyprinus carpio* L) foram alimentadas durante quatro semanas com ração contaminada com 5,96 mg de DON, 0,33 mg de 15-Acetil-desoxinivalenol kg⁻¹, 4,11 mg de toxina T-2 e 0,45 mg de toxina HT-2 kg⁻¹ e os resultados apresentados pelos autores demonstraram que a exposição dos peixes às micotoxinas resultou no aumento da mortalidade em ambos os grupos que consumiram os alimentos contaminados.

Sahoo e Mukherjee (2001) utilizaram dois níveis de AFB₁ (1,25 e 5,0 mg/kg) intraperitoneal em alevinos de carpa indiana (*Labeo rohita*) por um período de 90 dias, observando que os alevinos têm resistência à AFB₁ em dose igual ou mais baixa do que 1,25 mg/kg e que doses superiores são prejudiciais aos peixes. Jantrarotai e Lovell (1991) encontraram lesões no fígado e no rim de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com uma dieta com concentração de 10 mg/kg de AFB₁ por 10 semanas. Nota-se, portanto, que o metabolismo de aflatoxinas é diferente, para cada espécie de peixe (ABDELHAMID, 2007). Aflatoxina B₁ em alimentos de peixes leva a uma baixa taxa de crescimento, diminuição da ingestão de alimentos, menor conversão alimentar e aumento da susceptibilidade à doença (ROYES e YANONG 2002).

5.5 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Fígado

Os efeitos dos níveis de aflatoxinas, do tempo de exposição e a interação de ambos no fígado dos peixes podem ser observados nas Tabelas 13 a 17. Todos os efeitos foram significativos ($P < 0,05$), exceto o efeito do tratamento para AFG₁, e o efeito do dia e a interação para AFM₁.

De acordo com dados da literatura, pode-se notar que o nível de AFB₁ residual no fígado é superior ao encontrado no músculo (DENG et al, 2010; NOMURA et al., 2011). De fato, na Tabela 13 pode-se observar que o acúmulo de AFB₁ no fígado dos lambaris aumentou com o tempo, sendo este aumento mais expressivo para o tratamento C a partir dos 90 dias. Ainda, pode-se notar que o acúmulo de AFB₁ foi expressivo para os tratamentos B e C aos 120 dias, com níveis de 264,73 µg/kg e 242,75 µg/kg, respectivamente.

Tabela 13 - Níveis de aflatoxina B₁ no fígado do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina B ₁ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	4,39 ^{aA}	53,46 ^{aB}	ND	15,804
B	ND	4,99 ^{bA}	47,07 ^{bB}	264,73 ^{aA}	13,480
C	ND	2,95 ^{bA}	215,34 ^{aA}	242,75 ^{aA}	15,317
Erro padrão		0,635	31,112	14,687	
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	0,0105				
Dia	< 0,0001				
Tratamento*Dia	< 0,0001				

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

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

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Por outro lado, na Tabela 14, apesar de ser observado o mesmo padrão aos 90 dias, ao final do experimento os níveis acumulados não diferiram ($P > 0,05$).

Tabela 14 - Níveis de aflatoxina B₂ no fígado do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina B ₂ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	8,03 ^{bb}	22,83 ^{aa}	1,377
B	ND	ND	4,40 ^{ab}	3,96 ^{aa}	1,594
C	4,61 ^b	ND	24,90 ^{aa}	13,64 ^{ab}	1,439
Erro padrão	0,339		1,460	2,865	
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	0,0189				
Dia	< 0,0001				
Tratamento*Dia	< 0,0001				

A: 0,79 µg AFB₂/kg; B: 1,19 µg AFB₂/kg; C: 3,16 µg AFB₂/kg.

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

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Para a AFG₁, os resíduos no fígado aumentaram com o tempo, mas foram semelhantes (P>0,05) entre os tratamentos (Tabela 15).

Tabela 15 - Níveis de aflatoxina G₁ no fígado do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina G ₁ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	2,42 ^{aa} *	5,08 ^{aa}	0,557
B	ND	ND	ND	3,77 ^A	0,518
C	ND	ND	4,63 ^{aa}	4,65 ^{aa}	0,518
Erro padrão			0,726	0,874	
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	0,3307				
Dia	< 0,0001				
Tratamento*Dia	0,0446				

A: 0,51 µg AFG₁/kg; B: 0,82 µg AFG₁/kg; C: 1,05 µg AFG₁/kg.

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

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

A AFG₂ apresentou maior acúmulo ($P<0,05$) no fígado dos lambaris do tratamento C, comparado aos demais, atingindo níveis de 13,56 µg/kg aos 90 dias e 9,05 µg/kg aos 120 dias (Tabela 16).

Tabela 16 - Níveis de aflatoxina G₂ no fígado do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina G ₂ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	ND	ND	
B	5,23 ^{B*}	ND	ND	ND	0,145
C	9,14 ^{bA}	ND	13,56 ^a	9,05 ^b	0,152
Erro padrão	0,381		0,319	0,592	
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	< 0,0001				
Dia	< 0,0001				
Tratamento*Dia	< 0,0001				

A: 0,03 µg AFG₂/kg; B: 0,17 µg AFG₂/kg; C: 0,23 µg AFG₂/kg.

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

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Na Tabela 17 pode-se observar que houve apenas efeito do tratamento para os níveis de AFM₁ no fígado dos lambaris, não havendo variações ($P>0,05$) de modo geral durante os 120 dias de produção. O nível de 25,17 µg/kg no tratamento C aos 30 dias de experimento evidencia a biotransformação da AFB₁ no fígado dos animais, tendo em vista os altos níveis na dieta.

A AFB₁ passa pelo processo de biotransformação primária no fígado, com a hidroxilação da molécula, resultando na formação de metabólitos tóxicos, como a AFM₁. Os compostos que contêm o grupo hidroxila são bastante solúveis em água, possibilitando a rápida excreção através da urina, bile, fezes e leite (HUSSEIN; BRASEL, 2001; CREPPY, 2002). No presente trabalho, pode-se inferir que nos primeiros 60 dias do experimento os peixes ingeriram a ração contaminada e houve metabolização da toxina no fígado, evidenciada pelos valores encontrados. Após 90 dias, pode ter havido uma sobrecarga do fígado, com menor eficácia na eliminação das toxinas ingeridas.

Tabela 17 - Níveis de aflatoxina M₁ no fígado do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina M ₁ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	ND	ND	
B	ND	ND	ND	4,68 ^A	1,854
C	25,17 ^{a*}	ND	4,07 ^b	3,23 ^{bA}	1,852
Erro padrão	3,859		0,374	1,071	
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	0,0427				
Dia	0,0829				
Tratamento*Dia	0,0724				

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

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

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Alguns estudos avaliaram a deposição de aflatoxinas no fígado de diferentes espécies de peixes. No trabalho de Deng et al. (2010), a espécie tilápia juvenil (*Oreochromis niloticus*) foi alimentada com diferentes níveis de AFB₁ (19, 85, 245, 638, 793 e 1641 mg/kg) durante 20 semanas, e os autores verificaram resíduos de AFB₁ no fígado, levando a um efeito de aflatoxicose.

Plakas et al. (1991) administraram uma solução oral de 250 µg/kg de aflatoxinas em bagre do canal e analisaram após duas e quatro horas. Após duas horas encontraram resíduos de 246 µg/kg de aflatoxinas no fígado dos peixes e depois de quatro horas observaram uma concentração de 421 µg/kg.

De acordo com Tuan et al. (2002), trutas arco-íris expostas à uma dieta com 0,4 µg/kg de AFB₁ durante 15 meses apresentaram uma maior probabilidade em desenvolver neoplasia. Em outro trabalho, os autores alimentaram trutas com uma dieta contendo 20 µg/kg de AFB₁ por oito meses e houve uma ocorrência de 58% de tumores no fígado. Ao continuar a alimentação por 12 meses, ocorreu um aumento de 83% nessa incidência. Jantrarotai e Lovell (1991) encontraram lesões no fígado no bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com uma dieta com concentração de 10 mg/kg de AFB₁ por 10 semanas.

Trabalhos com outras micotoxinas também foram realizados avaliando o fígado dos animais. No trabalho de Lumlertdacha et al. (1995), foram testadas doses de 0,3 (controle),

20, 80, 320 e 780 mg de fumonisina B₁/kg na dieta de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) por 10 e 14 semanas e os resultados encontrados apontaram lesões no fígado com níveis acima de 80 mg de FB₁/kg na dieta. Carlson et al. (2001) alimentaram trutas arco-íris com dietas contendo 0, 3,2, 23 e 104 ppm de fumonisina B₁ (FB₁) produzida por *Fusarium verticillioides* durante 34 semanas, observando ao final do experimento lesões no fígado ao incluir AFB₁ na dieta dos peixes. Desta forma, com estes resultados há demonstração que o fígado é o órgão de metabolização da aflatoxinas.

5.6 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras de Músculo

Os resultados das análises de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁ no músculo dos lambaris estão apresentados nas Tabelas 18, 19, 20, 21 e 22, respectivamente.

Na Tabela 18 pode-se observar que houve efeito ($P < 0,05$) do tratamento, do tempo e interação entre eles para a AFB₁ no músculo do lambari. O acúmulo de AFB₁ no músculo tornou-se mais evidente após 90 dias de produção, atingindo 58,47 µg/kg no tratamento C, e mantendo um alto nível no dia 120, significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos. Deve-se, no entanto, destacar que nos tratamentos A e B, os níveis finais também foram altos, considerando que o tecido muscular do lambari pode ser consumido como alimento.

Tabela 18 - Níveis de aflatoxina B₁ no músculo do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina B ₁ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	6,64 ^{aB}	18,76 ^{aB}	0,936
B	ND	ND	16,17 ^{aB}	19,69 ^{aB}	0,855
C	ND	ND	58,47 ^{aA}	49,92 ^{aA}	0,936
Erro padrão			2,168	1,542	
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	< 0,0001				
Dia	< 0,0001				
Tratamento*Dia	< 0,0001				

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

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

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Na Tabela 19, nota-se que tratamento, tempo e interação foram significativos ($P < 0,05$). A AFB₂ foi detectada somente aos 90 e 120 dias, para os tratamentos C e B, respectivamente.

Os resultados apresentados na Tabela 20, para AFG₁ no músculo, evidenciaram também que tratamento, tempo e interação foram significativos ($P < 0,05$), com nível de 3,16 µg/kg no tratamento C.

Para AFG₂, houve efeito ($P < 0,05$) do tratamento, tempo e interação entre eles. O maior nível observado de AFG₂ no músculo ocorreu no tratamento B aos 30 dias (Tabela 21).

Tabela 19 - Níveis de aflatoxina B₂ no músculo do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina B ₂ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	ND	ND	
B	ND	ND	ND	2,20	0,301
C	ND	ND	6,28	ND	0,338
Erro padrão			0,557	0,648	
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	0,0373				
Dia	< 0,001				
Tratamento*Dia	0,0102				

A: 0,79 µg AFB₂/kg; B: 1,19 µg AFB₂/kg; C: 3,16 µg AFB₂/kg.

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Tabela 20 - Níveis de aflatoxina G₁ no músculo do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina G ₁ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	ND	ND	
B	ND	ND	ND	ND	
C	ND	ND	3,16	ND	0,123
Erro padrão			0,167		
Fonte de variação	----- <i>P valor (nível descritivo do teste)</i> -----				
Tratamento		0,0095			
Dia		< 0,0001			
Tratamento*Dia		< 0,0001			

A: 0,51 µg AFG₁/kg; B: 0,82 µg AFG₁/kg; C: 1,05 µg AFG₁/kg.

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Tabela 21- Níveis de aflatoxina G₂ no músculo do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina G ₂ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	ND	ND	
B	2,56	ND	ND	ND	0,126
C	ND	ND	ND	ND	
Erro padrão	0,119				
Fonte de variação	----- <i>P valor (nível descritivo do teste)</i> -----				
Tratamento		0,0242			
Dia		< 0,0001			
Tratamento*Dia		< 0,0001			

A: 0,03 µg AFG₂/kg; B: 0,17 µg AFG₂/kg; C: 0,23 µg AFG₂/kg.

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

Os níveis de AFM₁ no músculo, apresentados na Tabela 22, permitem verificar que, aos 90 dias houve resíduo no tratamento C. Houve efeito ($P < 0,05$) do tratamento, tempo e interação.

De modo geral, houve acúmulo de AFB₁ no músculo dos lambaris com o passar do tempo, havendo maior aumento após 90 dias de produção. Notou-se, ainda, que os níveis

de AFB₁ no músculo dos lambaris no dia 120 foram semelhantes aos níveis empregados nas rações.

No presente trabalho pode-se notar que, semelhante ao que ocorreu no fígado, houve maior acúmulo de aflatoxinas a partir dos 90 dias de experimento. De fato, a deposição de aflatoxinas nos peixes é residual e cumulativa, havendo mais efeitos no músculo e fígado (PLAKAS et al., 1991). No entanto, sabe-se que há diferenças na sensibilidade das diferentes espécies à aflatoxina, devido ao diferente metabolismo entre as espécies (NAKATSURU et al., 1990; NGETHE et al., 1993; OMAR et al. 1996 ABDELHAMID, 2007).

Tabela 22- Níveis de aflatoxina M₁ no músculo do lambari durante o período experimental.

Tratamento	Aflatoxina M ₁ (µg/kg)				Erro padrão
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	
controle	ND	ND	ND	ND	
A	ND	ND	ND	ND	
B	ND	ND	ND	ND	
C	ND	ND	2,13	ND	0,071
Erro padrão			0,107		
Fonte de variação	----- <i>P</i> valor (nível descritivo do teste) -----				
Tratamento	0,0003				
Dia	< 0,0001				
Tratamento*Dia	< 0,0001				

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

ND: não detectado, inferior ao limite de detecção.

O efeito da aflatoxina na ração sobre resíduos na musculatura de badejo foi estudado por HUSSAIN et al. (1993), revelando aflatoxinas B₁, G₁ e G₂ na musculatura de ambos os grupos em concentrações de 5, 10, 15 e 20 ppb, respectivamente. Em um estudo de exposição de trutas arco-íris às aflatoxinas por meio de ração contaminada, foi constatada a presença de AFB₁ e AFM₁ no músculo e fígado dos animais (NOMURA et al., 2011). HUANG (2011) reportou que resíduos de aflatoxina foram detectados em diferentes tecidos do camarão, sendo o músculo o tecido com maior acúmulo: 14,2 ppb quando alimentado com 100 ppb de AFB₁ por quatro semanas. No Brasil, LOPES et al. (2005) demonstraram que concentrações de aflatoxina superiores a 350 µg/kg de ração acarretam deposição residual no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*).

PLAKAS et al. (1991) reportaram que o bagre possui um baixo potencial para acúmulo de AFB₁ na carne. No tecido de tilápias vermelhas (EL-SAYED e KHALIL, 2009) e camarões (BAUTISTA et al. 1994; DIVAKARAM e TACON, 2000) foi reportado não ocorrer acúmulo de aflatoxinas. Os resíduos de aflatoxinas, presentes nos alimentos contaminados, podem ficar retidos nos tecidos dos peixes, os quais podem levar os consumidores a riscos de saúde pública (WU 1998; BOONYARATPALIN et al. 2001; PÜSCHNER, 2002; MURJANI 2003).

Diante do exposto, pode-se notar que, assim como várias espécies de peixes estudadas, os lambaris apresentaram acúmulo de aflatoxinas no músculo durante exposição a níveis de 10 µg/kg, 20 µg/kg e 50 µg/kg por 120 dias, sendo o acúmulo semelhante à dose na ração ao final dos 120 dias.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que o lambari é uma espécie sensível aos efeitos das aflatoxinas, sendo que a exposição prolongada da espécie pode trazer consequências negativas sobre o desempenho.

De modo geral, observou-se que, principalmente a partir dos 90 dias de experimento, houve acúmulo de aflatoxinas no fígado dos lambaris, e consequentemente no músculo dos animais. A concentração de aflatoxina B₁ observada no músculo dos lambaris ao final do período de exposição foi semelhante aos níveis empregados na dieta, podendo causar prejuízos à saúde do consumidor.

Assim, conclui-se que a exposição diária e prolongada de lambaris às aflatoxinas, dentro dos limites atuais das legislações para aflatoxinas em ração animal não garantem segurança à produção e à saúde dos consumidores.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos, sugere-se mais trabalhos relacionando micotoxinas em aquicultura.

8 REFERÊNCIAS

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

ABDELHAMID, A.M. Mycotoxins in Fish With Special Emphasis On The Egyptian Situation. 2007. Disponível em: <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mycotoxins-fish-special-emphasis-t461/p0.htm>. Acesso em 24/09/2013.

ABDELHAMID, A. M. **Mycotoxins in fish with special emphasis on the Egyptian situation**. 2008. Disponível em: <en.micotoxins.com>. Acesso em: 10 dez. 2015.

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

ABABOUC, L. Fisheries and Aquaculture topics. Composition of fish. **Topics Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department**. Rome: FAO, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1, n. 37, p. 72-73.

ALINEZHAD, S. M. et al. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed with emphasis to *Aspergillus* section *Flavi*. **Iranian Journal of Fisheries**, Iran, v. 10, p. 363-374, 2011.

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

ALVARADO, C. E. G. **Sobrevivência e aspectos econômicos do treinamento alimentar de juvenis de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829), em laboratório**. 2003. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

AMARAL, K. A. S. et al. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

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

ARANA, S. et al. Differential effect of chronic aflatoxin B₁ intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 4, p. 253-263, 2002.

BARKAI-GOLAN, R. Alternaria mycotoxins. In: BARKAI-GOLAN, R.; NACHMAN, P. (Eds.). **Mycotoxins in fruits and vegetables**. San Diego, CA: Academic Press, 2008. p. 185-203.

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

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

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

BOSHY EL-, M. E., EL-ASHRAM, A. M. M., e EL-GHANY, N. A. A. (2008). Effect of dietary beta-1, 3 glucan on immunomodulation on diseased *Oreochromis niloticus* experimentally infected with aflatoxin B1. In: **Proceedings of 8th international symposium on tilapia in aquaculture** (pp. 1109-1127).

BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A. Toxigenic alternaria species of economic importance. In: SINHA, K. K.; BHATNAGER, D. (Eds.). **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 65-108.

BRAGA, L. C. et al. Influência da toxina t2 no fator de condição corporal em alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*). In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 7., 2015, Alegrete. **Anais...** Alegrete, 2015. Disponível em:< <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/16485>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. **Legislação sobre micotoxinas**. 2002. Disponível em:<<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em: 28 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. 2011. Disponível em:<<http://www.mpa.gov.br/index.php/ultimas-noticias/885-mpa-lanca-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2011>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Departamento de Pesca e Aquicultura. **Ministério da Pesca e Aquicultura/produção 2014**. Disponível em:<<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/producao>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano de Desenvolvimento da aquicultura brasileira 2015/2020**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: Acesso em: 5 Nov. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 30 ago. 2013. Seção 1, p. 33-35.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento - MAPA. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09 novembro de 1988. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 09 nov. 1988. Seção 1, p. 21.968.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no. 14, de 30 de março de 2010. **Diário Oficial da União**. Brasília, 5 abr. 2010. Seção 1, p.85-87.

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

CAGAUAN, A. G. et al. Effect of aflatoxin-contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 6., 2004, Philippines. **Abstracts...** Philippines, 2004. v. 12, p. 6.

CANTON, J. H. et al. The carcinogenicity of aflatoxin M1 in rainbow trout. **Food and Cosmetics Toxicology**, Kidlington, v. 13, p. 441-443, 1975.

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

CARLSON, D. B.; WILLIAMS, E. D.; SPITSBERGEN, J. M. Fumonisin B1 promotes aflatoxin B1 and N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine-limited liver tumors in Rainbow Trout. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 172, p. 29-36, 2001.

CHÁVEZ-SÁNCHEZ, M. C.; MARTÍNEZ PALACIOS, C. A.; OSORIO MORENO, I. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 127, p. 49-60, 1994.

CHEN, Y. et al. Effect of dietary chitosan on growth performance, haematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Aquaculture Nutrition**, Chichester, v. 20, p. 532-546, 2014.

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

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. H. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-143.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Techn, 2003.

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

DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 100, p. 187-196, 2005.

DE LONGH, H.; VIES, R. O.; VAN PELT, J. G. Milk of mammals fed an aflatoxin containing diet. **Nature**, London, v. 202, p. 466-467, 1964.

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

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

DINIS, A. M. P.; LINO, C. M.; PENA, A. S. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 553-557, 2007.

DIVAKARAM, S.; TACON, A. G. J. Studies on the toxicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) fed diets dosed with aflatoxin B₁ to humans. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, New York, v. 9, n. 3, p. 115-120, 2000.

DVORÁČKOVÁ, I. et al. Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye). **Annales de la Nutrition et de l'Alimentation**, Paris, v. 31, n. 4-6, p. 977-989, 1977.

DVORÁČKOVÁ, I.; PÍCHOVÁ, V. Pulmonary interstitial fibrosis with evidence of aflatoxin B₁ in lung tissue. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, New York, v. 18, p. 153-157, 1986.

EIGENMANN, C. H. **The American characidae**. Cambridge: Printed for the Museum, 1921.

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**, Kidlington, v. 47, p. 1606-1609, 2009.

FARABI, S. M. V.; YOUSEFIA, M.; HAJIMORADLOO, A. Aflatoxicosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 22, suppl.10, p. 234-237, 2006.

FÁVARO, T. Lambari ganha mercado, na pesca e na mesa: de isca viva a petisco, peixe deixa de ser praga em tanques para se tornar fonte de renda. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 15 maio 2002. Disponível em: <<http://www.saopaulo.sp.gov.br/spnoticias/lenoticia.php?id=20529&c=5&q=lambari-ganha-mercado-na-pesca-e-na-mesa>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

FEDDERN, V. et al. Aflatoxins importance on animal nutrition. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. **Aflatoxins** – recent advances and future prospects. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 171-195.

FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, M. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 63, p. 158-169, 2014.

FERREIRA, P. M. F. et al. Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Hoboken, v. 45, p. 28-34, 2014.

FITZPATRICK, D. W. Mycotoxins in the food chain: nutritional and toxicological considerations. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, Ottawa, v. 68, p. 979-981, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Cereal supply and demand brief**. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>>. Acesso em: 13 dez. 2015.

_____. **Economic analysis of supply and demand for food up to 2030**: special focus on fish and fishery products. Rome, 2014. (Audun Lem, Trond Bjørndal, Alena Lappo).

_____. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. 223 p.

_____. **The state of world armazenagem**. 2013. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 set. 2014.

_____. **World aquaculture production by culture environment**. 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/es>>. Acesso em: 20 out. 2014.

_____. **Statistics**. 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

_____. **On-farm mycotoxin control in food and feed grain (Peter Golob)**, Rome, 2007.

_____. **Fisheries and aquaculture**. 2004. Disponível em: <faostat.fao.org/default.aspx>. Acesso em: 04 jun. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Section 683.100 action levels for aflatoxins in animal feeds (CPG 7126.33)**. 2009. Disponível em: <http://www.abvt.org/public/docs/Aflatoxin_In_Animal_Feed.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2014.

_____. **Section 555.400: foods: adulteration with aflatoxins**. 1995. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074555.htm>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO - FIGIS), **Fisheries global information system**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/figis/>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **World aquaculture production by culture environment**. 2012. Disponível em: < <http://www.fao.org/fishery/statistics/es>> Acesso em: 07 Mar. 2016.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: ARORA, D. K.; MUKERJII, K. G.; MARTH, E. H. (Eds.). **Handbook of applied mycology: food and feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 31-68.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos Astyanax (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. 1995. 286 f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1995.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de Astyanax (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 13, p. 65-88, 2000.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Editora UNESP, 2003. 332 p.

GIMENO, A. **Revisión genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en alimentación animal**. 2000. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 21 dez. 2014.

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

GOPINATH, R. et al. Ultrastructural changes in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius 1798 given aflatoxin B₁ diets. **Aquaculture Research**, Chichester, v. 43, n. 1, p. 32-43, 2012.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguazu River basin. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 451-453, 2002.

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

HALL, S. J. et al. **Blue frontiers: managing the environmental costs of aquaculture**. Penang, Malaysia: The World Fish Center, 2011.

HALVER, E. J. **Fish nutrition**. 2. ed. New York: Academic Press, 1988. 693 p.

HALVER, J. E. My 50 years in fish nutrition, 1949–99. **Aquaculture Research**, Chichester, v. 32, n. 8, p. 615-622, 2001.

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

HUSSAIN, M. et al. Effect of aflatoxin-contaminated feed on morbidity and residues in walleye fish. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 35, n. 5, p. 396-398, 1993.

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

HYGINO DA CRUZ, L. C. Micotoxinas: são tão importantes In: _____. (Ed.). **Micotoxinas: perspectiva latino-americana**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996. p. 1-12.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRÔNOMICA, 2010, Recife. **Anais...** Recife, 2013. v. 7, p. 138-161, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2003-2003**: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. 76 p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/default.shtm>>. Acesso em: 4 jun 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da pecuária municipal 2014**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. 39 p. Disponível em:

<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em 05 fev 2015.

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

_____. **Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-112**. Lyon, 2010. Disponível: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2013.

_____. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: World Health Organization, 2002. v. 82.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 633-640.

JIANG, Y. et al. Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. **Clinical and Developmental Immunology**, Abingdon, v. 2008, art. 790309, 2008.

JINAP, S. et al. Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods. **Food Control**, Kidlington, v. 26, n. 1, p. 42-48, 2012.

KENNEDY, D.; DELANEY, A.; KOREN, G. Mutagens, carcinogens and teratogens. In: GOLDFRANK, L. (Ed.). **Goldfrank's toxicologic emergencies**. 6th edn. Stanford: Appleton & Lange, 1998. p. 262-273.

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

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

LAZO, R. F.; SIERRA, G. Investigacion del efecto de las micotoxinas en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, Madrid, v. 25, p. 7-11, 2008.

LEUNG, M. C.; DIAZ-LLANO, G; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 26, p. 9623-9635, 2006.

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

LINDNER, E. **Toxicología de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1995. 251 p.

- LÓPES, C. et al. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 211-215, 2001.
- LOPES, P. R. S. et al. Utilização de adsorvente em rações contendo aflatoxina para alevinos de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 4, p. 589-595, 2009.
- LOPES, P. R. S. **Efeito das aflatoxinas e dos adsorventes sobre o desempenho zootécnico de alevinos e juvenis de jundiá (Rhamdia quelen)**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.
- LOPES, P. R. S. et al. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 1029-1034, 2005.
- LOVELL, R. T. **Use of soybean products in aquaculture diets**. St. Louis, Missouri: American Soybean Association, 1984.
- LUMLERTDACHA, S. et al. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, v. 130, p. 201-218, 1995.
- MAHFOUZ, M. E.; SHERIF, A. H. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, Cairo, v. 71, p. 48-59, 2015.
- MALLMANN, A. G.; SANTURIO, J. M.; WENTZ, I. Aflatoxinas - aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, p. 635-643, 1994.
- MANDARINO, J. M. G.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. Detoxificação de milho (*Zea Mays* L.) contaminado com aflatoxinas através do processamento por extrusão termoplástica. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v. 10, p. 6-11, 1989.
- MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 60, p. 218-237, 2013.
- MARTINEZ, C. B. R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E. U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2006. p. 81-95.
- METZENER, A. F. M.; ROTEROTTE, J. A.; SENHORINI, J. A. Crescimento e sobrevivência final de juvenis de lambari (*Astyanax altiparanae*) sob diferentes densidades de estocagem, na fase de alevino. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE 45 AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 1., 2004, Vitória, ES. **Resumos...** Vitória, ES, 2004. p. 203.
- MURJANI, G. **Chronic aflatoxicosis in fish and its relevance to human health**. India: Central Institute of Freshwater Aquaculture, 2003.
- NAKATSURU, Y. et al. Immunological detection of in vivo aflatoxin B₁ – DNA adduct formation in rats, rainbow trout and coho salmon. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 11, p. 1523-1526, 1990.

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

NOMURA, H. et al. Uptake by Dietary Exposure and Elimination of Aflatoxins in Muscle and Liver of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59: 5150–5158, 2011.

NUNES, E. M. C. G. **Micobiota fúngica nos ingredientes e em ração para piscicultura**. 2009. 32 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2009.

OECD. GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. OECD 425. **Acute Oral Toxicity—Modified Up and Down Procedure**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001

OLCER, Z. et al. Fast and sensitive detection of mycotoxins in wheat using microfluidics based Real-time electrochemical profiling. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 62, p. 163-169, 2014.

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

PAIVA, R. O. **Avaliação das atividades antifúngicas de substâncias sintéticas frente a fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário**. 2013. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

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

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

PELYHE, C. et al. Effect of 4-week feeding of deoxynivalenol-or T-2-toxin-contaminated diet on lipid peroxidation and glutathione redox system in the hepatopancreas of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 32, n. 2, p. 77-83, 2016.

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

PONG, R. S.; NOGAN, G. N. Toxicity, biochemical, fine structural effects of synthetic aflatoxin M₁, and B₁ in rat liver. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 47, p. 585-590, 1971.

PONTES, M. D. **Relação de ácidos graxos n6/n3 em dietas para lambaris do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*)**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

PORTO-FORESTI, F. et al. Cultivo do Lambari: uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 67, p. 15-19, 2001.

PORTO-FORESTI, F. et al. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDSSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2010. cap. 4, p. 111-16.

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

PULLIN, R. S.; LOWE-MCCONNELL, R. H. (Eds.). **The biology and culture of Tilapias**. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1980. (International Conference on the Biology and Culture of Tilapias, 7)

PURCHASE, Y. F. H. Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old duckling. **Food and Cosmetics Toxicology**, Kidlington, v. 5, p. 339-342, 1963.

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

RAGHAVAN, P. R. et al. Low levels of Aflatoxin B₁ could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* male Chi A. baeri female. **Aquaculture Nutrition**, Chichester, v. 17, p. E39-E47, 2011.

RANA, K. J.; SIRIWARDENA, S.; HASAN, M. R. **Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009.

RAMIRES, L. et al. Efeito da micotoxina fumonisina sobre o ganho médio diário em alevinos de jundiá (*Rhanda quelen*). In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 7., Bage. 2016. **Anais eletrônicos...** Bage, 2016. Disponível em: < [Http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/viewfile/16483/5531](http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/viewfile/16483/5531)>. Acesso em: 10 abr. 2016.

RASTOGI, S. et al. Detection of Aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by Elisa. **Food Control**, Kidlington, v. 15, p. 287-290, 2004.

RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE Jr., R. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolismo and prevention. **Research in Veterinary Science**, London, v. 89, p. 325-331, 2010.

ROCHA, M. D. et al. Incidência de afltoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 21, p. 15-19, 2008.

ROSSETTO, C. A. V.; VIEGAS, E. C.; LIMA, T. M. Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e das épocas de amostragem. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 437-445, 2003.

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

ROYES, J. B.; YANONG, R. P. **Molds in fish feeds and aflatoxicosis**. Florida: University of Florida, Institute of Agricultural Science (UF/IFAS), 2002

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Immunosuppressive effects of aflatoxin B₁ in Indian major carp *Labeo rohita*. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, London, v. 24, p. 143-149, 2001.

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

SANTOS, F.C.F. **Fungos em rações para camarões cultivados no estado do Piauí**. Dissertação de Mestrado. Programa de Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí, 2006. 55 p. Acesso http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/ciencianimal/arquivos/files/DM_FCFS.pdf. 20 Fev. 2015.

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

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

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

SFORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, Hoboken, v. 25, p. e54-e76, 2006

SHANE, S. Economic issues associated with aflatoxins. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Eds.). **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. London: Academic Press, 1993. p. 513-527.

SILVEIRA, A. M. **Avaliação de peitos e fígados de frangos de corte com lesões suspeitas de Aflatoxicose**. 2009. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SILVA, Cynthia Siqueira et al. Nutritional value of corn with different qualities for broiler chicken. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 5, p. 883-889, 2008.

SINNHUBER, R. O. et al. Aflatoxin M₁: a potent liver carcinogen for rainbow trout. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 29, p. 568, 1970.

SILVA, J. D. et al. (2008). Ocorrência de aflatoxinas em arroz consumido por militares do Exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Agrotecnologia**, 32(4), 1238-1244.

SMITH, J. E.; ROSS, I. C. The toxigenic *Aspergilli*. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, 1991. p. 31-61.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. **Fungos produtores de micotoxinas**. 2013. Disponível em: <<https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/27316/3/Fungos%20produtores%20de%20micotoxinas%20-%20Microbiologia.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

SOARES, C. M. et al. Substituição parcial da proteína da farinha de peixe pela de fontes protéicas alternativas em dietas para alevinos de lambari (*Astyanax bimaculatus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., Porto Alegre, 1999. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. 1 CD-ROM.

SORVIG, A. **Aqüicultura**: uma alternativa necessária à demanda do mercado e pescados. 2006. Disponível em: < <http://www.knowledgeatwharton.com.br/article/aquicultura-uma-alternativa-necessaria-a-demanda-do-mercado-de-pescados/>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. Barueri, SP: Ed. Manole, 1ª Edição, 2008.

TACON, A. G. J.; METIAN, M.; HASAN, M. R. **Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals: sources and composition**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009.

TAVARES, M. M. **Fontes de óleos vegetais em dietas para lambaris-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*)**: desempenho produtivo e perfil de ácidos. 2011. 58 f. Dissertação - (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

TELLER, R. S. et al. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, p. 1428-1436, 2012.

TRISTAN, T. Q. **Dinâmica toxicológica de aflatoxinas em alimentos de origem animal em Aguascalientes y Querétaro**. Santiago de Querétaro: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Edición Comunicación del Centro, 2002.

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

VAN EGMOND, H. P. Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, p. 1152-1160, 2004.

VASANTHI, S.; BHAT, R. V. Mycotoxins in foods-occurrence, health and economic significance and food control measures. **The Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 108, p. 212-224, 1999.

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

VINEIS, P.; XUN, W. The emerging epidemic of environmental cancers in developing countries. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 205-212, 2009.

WOGAN, G. N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, New York, v. 374, p. 123-37, 1992.

WU, F. C. **Retention of diet-related mycotoxins in tissues of channel catfish**. Ph. D. (Dissertation) - Auburn University, Auburn, Alabama, 1998.

WU, F. Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds. **Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 363-374, 2007.

WU, H. C., SANTELLA, R. The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. **Hepatitis Monthly**, Iran, p. e7238, Oct. 2012.

YANONG, R. P. Fungal diseases of fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Maryland Heights, v. 6, n. 2, p. 377-400, 2003.

YUE, S. et al. Simultaneous detection of ochratoxin A and fumonisin B₁ in cereal samples using an aptamer–photonic crystal encoded suspension array. **Analytical Chemistry**, Hyderabad, v. 86, n. 23, p. 11797-11802, 2014.

ZAKI, M. S. et al. Diminution of aflatoxicosis in tilapia nilotica fish by dietary supplementation with fix in toxin and Nigella sativa oil. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Dubai, v. 3, p. 211-215, 2008.

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