

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação Micológica e Micotoxicológica de Rações
Fornecidas na Dieta de Tilápias em Criatórios.**

Tatiana Salomão Barbosa

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO MICOLÓGICA E MICOTOXICOLÓGICA DE RAÇÕES
FORNECIDAS NA DIETA DE TILÁPIAS EM CRIATÓRIOS.**

TATIANA SALOMÃO BARBOSA

Sob a Orientação do Professor
Pedro Paulo de Oliveira Silva

e Co-orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

639.312

B238a

I

Barbosa, Tatiana Salomão, 1985-.

Avaliação micológica e micotoxicológica de rações fornecidas na dieta de tilápias em criatórios / Tatiana Salomão Barbosa - 2011.

48 f. : il.

Orientador: Pedro Paulo de Oliveira Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 30-37.

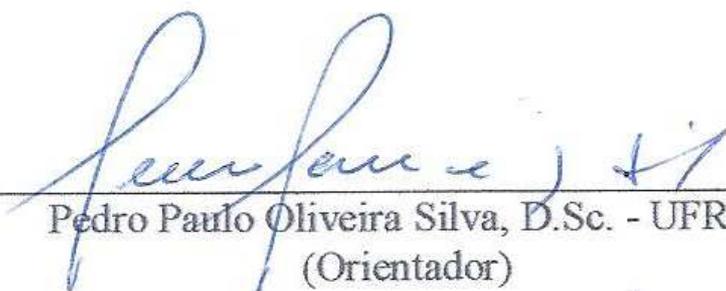
1. Tilápia (peixe) - Alimentação e rações - Teses. 2. Ração - Toxicologia - Teses. 3. Ração - Microbiologia - Teses. 4. Micotoxinas - Teses. I. Silva, Pedro Paulo de Oliveira, 1957-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

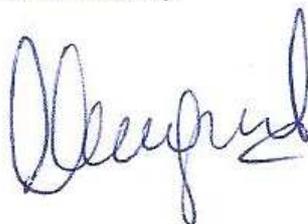
TATIANA SALOMÃO BARBOSA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/02/2011



Pedro Paulo Oliveira Silva, D.Sc. - UFRRJ
(Orientador)



Carina Elizabeth Magnoli, D.Sc.- UNRC, Argentina



Lilia Renée Cavaglieri, D.Sc.- UNRC, Argentina

Dedico este trabalho aos meus pais, a minha avó, aos meus irmãos e ao meu namorado por todo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família e ao meu namorado Sérgio, que me deram amor e apoio durante este percurso e que foram fundamentais para que tudo se tornasse possível.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que me proporcionou todas as ferramentas necessárias a minha formação, especialmente ao Instituto de Veterinária e ao Instituto de Tecnologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRRJ e todo o seu corpo docente pela qualidade de ensino oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa-auxílio concedida e à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ (FAPUR) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Pedro Paulo de Oliveira Silva e ao meu co-orientador Carlos Alberto da Rocha Rosa, pela oportunidade e confiança que depositaram em meu trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram com este projeto. À professora Gesilene Mendonça de Oliveira pelo carinho e boa vontade com que me recebeu, à Rojane de Oliveira Paiva e Renato Clapp do Rego Barros pela colaboração com as análises.

Ao professor Sérgio Gaspar de Campos pela orientação no estágio em docência.

Ao grupo pertencente ao laboratório do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas; Luiz Antonio Moura Keller, Tatiana Xavier de Almeida, Beatriz Dias Queiroz, Beatriz de Souza Monteiro, Michele Valadares Deveza, Lucila Maria Teixeira Nunes, Renata Quintela Assad, Francine Siqueira Santos e, especialmente a Kelly Moura Keller, Ágida Aparecida de Oliveira e Érica de Oliveira Dias, pelo auxílio no projeto.

A Ana Cláudia Marassi, pela amizade e por ser a ponte para minha chegada ao NPMM e a Thais Ferreira Fagundes e Carla Alves Soleiro pelo auxílio, apoio e amizade.

RESUMO

BARBOSA, Tatiana Salomão. **Avaliação micológica e micotoxicológica de rações fornecidas na dieta de tilápias em criatórios.** 2011. 37 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A piscicultura é um ramo específico da aqüicultura voltada para a criação de peixes em cativeiro. Por suas grandes vantagens as tilápias se destacam como as rainhas da piscicultura moderna e seu cultivo vem sendo apontado por especialistas como promissora atividade no mundo e principalmente no Brasil em decorrência do seu potencial hidrográfico, condições climáticas excelentes e produção satisfatória de grãos utilizados na fabricação de ração. Sabe-se que estes grãos são altamente susceptíveis à contaminação fúngica com possível formação de micotoxinas, o constitui um problema de grande importância em nível mundial. Dentre os gêneros fúngicos envolvidos na produção de micotoxinas destacam-se o *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As micotoxinas de maior prevalência são as aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, zearalenona e tricotecenos. Estas são substâncias capazes de afetar os parâmetros produtivos, com graves perdas econômicas e riscos para a saúde animal e humana. Assim, este estudo objetivou determinar a atividade de água e a microbiota total contaminante, estabelecer a ocorrência de espécies potencialmente produtoras de micotoxinas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, determinar a presença de aflatoxina B₁, ocratoxina A e fumonisina B₁ e caracterizar o perfil toxígeno de cepas de espécies isoladas de amostras de rações fornecidas na alimentação de tilápias provenientes de pisciculturas. Para isto, foram coletadas 60 amostras de rações comerciais diretamente das propriedades piscicultoras nas regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro. As amostras tiveram sua atividade de água aferida. Em seguida, a microbiota total foi determinada pelo método de diluição decimal seriada em placa. Depois de isoladas, as colônias foram identificadas em nível de gênero. A identificação de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. seguiu chaves taxonômicas específicas. O perfil toxígeno foi realizado para as cepas potencialmente produtoras de ocratoxina A e de aflatoxina B₁ isoladas das amostras. A determinação da incidência natural destas micotoxinas foi realizada através de cromatografia em camada delgada. A determinação da presença de fumonisina B₁ nas amostras foi feita através de kits ELISA. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A média obtida da A_a das amostras foi de $0,61 \pm 0,041$ na Região Centro e de $0,58 \pm 0,060$ na Região Sul, ambas abaixo do valor considerado ótimo para o crescimento fúngico e produção de micotoxinas. Os níveis médios de contaminação fúngica foram de $1,0 \times 10^3$ UFC g⁻¹ no Centro e de $4,7 \times 10^3$ UFC g⁻¹ no Sul do Estado, ficando dentro dos padrões recomendados pelas Boas Práticas de Fabricação internacional para a alimentação animal, que é de $1,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ de amostra. Os gêneros fúngicos mais isolados foram *Cladosporium* (85%), *Aspergillus* (68%) e *Penicillium* (60%). As espécies mais frequentes foram *P. citrinum* (31%), *A. niger* agregados (21%) e *A. flavus* (20%). Todas as cepas isoladas de *A. niger* agregados foram negativas para o teste de capacidade produtora de ocratoxina A. Dentre as cepas de *A. flavus* isoladas, 16% foram positivas para a produção de aflatoxina B₁. Quanto à incidência natural de micotoxinas, 98% das amostras apresentaram níveis detectáveis de fumonisina B₁, 55% de aflatoxina B₁ e 2% de ocratoxina A. A detecção de micotoxinas em quase todas as amostras de ração analisadas ressalta a necessidade de implantação de boas práticas de agricultura e de fabricação, a fim de se garantir um alimento mais seguro e reduzindo os riscos da ocorrência de micotoxicoses.

Palavras chave: fungos, micotoxinas, peixe

ABSTRACT

BARBOSA, Tatiana Salomão. **Mycological and mycotoxicological evaluation of feed supplied in the diet of tilapias in breeding.** 2011. 37 p. Dissertation (Master's Degree in Science and Technology of Food). Technology Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Pisciculture is a specific branch of aquaculture aimed at raising fish in captivity. For its great advantages tilapia stand out as the queens of modern pisciculture and its cultivation has been pointed out by experts as a promising activity in the world and especially in Brazil due to its potential hydrological, climatic conditions and excellent satisfactory production of grains used in manufacturing ration. It is known these grains are highly susceptible to fungal contamination with possible formation of mycotoxins, and this constitutes a major problem worldwide. Among the genera evolved in mycotoxins production is *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. The most prevalent mycotoxins are aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, zearalenone and trichothecenes. These are substances capable of affecting the productivity with serious economic losses and risks to animal and human health. Then, this study aimed to determine the water activity and the total contaminant mycoflora, to establish the occurrence of species potentially mycotoxin-producing belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, to determine the presence of aflatoxin B₁, ochratoxin A, fumonisin B₁ and to characterize mycotoxins profile of toxigenic strains isolated from feed supplied in the diet of tilapia in piscicultures. Samples (60) were collected from commercial feed directly from the fish-farming properties in Central and South regions of Rio de Janeiro. Water activity was measured. The total mycoflora was determined by serial decimal dilution plate and fungal colonies were identified at genera level. The identification of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. followed specific taxonomic keys. The profile was conducted to toxigenic strains potentially ochratoxin A and aflatoxin B₁ producers isolated from the samples. The determination of the natural incidence of ochratoxin A and aflatoxin B₁ was performed by thin layer chromatography and fumonisin B₁ was determined by ELISA kits. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and comparisons of means by Tukey's test ($p < 0.05$). The average of the a_w of the samples was 0.61 ± 0.041 in the Central Region and 0.58 ± 0.060 in the South, both below the value considered optimal for fungal growth and mycotoxin production. Mean levels of fungal contamination were 1.0×10^3 CFU g⁻¹ in the Central and 4.7×10^3 CFU g⁻¹ in the South region, being within the recommended standards for international Good Manufacturing Practice for feed, which is 1.0×10^4 CFU g⁻¹. The most isolated genera were *Cladosporium* (85%), *Aspergillus* (68%) and *Penicillium* (60%). The most frequent species were *P. citrinum* (31%), *A. niger* aggregate (21%) and *A. flavus* (20%). All isolates of *A. niger* aggregate were negative for the capacity to produce ochratoxin A. Among the *A. flavus* strains, 16% were positive for the production aflatoxin B₁. Concerning the natural incidence of mycotoxins, the samples had detectable levels of fumonisin B₁ (98%), aflatoxin B₁ (55%) and ochratoxin A (2%). The detection of mycotoxins in almost all the feed samples analyzed highlights the need to implement good agriculture and manufacturing practices, in order to ensure the safety of feed and to reduce the risk of mycotoxicosis occurrence.

Key words: fungi, mycotoxins, fish

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Principais micotoxinas, fungos produtores, alimentos mais contaminados e condições favoráveis para sua ocorrência.	9
Tabela 2: Carga fúngica das amostras de ração analisadas, expressos em UFC g ⁻¹ , nas regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.	22
Tabela 3: Valores de FB ₁ obtidos das amostras analisadas.	27
Tabela 4: Relação entre as espécies isoladas das amostras e a presença de micotoxinas nestas, nas Regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Características morfológicas do gênero <i>Aspergillus</i> .	6
Figura 2: Estrutura morfológica e tipos de conidióforos de <i>Penicillium</i> spp.: (a) monoverticilado (b) biverticilado, (c) terverticilado, (d) quaternverticilado.	7
Figura 3: Conídios do gênero <i>Fusarium</i> : (a) macroconídios; (b) microconídios.	8
Figura 4: Estrutura química das aflatoxinas (AFs) B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ .	11
Figura 5: Estrutura química das ocratoxinas.	13
Figura 6: Estrutura química da FB ₁ e das bases esfingóides.	14
Figura 7: Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (UFC g ⁻¹).	17
Figura 8: Esquema utilizado para identificação de cepa isolada de <i>Aspergillus</i> spp. nos meios de cultivo CYA, CY20S e MEA em duas condições de temperatura (25 °C e 37 °C).	18
Figura 9: Esquema do sistema utilizado para identificação de duas cepas isoladas de <i>Penicillium</i> spp. nos meios de cultivo MEA, CYA e G25N em três condições de temperatura (5 °C, 25 °C e 37°C).	18
Figura 10: Esquema da técnica de triagem de AFB ₁ e OTA nas matrizes analisadas.	20
Figura 11: Níveis de contaminação fúngica das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro, no meio de cultivo DRBC.	23
Figura 12: Frequência dos gêneros fúngicos isolados das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.	24
Figura 13: Densidade relativa das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.	25
Figura 14: Densidade relativa das espécies do gênero <i>Penicillium</i> isoladas das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.	25
Figura 15: Coeficiente de determinação obtido com a curva de calibração dos padrões de AFB ₁ .	26

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Objetivos	02
1.1.1 Objetivo geral	02
1.1.2 Objetivos específicos	02
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A Tilapicultura	03
2.1.1 Alimentação na Piscicultura	04
2.2 Fungos em Alimentos	05
2.2.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	06
2.2.2 Gênero <i>Penicillium</i>	07
2.2.3 Gênero <i>Fusarium</i>	08
2.3 Micotoxinas e Micotoxicoses	08
2.3.1 Aflatoxinas	10
2.3.2 Ocratoxinas	12
2.3.3 Fumonisinias	14
2.4 Bioacumulação em Peixes	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Amostragem	16
3.2 Determinação da Micobiota Contaminante	16
3.3 Isolamento e Identificação Fúngica	17
3.4 Caracterização do Perfil Toxígeno de Espécies Isoladas	18
3.5 Determinação de Aflatoxina B ₁ e Ocratoxina A nas amostras por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	19
3.6 Detecção e Quantificação de Fumonisina B ₁ nas amostras por Técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	20
3.7 Análise Estatística	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Atividade de Água	22
4.2 Níveis de Contaminação	22
4.3 Micobiota Contaminante	23
4.4 Perfil Toxígeno das Cepas Isoladas	26
4.5 Análises Micotoxicológicas das Amostras de Ração	26
4.5.1 Aflatoxina B ₁	26
4.5.2 Ocratoxina A	27
4.5.3 Fumonisina B ₁	27
5 CONCLUSÕES	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

A criação de peixes, ou piscicultura, é uma atividade pecuária e zootécnica das mais antigas, pois já era praticada por povos milenares como os chineses há 4.000 anos antes de Cristo. No Brasil, a prática comercial da piscicultura é considerada recente, tendo ocorrido somente no início do século XX. Desde então vem se desenvolvendo em um ritmo acelerado, levando ao aumento da produção nacional com boa qualidade.

Os peixes são animais vertebrados, aquáticos, tipicamente ectotérmicos e que possuem o corpo fusiforme, os membros transformados em barbatanas ou nadadeiras sustentadas por raios ósseos ou cartilagosos. São dotados de guelras ou brânquias que os capacitam de respirar o oxigênio dissolvido na água.

Muitas espécies de peixes são criadas em condições artificiais não só para alimentação humana, mas também com outras finalidades como a ornamentação. Por serem animais que dependem muito pouca energia para a flutuação, locomoção e manutenção de sua temperatura interna, garantem uma maior conversão da energia contida nos alimentos que consomem em massa corpórea, alcançando uma altíssima produtividade. Por isso, a piscicultura assume importância cada vez maior no panorama do abastecimento alimentar mundial.

A tilapicultura é uma atividade econômica baseada na criação de tilápias em cativeiro e que vem ganhando cada vez mais espaço em todo o mundo. Tilápias são peixes da família Cichlidae, provenientes de água doce, nativos da África e que foram introduzidos no Brasil há muitos anos. São espécies excelentes para criação, já que necessitam de pouco espaço para sua reprodução e crescimento, além de possuírem uma carne de alta apreciação humana e com bom valor de mercado.

Atualmente o mercado oferece uma grande variedade de rações balanceadas e alimentos desidratados criteriosamente formulados e preparados capazes de atender as necessidades nutricionais de um grande número de espécies de peixes. Na produção de rações os ingredientes principais são os cereais, alimentos cultivados e utilizados há milhares de anos na alimentação humana e animal.

Os cereais são alimentos altamente susceptíveis à contaminação por fungos toxígenos: microorganismos multicelulares capazes de produzir substâncias tóxicas denominadas de micotoxinas, nocivas à saúde dos animais que as consomem. Muitas espécies de fungos podem desenvolver-se utilizando grãos como substrato, sendo que as espécies toxígenas mais importantes pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Hoje em dia são conhecidas centenas de micotoxinas, dentre as mais importantes encontram-se as aflatoxinas (AFs), produzidas pelos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*, importante devido ao seu efeito hepatotóxico e carcinogênico; as ocratoxinas, produzidas pelos fungos *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum*, entre outros, importante pelo seu poder nefrotóxico; e as fumonisinas (FBs), produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, especialmente pelas espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, capazes de causar diferentes patologias em diversas espécies de animais. Essas toxinas são de grande preocupação, pois podem afetar os parâmetros produtivos das tilápias, levando a graves perdas econômicas e representando um risco para a saúde animal e humana.

Alterações no crescimento e nas células sanguíneas, hepatomas, icterícia, alterações visuais e morte são alguns dos efeitos que já puderam ser observados em surtos de micotoxicose em peixes alimentados com rações contaminadas em diversos lugares em todo o

mundo. Experimentos realizados na área também revelaram a relação entre a dose de micotoxina ingerida e gravidade das lesões.

Além disso, há possibilidade de ocorrer a presença de mais de uma micotoxina em determinado alimento, podendo levar a formação de efeitos sinérgicos ou aditivos que irão aumentar o risco à saúde. Logo, a identificação da carga fúngica contaminante das rações é de grande importância a fim de preservar a saúde do animal e a da população consumidora desta carne.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Estabelecer a ocorrência de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas e determinar sua presença em amostras de rações fornecidas na alimentação de tilápias provenientes da piscicultura.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a atividade de água (A_a) das amostras
- b) Determinar a frequência da microbiota total estabelecendo a distribuição das espécies toxígenas;
- c) Isolar e identificar espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas;
- d) Caracterizar o perfil toxígeno de espécies isoladas potencialmente produtoras de aflatoxina B₁ (AFB₁) e ocratoxina A (OTA);
- e) Detectar AFB₁, OTA e Fumonisina B₁ (FB₁) presentes nas amostras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Tilapicultura

A aqüicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, que produzem mais de 90% dos produtos desta atividade. No ano de 2007 este setor apresentou um percentual estimado de 44% de toda produção pesqueira mundial (FAO, 2009).

Ao contrário de sistemas terrestres de produção, o setor de aqüicultura é altamente diversificado, incluindo mais de 200 espécies diferentes, entre peixes, crustáceos, moluscos e algas. Os países asiáticos como China, Índia, Indonésia, Japão, Bangladesh e Tailândia contribuíram em 2002 por grande parte da produção global (BRIGGS et al., 2004).

A piscicultura é um ramo específico da aqüicultura voltada para criação de peixes em cativeiro e que, desde 1970, vem apresentando um crescimento maior que o da pesca extrativista. O crescimento médio anual gira em torno de 20 a 30% em todo o mundo (SIQUEIRA, 2004).

Quando foi introduzida no Brasil, na década 1950, a criação era apenas de espécies exóticas, tais como carpa, tilápia e truta, que começaram a ser cultivadas principalmente em tanques de pequenas propriedades. Hoje, na produção nacional encontram-se várias espécies de peixes tropicais e também algumas espécies nativas como o tambaqui, pacu, surubim e outras (GEHLEN; PEIXOTO; VIEIRA, 2007).

As tilápias estão distribuídas em três gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*, englobando mais de cem espécies. São animais originários do continente africano e vivem em água doce: rios, lagos, lagoas e até pequenas represas. Suportam bem às adversidades e, por isso, estão entre os peixes mais cultivados em cativeiro no mundo (FILHO, 2005). Têm hábitos alimentares rudimentares e ingerem uma grande variedade de alimentos naturais, tais como o plâncton (pequenos animais e vegetais), folhas verdes, invertebrados aquáticos, larvas de outros peixes, detritos e matéria orgânica em decomposição. Restos ou subprodutos de atividades agropecuárias, como batata doce, mandioca, milho e frutas, são bem aceitos por esses peixes. No entanto, como o cultivo de tilápias se dá principalmente em regime intensivo, a exploração dos alimentos naturais torna-se inviável devido ao confinamento, sendo necessária a administração de rações balanceadas na dieta destes animais, o que permite também um maior equilíbrio nutricional e melhor resposta zootécnica (BARBOSA, 2007).

Devido as suas características de excelente capacidade reprodutiva, custo de produção muito baixo e filé de grande valor comercial, as tilápias podem ser consideradas as rainhas da piscicultura moderna. Destacam-se não somente pelo bom valor comercial de seu filé, mas por sua versatilidade; seu couro pode ser utilizado na produção de cintos, bolsas e calçados, e sua carne pode constituir preparados de produtos comestíveis, como embutidos e iscas. Já os seus resíduos podem entrar na formulação de rações, possuindo uma ampla aceitação de mercado em todo o mundo e com vasto campo de exportação (FILHO, 2005).

Dentre os fatores indicadores de viabilidade econômica para a produção de tilápias em cativeiro estão: o preço da venda do peixe, a conversão alimentar, a taxa de sobrevivência, o preço dos alevinos (peixes jovens) e, como destaque, o preço da ração, que pode representar mais de 50% dos custos operacionais totais (SILVA et al., 2003).

As excelentes condições ambientais que o Brasil oferece como o clima favorável, a disponibilidade de água doce de boa qualidade e o baixo custo na produção de grãos para a

fabricação de ração, associadas ao manejo adequado dos animais, permitem que a piscicultura nacional seja viável e tenha boa rentabilidade (MOURA, 2006).

Ainda que em franca expansão, a produção nacional de pescado encontra-se voltada para suprir principalmente a demanda interna que tem crescido nos últimos anos. De acordo com um estudo divulgado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010), o consumo *per capita* de pescado no Brasil foi de 9,03 kg/hab. no ano de 2009 e, há uma década, vem apresentando um crescimento acima de 6% ao ano. Enquanto isto, a taxa média de crescimento do consumo das carnes bovina (39,7 kg/hab/ano), de frango (39,6 kg/hab/ano) e suína (13,5 kg/hab/ano) não ultrapassa 2% ao ano (MAPA, 2011).

2.1.1 Alimentação na piscicultura

A alimentação é um importante item na criação de peixes, pois dela depende, em grande parte, o sucesso da criação e os lucros que ela pode proporcionar. Com relação a sua cadeia alimentar, as espécies de peixes podem ser divididas em: peixes de cadeia alimentar curta, abrangendo os consumidores primários, ou seja, herbívoros e que transformam diretamente os vegetais em proteína animal para consumo do homem; peixes de cadeia alimentar intermediária, ou onívoros, que se alimentam de fito e zooplâncton, vegetais e animais encontrados no fundo do tanque; e peixes de cadeia alimentar longa, isto é, os carnívoros, que exigem alimentos com alto teor de proteína animal. Dentre elas, as espécies de cadeia alimentar curta e intermediária são as mais indicadas para as condições brasileiras, porque transformam subprodutos agrícolas e alimentos pobres diretamente em proteína animal, além de proporcionarem altas produções a um baixo custo (ROCHA, 2006).

O objetivo de alimentar os peixes é provê-los, de forma econômica, com uma nutrição adequada para o seu crescimento e perfeito desenvolvimento. Para isto, o emprego de técnicas de alimentação apropriadas e a utilização de alimentos de qualidade e nas quantidades corretas são fundamentais. Dentre os ingredientes utilizados na formulação de rações para peixe temos concentrados protéicos de origem vegetal: farelo de soja, farelo de algodão, farelo de amendoim e farelo de canola; fontes protéicas: farinha de peixe, farinha de carne e ossos, farinha de sangue e leveduras; e fontes energéticas como o milho, sorgo e farelo de arroz. Os peixes, por serem organismos aquáticos, precisam que as rações sejam processadas para reduzirem as perdas de nutrientes, comum na utilização de ração farelada, indicada para alevinos. As outras rações disponíveis são dos tipos peletizada e extrusada (RIBEIRO; GOMIERO; LOGATO, 2005).

A peletização é um processo mecânico que combina umidade, calor e pressão, permitindo que partículas pequenas sejam aglomeradas e originem partículas maiores, ou “*pellets*”, aumentando a eficiência da ingestão do alimento. Quando esta sofre trituração, denomina-se ração triturada. A peletização, no entanto, não é um processo muito viável, pois tem um custo mais elevado de processamento e a sua estabilidade na água dura apenas alguns minutos, enquanto que a extrusada pode durar horas. Esta última é obtida através de um cozimento dos ingredientes sob altas temperaturas e pressão, provocando a gelatinização do amido e a desnaturação das proteínas, com uma maior exposição dos nutrientes à ação digestiva, o que melhora a eficiência alimentar dos peixes (SIMÕES, 2008).

Um dos pontos mais importantes relativos às rações é o nível de proteína bruta contida nas mesmas, pois nas diversas fases de vida os peixes requerem níveis protéicos diferentes para o seu desenvolvimento. Para tilápias, recomenda-se o uso de rações de, pelo menos, 32% no início do cultivo podendo chegar até 40% nos sistemas mais intensivos (KUBITZA, 2006).

Além da importância de seguir as recomendações nutricionais adequadas para cada espécie e fase do desenvolvimento, é imprescindível que se faça uso de produtos de

qualidade, cujos fabricantes façam um controle sanitário das matérias-primas básicas de origem vegetal utilizadas no preparado das rações, afim se reduzirem os problemas com micotoxinas devido à susceptibilidade destes alimentos aos fungos toxígenos (HASHIMOTO et al., 2003).

2.2 Fungos em Alimentos

Os fungos são organismos com grandes variações em suas estruturas, podendo ser uni ou multicelulares, de tamanhos microscópicos ou bem maiores, como os cogumelos. Os microorganismos multicelulares produzem estruturas filamentosas microscópicas e são frequentemente chamados de bolores, enquanto as leveduras são os fungos unicelulares. Os bolores têm grande importância nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Alguns deles são utilizados para fins de produção de medicamentos como antibióticos e na elaboração de produtos alimentícios como molhos, queijos, entre outros. Contudo, podem promover a deterioração de diversos materiais e alimentos, além de causar doenças em animais, plantas e nos seres humanos (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 2004).

A contaminação fúngica dos produtos agrícolas, principalmente os cereais e sementes oleaginosas pode ocorrer durante o crescimento, colheita, estocagem ou processamento do alimento. Os ingredientes vegetais contaminados com esporos fúngicos irão também contaminar o produto final e, caso a temperatura e a umidade do ambiente sejam propícias ao crescimento destes microorganismos, as micotoxinas podem ser conseqüentemente produzidas por cepas toxígenas (SPRING; FEGAN, 2006).

As micotoxinas representam um grande desafio para a indústria de alimentos dado a dificuldade de se obter insumos livres destes produtos tóxicos. Estima-se que 25% dos alimentos cultivados no mundo estão contaminados com micotoxinas (FAO, 1999). Como alternativas de controle são propostas diferentes formas para o manejo deste problema, sendo o cuidado com o alimento a melhor contribuição para sua inocuidade, repercutindo em uma melhor nutrição e menor número de enfermidades.

É importante que os produtores percebam que as boas práticas agrícolas (BPA) constituem a principal linha de defesa contra a contaminação de cereais com fungos toxígenos, seguido pela implementação de boas práticas de fabricação (BPF) durante a manipulação, armazenamento, processamento e distribuição dos cereais para a alimentação humana e animal. Os procedimentos devem servir para tratar adequadamente, através da segregação, do acondicionamento, retirada ou desvio, cereais que possam representar uma ameaça para a saúde humana ou animal. As autoridades nacionais devem apoiar a investigação sobre os métodos e técnicas para evitar a contaminação de fungos no campo e durante a colheita e o armazenamento, incluindo técnicas de secagem, manutenção de instalações para um armazenamento adequado e cuidado para não expor os grãos ou sementes à umidade durante o transporte e comercialização (FAO, 2003).

Doenças crônicas adquiridas pela exposição a esses contaminantes podem ser prevenidas ou reduzidas através da conscientização dos produtores de alimentos e de ações permanentes da vigilância sanitária (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002). Conhecer as condições que afetam o crescimento dos fungos e sua capacidade de produzir toxinas é fundamental para que medidas efetivas de profilaxia sejam tomadas. Sabe-se que quando o crescimento dos fungos é controlado decresce a produção de micotoxinas indiretamente. Contudo, a presença de fungos em um alimento não implica, necessariamente, na presença de micotoxinas. Isto porque nem todas as cepas de fungos reconhecidamente toxígenas são capazes de produzi-las. São necessários nutrientes adequados e um conjunto de fatores externos como luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar e umidade do substrato

que irão influenciar no crescimento fúngico e na classe de micotoxinas que será produzida (OGA, 2003).

Dentre as principais espécies de fungos produtores de micotoxinas encontram-se aquelas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Este último ocorre principalmente em nível de campo, contaminando o alimento antes da colheita. Em contrapartida, os outros dois gêneros costumam acometer os grãos durante seu armazenamento. Neste último caso, o controle da umidade dos grãos desde sua recepção no armazém até seu consumo ou utilização na indústria pode ser uma medida eficaz contra a produção de micotoxinas (ARELLANO, 2003).

2.2.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* possui mais de 200 espécies, e é comumente isolado do solo, restos de plantas e em ambientes fechados. Algumas espécies podem desenvolver estruturas de resistência conhecidas como esclerócios, que funcionam como forma de sobrevivência e que contêm uma grande quantidade de metabólitos tóxicos. São fungos de extrema importância devido ao fato de serem facilmente isolados de alimentos e produtos alimentícios de diversos tipos, resistindo a altas temperaturas e à baixa atividade de água (PITT; HOCKING, 1997).

A classificação e identificação de *Aspergillus* spp. baseia-se nas características morfológicas, fisiológicas e reprodutivas observadas nos cultivos em meios gerais e seletivos conforme literatura especializada (PITT; HOCKING, 1997). Em linhas gerais, caracteriza-se pela formação de conidióforos, que são estipes compridas e de paredes grossas com ápice proeminente denominado vesícula. As vesículas são, em sua maioria, grandes e esféricas, podendo também ser alongadas ou mais discretas em algumas espécies. Estas irão anexar as fiálides diretamente (unisseriados) ou indiretamente, através de células de apoio denominadas de métulas (bisseriados) que crescem simultaneamente (Figura 1).

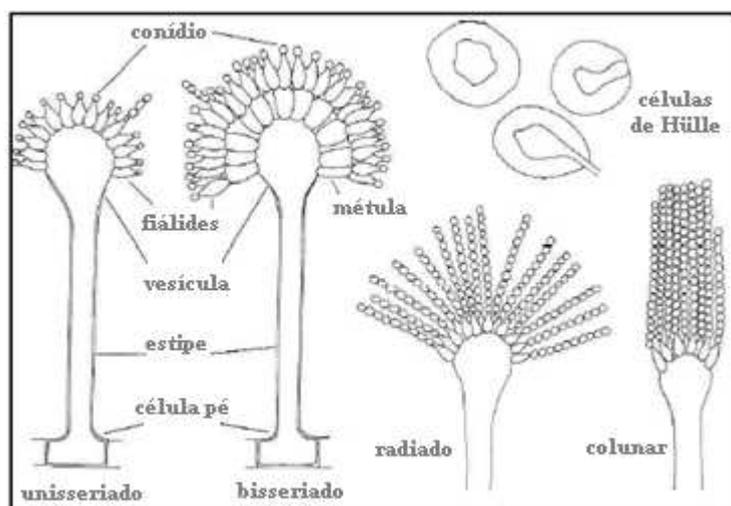


Figura 1: Características morfológicas do gênero *Aspergillus*.

Fonte: SAMSON et al. (2000)

Em climas tropicais e subtropicais, o gênero *Aspergillus* predomina. Algumas espécies preocupam por serem patogênicas ou produtoras de micotoxinas, outras são importantes na elaboração de produtos alimentícios fermentados, na produção de ácidos orgânicos e enzimas (SAMSON et al., 2000).

Dentre os fungos filamentosos, o *Aspergillus* é o gênero mais comumente isolado em infecções invasivas, podendo acometer quase todos os órgãos do corpo humano. A imunossupressão do indivíduo é o principal fator predisponente ao desenvolvimento de infecções oportunistas. Estados alérgicos e toxicoses também podem ocorrer como consequência da aspergilose (HO; YUEN, 2000).

2.2.2 Gênero *Penicillium*

Este é, certamente, o gênero mais diverso em termos de número de espécies e extensão de habitats. São pouco exigentes no aspecto nutricional, podendo crescer em quase todos os tipos de ambientes com diferentes características físico-químicas como atividade de água, temperatura, pH e potencial-redox. As espécies de *Penicillium* podem ser consideradas, em sua maioria, como fungos de solo associados com alimentos tais como cereais e frutas. São contaminantes comuns em vários substratos e são conhecidas como potenciais produtoras de micotoxinas, por isso é de fundamental importância sua correta identificação como possível contaminante do alimento (SAMSON et al., 2000).

A taxonomia de *Penicillium* spp. é uma tarefa complexa, uma vez que as espécies comumente encontradas nos alimentos apresentam a cor e a aparência da colônia muito similares, além das estruturas reprodutivas serem pequenas e, frequentemente, efêmeras. Este problema pode ser minimizado quando o isolamento é feito sob condições de meio e temperatura adequados e a análise é feita em curto espaço de tempo (sete dias), fazendo com que as estruturas microscópicas e o aspecto das colônias sejam melhores (PITT; HOCKING, 1997).

As colônias de *Penicillium* spp. são filamentosas, com textura aveludada ou algodonosa e de rápido crescimento. Sua cor é inicialmente branca, tornando-se azul esverdeado, verde acinzentado, verde oliva, até amarelado ou rosado com o tempo. O reverso da placa é geralmente pálido a amarelado. Microscopicamente, apresentam hifas hialinas septadas, conidióforos simples ou ramificados, fiálides e conídios. As métulas são ramos secundários que se formam a partir dos conidióforos de algumas espécies de *Penicillium*, e que transportam as fiálides (Figura 2).

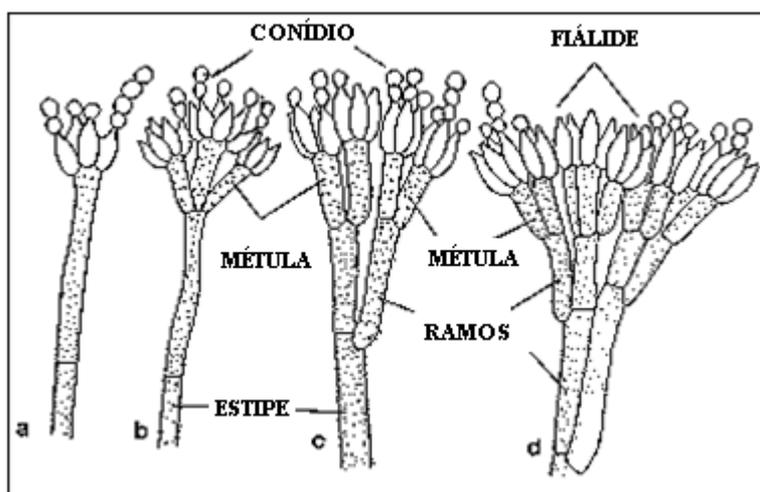


Figura 2: Estrutura morfológica e tipos de conidióforos de *Penicillium* spp: (a) monoverticilado (b) biverticilado, (c) terverticilado, (d) quaterverticilado.

Fonte: SAMSON; REENEN-HOEKSTRA; VAN-OORSCHOT (1984).

Um dos aspectos mais importantes na classificação destes fungos em nível de sub-gênero é observação da sua estrutura quanto ao número de ramificações do conidióforo. Quando não há ramificação, o fungo é denominado de monoverticilado, quando há uma, duas ou três, é chamado de bi, ter ou quaterverticilado, respectivamente. A organização das fiálides nas pontas dos conidióforos é muito típica. Os conídios são redondos, unicelulares, e visualizados como cadeias nas pontas das fiálides (LARONE, 2002).

Apesar das espécies patogênicas aos seres humanos serem raras, algumas doenças oportunistas como a ceratite micótica, otomicose, endocardite e infecções pulmonares já foram relatadas, principalmente em pacientes imunossuprimidos (QUADROS, 2008).

2.2.3 Gênero *Fusarium*

As espécies de *Fusarium* estão extensamente distribuídas pelos solos. São a maior causa de podridão de frutas e vegetais armazenados, geralmente contaminando o alimento antes da colheita. Assim como são fitopatógenos, estes fungos também são agentes causadores de infecções superficiais e sistêmicas em humanos. Considerados como organismos oportunistas, desenvolvem-se em indivíduos imunossuprimidos, especialmente pacientes transplantados. Infecções cutâneas e pulmonares, sinusite, endocardite, infecções disseminadas e fungemia têm sido relatadas como conseqüências da contaminação por *Fusarium* spp. (GUARRO et al., 2000; HOOG et al., 2000; ROLSTON, 2001).

Este gênero também é considerado como um dos maiores produtores de micotoxinas, assim como *Aspergillus* e *Penicillium*. A ingestão de grãos contaminados por estas toxinas podem provocar sintomas alérgicos ou ser cancerígeno no consumo a longo prazo (PITT, 2000).

A taxonomia de *Fusarium* spp. é baseada em numerosas características morfológicas, que incluem a forma dos macroconídios, a presença ou ausência de microconídios, sua forma e disposição em cadeia ou não (Figura 3).

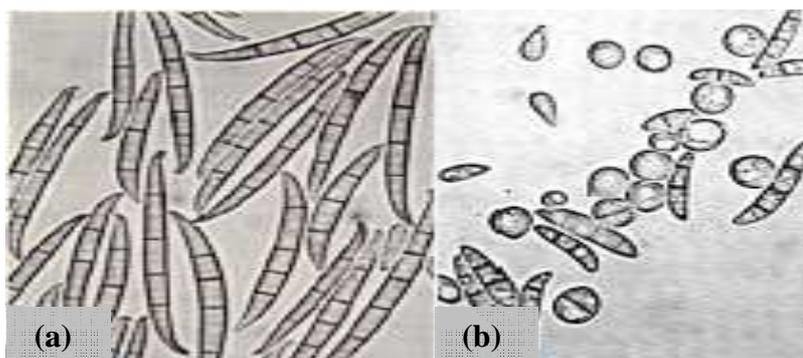


Figura 3: Conídios do gênero *Fusarium*: (a) macroconídios; (b) microconídios.

Fonte: NELSON; TOUSSOUN; MARASAS (1983).

Ocasionalmente pode ocorrer algum problema de mutação ou no crescimento da cultura e o fungo passa a produzir apenas microconídios. Nestes casos, algumas confusões com outros gêneros oportunistas podem acontecer. Além destas características primárias, o tipo de conidióforo e a presença ou ausência de esporodóquios (conidióforos em feixes densos) também são de interesse. Algumas características macroscópicas, tais como a textura das colônias, pigmentação e taxa de crescimento podem ser úteis se forem determinadas por métodos padronizados (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

2.3 Micotoxinas e Micotoxicoses

Os efeitos indesejáveis causados pela intoxicação decorrente da ingestão de alimentos contaminados são conhecidos há séculos, porém as pesquisas relacionadas ao crescimento fúngico nos alimentos e à produção de micotoxinas são relativamente recentes (BENNETT; KLICH, 2003).

A história da micotoxicologia moderna é marcada por um surto de mortes inexplicáveis em milhares de aves (principalmente perus) no Reino Unido em 1960. O caso ficou conhecido em todo o mundo como a Doença “X” dos perus. Na investigação determinaram que o surto ocorreu devido à contaminação do amendoim importado da África e Brasil utilizado na fabricação da ração destes animais. Foi encontrada uma substância fluorescente produzida pelo fungo *A. flavus* no alimento, chamada inicialmente de “*A. flavus toxin*” originando a palavra aflatoxina (LOURENÇO, 2008).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e que causam efeitos adversos tais como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, nefrotoxicidade e imunossupressão provocando diversas patologias e grandes perdas econômicas agropecuárias (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Atualmente são conhecidas centenas de micotoxinas, produzidas por diversos fungos. As mais relevantes podem ser divididas nos grupos das AFs, produzidas principalmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas, produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as fusariotoxinas como os tricotecenos, zearalenona e FBs, produzidas por algumas espécies do gênero *Fusarium* (MALLMANN; DILKIN, 2007). A Tabela 1 demonstra os fungos relacionados à produção das principais micotoxinas, os substratos mais acometidos por estes e as condições favoráveis à contaminação.

Tabela 1: Principais micotoxinas, fungos produtores, alimentos mais contaminados e condições favoráveis para sua ocorrência.

Micotoxina	Fungo que mais produzem	Alimentos mais propensos à contaminação	Principais fatores da produção
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	Amendoim, castanhas, nozes, milho e cereais em geral.	Armazenamento em condições inadequadas.
Zearalenona	<i>Fusarium</i>	Milho e cereais de inverno.	Temperaturas frias associadas à alta umidade.
Fumonisinias	<i>Fusarium</i>	Milho e cereais de inverno.	Estação seca seguida de alta umidade e temperaturas moderadas.
Tricotecenos	<i>Fusarium</i>	Milho e cereais de inverno.	Temperatura fria, alta umidade e problemas no armazenamento.
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Milho e grãos estocados.	Deficiências no armazenamento.

Fonte: MALLMANN; DILKIN (2007).

O quadro clínico-patológico tóxico ocasionado por micotoxinas, onde as vias de transmissão podem ser pela ingestão, inalação ou por contato é denominado de micotoxicose. A micotoxicose primária é o resultado da intoxicação provocada pela ingestão direta de alimentos em que foram produzidas as micotoxinas, enquanto que a micotoxicose secundária ocorre pela ingestão de leite, ovos, carnes e produtos derivados que contenham essas substâncias e sejam oriundos de animais que se alimentaram com ração contaminada (SILVA et al., 2005).

Devido ao fato de apresentar sintomas bastante inespecíficos, o diagnóstico de micotoxicose torna-se muitas vezes dificultado. Os sintomas gerais (reduções de desempenho e queda imunológica) são vistos quando a intoxicação ocorre em níveis baixos a moderados e por período crônico, enquanto que os sintomas causados por altos níveis de toxinas são mais característicos, porém de ocorrência mais rara. Outras complicações no diagnóstico podem ocorrer por causas secundárias decorrentes de doenças oportunistas relacionadas com a supressão do sistema imune após exposição às micotoxinas. A experiência com animais afetados combinada com a análise histológica fornece o diagnóstico mais preciso das micotoxicoses (SPRING; FEGAN, 2006).

Os inúmeros efeitos resultantes da contaminação por micotoxinas nas rações para peixes dependem de diversos fatores que incluem a potência da micotoxina, o efeito sinérgico provocado pela possível presença de mais de uma toxina, a dose ingerida, espécie do animal, estado de saúde e estágio de vida. A exposição aguda pode resultar em um aumento de mortalidade e grandes perdas para o piscicultor, enquanto a exposição crônica leva a problemas como redução do crescimento, baixa eficiência alimentar, infecções e neoplasia. Por isto é extremamente importante que o piscicultor faça uso de rações com ingredientes de alta qualidade, reconheça os sintomas de micotoxicoses, analise e identifique o agente responsável pelo problema (SMITH; HENDERSON, 1991).

2.3.1 Aflatoxinas

As AFs são metabólitos fúngicos secundários, produzidos especialmente por cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, comumente encontrados em milho, trigo, amendoim, nozes, soja, semente de algodão, dentre outros. Grande parte da produção das AFs ocorre durante o armazenamento dos alimentos e sua concentração aumenta ao longo do tempo, caso as condições climáticas sejam propícias (GOLOB, 2007). Quando o alimento apresenta aproximadamente 25% de umidade em um ambiente com umidade relativa do ar de, pelo menos, 83% e temperatura de 30°C, o gênero *Aspergillus* encontra-se em ótimas condições para a produção de AFs (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002).

Hoje são conhecidos diversos compostos tóxicos de AFs que diferem entre si por pequenas variações em suas estruturas moleculares, sendo os mais importantes as AFs B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 4). São assim denominadas por terem a capacidade de fluorescer sob luz ultravioleta (365 nm), emitindo a cor azul ou verde (*blue* e *green* na língua inglesa, de onde vêm as letras “B” e “G”).

Quimicamente elas possuem estrutura heterocíclica, com um núcleo cumarínico ligado a um sistema bi-furânico. As moléculas de AFs da série B apresentam ainda um anel ciclopentanona, enquanto as AFs da série G possuem um anel lactona (OGA, 2003). A diferença estrutural das AFs B₁ e G₁ para as AFs B₂ e G₂ é a presença da ligação dupla 8,9 vinil éter no anel terminal do furano das duas primeiras, o que as torna mais tóxicas que as outras (JAIMEZ et al., 2000).

Algumas características físico-químicas das AFs são: ponto de fusão próximo de 269°C, sensibilidade à luz ultravioleta e ao tratamento com hipoclorito, pouca solubilidade em água e inativação por autoclavação em presença de amônia (MALLMANN; DILKIN, 2007).

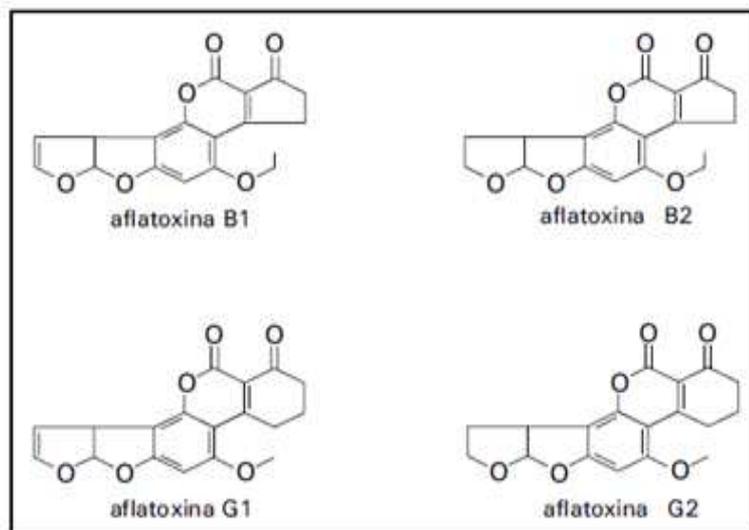


Figura 4: Estrutura química das aflatoxinas (AFs) B₁, B₂, G₁ e G₂.

Fonte: FREIRE et al. (2007).

Devido a sua prevalência entre as micotoxinas e por ser considerado o agente natural mais carcinogênico que existe, a AFB₁ é a mais importante micotoxina, classificada pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer) como carcinógeno de classe 1 (IARC, 1993).

Amplamente encontrada em concentrações significativas nos ingredientes de rações animais, a AFB₁ após ser ingerida é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, entrando no sistema porta-hepático e sendo transportada para o fígado, onde é biotransformada. A biotransformação do composto original (AFB₁) pode ocorrer por diferentes processos. Os compostos derivados que passaram pelo processo de O- dimetilação são excretados pela urina e pela bile e, subsequentemente, nas fezes. Outros conjugados hidrossolúveis e os adutos de moléculas B₁, resultantes dos processos de hidratação e epoxidação da AFB₁ respectivamente, e os metabólitos não conjugados são direcionados, em geral, para o sistema circulatório sanguíneo e tem distribuição sistêmica, tendo efeito imunossupressor, teratogênico, carcinogênico, mutagênico, entre outros. Eventualmente, ao passar pelo processo de hidroxilação, a AFB₁ é transformada em aflatoxina M₁ (AFM₁), que são resíduos transferidos para o leite e aflatoxina Q₁ (AFQ₁), transferido para ovos e carnes. A diferença da susceptibilidade entre raças e espécies e em diferentes tecidos irá refletir no processo de detoxificação e excreção destes compostos não tóxicos. Geralmente as toxinas encontradas em produtos de origem animal são metabólitos detoxificados e sua concentração corresponde a uma fração da micotoxina original presente na ração. Por essa razão, a toxicidade crônica é a principal preocupação com as micotoxinas e seus derivados nos produtos de origem animal (BIEHL; BUCK, 1987; OGA, 2003).

As AFs foram as primeiras micotoxinas investigadas na aquicultura. O primeiro caso de aflatoxicose em peixes foi relatado em maio de 1960, quando um surto de hepatomas atingiu incubadoras de truta arco-íris em Idaho, nos Estados Unidos. A causa foi atribuída ao algodão mofado utilizado como ingrediente da ração dos animais acometidos (SANTACROCE et al., 2008). Outros surtos de aflatoxicose em peixes foram descritos então

na Alemanha (WUNDER; KORN, 1982), México (RUIZ-PEREZ et al., 1984) e Dinamarca (RASMUSSEN et al., 1986).

A truta arco-íris parece ser uma das espécies de peixe mais sensíveis à presença de AFB₁ nas rações. Enquanto o nível mínimo prejudicial para as tilápias chega a 1,8 mg/kg de ração e para o bagre-do-canal fica cerca de 1,0 mg/kg, as trutas arco-íris sofrem com os efeitos da AFB₁ a partir de 0,4 µg/kg. A dose letal (LD₅₀) de AFB₁ em truta foi estimada em 0,8 mg/kg de peso vivo (KUBITZA, 2010).

Em uma investigação sobre o amarelamento de tilápias em fazendas comerciais nas Filipinas, Cagauan et al. (2004) concluíram que o problema foi resultado da contaminação por AFs de rações mofadas que foram fornecidas a estes animais. No experimento, as rações utilizadas na dieta de tilápias foram inoculadas com cepas de *A. flavus*. Os animais foram alimentados com ração mofada nas proporções de 10, 50 ou 100%. As concentrações finais de AFB₁ variaram de 5µg/kg a 115,34µg/kg de ração. Os sinais clínicos observados nos peixes que tiveram a ração contaminada foram: opacidade nos olhos, catarata e cegueira, lesões de pele, podridão na cauda e nadadeiras, amarelamento da superfície do corpo, nado anormal e redução do apetite. A histologia revelou também deterioração progressiva do fígado.

Outro estudo sobre intoxicação de tilápias com dietas contendo AFB₁ nas concentrações de 0,25; 2,5; 10 ou 100 mg/kg de ração demonstrou que estes animais também apresentaram dificuldades com ganho de peso, problemas de redução das células sanguíneas e aparecimento de lesões hepáticas, podendo desencadear na morte do animal. Os sintomas eram agravados conforme a dose administrada e os resultados indicaram que os efeitos agudos ou subcrônicos eram improváveis nas dietas de 0,25 mg/kg ou menos (TUAN et al., 2002).

Devido aos efeitos nocivos causados no organismo dos indivíduos expostos às AFs, em alguns países as autoridades reguladoras fixaram limites máximos destas em alimentos e produtos animais. No Brasil, a Portaria nº 07 de 9/11/1988 (MAPA, 1988) que regulamentava sobre os níveis máximos permitidos de AFs em alimentos destinados à alimentação animal (50µg/kg de matérias-primas ou rações) encontra-se revogada pela Instrução Normativa nº 30 de 5/8/2009 (MAPA, 2009) que não faz referência a estas substâncias.

2.3.2 Ocratoxinas

As ocratoxinas são um grupo de micotoxinas compostas por uma estrutura isocumarínica ligada ao aminoácido L- β- fenilalanina (Figura 5) produzidas por diferentes fungos, sobretudo o *A. ochraceus* e o *P. verrucosum*, podendo ser encontrados em cereais, amendoim, especiarias, uvas secas, entre outros (GOLOB, 2007).

Dentre as ocratoxinas conhecidas, apenas a OTA apresenta relevância toxicológica. Sua produção é otimizada quando o *P. verrucosum* encontra-se em regiões de temperaturas mais baixas (4° C a 31° C), comparado a faixa ótima de temperatura para *A. ochraceus* (12° C a 37° C). Enquanto o primeiro usa como substrato principalmente grãos de milho e trigo, o segundo prefere sementes oleaginosas como o amendoim e a soja para sua nutrição (LIM; WEBSTER, 2001).

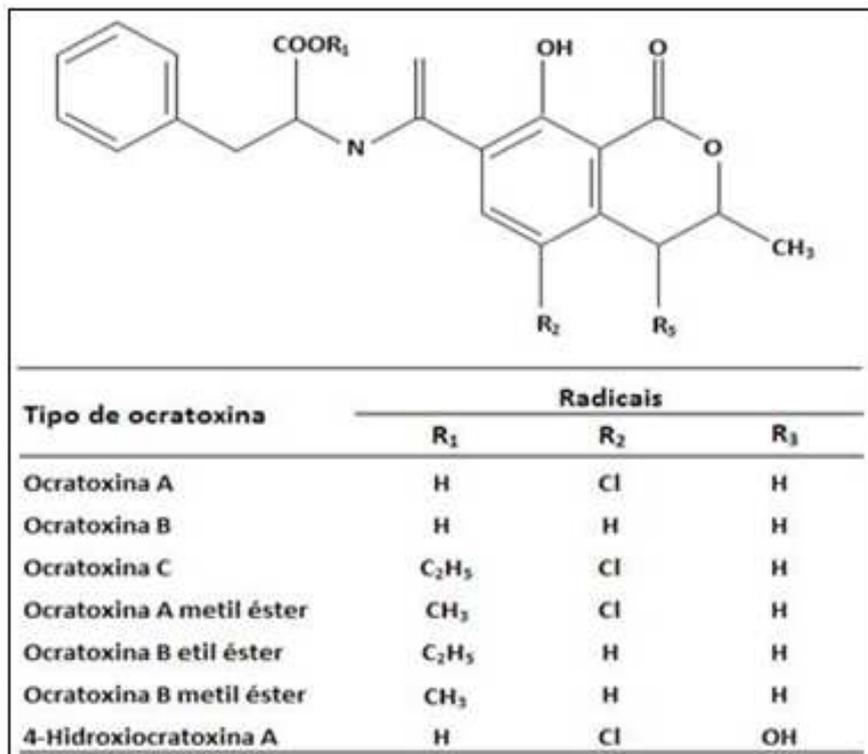


Figura 5: Estrutura química das ocratoxinas.

Fonte: MALLMANN, DILKIN (2007).

Após ser absorvida, ao longo do trato gastro-intestinal, a OTA cai na circulação sanguínea onde se adere a proteínas e outras estruturas macromoleculares. Em seguida, ela é transferida principalmente para os rins, músculos, fígado e tecido gorduroso. Sua biotransformação em moléculas atóxicas pode ocorrer em diferentes órgãos por reações de hidrólise produzindo, sobretudo, as ocratoxinas α e L-fenilalanina. A eliminação dos derivados da OTA ocorre por via urinária e, principalmente, pelo suco biliar, apresentando altos índices de reabsorção intestinal. Seu efeito tóxico principal está relacionado à inibição da produção de proteínas devido à competição entre a fenilalanina presente na estrutura da micotoxina e a enzima fenilalanina-tRNA sintetase, de suma importância no processo de iniciação da cadeia protéica. Secundariamente, afeta a codificação de RNA mensageiro responsável pela produção de fosfoenolpiruvato carboxinase, uma enzima fundamental na gliconeogênese, alterando o metabolismo de carboidratos no córtex renal. Consequentemente há graves lesões nos néfrons, ocasionando a disfunção renal, característica da intoxicação por OTA (MALLMANN; DILKIN, 2007).

Pesquisas com animais de laboratórios têm apontado tratar-se de uma micotoxina de atividade nefrotóxica, cancerígena e teratogênica. Segundo a IARC, a OTA pode também estar associada ao desenvolvimento de câncer no trato urinário em humanos cronicamente expostos a alimentos contaminados com essas substâncias, e por isso encontra-se classificada dentro do grupo 2B, como possível carcinógeno humano com evidências em animais (IARC, 1993; KAWASHIMA, 2004).

Os efeitos tóxicos da OTA também têm sido demonstrados em peixes de diferentes espécies. Shalaby (2004) utilizou concentrações de 0,4 e 0,6 mg de OTA/kg de ração na dieta das tilápias e os sintomas observados foram: redução na contagem de eritrócitos, na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito e o aumento acentuado das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) no sangue, que confirmam os danos teciduais e nas células sanguíneas causados pela ação tóxica desta

micotoxina. Em outro estudo com intoxicação de bagres-do-canal alimentados com dietas de 2 e 4 mg de OTA/kg de ração os autores observaram distúrbios do crescimento dos animais, lesões renais e aumento da susceptibilidade à infecção bacteriana, além de alterações nas células sanguíneas (MOUSA; KHATTAB, 2003).

2.3.3 Fumonisin

As FBs são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, principalmente pelas espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, de distribuição mundial e comumente encontradas em milho e produtos derivados. Estas espécies são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura (5°C a 40°C), sendo o intervalo entre 20°C e 25°C ótimo para a produção de fumonisin (SANTOS, 2004).

Em 1988 estas micotoxinas foram descobertas e, desde então, já foram identificadas diversas substâncias pertencentes a este grupo, sendo a FB₁ a de maior importância (VOGEL; JIMÉNEZ, 2006).

Quimicamente as FB_s possuem a estrutura molecular de um amino poliálcool tricarboxilado altamente polar (FARIAS; ROCHA; COSTA, 2002) e se assemelham às bases esfingóides (esfinganina e esfingosina), substâncias envolvidas no metabolismo dos esfingolípídeos que compõem as membranas celulares (Figura 6).

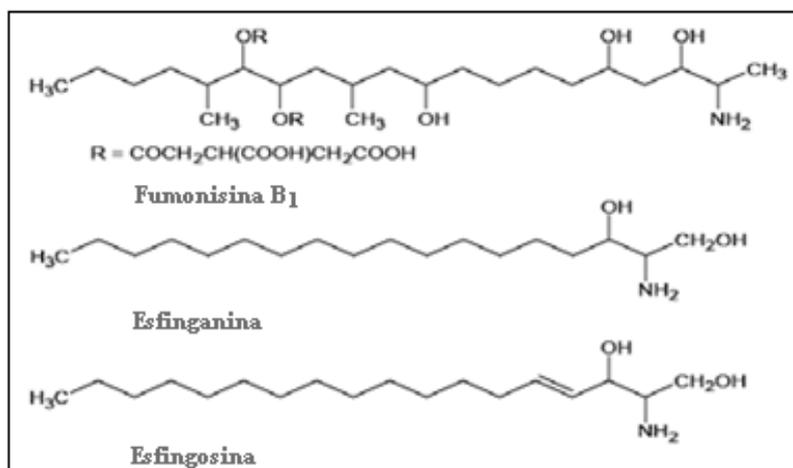


Figura 6: Estrutura química da FB₁ e das bases esfingóides.

Fonte: GRIESSLER, ENCARNAÇÃO (2009).

Acredita-se que a FB₁ possa atuar como inibidora de uma enzima-chave denominada ceramida sintetase que age sobre as esfinganinas, precursoras da ceramida presente no complexo esfingolípídico. A inibição da biossíntese deste componente gera alterações nos fatores de crescimento das células e nas interações intra e intercelular. O consequente excesso de esfinganinas livres está associado a efeitos hepato e nefrotóxicos e pode ser observado no soro e urina de indivíduos expostos à FB₁, sendo aquelas, portanto, utilizadas como biomarcadores (FREIRE et al., 2007; GRIESSLER; ENCARNAÇÃO, 2009).

Alguns efeitos maléficos da ingestão de alimentos contaminados com FBs já puderam ser observados: danos principalmente nos rins e fígado de animais domésticos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos e leucoencefalomalacia em equinos. Além disto, pertencem ao grupo 2B da IARC por haver indícios de sua ligação com o câncer esofágico em humanos (IARC, 1993; BOLGER et al., 2001).

Sua importância como agente tóxico em peixes ainda é pouco entendida devido à carência de trabalhos publicados na área, mas alguns experimentos já comprovaram a toxicidade das FBs nestes animais. Alterações no crescimento do animal e no hematócrito e o aumento da taxa de esfinganina / esfingosina (SA/SO) puderam ser observados em tilápias com dieta adicionada de FB₁ em diferentes concentrações. Esses efeitos adversos também foram descritos em bagres, que se mostraram mais sensíveis às FB₁ que as primeiras. Em ambos os casos a intoxicação não demonstrou efeito letal, sugerindo que os peixes são, em geral, mais resistentes às micotoxinas que outros animais já estudados (YILDIRIM et al., 2000; TUAN et al, 2003).

2.4 Bioacumulação em peixes

Bioacumulação é um termo geral que descreve os processos de absorção e retenção de um contaminante químico no organismo dos animais e que pode ocorrer por diversas rotas (respiração, dieta, via dérmica, etc.), a partir de qualquer fonte no ambiente onde tais substâncias estão presentes. Os peixes, por exemplo, assimilam algumas substâncias químicas procedentes de sua alimentação, ou ainda através da ingestão de material presente em suspensão nas águas. Em muitos casos, tais substâncias não são metabolizadas pelo animal e acabam se acumulando nos tecidos, nos quais sua concentração aumenta com o tempo (TARDIVO, 2004; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Devido a bioacumulação de AFs na musculatura de peixes já ter sido comprovada (PLAKAS et al., 1991; HUSSAIN; WILSON, 1993), o monitoramento da qualidade de todo o processo de obtenção das rações é de extrema importância, pois não se pode descartar a repercussão da contaminação por micotoxinas na dieta de humanos (HASHIMOTO, 2003). Assim, isto se torna não só uma preocupação para a saúde animal, mas também para a saúde das populações que consomem alimentos de origem animal, especialmente aqueles onde a dieta é à base de pescado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises ocorreram no laboratório do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, contando com o apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ e bolsa-auxílio da CAPES.

3.1 Amostragem

A coleta das amostras foi realizada no período entre setembro de 2009 e agosto de 2010, em propriedades produtoras de tilápias localizadas nas regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro. Foram coletadas 60 amostras de rações comerciais (30 amostras de cada região) formuladas para atender às exigências nutricionais de peixes onívoros criados em cativeiro, especialmente para o cultivo das tilápias nas fases de alevinagem, crescimento ou engorda, nos tipos: triturada (2), peletizada (2) ou extrusada (56). A aquisição das amostras ocorreu por conveniência de facilidade para obtenção das mesmas.

As amostras foram retiradas de embalagens comerciais de 25 Kg, armazenadas nas propriedades. A amostragem foi feita em três diferentes pontos da embalagem: fundo, meio e superfície, obtendo-se, em média, 1 Kg em cada amostra representativa.

Após recepção no laboratório as amostras foram cadastradas, com descrição do lote, procedência, fabricante, tipo de processamento e data da coleta. Em seguida, tiveram sua atividade de água (A_a) aferida com o uso do aparelho AquaLab[®] modelo CX-2T. Para isto foram necessários alguns cuidados prévios: o equipamento foi estabilizado em ambiente climatizado e calibrado com água destilada. Posteriormente, as amostras foram colocadas em quantidade suficiente para preencher 2/3 das cápsulas utilizadas para leitura e tiveram sua A_a mensurada. Só então as amostras foram completamente trituradas, homogeneizadas e quarteadas obtendo-se duas sub-amostras para as análises (prova e contra-prova), as quais foram armazenadas a 4°C até o seu uso.

3.2 Determinação da Micobiota Contaminante

Para a determinação da micobiota total utilizou-se o método de diluição decimal em placa descrito por Pitt; Hocking (1997) que consiste em homogeneizar durante 2 minutos 10 g de cada amostra com 90 mL de água peptonada 0,1% estéril em Erlenmeyer também estéril, obtendo a diluição 10^{-1} . A partir da solução obtida foram realizadas diluições seriadas 1:10, colocando 1 mL desta em 9 mL do mesmo diluente, obtendo as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas, em triplicata, nos meios de cultivo dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC), agar dicloran glicerol 18% (DG18) e meio Nash Snyder agar (NSA), conforme demonstra a Figura 7.

Os meios utilizados foram escolhidos devido a algumas características, tais como:

- DRBC → inibir o crescimento bacteriano sem afetar o crescimento fúngico, promover o crescimento de fungos relevantes nos alimentos, suprimir o crescimento de fungos do solo.
- DG18 → estimular o crescimento de fungos xerofílicos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.
- NSA → estimular o crescimento de fungos do gênero *Fusarium*.

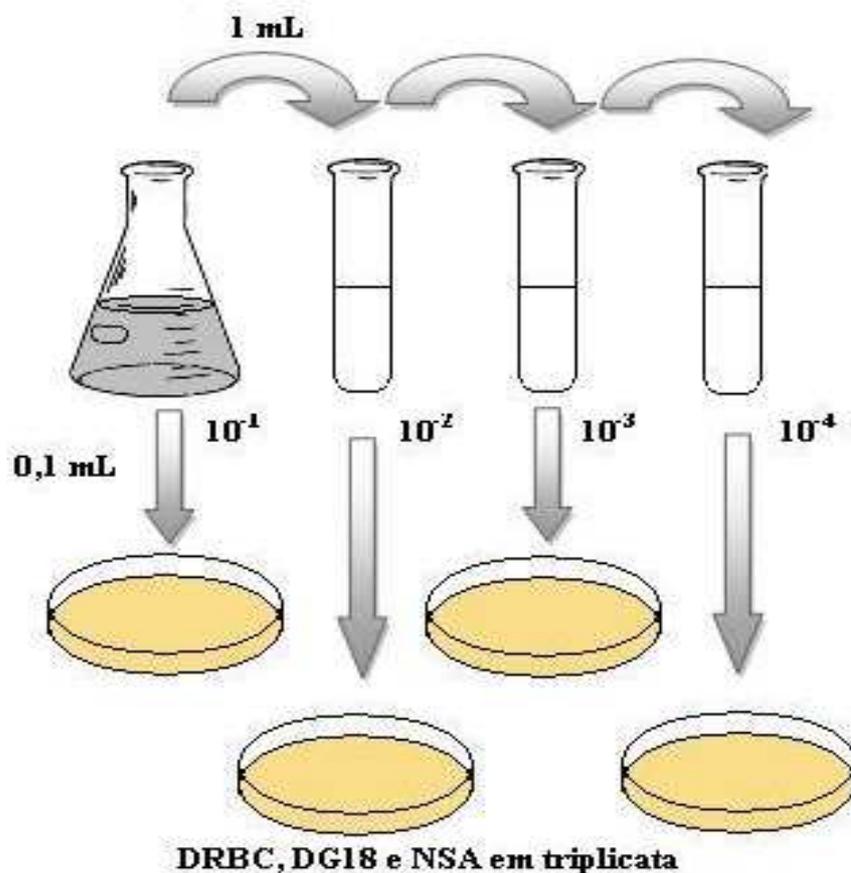


Figura 7: Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (UFC g^{-1}).

As placas foram incubadas durante 7 dias a 25° C em estufas microbiológicas com temperatura controlada. Em seguida, foi realizada a contagem em UFC g^{-1} (unidades formadoras de colônias por grama) a partir de cada amostra nas placas que continham entre 10-100 UFC g^{-1} . Foram calculadas as frequências de distribuição de cada gênero fúngico e das espécies dentro dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

3.3 Isolamento e Identificação Fúngica

Ao final do período de incubação, as colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* foram subcultivadas em tubos inclinados de agar extrato de malte (MEA) e novamente incubadas para permitir seu desenvolvimento com posterior identificação em nível de espécie. As demais colônias foram identificadas em nível de gênero segundo Samson et al. (2000) de acordo com suas características macro e microscópicas.

Depois de isoladas, as cepas dos fungos foram finalmente identificadas. As espécies de *Aspergillus* foram identificadas seguindo a chave taxonômica de Klich (2002), baseada na sementeira em três meios de cultivo: agar Czapek extrato de levedura (CYA), agar Czapek extrato de levedura sacarose a 20% (CY20S) e MEA. Para isto, utilizou-se uma suspensão de conídios de cada cepa em agar semi-sólido, e que foi inoculada em picada, em três pontos equidistantes, nos meios de cultivo com auxílio de uma alça de platina. As placas foram

incubadas por 7 dias em estufas microbiológicas sob duas condições de temperatura: 25° C e 37° C, como pode ser observado na Figura 8.

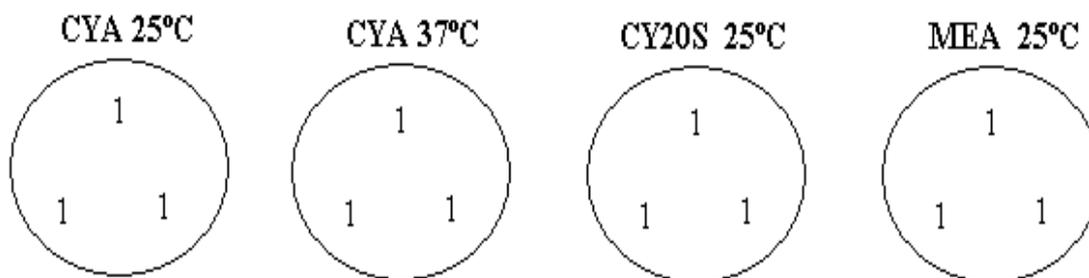


Figura 8: Esquema utilizado para identificação de cepa isolada de *Aspergillus* spp. nos meios de cultivo CYA, CY20S e MEA em duas condições de temperatura (25°C e 37°C) por 7 dias.

A identificação de *Penicillium* spp. seguiu a chave taxonômica de Pitt (1988), onde foram necessários os seguintes meios de cultivo: CYA, MEA e G25N (agar nitrato glicerol a 25%), sendo inoculadas duas cepas por vez para cada marcha de identificação. A preparação da suspensão e a inoculação foram feitas do mesmo modo utilizado para *Aspergillus* spp. As placas foram incubadas por 7 dias em estufas microbiológicas sob três condições de temperatura: 5° C, 25° C e 37° C, como pode ser observado na Figura 9.

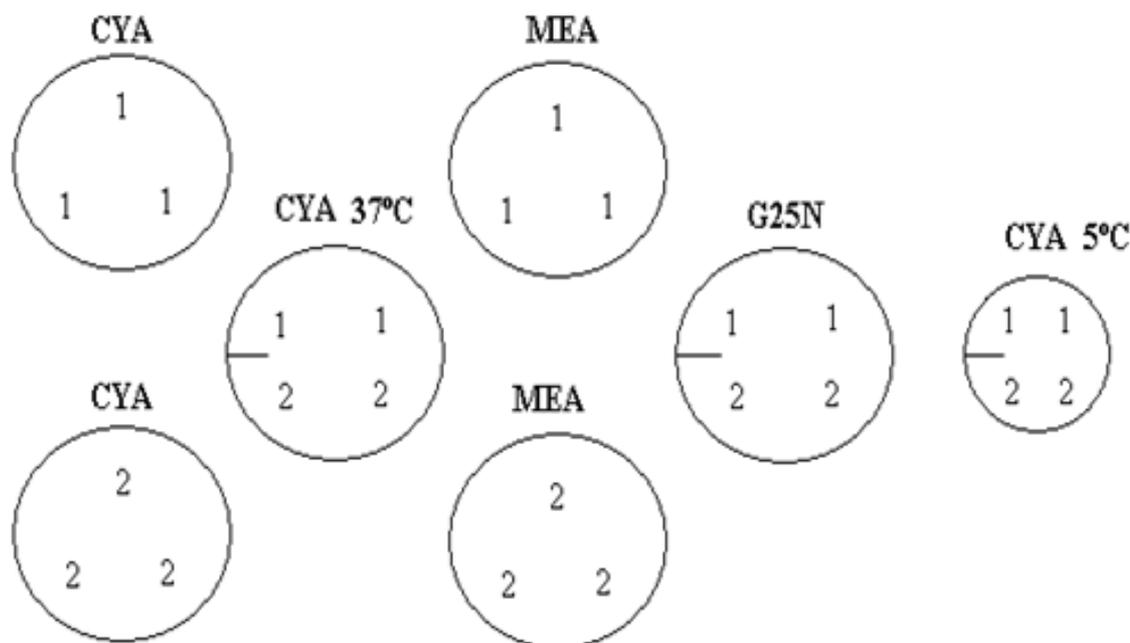


Figura 9: Esquema do sistema utilizado para identificação de duas cepas isoladas de *Penicillium* spp. nos meios de cultivo MEA, CYA e G25N em três condições de temperatura (5°C, 25°C e 37°C) por 7 dias.

Fonte: PITT; HOCKING (1997)

3.4 Caracterização do Perfil Tóxico de Espécies Isoladas

O perfil tóxico foi realizado para as cepas de espécie produtora de AFs (*A. flavus*) e para as cepas de espécie produtora de OTA (*A. niger* agregados) segundo metodologia descrita por Geisen (1996) e Bragulat; Abarca; Cabañes (2001), respectivamente.

Após serem isoladas e identificadas, as cepas de *A. flavus* foram inoculadas em placas pequenas de MEA em ponto único central com auxílio de uma alça de platina. A incubação ocorreu por 7 dias em estufa à temperatura de 25°C. No caso das cepas de *A. niger* agregados, o procedimento aconteceu da mesma maneira, porém os meios utilizados foram CYA ou YES (*Yeast extract sucrose agar*).

Decorrido este tempo, três *plugs* da colônia foram retirados juntos com o meio de cultivo, pesados e colocados em microtubos, onde se adicionou 1 mL de solvente para a extração da toxina (clorofórmio para AFs ou metanol para OTA). A seguir, o material foi centrifugado sob 4.000 RPM durante 10 min. Uma vez centrifugado, o sobrenadante da mistura foi transferido para outro microtubo que foi armazenado destampado em uma bancada e protegido contra a incidência de luz até que o seu conteúdo evaporasse naturalmente (aproximadamente 24 horas). O microtubo foi mantido em freezer até o extrato ser testado qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD).

Para serem analisados por CCD, os extratos foram ressuspensos com 1 mL do solvente de extração específico e então, aplicados em placa de sílica gel 60 de 20x20 cm com 0,2 mm de espessura previamente ativada a uma temperatura de 130°C por 60 min. Os extratos e padrões foram aplicados em pontos equidistantes com volume de 10 µL cada. Após uma hora dentro do cromatotânque saturado contendo fase-móvel composta por solução de tolueno:clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (70:50:50:10), a placa foi analisada através de um visor cromatográfico sob luz UV de $\lambda = 365$ nm, para a evidenciação das manchas fluorescentes que foram avaliadas e comparadas. Os resultados positivos indicaram a capacidade das cepas produzirem certa micotoxina em condições *in vitro*.

As cepas isoladas positivas para AFB₁ tiveram sua produção quantificada por CLAE. O extrato foi ressuspensionado em 1 mL de metanol, filtrado em filtros de nylon de 0,22 µm e, imediatamente, analisado. O cromatógrafo líquido de alta eficiência disponível para este experimento (Waters Associates[®]) era equipado com uma bomba Waters[®] (modelo 510) em sistema isocrático, injetor Rheodyne[®] com loop de 20 µL, detector Merk-Hitachi UV-VIS L-4250 ajustado para comprimento de onda de 360 nm e integrador Merk-Hitachi D-2500. A coluna de separação foi constituída de C18 (Zorbax ODS[®]) de tamanho 150 x 4,6 mm e partícula de 5µm de diâmetro. Como fase móvel utilizou-se água:metanol:acetonitrila (60:20:20) com fluxo de 0,7 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. Foi obtido um tempo de retenção de 14 min ± 1 e o limite de detecção da técnica foi de 2 ng/g (ppb). Foi utilizado padrão Biopure[®] com pureza 99,5 ± 0,5%, comercializado por Romer Labs do Brasil Imp. e Exp. Ltda. A toxina foi diluída em metanol e sua concentração foi padronizada em espectrofotômetro Shimadzu mod. 2001. (Shimadzu Co.[®], Kyoto, Japão) segundo a AOAC (1990). A concentração dos extratos positivos para a capacidade toxígena foi determinada utilizando padronização externa, onde foi calculado o coeficiente de determinação da curva de calibração.

3.5 Determinação de Aflatoxina B₁ e Ocratoxina A nas amostras por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A obtenção do extrato para a determinação da incidência natural de AFB₁ e de OTA nas rações fornecidas às tilápias seguiu de acordo com a técnica proposta por Soares; Rodriguez-Amaya (1989). O esquema deste procedimento pode ser observado na Figura 10.

O extrato, depois de evaporado em banho-maria a 60°C, foi ressuspensionado em metanol e armazenado no freezer em frasco cor âmbar até ter sido analisado qualitativamente por CCD.

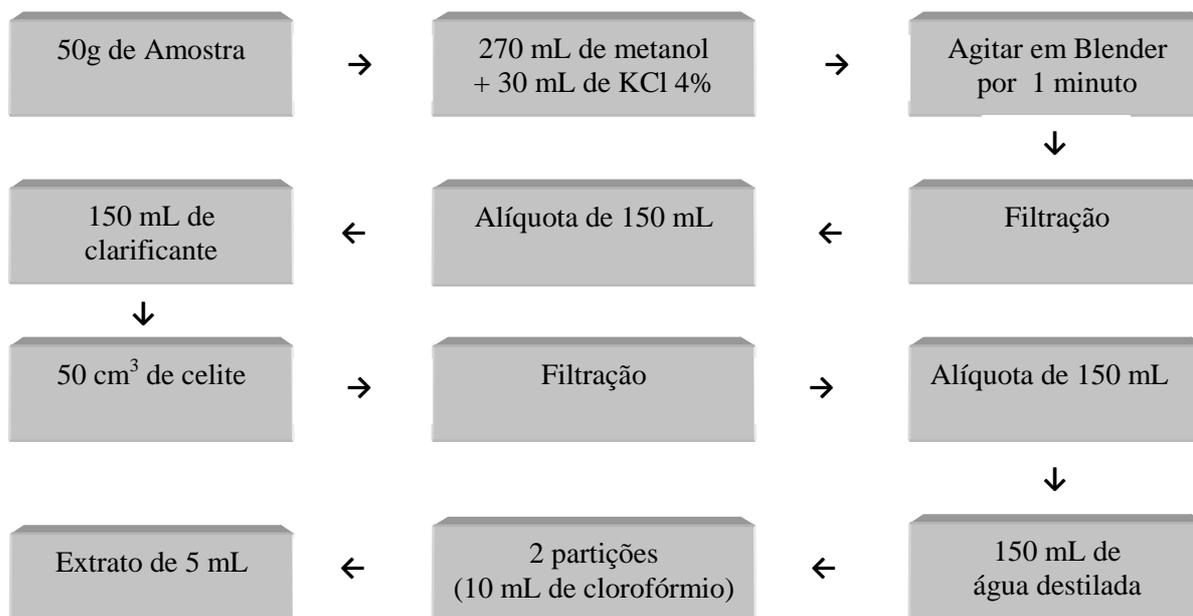


Figura 10: Esquema da técnica de triagem de AFB₁ e OTA nas matrizes analisadas.

Adaptado de: Soares; Rodriguez-Amaya (1989).

3.6 Detecção e Quantificação de Fumonisina B₁ nas amostras por Técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

O procedimento de detecção e quantificação de FB₁ foi realizado através do *Kit AgraQuant[®] Total Fumonisin Assay* produzido pela *Romer Labs[®]*, que utiliza o método de ELISA competitivo direto, cujo princípio é a competição entre a FB₁ das amostras e a presente no conjugados enzimático pela ligação com os anticorpos contidos nos micropoços.

Primeiramente os extratos foram obtidos através da agitação vigorosa de 20 g de amostra triturada em 100 mL de metanol a 70% durante três minutos. Em seguida, foram filtrados e diluídos na proporção 1:20 com água destilada para, posteriormente, serem analisados.

Dentro de cada poço de diluição do *Kit* foram adicionados e homogeneizados 200 µL do conjugado enzimático e 100 µL de padrão ou amostra. Desta mistura foram transferidos 100 µL para os micropoços revestidos de anticorpos. Após dez minutos, o conteúdo foi descartado e os micropoços lavados cinco vezes com água destilada. Depois de totalmente secos foram adicionados 100 µL de substrato enzimático em cada micropoço, desenvolvendo uma coloração azul de intensidade inversamente proporcional à presença de FB₁ nas amostras ou padrões. Decorridos cinco minutos, foram pipetados 100 µL da solução Stop e a coloração do conteúdo mudou de azul para amarelo. Assim, as tiras encontravam-se prontas para serem lidas opticamente em um leitor de micropoços com filtro de absorvância de 450 nm e um filtro diferencial de 630 nm.

Utilizando os valores de absorvância expressos para os seis padrões fornecidos pelo *Kit* foi construída uma curva dose-resposta. As densidades ópticas das amostras foram comparadas às absorvâncias dos padrões e os resultados foram calculados usando a tabela *Romer[®] Log/ Logit* que foi fornecida pelo fabricante. O limite de detecção do *Kit* era de 0,2 ppm e a faixa de quantificação de 0,25 – 5,0 ppm.

3.7 Análise Estatística

Estatisticamente foi realizada a análise de variância (ANOVA), com os dados transformados em função logarítmica $\text{Log}_{10}(x + 1)$. Para comparação entre as médias de contaminação fúngica nas duas localidades (Centro e Sul do estado do Rio de Janeiro) foi utilizado o teste de Tukey ($p\text{-valor} < 0,05$), através do programa computacional BioEstat 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade de Água

A média obtida da A_a das amostras da Região Centro do Estado do Rio de Janeiro foi de $0,61 \pm 0,041$, enquanto que as amostras adquiridas na Região Sul apresentaram uma média de A_a de $0,58 \pm 0,060$. Ambas as médias encontraram-se abaixo do valor requerido para o crescimento de fungos tóxicos. Para um bom desenvolvimento e produção de toxinas, estes microorganismos necessitam de substratos com A_a acima de 0,77 (SWEENEY; DOBSON, 1998). Contudo, a contaminação pode ter ocorrido devido ao armazenamento inadequado da ração, em temperatura e umidade relativa do ar favoráveis à proliferação de microorganismos. Além disto, a micotoxina pode não ser inviabilizada durante o processamento da ração, assim, não há garantia de que os substratos usados no preparo deste produto não estivessem contaminados desde a colheita.

4.2 Níveis de Contaminação

A determinação da micobiota contaminante foi realizada através da enumeração de propágulos fúngicos e expressa em unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada (UFC g^{-1}), podendo ser observada na Tabela 2.

Tabela 2: Carga fúngica das amostras de ração analisadas, expressos em UFC g^{-1} , nas regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.

Meios de cultivo Localidades	DRBC (UFC g^{-1})*	DG18 (UFC g^{-1})*
Região Centro	$1,0 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$ (ND a $6,0 \times 10^3$)	$1,2 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$ ($1,0 \times 10^2$ a $7,0 \times 10^3$)
Região Sul	$4,7 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^4$ (ND a $4,7 \times 10^4$)	$3,1 \times 10^3 \pm 6,2 \times 10^3$ (ND a $2,7 \times 10^4$)

* valores de média \pm desvio padrão / intervalo dos valores mínimos e máximos

ND (não detectado): valor abaixo de 10^2 UFC g^{-1}

Obs. Não houve diferença significativa entre as regiões de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

A presença de fungos em alimentos pode representar não somente uma baixa qualidade higiênica do produto, mas também uma qualidade nutricional inferior, além de favorecer a ação de leveduras, bactérias e insetos (FONSECA, 2010).

Do total de amostras de ração analisadas, 10% provenientes de pisciculturas localizadas na Região Sul do Estado do Rio de Janeiro apresentaram valores de contaminação fúngica acima dos padrões internacionais recomendados para alimentação animal que é de $1,0 \times 10^4$ UFC g^{-1} de amostra (GMP, 2008). Porém, segundo as análises estatísticas, não houve diferença significativa entre as regiões.

Os níveis de contaminação fúngica total das amostras analisadas foram avaliados pela contagem de propágulos fúngicos presentes no meio de cultivo DRBC, de isolamento de fungos em geral, e podem ser melhor observados na Figura 11.

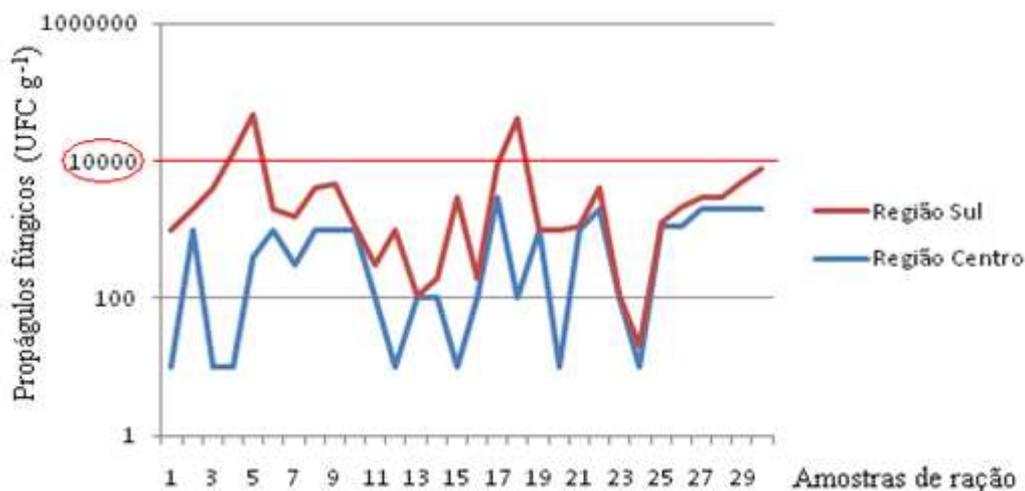


Figura 11: Níveis de contaminação fúngica total das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do estado do Rio de Janeiro, no meio de cultivo DRBC.

Mesmo que a maioria dos autores concorde que os processamentos térmicos pelos quais as rações passam durante sua industrialização sejam capazes de destruir grande parte dos microorganismos, algumas espécies de fungos conseguem sobreviver a altas temperaturas (FAO, 2003). Este fato, aliado às deficiências de cuidado com o alimento desde seu plantio até o armazenamento do produto final, permite que haja a ocorrência de fungos em diversos tipos de rações em níveis acima do tolerável.

Devido à carência de pesquisas de fungos e micotoxinas em rações para peixes, algumas comparações com rações para outros animais de produção serão feitas, considerando que todos estes produtos possuem uma formulação baseada em alimentos altamente susceptíveis à contaminação fúngica. O arroz, milho e trigo são alguns dos ingredientes utilizados na fabricação de rações para diversos animais que são excelentes substratos para o crescimento destes microorganismos (NUNES et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003; GIMENO, 2010).

4.3 Microbiota Contaminante

Foram isolados oito gêneros de fungos filamentosos das amostras de ração de peixe analisadas provenientes da Região Centro do Estado do Rio de Janeiro e seis gêneros da Região Sul, nos meios de cultivo DRBC e DG18. Como pode ser observado na Figura 12, os gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais encontrados, o que pode implicar em maior incidência de micotoxinas nestes alimentos uma vez que os dois últimos gêneros são potenciais produtores destas substâncias.

Fungos do gênero *Cladosporium* podem ser encontrados no ambiente (PITT; HOCKING, 1997) e são facilmente disseminados pelo ar, o que pode justificar sua alta incidência nas amostras analisadas, assim como *Aspergillus* e *Penicillium*, considerados como fungos de armazenamento (SANTOS, 2004). Desta forma, esses resultados associados a não detecção de fungos do gênero *Fusarium*, presentes principalmente no solo, podem representar um armazenamento inadequado do produto.

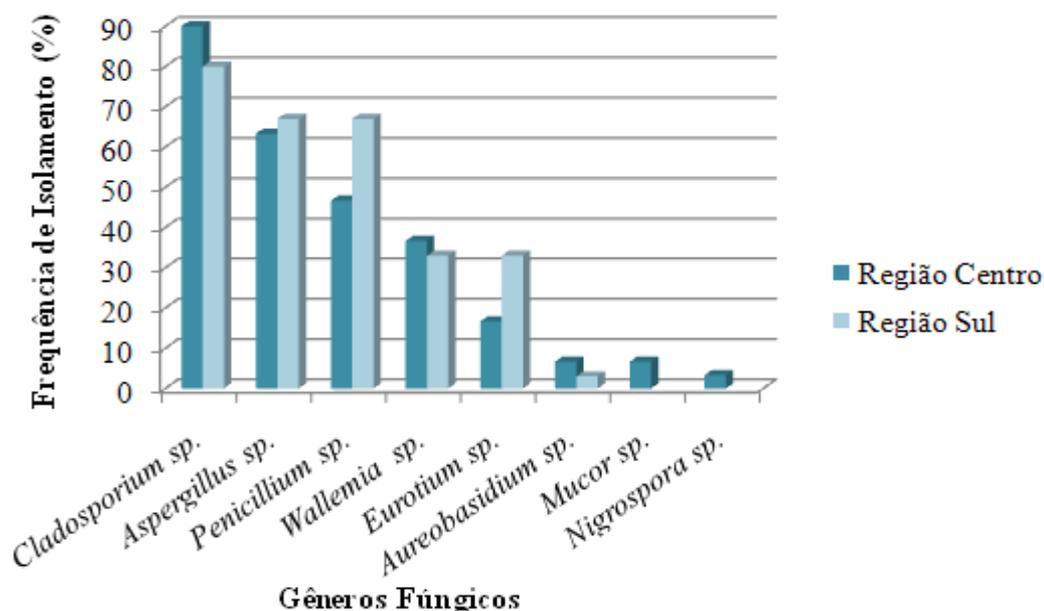


Figura 12: Frequência dos gêneros fúngicos isolados das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.

Os resultados deste trabalho, destacando-se a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, assemelham-se com os resultados encontrados por Santos (2006) com amostras de rações para camarões no estado do Piauí; Alvarenga et al. (2006) e Rosa et al. (2006) com rações para aves; e Rosa et al. (2009) com rações para suínos. Deste modo, conforme ocorre com outras espécies de animais de produção, os peixes de criatórios também estão expostos aos danos acarretados pela presença de fungos potencialmente toxígenos em rações.

Foram isoladas seis espécies de *Aspergillus* de ambas as regiões estudadas. Dentre elas, houve maior incidência de *A. niger* agregados e *A. flavus*, potencialmente produtoras de OTA e AFB₁, respectivamente. A Figura 13 demonstra a densidade relativa das espécies de *Aspergillus* isoladas das amostras analisadas, nos meios de cultivo DRBC e DG18.

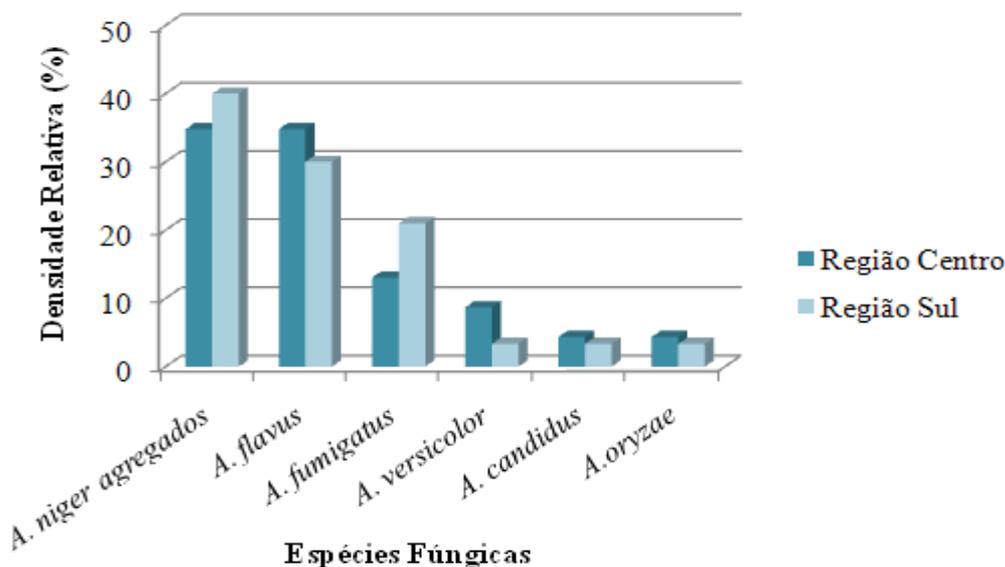


Figura 13: Densidade relativa das espécies do gênero *Aspergillus* isoladas das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.

A prevalência das espécies *A. niger* e *A. flavus* também pode ser observada em estudos com amostras de rações para equinos (KELLER, 2009), aves (ALVARENGA et al., 2006), suínos (GONZÁLEZ PEREYRA et al., 2008), entre outros.

Os resultados encontrados no presente trabalho se assemelham ainda com os descritos por Ribeiro et al. (2009), onde foram isoladas cepas das espécies *A. niger* e *A. flavus* das amostras de ração avícola analisadas, além de *A. versicolor* e *A. fumigatus*, potenciais produtoras de sterigmatocistina e gliotoxina, respectivamente.

Com relação ao gênero *Penicillium*, foram isoladas nos meios de cultivo DRBC e DG18 sete espécies nas amostras de ração analisadas provenientes da Região Sul do Estado Rio de Janeiro, dentre as quais *P. citrinum* e *P. citreonigrum*, capazes de produzir citrinina e citreoviridina, respectivamente. Estas micotoxinas já tiveram sua toxicidade comprovada em animais (LACEY, 1990; ROSA et al., 2010), o que pode implicar em um aumento do risco à saúde dos animais que consomem estes alimentos e da população consumidora desta carne.

Na Região Centro do Estado do Rio de Janeiro, por sua vez, foram isoladas somente duas espécies do gênero *Penicillium*, como pode ser observado na Figura 14.

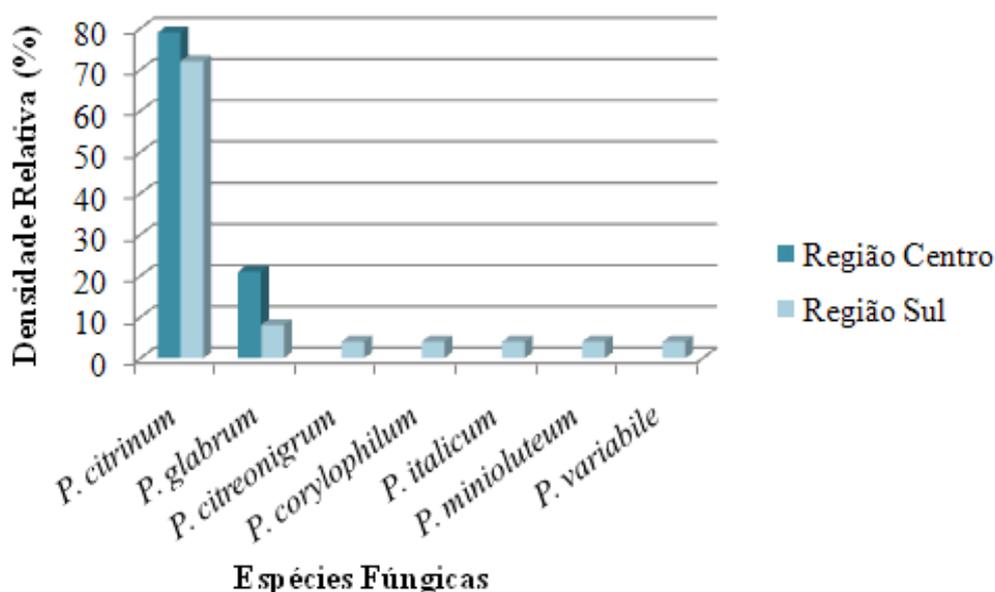


Figura 14: Densidade relativa das espécies do gênero *Penicillium* isoladas das amostras de ração provenientes das regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.

A maior diversidade de espécies do gênero *Penicillium* isoladas das amostras provenientes da Região Sul do Estado do Rio de Janeiro pode ser justificada pelas diferenças climáticas entre as duas regiões estudadas. O clima na Região Sul fluminense em grande parte do ano apresenta-se com temperaturas altas associadas à elevada pluviosidade, o que favorece o crescimento dos fungos. Enquanto isso, a Região Centro fluminense possui um clima com temperaturas mais amenas comparadas à outra região, principalmente no inverno que costuma ser mais frio e seco (CPTEC, 2010).

Assim como neste estudo, a prevalência de *P. citrinum* entre as espécies pertencentes ao mesmo gênero também pode ser observada em outros trabalhos com análise de rações (OLIVEIRA et al., 2006; KELLER et al., 2008; PEREYRA et al., 2009; ROSA et al., 2009).

4.4 Perfil Toxígeno das Cepas Isoladas

Foram isoladas vinte cepas de *A. niger* agregados, sendo que todas foram negativas para o teste de capacidade produtora de OTA. Segundo dados da literatura, o percentual de cepas de *A. niger* agregados isolados capazes de produzir OTA é bastante variável (ACCENSI; ABARCA; CABANES, 2004). Contudo, em outros estudos em que também foram isoladas cepas de *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, os resultados indicam uma menor capacidade das cepas de *A. niger* agregados produzirem OTA em comparação com as cepas das outras duas espécies (ABARCA et al., 2003; TANIWAKI et al., 2003; URBANO et al., 2001).

Quanto às dezenove cepas de *A. flavus* isoladas e submetidas ao teste de capacidade de produção de AFs, três (16%) foram positivas para AFB₁ através de CCD.

Depois de passar por CCD, as cepas positivas foram quantificadas por CLAE. Para isto, foi obtida a curva de calibração dos padrões, que apresentou um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9998$, como pode ser visto na Figura 15.

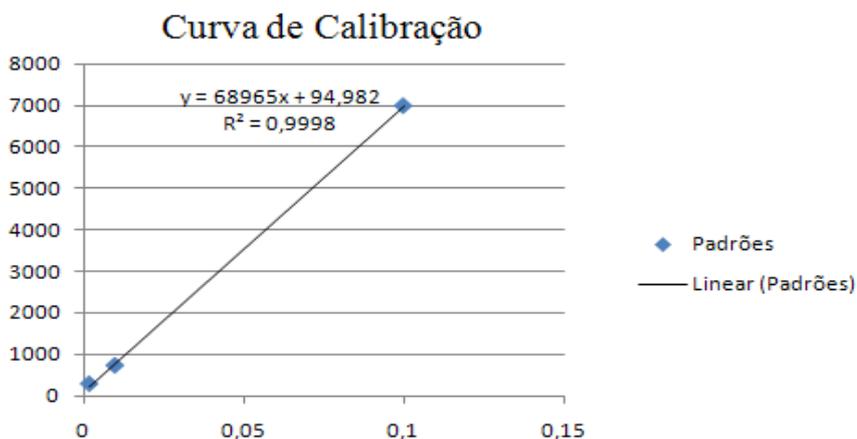


Figura 15: Coeficiente de determinação obtido com a curva de calibração dos padrões de AFB₁.

As cepas analisadas apresentaram uma alta capacidade produtora de AFB₁ em condições *in vitro*, com concentrações de 4,55 µg/g, 321 µg/g e 353 µg/g de micélio. Estes resultados podem indicar uma maior chance de incidência natural desta micotoxina nas rações analisadas e em quantidades elevadas, podendo aumentar a risco de ocorrência de micotoxicoses primária e secundária.

4.5 Análises Micotoxicológicas das amostras de ração

4.5.1 Aflatoxina B₁

No presente trabalho, 33 amostras de ração analisadas (55%) apresentaram níveis detectáveis de AFB₁ através de CCD. Este resultado demonstrou uma frequência de AFB₁ acima da encontrada por Hashimoto et al. (2003) em rações utilizadas em pisciculturas na região de Londrina, no Paraná, que foi de 28,5% de amostras contaminadas por AFs totais, sendo a AFB₁ encontrada em maior frequência e concentração.

Em outro estudo com rações comerciais para peixes nas regiões Norte e Oeste do estado do Paraná, Buck (2005) detectou contaminação por AFs totais em 17% das amostras analisadas.

A presença de AFs em amostras de rações utilizadas em pisciculturas pode indicar que, mesmo havendo a aplicação de diversas maneiras de controle de micotoxinas tanto nos ingredientes quanto no produto final, como o uso de fungicidas, adsorventes e boas práticas de colheita e fabricação, um constante monitoramento da qualidade destes produtos se faz necessário.

4.5.2 Ocratoxina A

As análises por CCD demonstraram que 2 amostras de ração analisadas (3,3%) provenientes da Região Centro do Estado do Rio de Janeiro foram positivas para a presença de OTA, sendo que ambas ainda apresentaram AFB₁ e FB₁. Este resultado se assemelha ao encontrado por Buck (2005), aonde 4% das amostras de ração analisadas apresentaram somente OTA e mais 4% apresentaram AFs e OTA associadas.

Ainda que em baixa ocorrência, a presença de mais de uma micotoxina em uma mesma amostra de ração tem sua importância, uma vez que estas substâncias podem ter seus efeitos potencializados por atuação sinérgica ou aditiva.

4.5.3 Fumonisinias

Os resultados obtidos demonstraram que 59 amostras de ração analisadas (98%) foram positivas para a presença de FB₁. Estes achados contrastam com a não detecção de fungos do gênero *Fusarium*, responsáveis pela produção deste grupo de micotoxinas. Porém, o fato pode ter ocorrido porque o tratamento térmico dado às rações comerciais pode chegar a 140° C (AMARAL, 2002), enquanto que a remoção de FBs nos alimentos se dá em temperaturas acima de 150° C (WHO, 2001). A sobrevivência destes microorganismos, contudo, fica praticamente inviável, uma vez que a faixa de temperatura ideal para seu crescimento encontra-se muito abaixo da alcançada durante o processamento da ração.

O coeficiente de determinação obtido no *kit* ELISA utilizado foi $R^2 = 0,97$ e as concentrações de FB₁ nas amostras variaram desde não detectável a 4,94 µg/g. A frequência encontrada neste estudo ficou acima da descrita por Hashimoto et al. (2003), aonde 55% foram positivas para a mesma micotoxina. Assim como no presente estudo, a outra pesquisa também descreveu a co-ocorrência de AFB₁ e FB₁. Na Tabela 3 encontram-se descritos os resultados obtidos das análises de FB₁.

Tabela 3: Valores de FB₁ obtidos das amostras analisadas.

Análise de Fumonisina B₁ nas amostras	
Número de amostras positivas	59
Valor mínimo detectado	0,30 µg/g
Valor máximo detectado	4,94 µg/g
Média de contaminação	2,60 µg/g

Não existem regulamentos no Brasil indicando os níveis máximos de FB₁ permitidas em alimentos para animais, mas os resultados obtidos neste trabalho indicam que as amostras analisadas encontravam-se dentro do limite de 10 µg/g recomendado pela *European Food Safety Authority* (EFSA, 2006).

A Tabela 4 demonstra o resumo dos resultados das análises micotoxicológicas das amostras de ração fornecidas na dieta de tilápias em criatórios localizados nas regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro, contendo o número de amostras contaminadas por cada micotoxina encontrada e o número de cepas das espécies isoladas relacionadas à produção destas substâncias.

Tabela 4: Relação entre as espécies isoladas das amostras e a presença de micotoxinas nestas, nas Regiões Centro e Sul do Estado do Rio de Janeiro.

Localidade	Micotoxinas	Nº amostras	Espécies relacionadas	Cepas isoladas
Região Centro	Aflatoxina B ₁	15/30	<i>A. flavus</i>	8
	Fumonisina B ₁	29/30	-	-
	Ocratoxina A	2/30	<i>A. niger</i> agregados	8
Região Sul	Aflatoxina B ₁	18/30	<i>A. flavus</i>	9
	Fumonisina B ₁	30/30	-	-
	Ocratoxina A	0/30	<i>A. niger</i> agregados	12

5 CONCLUSÕES

- A média de atividade de água das amostras encontrou-se relativamente baixa para um bom desenvolvimento de fungos toxígenos segundo dados da literatura, mas não impediu o crescimento destes e a produção de micotoxinas.
- A média de contaminação fúngica das amostras de ração fornecidas na dieta de tilápias em criatórios do E do Estado do Rio de Janeiro encontrou-se dentro dos padrões internacionais recomendados de, no máximo, $1,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹. Contudo, a Região Sul apresentou 10% de suas amostras acima do limite preconizado, o que destaca a necessidade de maior controle de qualidade destes produtos.
- Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram isolados em mais da metade das amostras analisadas, o que pode indicar maiores chances de incidência de micotoxinas, deterioração do alimento e redução de seu valor nutricional.
- A alta incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, associada a não detecção de fungos do gênero *Fusarium*, indicam que estes alimentos podem ter passado por um processamento industrial eficiente, porém seu armazenamento ocorreu de forma inadequada.
- Apesar de não terem sido isolados fungos do gênero *Fusarium* nas amostras, a presença de FB₁ foi detectada em 98% delas. Isto pode indicar que o tratamento térmico dado ao alimento industrializado não é capaz de inativar as micotoxinas previamente produzidas.
- A detecção de AFB₁ em 33 amostras analisadas (55%), sendo 2 destas com contaminação simultânea de FB₁ e OTA, e a presença de FB₁ em 98% das amostras ressaltam a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas na área para melhor avaliar o risco à saúde dos peixes de criatórios e suas implicações à saúde dos consumidores desta carne.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from Spanish market. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 504–506, 2003.

ACCENSI, F.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food Microbiology**, v.21, p.623-627, 2004.

ALVARENGA, D.P.; GIGLI, A.C.S.; BARACHO, M.S.; NÄÄS, I.A.; JESUS, C.P.; OLIVEIRA, E.S. Qualidade da ração quanto à contaminação por fungos em galpões avícolas. **Veterinária Notícias**, v.12, n.2, p.130, 2006.

AMARAL, C.M.C. **Extrusão e peletização de ração completa: efeitos no desempenho, na digestibilidade e no desenvolvimento das câmaras gástricas de caprinos Saanen**. 2002. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

AOAC- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Arlington: AOAC, 1990.

ARELLANO, J.L. **Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas em ingredientes para la nutrición animal**. Sítio Argentino de Producción Animal, Córdoba, Argentina, 2003. Disponível em: < <http://www.produccion-animal.com.ar> >. Acesso em: 21 jan. 2010.

BARBOSA, A.C.A. **A criação de tilápias em gaiolas**. Lagoa Nova: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte, 2007.

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

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v.50, n. 12, p.1058-1073, 1987.

BIOESTAT 5.0. Disponível em: <<http://www.mamirauana.org>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

BOLGER, M.; COKER, R.D.; DINOVI, M.; GAYLOR, D.; GELDERBLUM, W.C.; OLSEN, M.; PASTER, N.; RILEY, R.T.; SHEPHARD, G.; SPEIJERS, G.J.A. Fumonisin. In: JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). **Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Foods Additives Series n. 47, FAO Food and Nutrition Paper n. 74**. Geneva: FAO/ WHO, 2001. p.103-279.

BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n.3, p. 139-144, 2001.

BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. **Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific.** Bangkok: RAP publication, 2004.

BUCK, E.L. **Micotoxinas em rações destinadas à piscicultura comercial.** 2005. 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

CAGAUAN, A.G.; TAYABAN, R.H.; SOMGA, J.R.; BARTOLOME, R.M. Effect of aflatoxin-contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 6, 2004, Manila, Filipinas. **Proceedings...** Manila: ATA, 2004. p.172-178.

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

CPTEC – CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS. Disponível em: <<http://www.cptec.inpe.br>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

EFSA- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. **Official Journal of the European Union**, n.49, p. 7-9, 2006.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Basic Food Safety for Health Workers.** Geneva: FAO/WHO, 1999.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Code of Practice for the Prevention of Mycotoxin Contamination in Cereals.** Roma: FAO/WHO, 2003.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Fishery and aquaculture Statistics.** Roma: FAO/WHO, 2009.

FARIAS, A.X.; ROCHA, E.S.; COSTA, P.P. Fumonisinas em milho: um risco à saúde humana e animal. **Comunicado Técnico 51.** Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2002.

FILHO, R.M. Tilápia - A rainha da piscicultura. **Revista Destaque IN**, Sacramento, 2005. Disponível em: <<http://destaquein.sacrahome.net/node/18>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos.** Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

FREIRE F.C.O.; VIEIRA I.G.P.; GUEDES M.I.F.; MENDES F.N.P. **Micotoxinas: importância na saúde humana e animal.** 1. ed. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2007.

GEHLEN, V.R.F.; PEIXOTO, A.C.B.; VIEIRA, A.C.S. A Pesca Artesanal e a Sustentabilidade da Atividade da Piscicultura em Tanques-rede no Assentamento Rural : Nova Esperança em Olho D'água do Casado-Alagoas. In: FORUM AMBIENTAL DA ALTA PAULISTA, 3., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ANAP, 2007. p. 1009-1031.

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 388-392, 1996.

GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v.30, n.3, p.695-706, 2007.

GIMENO A. **Revisión genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en la alimentación animal**. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

GMP. **Certification Scheme Animal Feed Sector. 2006. Appendix 1: Product standards (including residue standards)**. The Hague, The Netherlands: Productshap Diervoeder, p.1-39, 2008.

GOLOB, P. **On-farm mycotoxin control in food and feed grain**. Rome: FAO, 2007.

GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; PEREYRA, C.M.; RAMIREZ, M.L.; ROSA, C.A.R. Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, n.5, p.555-61, 2008.

GRIESSLER, K.; ENCARNAÇÃO, P. Fumonisin - mycotoxins of increasing importance in fish. **Aquaculture Asia Magazine**, v.14 , n.2 , p.24-26, 2009.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, p.454-500, 1999.

GUARRO, J.; NUCCI, M.; AKITI, T.; GENÉ, J.; BARREIRO, M.D.C.; GONCALVES, R.T. Fungemia due to *Fusarium sacchari* in an immunosuppressed patient. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p.419-421, 2000.

HASHIMOTO, E.H.; SANTOS, M.A.; ONO, E.Y.S.; HAYASHI, C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; HIROOKA, E.Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.123-132, 2003.

HO, P.L.; YUEN, K.Y. Aspergillosis in bone marrow transplant recipients. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v.34, n.1, p.55-69, 2000.

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas Of The Clinical Fungi**. 2. ed. Utrecht, The Netherlands: ASM Press, 2000.

HUSSAIN, M.; WILSON, T. Effect of aflatoxin contaminated feed on morbidity and residues in Walle fish. **Veterinary and Human Toxicology**, 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**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Working group on the evaluation of carcinogenic risks to man**. Geneva: World Health Organization, v.56, 1993.

JAIMEZ, J.; FENTEC, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p.1-10, 2000.

KAWASHIMA, L.M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KELLER, K.M.; KELLER, L.A.M.; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X.; GARCIA, R.S.; ROSA, C.A.R. Avaliação micológica em produtos destinados à alimentação de caprinos leiteiros em Teresópolis, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.30, n.2, p.91-96, 2008.

KELLER, K.M. **Estudo sobre a contaminação com espécies toxígenas, potencialmente produtoras de micotoxinas, em rações destinadas à alimentação de equinos**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. 1.ed. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2002.

KUBITZA, F. Ajustes na nutrição e alimentação das tilápias. **Revista Panorâma da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v.16, n.98, p.14-24, 2006.

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

LACEY, J. Mycotoxins in UK cereals and their control. **Aspects of Applied Biology**, v.25, p.395-405, 1990.

LARONE, D. H. **Medically Important Fungi - A Guide to Identification**. 4.ed. Washington, D.C: ASM Press, 2002.

LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and fish health**. New York, U.S: The Haworth Press, 2001.

LOURENÇO, A. Micotoxinas. **Microbiologia**, 2008. Disponível em: <<http://www.microbiologia.vet.br>>. Acesso em: 17 jul. 2009.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria: Editora Sociedade Vicente Pallotti, 2007.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Portaria nº 07 de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de novembro de 1988, Seção 1, p. 21968.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Instrução Normativa nº 30 de 05 de agosto de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de agosto de 2009, Seção 1, p. 13.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Portal do MAPA**, 2011. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em: 05 fev. 2011.

MOURA, G.S. Produção de peixes em tanque-rede. **Portal do Agronegócio**, 2006. Disponível em: < <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23262> >. Acesso em: 17 jul. 2009.

MOUSA, M.A.; KHATTAB, Y.A. The counteracting effect of vitamin C (L- ascorbic acid) on the physiological perturbations induced by ochratoxin intoxication in the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Journal of the Academy of Egyptian Environmental Development**, v.1, n.4, p.117-128, 2003.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA). Balança Comercial do Pescado. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2008/2009**, Brasília, p.60-62, 2010.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species : An Illustrated Manual for Identification**. USA: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

NUNES, I. L. MAGAGNIN, G.; BERTOLIN T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.190-194, 2003.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v.162, p.355-362, 2006.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 2004.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.20, n.1, p.141-156, 2002.

PEREYRA, C.; PENA, G.; CAVAGLIERI, L.R.; KRÜGER, C.D.; KELLER, K.M.; ROSA, C.A.R., CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Influence of poultry feed processing on mycobiota and ochratoxin and citrinin co-occurrence. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.31, n.1, p. 51-58, 2009.

PITT, J.I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2.ed. Sydney, Australia: CSIRO, Division of Food Processing, 1988.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v.38, n.1, p.17-22, 2000.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.

PLAKAS, S.M., LOVELAND, P.M., BAILEY, G.S., WILSON, G.L. Tissue disposition and excretion of C14- labelled aflatoxin B1 after oral administration in Channel cat fish. **Food Chemical Toxicology**, v.29, n.12, p. 805-808, 1991.

QUADROS, M.E. **Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: parâmetros físico-químicos e microbiológicos**. 2008. 134 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RASMUSSEN, H.B.; LARSEN, K.; HALD, B.; MOELLER, B.; ELLING, F. Outbreak of liver-cell carcinoma among saltwater-reared rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. **Diseases of Aquatic Organisms**, n.1, p.191–196, 1986.

RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; VITAL, H.C.; KRUGER, C.D.; ROSA, C.A.R. Radiação gama sobre a microbiota de ração avícola e *Aspergillus* spp. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1452-1458, 2009.

RIBEIRO, P.A.P.; GOMIERO, J.S.G.; LOGATO, P.V.R. **Manejo alimentar de peixes**. Lavras: Núcleo de Estudos em Aquacultura, 2005.

RIBEIRO, S. A. L., CAVALCANTI, M. A.Q., FERNANDES M. J.S., LIMA, D. M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.223-229, 2003.

ROCHA, D. Alimentação dos peixes. **Fauna Brasil**, 2006. Disponível em: <<http://www.fauabrasil.com.br/sistema/modules/wfsection/>>. Acesso em: 05 jun. 2009.

ROLSTON, K. V. I. The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. **Current Opinion in Oncology**, v.13, p.218-223, 2001.

ROSA, C.A.R., RIBEIRO, J. M. M., FRAGA, M.J., GATTI, M., CAVAGLIERI, L.R. MAGNOLI, C.E., DALCERO, A.M., LOPES, C.W. G. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**. v.113, n.1, p. 89-96, 2006.

ROSA, C.A.R., KELLER, K.M.; KELLER, L.A.M.; GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; PEREYRA, C.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R., LOPES, C.W.G. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. **Toxicon**, v. 53, p.283-288, 2009.

ROSA, C.A.R.; KELLER, K.M.; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X.; KELLER, L.A.M.; MARASSI, A.C.; KRUGER, C.D.; DEVEZA, M.V.; MONTEIRO, B.S.; NUNES, L.M.T.;

ASTORECA, A.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; EIFERT, E.C.; LIMA, T.A.S.; MODERNELL, K.G.; NUNES, F.I.B.; GARCIA, A.M.; LUZ, M.S.; OLIVEIRA, D.C.N. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A.**, v. 27, n. 2, p. 241 - 248, 2010.

RUIZ-PEREZ, A.; MARTINEZ, L.P.; PAASCH, P.A.; MARTINEZ, R.R. Hepatic neoplasia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) bred in El Zarco Fish Hatchery, Federal District. **Revista Veterinária**, n.15, p.255-261, 1984.

SAMSON, R.A.; REENEN-HOEKSTRA, E.S.; VAN OORSCHOT, C.A.N. **Introduction to food-borne fungi**. Baarn , The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 1984.

SAMSON, R.A.; REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6. ed. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000.

SANTACROCE, M.P.; CONVERSANO, M.C.; CASALINO, E.; LAI, O.; ZIZZADORO, C.; CENTODUCATI, G.; CRESCENZO, G. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. **Reviews in Fish Biology Fisheries**, v.18, p.99-130, 2008.

SANTOS, M.M. **Ocorrência de fungos filamentosos e micotoxinas em bagaço de cevada destinado à alimentação do rebanho bovino leiteiro do estado da Bahia**. 2004. 148 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical), Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SANTOS, F.C.F. **Fungos em rações para camarões cultivados no Estado do Piauí**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Teresina.

SHALABY, A.M.E. The opposing effect of ascorbic acid (vitamin C) on ochratoxin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF TILAPIA IN AQUACULTURE, 6., 2004, Manila, Filipinas. **Proceedings...** Manila: ATA, 2004. p. 209–221.

SILVA, P.C.; KRONKA, S.N.; TAVARES, L.S.H.; JUNIOR, R.P.S.; SOUZA, V.L. Avaliação econômica da produção de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) em sistema “raceway”. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.25, n.1, p.9-13, 2003.

SILVA, O.F.; OLIVEIRA, E.M.M.; FARIAS, A.X.; SOUZA, M.L.M. **Alternaria spp: detecção e avaliação do potencial tóxico em tomate pós-colheita**. 1. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, 2005.

SIMÕES, A.C. Importância da alimentação de peixes em tanques-rede. **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**, 2008. Disponível em: < <http://www.apta.sp.gov.br/noticias>>. Acesso em: 07 jun. 2009.

SIQUEIRA, A.D.D. **Saprolegnose: doença fúngica em peixe**. São João da Boa Vista, SP: Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, 2004.

SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. **Mycotoxins and animal foods**. Florida, U.S.: CRC Press, 1991.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by multitoxin thin layer chromatographic method. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p.22-26, 1989.

SPRING, P.; FEGAN, D.F. Mycotoxins - a rising threat to aquaculture. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 22., 2006, Bangkok, Thailand. **Proceedings...** Bangkok: Alltech, 2006. p.323-331.

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

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; TEIXEIRA, A.A.; IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 173-179, 2003.

TARDIVO, M. **Determinação de compostos organoclorados em espécies de insetos aquáticos e peixes dos rios da Bacia do Betari - Vale do Ribeira/SP**. 2004. 0 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

TUAN, N.A.; GRIZZLE, J.M.; LOVELL, R.T.; MANNING, B.B.; ROTTINGHAUS, G.E. Growth and hepatic lesions of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B1. **Aquaculture**, n.212, p.311-319, 2002.

TUAN, N.A.; MANNING, B.B.; LOVELL, R.T.; ROTTINGHAUS, G.E. Responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different concentrations of moniliformin or fumonisin B1. **Aquaculture**, n.217, p.515-528, 2003.

URBANO, G.R.; TANIWAKI, M.H.; LEITÃO, M.F.F.; VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1226-1230, 2001.

VOGEL, S.D.; JIMÉNEZ, L.C.V. Micotoxinas en la salud pública. **Revista Salud Pública**, v.1, n.8, p.129-135, 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Roma: JECFA, 2001.

WUNDER, W.; KORN, H. Aflatoxin cancer hepatomas in the liver of the rainbow trout (*Salmo irideus*). **Bonner Zoologische Beiträge**, n.28, p.99-109, 1982.

YILDIRIM, M.; MANNING, B.B.; LOVELL, R.T.; GRIZZLE, J.M.; ROTTINGHAUS, G.E. Toxicity of moniliformin and fumonisin B₁ fed singly and in combination in diets for young channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World of Aquaculture Society**, n.31, p. 599-608, 2000.