PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AMANDA ANATER

AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS DELETÉRIOS DE AFLATOXINA B_1 EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)

(*Evaluation of Possible Deleterious Effects of Aflatoxin B_1 in Rhamdia quelen*)

CURITIBA
2016

AMANDA ANATER

AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS DELETÉRIOS DE AFLATOXINA B_1 EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)

(*Evaluation of Possible Deleterious Effects of Aflatoxin B_1 in Rhamdia quelen*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Cláudia Turra Pimpão

CURITIBA

2016

ATA Nº 0095 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA AMANDA ANATER

Aos onze dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezesseis, às 09:00 horas, realizou-se na sala 07 da Pós-Graduação, 1º andar, Bloco Amarelo, Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da mestranda Amanda Anater, intitulada: **"AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS DELETÉRIOS DE AFLATOXINA B_1 EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)"**. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pela Professora orientadora e Presidente da banca, Dra. Cláudia Turra Pimpão (PUCPR), auxiliada pelos Professores Doutores Francisco Pizzolato Montanha (PUCPR) e Helena Cristina da Silva de Assis (UFPR). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua argüição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada Aprovada.

Profa. Dra. Cláudia Turra Pimpão (Presidente)

Assinatura_____

Prof. Dr. Francisco Pizzolato Montanha (PUCPR)

Assinatura_____

Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis (UFPR)

Assinatura Helena C. da S. de Assis

Proclamado o resultado, a Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Regiani de Fátima Terto, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 11 de agosto de 2016.

Renata Macedo

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Regiani de Fátima Terto

Regiani de Fátima Terto

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS ..... **v**
FORMATO DA DISSERTAÇÃO ..... **vi**
RESUMO GERAL ..... **vii**
ABSTRACT ..... **viii**
CAPÍTULO 1 ..... **1**
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO 1
CAPÍTULO 2 ..... **16**
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE ALEVINOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*), ALIMENTADOS COM RAÇÃO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AFLATOXINA B_1 16
CAPÍTULO 3 ..... **35**
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AFLATOXINA B_1 NA RAÇÃO, SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS SÉRICOS DE ALEVINOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) 35
CAPÍTULO 4 ..... **71**
AVALIAÇÃO DOS DANOS HISTOLÓGICOS PROVOCADOS PELA AFLATOXINA B_1 EM ALEVINOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) 71
CAPÍTULO 5 ..... **102**
DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE AFLATOXINA B_1 EM MÚSCULO, ORGÃOS, PLASMA E NA ÁGUA DE *Rhamdia quelen* (JUNDIÁS) 102
CAPÍTULO 6 ..... **121**
CONSIDERAÇÕES FINAIS 121
ANEXO **123**

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me concebido saúde, serenidade e força para concluir mais uma etapa em minha vida.

Ao meu namorado e amor da minha vida, **Deivid Roni Ribeiro** por todo amor, companheirismo, apoio, compreensão e ajuda nos muitos momentos de minha vida.

A professora **Cláudia Turra Pimpão** pela orientação, amizade, incentivo, confiança, horas de dedicação, palavras sábias, pela capacidade de me acalmar e encorajar, e que de forma simples e materna conduziu-me neste período importante da minha formação profissional e pessoal.

A todos os professores que contribuíram para minha formação e execução desse trabalho, em especial, ao Professor **André Ostrensky**, que com seu notório saber me transmitiu valiosos ensinamentos.

Aos alunos de graduação **Edevaldo Antonto Iachinski** e **Carolina Konkel Barbosa**, pelas incansáveis horas no LAPEP trabalhando arduamente para que esse trabalho pudesse ser concluído, encarando com vontade cada desafio vencido, além de toda amizade e debates de onde seria o almoço.

A **Chiara Maria Thiensen Domingues Araújo** e a **Daniel Carlos Coatti Rocha**, por todo apoio e auxílio na realização das análises hematológicas e bioquímicas.

À **Pontifícia Universidade Católica do Paraná** e a **Capes** pela minha formação profissional e auxílio financeiro.

Aos **meus familiares** e todos aqueles que me apoiaram e torceram por mim em todos os momentos.

Aos demais **alunos de graduação** e **amigos** que de alguma forma contribuíram para a concretização de mais essa etapa da minha vida e pelas palavras de incentivo nas horas mais difíceis.

Por fim, afirmo minha gratidão aos **animais**, companheiros com quem tenho o privilégio de dividir a vida e aprender lições importantes, e pelos quais desenvolvi minha vocação de ser, orgulhosamente, médica veterinária. Em especial a Nala, ao Dunga, ao Rabicho Pai, a Rabicha Mãe, Rabicha Filha, Rabicho Junior, Batata, Pimenta e Lica, com quem ainda tenho o privilégio e a felicidade de compartilhar meus dias.

Muito Obrigada!

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por 6 capítulos em formato de artigo.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e os objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata da avaliação do desempenho zootécnico de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com diferentes concentrações de aflatoxina B_1 fornecidas via ração.

O capítulo 3 trata da avaliação dos efeitos das diferentes concentrações de aflatoxina B_1, fornecidas via ração, sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos jundiás (*Rhamdia quelen*).

No capítulo 4, as alterações histológicas relacionadas aos efeitos de diferentes concentrações de aflatoxina B_1 fornecidas via ração aos jundiás (*Rhamdia quelen*), são apresentadas.

O capítulo 5 apresenta o artigo final que trata da determinação cromatográfica de aflatoxina B_1 em músculo, órgãos, plasma e na água de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contaminada com diferentes concentrações de aflatoxina B_1.

O capítulo 6 finaliza esta dissertação através das considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram ao final de cada capítulo.

RESUMO GERAL

Introdução: As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos que se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais vertebrados, incluindo o homem. Os sinais clínicos da intoxicação dos peixes por micotoxinas variam em função da espécie, tipos de micotoxinas, concentrações destas nas rações, período de exposição do animal, dentre outros fatores. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi determinar os possíveis efeitos deletérios do fornecimento de rações contendo diferentes níveis de aflatoxina B_1 (AFB_1) através de parâmetros de desempenho zootécnico, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de jundiás (*Rhamdia quelen*), além da determinação da bioacumulação dessa micotoxina no pescado e na água proveniente da produção desses animais. **Métodos:** Foram utilizados 624 alevinos de jundiás, distribuídos em 4 grupos distintos (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 e G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 na ração), os grupos foram separados aleatoriamente em 24 aquários (n=26 alevinos/aquário) e os peixes alimentados durante 56 dias consecutivos com ração peletizada. Foram avaliados índices zootécnicos, parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos, bem como a quantificação de AFB_1 em músculo, órgãos (fígado, rins, brânquias, intestino), conteúdo intestinal, plasma e na água de manutenção dos jundiás. Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA seguido por teste de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's. **Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) nos parâmetros de índice zootécnico quando comparados os grupos expostos a AFB_1 com o grupo controle. A AFB_1 foi capaz de induzir alterações hematológicas e bioquímicas condizentes com distúrbios metabólicos no jundiá, caracterizados pela redução significativa ($p<0,05$) do leucócitos totais, linfócitos, células granulocíticas especiais, neutrófilos e trombócitos e redução significativa ($p<0,05$) das concentrações séricas das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) dos peixes expostos em relação ao grupo controle, após 56 dias consecutivos de fornecimento da ração experimental. Não foi possível evidenciar alterações nos tecidos hepático, branquial e renal compatíveis com quadros de exposição à AFB_1, tão pouco detectar a presença de AFB_1 em nenhum dos órgãos, conteúdo intestinal, músculos e água analisados. A AFB_1 foi detectada somente nas amostras de plasma nos grupos G3 e G4, nos diferentes períodos avaliados (dias +28, +42 e +56). **Conclusão:** As diferentes concentrações de AFB_1 não afetam o desempenho zootécnico de jundiás de forma linear, também não causam alterações histológicas nos órgãos avaliados. Entretanto, os animais expostos a AFB_1 apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, condizentes com imunossupressão e hepatoxicidade, ambas relatadas em aflatoxicoses em animais. Concentrações de até 180 $\mu g.kg^{-1}$ não causam acumulação residual em pescado e órgãos, não demonstrando assim efeitos deletérios aos peixes e consequentemente não afetando o consumidor final.

Palavras chaves: Análise Cromatográfica; Aquicultura; Peixes; Ração Contaminada; Toxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that grow naturally in foodstuffs, it is able to generating a wide variety of toxic effects on vertebrate animals, including human. Clinical signs of fish intoxication by mycotoxins vary depending of the species, types of mycotoxin, concentrations in feeds, animal exposure time, and other factors. **Objective:** The aim of this study was to determine the possible deleterious effects of supplying feeds with different levels of aflatoxin B_1 (AFB_1), in parameters of growth performance, haematological, biochemical and histopathological of jundiá (*Rhamdia quelen*), as well the determination of AFB_1 bioaccumulation in fisheries and water from the production of this fish. **Methods:** 624 jundiá's fingerlings were used, divided into 4 different groups (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 and G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ of AFB_1 in feed), fish was randomly divided into 24 aquariums (n=26 fingerlings/aquarium). The fish were fed for 56 consecutive days with pelleted feed. Parameters of growth performance, hematological, biochemical and histopathology, besides the AFB_1 quantification in muscle, organs (liver, kidneys, gills and intestine), intestinal content, plasma and water of jundiá's aquariums were evaluated. ANOVA with Bonferroni or Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests was performed in the statistical analysis. **Results:** No significant differences ($p>0.05$) were observed in the growth parameters when comparing the groups exposed to AFB_1 to the control group. The AFB_1 was able to induce hematological and biochemical changes consistent with metabolic disorders in jundiá, characterized by significant reduction ($p<0.05$) of total leukocytes, lymphocytes, special granulocytic cells, neutrophils and thrombocytes, as well a significant reduction ($p<0.05$) of serum concentrations of liver enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminostranferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) in exposed fish in contrast with the control group after 56 consecutive days of administration of the experimental diet. It was not possible to demonstrate changes in liver, branchial and kidney tissues compatible with exposure to AFB_1. Neither the presence of AFB_1 was detected in any organs, musculature and water analyzed. AFB_1 was detected only in the plasma samples in G3 and G4, in the different periods (days +28, +42 and +56). **Conclusion:** The different concentrations of AFB_1 not affected the growth performance of jundiá, as well did not cause histological changes in the evaluated organs. However, the animals exposed to AFB_1 showed changes in haematological and biochemical parameters, consistent with immunosuppression and hepatotoxicity, both reported in animals aflatoxicosis. Concentrations up to 180 $\mu g.kg^{-1}$ of AFB_1 in feed, did not cause residual accumulations in fisheries and organs, thus not showing detrimental effects to fish and therefore not affecting the final consumer.

Keywords: Aquaculture; Contaminated Feed; Chromatographic Analysis; Fish; Toxicity.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A população mundial deverá atingir 8,2 bilhões de pessoas em 2030, sendo estimado que 842 milhões tenham estado subnutridas somente no período 2011-13, e isso demonstra que o suprimento de alimentos será um desafio cada vez maior nas próximas duas décadas. Com o aumento da renda, da expectativa de vida e da urbanização, juntamente com as alterações demográficas decorrentes da composição familiar, e a preocupação para uma alimentação saudável e produção sustentáveis, haverá grandes mudanças no volume e na composição da demanda por alimentos. Esse cenário, por sua vez terá um impacto sobre a oferta de alimentos, a qual deverá aumentar tornando-se mais eficiente dentro das limitações apresentadas pela disponibilidade de recursos naturais e tecnologias existentes (FAO, 2014).

O peixe é um componente importante para a alimentação humana, representando uma fonte relativamente barata e acessível de proteína de alta qualidade para as famílias de baixa renda. Atualmente o consumo de peixes pela população tem aumentado em todo o mundo, principalmente em função do aumento da disponibilidade, do fácil acesso e de preços competitivos em relação às carnes bovina, suína e de aves (Anater et al., 2016).

Em uma avaliação na África Ocidental, estimou-se que o consumo de pescados proporciona de 40 à 70% da ingestão de proteína da população (Béné & Heck, 2005), sendo uma proteína com maior disponibilidade do que aquela presente nos alimentos básicos baseados em carboidratos (Ikutegbe & Sikoki, 2014).

Essa demanda levou a um rápido desenvolvimento da aquicultura, a qual tem a possibilidade de preencher a lacuna deixada pela escassez de produtos alimentares oriundos da pesca predatória e aumento populacional; escassez essa causada pelo declínio ou mesmo estagnação da população das espécies com interesse comercial para captura, enquanto há um aumento constante da demanda por alimentos (De Silva, 2001).

A produção mundial de peixes de viveiro, camarão, mariscos e ostras, ou seja, a aquicultura, mais que dobrou em peso e valor durante a década de 90, enquanto os desembarques de peixes capturados permaneceram estabilizados

(Naylor et al., 2001). Esse incremento na produção aquícola contínua demonstrando sua importância, pois de acordo com Bostock et al., em 2010, a aquicultura contribuía com quase metade de todos os alimentos de origem aquática destinada ao consumo humano no mundo, sendo uma parte vital da indústria global de alimentos. Numa breve estimativa o Banco Mundial (2014) prevê que em 2030, com a estabilização ou a diminuição da pesca predatória e o substancial incremento na demanda devido ao crescimento da classe média, a aquicultura poderá ser responsável por cerca de dois terços da produção mundial de pescados.

Com esse aumento no consumo de pescado, consequentemente algumas preocupações começam a tomar importância, principalmente àquelas relacionadas à segurança alimentar desses produtos disponíveis no mercado.

Uma das preocupações é relacionada aos resíduos químicos que podem estar presentes em qualquer produto de origem animal, causando prejuízos desde a produção animal, como uma queda de desempenho, até ao consumidor final, já que a ingestão desses produtos pode colocar em risco a saúde humana.

Um dos principais pontos para se garantir a qualidade dos produtos finais, é o controle da alimentação de peixes em cativeiro, desde o uso de níveis nutricionais adequados até o controle de contaminação por fungos e micotoxinas, objetivando a máxima saúde animal e, consequentemente máximo desempenho, redução de perdas econômicas e minimização dos perigos para a saúde humana (Cavaliere et al., 2005; Barbosa et al., 2013), Rodrigues et al. (2011) relataram que essas perdas são suportadas por todos os participantes ao longo da cadeia de produção animal, ou seja, desde os agricultores (produtores dos grãos), os pecuaristas, os processadores, os distribuidores de produtos de origem animal, e finalmente aos consumidores.

Além de apresentar riscos à saúde pública, a presença de substâncias indesejáveis e perigosas nos produtos de origem animal, também limita e/ou reduz a comercialização desses nos mercados internacionais (Frenich et al., 2014). Devido a isto, agências internacionais, como a *Food and Drugs Administration* (FDA, 1995) e a *European Comission* (EC, 2006) estabeleceram normativas ditando os limites máximos de resíduos (LMR) para diversas

substâncias, entre elas as micotoxinas, as quais apresentam grande importância na produção intensiva de animais, em escala global.

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2004), o desenvolvimento dessas normativas pode ser influenciado por fatores científicos e socioeconômicos, entre os quais: a disponibilidade de dados toxicológicos cientificamente sólidos; a disponibilidade de dados sobre a ocorrência de micotoxinas em *commodities* utilizadas como matéria prima; o conhecimento da distribuição e concentrações de toxinas em matérias primas; a disponibilidade de métodos de detecção, incluindo conformacionais e analíticos; a legislação governamental de países onde existam contratos comerciais, e por último a necessidade de uma suficiência no fornecimento de alimentos.

As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por um grupo diversificado de fungos que contaminam culturas agrícolas antes da colheita ou durante o armazenamento pós-colheita. Diferentes espécies incluindo os seres humanos, aves, suínos e peixes que exibem diferentes níveis de mortalidade e morbidade quando da exposição a estas substâncias nocivas (Zychowski et al., 2013a). Elas representam um desafio cada vez maior, pois são encontradas numa ampla gama de culturas, além da significante diferença entre suas estruturas químicas, bem como nos efeitos e sintomatologia pós-exposição em animais e humanos (Kendra & Dyer, 2007).

Dentro da diversa sintomatologia em humanos e animais, elas podem apresentar efeitos carcinogênicos, neurotóxicos, hepatotóxicos, mutagênicos e teratogênicos (Kolpin et al., 2014), além dos efeitos que não são notados clinicamente, mas que afetam principalmente o desempenho zootécnico animal.

Mesmo com as normativas descritas anteriormente, Kendra & Dyer (2007) afirmam que devido à natureza onipresente das micotoxinas e o fato de que os padrões atuais concentram-se em regulamentar o produto ao invés do processo, a contaminação de alimentos e rações por essas substâncias é praticamente inevitável.

De modo geral as micotoxinas apresentam uma grande estabilidade química, o que permite sua permanência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (Chu,

1991; Cruz, 2010). As aflatoxinas (AFs) têm ponto de fusão alto e são estáveis ao calor, sendo decompostas à temperaturas superiores a 220º C (Scussel, 1984), ou seja, o processamento térmico de rações ou até mesmo alimentos contaminados não tem efeito sobre o nível de contaminação.

As AFs apresentam grande importância, seja para a produção animal, seja para o consumo humano, já que possui elevado grau hepatocarcinogênico para estes (Busby & Wogan, 1984; Yu, 2012).

São imunossupressoras (Bondy & Pestka, 2000; Jiang et al., 2005, 2008), promotoras de inflamação (Qian et al., 2014) e supressoras de crescimento em animais e seres humanos (Harvey et al., 1991; Gong et al., 2002; Marin et al., 2002; Turner et al., 2007; Mahdavi et al., 2010).

Existem 4 tipos principais de aflatoxinas, B_1, B_2, G_1 e G_2, além de um produto da metabolização da aflatoxina B_1 (AFB_1) que é a aflatoxina M_1. Elas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*, no entanto, existem algumas espécies encontradas em baixa frequência na natureza, entre elas: *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus*, os quais também têm demonstrado potencial aflatoxigênico (Kurtzman et al., 1987; Peterson et al., 2001; Moss, 2002).

O *Aspergillus* é um fungo que pertence principalmente a contaminantes de cereais na armazenagem. Desenvolvem-se naturalmente em produtos alimentícios, e cepas têm sido frequentemente encontrados em milho, amendoim, feijão, arroz e trigo, sementes de algodão, sorgo, especiarias, rações e frutas (Corrêa, 2000).

A temperatura mínima necessária para o desenvolvimento fúngico é 10º C e para a produção de AFB_1 é de 12º C. A atividade de água (AW) mínima necessária para o início do seu desenvolvimento e consequente sua produção é de 0,75 e de 0,83, respectivamente. Entretanto, o *Aspergillus* cresce e pode produzir aflatoxinas de forma ótima à 25º C, com uma atividade de água de 0,95 (Hesseltine, 1976).

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993, 2012) a AFB_1 foi classificada como um agente de elevado poder carcinogênico, recebendo a classificação 1 dentro de uma escala de 1 a 4, sendo 1 substância com comprovado efeito carcinogênico e 4 sem evidências de

carcinogenicidade. Em humanos o hepatocarcinoma é o principal tipo de câncer relatado por exposição às AFs.

Em virtude de sua grande extensão territorial, o Brasil tem encontrado dificuldades para implementar leis de controle de contaminantes. Os regulamentos existentes para o controle de micotoxinas nos produtos nacionais ainda são ineficazes. As informações sobre o impacto e distribuição de micotoxinas nos produtos agrícolas e *commodities* nacionais ainda são escassas levando-se em conta o nível produtivo e a importância econômica do setor agrícola brasileiro (Kubitza, 2010).

Em um levantamento realizado pelo Laboratório de Análises Micotoxicológicas – Universidade Federal de Santa Maria/RS (LAMIC) foram identificadas a presença de AFB_1 em 43,08% das amostras de milho destinadas à alimentação animal, com uma média de 17,16 $\mu g.kg^{-1}$ (Caureo et al., 2001).

Considerando que o milho é o principal ingrediente energético utilizado nas rações animais no Brasil e em diversos outros países, é muito provável que um grande percentual das rações apresente positividade para a presença de micotoxinas, independente da concentração (Lopes, 2008).

Na suinocultura e na avicultura, atualmente há uma maior conscientização por parte dos produtores em relação aos riscos da presença de micotoxinas nas rações, do que na aquicultura, onde o assunto ainda tem sido pouco considerado. O primeiro relato de mortalidade de peixes atribuída à intoxicação por micotoxinas, foi registrado no início da década de 60, na Califórnia com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que consumiram ração produzida com farelo de algodão contaminado por aflatoxinas (Kubitza, 2010).

Com a intensificação do cultivo de algumas espécies fluviais, como o *catfish* americano (*Ictalurus punctatus*) e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), os efeitos das micotoxinas em organismos aquáticos vem sendo avaliados com maior rigor (Kubitza, 2010), provavelmente devido ao manejo intensivo das produções e alto consumo de rações.

Dependendo da quantidade de AFB_1 ingerida e também do tempo de exposição, os animais podem apresentar sinais clínicos de intoxicação aguda e/ou alterações patológicas características, ou efeitos crônicos, na qual a identificação dos sinais clínicos é mais difícil, já que nestes casos não há um

quadro clínico típico, mas diversos reflexos negativos na saúde animal, com significativas perdas econômicas (Lopes, 2008).

Os sinais clínicos crônicos da intoxicação por micotoxinas em peixes, geralmente são inespecíficos, assemelhando-se em grande escala com outras enfermidades que muitas vezes apresentam-se concomitantemente, dificultando assim o diagnóstico e tratamento. Muitas vezes, os animais, são tratados somente para a doença concomitante, como por exemplo uma infecção bacteriana secundária, entretanto continuam com queda no desempenho zootécnico, apresentando assim um alto custo de tratamento devido a ineficiências do mesmo, resultando em consideráveis perdas econômicas nas criações (Kubitza, 2010).

Um dos principais problemas na investigação das micotoxicoses a campo, é a não detecção da micotoxina em uma amostra recente do alimento, visto que o animal pode ter ingerido a micotoxina durante um certo período de tempo, apresentando os sinais devido a um efeito cumulativo no organismo. Em resumo, na ausência de critérios diagnósticos, de exames laboratoriais adequados de confiança e de um histórico de análises nos alimentos, as micotoxicoses permanecerão sendo doenças com diagnósticos complicados e erráticos (Zain, 2011).

Em geral, os sinais clínicos de micotoxicoses em peixes variam em função da espécie, dos tipos de micotoxinas envolvidos, das concentrações destas nas rações, do período ao qual o animal é exposto ao alimento contaminado, dentre outros fatores. Algumas evidências encontradas nos estudos com micotoxinas indicam que: peixes de clima frio são menos tolerantes à micotoxina na ração, comparados a peixes cultivados em águas tropicais; animais jovens (pós-larvas e alevinos) são mais sensíveis do que juvenis e adultos (Kubitza, 2010).

A susceptibilidade à AFB_1 varia muito dentre as espécies de peixes. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é o peixe mais sensível (Horn et al., 1989), porém outras espécies como bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) e peixe-zebra (*Danio rerio*) apresentam maior tolerância (Hendricks & Bailey, 1989; Plakas et al., 1991; Tsai, 1996). Uma das espécies com maior interesse comercial no mundo é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que também é afetada pela AFB_1, estudos demonstraram diversos efeitos deletérios dessa micotoxina nessa

espécie, como: diminuição do ganho de peso, menor eficiência alimentar e diminuição no tamanho do fígado, quando da ingestão de rações com níveis de 1.500 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 durante um período de 10 semanas (Zychowski et al., 2013b).

Intoxicações leves podem passar despercebidas pelos produtores. Geralmente provocam uma redução no apetite e no crescimento dos peixes, e piora nos índices de conversão alimentar. Os peixes podem apresentar diarreias e, em alguns casos, até rejeitar ou regurgitar o alimento oferecido. Alguns sinais mais específicos, como lesões (carcinomas) no fígado e nos rins, anemias, icterícia, distúrbios reprodutivos e nervosos, vômitos, entre outros, podem ocorrer dependendo da micotoxina, de sua concentração na dieta e do tempo em que o animal foi exposto ao alimento contaminado (Kubitza, 2010).

Intoxicações crônicas podem provocar o aparecimento de lesões despigmentadas na pele, opacidade do cristalino (catarata), degeneração de nadadeiras e pigmentação amarelada da pele. Os animais podem apresentar letargia ou distúrbios nervosos na forma de espasmos musculares, natação errática e curvatura do corpo. Outro sinal clínico frequente é a palidez das brânquias, que pode ser indicativo de anemia nos peixes. Estas anemias são resultados da redução na contagem e no volume percentual (hematócrito) dos glóbulos vermelhos, bem como, na concentração de hemoglobina no sangue. Também podem ser decorrentes de hemorragias em órgãos internos, como no fígado e nos rins (Kubitza, 2010).

Outros sinais encontrados se referem à alterações na forma (aumento de tamanho) e lesões em órgãos internos como rins, fígado, baço e coração. O fígado pode apresentar hepatomegalia, com excessivo acúmulo de gordura e lesões cancerígenas (carcinomas), de cor amarelo pálido que, em alguns casos, também podem ser visualizadas nos rins. Lesões nas células renais e no baço, também são comuns nos casos de micotoxicoses, prejudicando a produção de células sanguíneas e a filtragem do sangue (Kubitza, 2010).

Os animais podem ficar com o sistema imunológico debilitado, favorecendo a maior incidência de doenças infecciosas e aumentando a mortalidade (Kubitza, 2010).

Entre os efeitos da imunossupressão, demonstrados em aves domésticas e outros animais de experimentação, destacam-se aplasia do timo e da bursa

de Fabricius, redução do número e da atividade de células T, diminuição da resposta de anticorpos, redução dos componentes humorais e imunoglobulinas (Pestka & Bondy, 1990).

Alguns antibióticos podem até mesmo agravar a saúde dos peixes expostos a micotoxinas, pois sua ação é tóxica ao fígado, muitas vezes já́ comprometido pela ação das micotoxinas. Deste modo, é preciso realizar uma adequada avaliação dos sinais clínicos e o rastrear potenciais micotoxinas presentes nas rações (Kubitza, 2010).

Na maioria dos casos de contaminação crônica a micotoxinas, quando os sinais clínicos são notados nos animais, a ração que desencadeou o problema já foi toda consumida, mas o reflexo persiste com a nova ração, que pode não apresentar quantidades detectáveis de micotoxinas. Assim, o ideal seria o armazenamento de amostras de um quilo de todas as rações utilizadas, colhidas na chegada dos produtos na propriedade, armazenadas por um período mínimo de seis meses em local fresco e seco (geladeira, de preferência) em embalagens com o mínimo de ar possível, em seu interior (Kubitza, 2010).

A maioria das contaminações por micotoxinas acontecem durante o armazenamento das rações sob condições adversas, como elevada umidade do ambiente, altas temperaturas, risco de respingos de chuva ou goteiras, locais pouco ventilados e sujos, com grande inoculo de fungos, presença de insetos, roedores e outros animais, sacos mal acomodados e empilhados em contato direto com o piso ou com as paredes do depósito, entre outras. Assim, uma ração que originalmente chegou à propriedade isenta ou com níveis aceitáveis de micotoxinas, pode acumular micotoxinas durante o seu armazenamento (Kubitza, 2010).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe teleósteo com distribuição neotropical (Gomes et al., 2000), facilmente encontrado na América do Sul e Central, ao leste dos Andes e na Venezuela (Barcellos et al., 2004; Borges, 2005; Gomiero et al., 2007), desde o centro da Argentina até o sul do México, e é muito encontrado em rios do interior do Rio Grande do Sul (Borges, 2005). Seu cultivo está aumentando no sul do Brasil, devido à sua relativa popularidade na região (Gomes et al., 2000; Tavares-Dias et al., 2002; Pamplona, 2009; Pamplona et al., 2011).

Vivem em lagos e rios e preferem ambientes mais calmos e profundos, com fundo de areia e lama junto as margens e vegetação (Gomes et al., 2000; Gomiero et al., 2007; Parra et al., 2008).

Por ser uma espécie nativa da América do Sul, suporta baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e resiste a grandes oscilações de temperatura, embora o ideal térmico para a espécie situe-se entre 22 e 28°C (Borges, 2005). Os alevinos podem suportar até 9 $g.L^{-1}$ de salinidade e um pH na faixa de 8,0 a 8,5 (Pouey et al., 1999). Cresce rapidamente no verão (Barcellos et al., 2004), sendo assim, uma espécie aceitável para sistemas de produção em regiões da região sul da América do Sul devido à fácil adaptação ao clima temperado e subtropical (Borges, 2005).

Os adultos da espécie *Rhamdia quelen* são onívoros no ambiente natural, possuem hábitos noturnos, alimentando-se de insetos terrestres e aquáticos, crustáceos, restos vegetais, detritos orgânicos além de peixes como lambaris e guarus (Gomes et al., 2000; Gomiero et al., 2007; Pamplona, 2009; Pamplona et al., 2011). Essa característica contribui para sua adaptação ao alimento artificial e, assim, para sua criação intensiva (Gomes et al., 2000).

A composição química da carne do jundiá (*Rhamdia quelen*) pode ser considerada como de alto valor nutricional para o consumo humano quando comparada a outras espécies de peixes, tal como relatado por Melo (2000) que encontrou valores de 12,38 a 15,99% de proteína bruta e 2,17 à 12,28% de lipídios na matéria natural.

No último *workshop* sobre a espécie, realizado de 21 a 23 de agosto de 2013 na cidade de Florianópolis – Santa Catarina, o *Rhamdia quelen* foi anunciado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013), como a espécie mais estudada nos últimos tempos, sendo indicada como um bom bioindicador. Dolci et al. (2013), ao estudarem a toxicidade do manganês (Mn), elemento presente em grande parte da formulação de praguicidas, observou que em condições de hipóxia moderada o jundiá (*Rhamdia quelen*) foi capaz de desenvolver mecanismos de adaptação para manutenção da homeostase, como diminuição do dano oxidativo no tecido cerebral e renal e o aumento da atividade mitocondrial no tecido hepático e branquial.

Esta dissertação justifica-se pelo fato de demonstrar e padronizar uma metodologia para avaliação de AFB_1 na carne e nos órgãos de peixes, bem

como na água onde os animais foram mantidos, podendo assim identificar: prováveis riscos no consumo de pescado de jundiá (*Rhamdia quelen*) pelo homem, o potencial de contaminação ambiental da água residual, bem como avaliar os efeitos tóxicos que a AFB_1 pode causar no organismo do jundiá (*Rhamdia quelen*). Estes dados podem servir como base para a estimativa do risco de exposição da população à contaminação de produtos por AFB_1.

O objetivo deste estudo foi determinar os possíveis efeitos deletérios do fornecimento de rações contendo diferentes níveis de AFB_1 através de parâmetros de desempenho zootécnico, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de jundiás (*Rhamdia quelen*), além da determinação da bioacumulação dessa micotoxina no pescado e na água proveniente da produção desses animais.

REFERÊNCIAS

Anater A, Manyes L, Meca G, Ferrer E, Luciano FB, Pimpão CT, Font G. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. Aquaculture. 2016; 451: 1-10.

Barbosa BTS, Pereyra CM, Soleiro CA, Dias EO, Oliveira AA, Keller KA, Silva PPO, Cavaglieri LR, Rosa CAR. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. International Aquatic Research. 2013; 5: 2-9.

Barcellos LJG, Kreutz LC, Souza C, Rodrigues LB, Fioreze I, Quevedo RM, Cericato L, Soso AB, Fagundes M, Conrad J, Lacera LM, Terra S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture. 2004; 237: 229-236.

Béné C, Heck S. Fish and food security in Africa. World Fish Centre. 2005; 28: 8.

Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 2000; 3: 109-143.

Borges A. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeito de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Tese de doutorado). Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Little D, Ross L, Handisyde N, Gatward I. Aquaculture: Global status and trends. Aquaculture. 2010; 365: 2897-2912.

Busby WF, Wogan GN. Aflatoxins. In: Searle GC, editor. Chemical Carcinogens. Washington DC: American Chemical Society; 1984. p. 945.

Caureo MS, Mallmann CA, Almeida CAA, Milbradt EL. Incidência de aflatoxinas em amostras de milho procedentes do Brasil e Países Platinos, destinado ao consumo animal. Anais do 1º Congresso Panamericano de Centros de Informação e Controle Toxicológico; 2001.

Cavaliere C, D'Ascenzo G, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Lagana A. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. Food Chemistry. 2005; 92: 559-568.

Chu FS. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. Mutation Research. 1991; 259: 291-306.

Corrêa B. Fungos toxigênicos: Panorama nacional. Anais do Encontro Nacional de Micotoxinas e Simpósio de Armazenamento Qualitativos de Grãos do Mercosul; 2000; Florianópolis, Santa Catarina. p.162-168.

Cruz JVS. Ocorrência das aflatoxinas e fumonisinas em produtos a base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, estado de São Paulo (Tese de doutorado). Pirassununga, SP: Universidade de São Paulo; 2010.

De Silva SS. A global perspective of aquaculture in the new millennium. In: Subasinghe RP, Bueno P, Phillips MJ, Hough C, McGladdery SE, Arthur, JR, editores. Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium; 2001 February 20-25; Bangkok, Thailand. p. 431-459.

Dolci GS, Dias VT, Roversi K, Roversi Kr, Pase CS, Segat HJ, Teixeira AM, Benvegnu DM, Trevizol F, Barcelos RCS, Riffel APK, Nunes MAG, Dressler VL, Flores EMM, Baldisserotto B, Bürger ME. Moderate hypoxia is able to minimize the manganese-induced toxicity in tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2013; 91: 103-109.

European Commission (EC). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L364: 2006; 5-24 (Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006).

Food And Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Economic analysis of supply and demand for food up to 2030 – Special focus on fish and fishery products. Audun Lem, Trond Bjorndal, Alena Lappo: 2014. Rome.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition Paper: 2004: No. 81. Rome.

Food and Drugs Administration (FDA). Section 555.400: Foods – Adulteration with aflatoxins; 1995. Disponível em: <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074555.htm>.

Frenich AG, Romero-González R, Aguilera-Luiz MM. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. Trends in Analytical Chemistry. 2014; 63: 158-169.

Gomes LC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). Ciência Rural. 2000; 30: 179-185.

Gomiero LM, Souza UP, Braga FMS. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. Biota Neotropical. 2007; 7: 127-133.

Gong YY, Cardwell K, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Hall AJ, Wild CP. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. B.M.J. Journals. 2002; 325: 20-21.

Harvey RB, Kubena LF, Phillips TD, Corrier DE, Elissalde MH, Huff WE. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. American Journal of Veterinary Research. 1991; 52: 152-156.

Hendricks JD, Bailey GS. Adventitious toxins. In: Halver JE, editor. Fish nutrition. New York: Academic Press Inc.; 1989. p. 605-651.

Hesseltine CW. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. In: Rodricks JV, editor. Mycotoxins and other fungal related food problems. Washington DC: American Chemical Society; 1976. p. 1-22.

Horn CW, Boleman LL, Coffman CG, Deton JH, Lawhorn DB. Mycotoxins in feed and food producing crops college state Texas. Texas Vet Med Diagnostic. 1989.

Ikutegbe V, Sikoki F. Microbiological and biochemical spoilage of smoke-dried fishes sold in West African open markets. Food Chemistry. 2014; 161: 332-336.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Chemical agents and related ocupations: A review of human carcinogens. 2012; 100F. Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 1993; 56. Lyon, France.

Jiang Y, Jolly PE, Ellis WO, Wang JS, Phillips TD, Williams JH. Aflatoxin B_1 albumin adduct levels and cellular immune status in ghanaians. International Immunology. 2005; 17: 807-814.

Jiang Y, Jolly PE, Preko P, Wang JS, Ellis WO, Phillips TD, Williams JH. Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. Clinical and Developmental Immunology. 2008; 1: 1-12.

Kendra DF, Dyer RB. Opportunities for biotechnology and policy regarding mycotoxin issues in international trade. International Journal of Food Microbiology. 2007; 119: 147-151.

Kolpin DW, Schenzel J, Meyer MT, Phillips PJ, Hubbard LE, Scott TM, Bucheli TD. Mycotoxins: Diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. Science of the Total Environment. 2014; 470-471: 669-676.

Kubitza, F. Micotoxinas e seus efeitos nos peixes. Panorama da Aquicultura. 2010; 20: 14-23.

Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. Antonie Van Leeuwenhoek. 1987; 53: 147-158.

Lopes, PRS. Efeito das aflatoxinas e dos adsorventes sobre o desempenho zootécnico de alevinos e juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) (Tese de doutorado). Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas; 2008.

Mahdavi R, Nikniaz L, Arefhosseini SR, Vahed Jabbari M. Determination of aflatoxin M_1 in breast milk samples in Tabriz–Iran. Maternal and Child Health Journal. 2010; 14: 141-145.

Marin DE, Taranu I, Bunaciu RP, Pasclae F, Tudor DS, Avram N, Sarca M, Cureu I, Criste RD, Suta V, Oswald IP. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. Journal of Animal Science. 2002; 80: 1250-1257.

Melo JF. Efeito da utilização de diferentes fontes e níveis de lipídios na composição corporal e desenvolvimento de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) (Dissertação de mestrado). Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria; 2000.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). IV Workshop sobre jundiá. 2013; Florianópolis, Santa Catarina.

Moss MO. Mycotoxin review e *Aspergillus* and *Penicillium*. Mycologist. 2002; 16: 116-119.

Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera J, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. Effects of aquaculture on world fish supplies. Journal of Ecology. 2001; 8: 1-12.

Pamplona JH, Oba ET, Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, Ribeiro CAO, Zampronio AR, Assis HCS. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011; 74: 342–334.

Pamplona JH. Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen*: Estudo bioquímico, hematológico e histopatológico (Dissertação de mestrado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2009.

Parra JEG, Neto JR, Veiverbeg CA, Lazzari R, Bergamin GT, Pedron FA, Rossato S, Sutili FJ. Alimentação de fêmeas de jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. Ciência Rural. 2008; 38: 2011-2017.

Peterson SW, Ito Y, Horn BW, Goto T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. Mycologia. 2001; 93: 689-703.

Petska JJ, Bondy GS. Alteracion of immune function following dietary mycotoxin exposure. Canadian Journal Physiology Pharmacology. 1990; 68: 1009-1026.

Plakas SM, Loveland PM, Bailey GS, Blazer VS, Wilson GL. Tissue deposition and excretion of 14C-labeled aflatoxin B_1 after oral administration in channel catfish. Food and Chemical Toxicology. 1991; 29: 805-808.

Pouey JLO, Miotto HC, Kunz TL. Principais componentes corporais do jundiá *Rhamdia* sp. cultivado na densidade de um peixe/m^2 e dividido em quatro faixas de peso. Anais da XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnica; 1999; Porto Alegre, Rio Grande do Sul. p. 314.

Qian G, Tang L, Guo X, Wang F, Massey ME, Su J, Guo TL, Williams JH, Phillips TD, Wang JS. Aflatoxin B_1 modulates the expression of phenotypic markers and cytokines by splenic lymphocytes of male f344 rats. Journal of Applied Toxicology. 2014; 34: 241-249.

Rodrigues I, Handl J, Binder EM. Mycotoxin occurrence in commodities, feeds and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance. 2011; 4: 168-179.

Scussel VM. Estudo da incidência de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogae l.*), milho (*Zea mays L.*) e produtos derivados. Campinas: UNICAMP; 1984.

Tavares-Dias M, Mataqueiro MI, Perecin D. Total leukocyte counts in fishes by direct or indirect methods? Boletim Instituto da Pesca. 2002; 2: 155-161.

The World Bank. Fish farms to produce nearly two thirds of global food fish supply by 2030, report shows. 2014 February 5. Disponível em: <http://www.worldbank.org/en/news/press-release/2014/02/05/fish-farms-global-food-fish-supply-2030>.

Tsai HW. Evaluation of zebrafish (*Brachydanio rerio*) as a model for carcinogenesis (Tese de doutorado). Corvallis, UE: Oregon State University; 1996.

Turner PC, Collinson AC, Cheung YB, Gong Y, Hall AJ, Prentice AM, Wild CP. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. International Journal of Epidemiology. 2007; 36: 1119-1125.

Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. Toxins. 2012; 4: 1024-1057.

Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society. 2011; 15: 129-144.

Zychowski KE, Hoffmann AR, Ly HJ, Pohlenz C, Buentello A, Romoser A, Gatlin DM, Phillips TD. The effect of aflatoxin-B_1 on red drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of NovaSil for the prevention of aflatoxicosis. Toxins. 2013a; 5: 1555-1573.

Zychowski KE, Pohlenz C, Mays T, Romoser A, Hume M, Buentello A, Gatlin DM, Phillips TD. The effect of NovaSil dietary supplementation on the growth and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-B_1 contaminated feed. Aquaculture. 2013b; 376: 117-123.

CAPÍTULO 2

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE ALEVINOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) ALIMENTADOS COM RAÇÃO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AFLATOXINA B_1

Growth Performance of Jundiá's (Rhamdia quelen) Fingerling Fed with Feed Containing Different Concentration of Aflatoxin B_1

ANATER A.[1], BARBOSA C.K.[2], IACHINSKI E. A.[3], RIBEIRO D.R.[4], OSTRENSKY A.[5], PIMPÃO C.T.[6]

[1]Mestranda em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, amanda_anater@hotmail.com;
[2]Graduanda em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, carolinakonkel@gmail.com.br
[3]Graduando em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, edevaldoia@hotmail.com;
[4]Mestrando em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, deividrr@hotmail.com;
[5]Professor Titular – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, andre.ostrensky@pucpr.br;
[6]Professora Titular – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, claudia.pimpao@pucpr.br.

RESUMO

Introdução: As aflatoxinas são compostos de baixo peso molecular produzidos principalmente pelos fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que geralmente são encontrados em climas quentes e úmidos. A toxicidade da aflatoxina B_1 (AFB_1) tem sido associada a um baixo crescimento dos animais, à anomalias comportamentais, à inibição da imunidade, a hepatócitos necróticos e a danos reprodutivos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das diferentes concentrações de AFB_1 fornecidas via ração por um período de 56 dias sobre o desempenho zootécnico de alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*). **Métodos:** Foram utilizados 624 alevinos de jundiás, distribuídos em 4 grupos distintos (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 e G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 na ração), os grupos foram separados aleatoriamente em 24 aquários (n=26 alevinos/aquário) e os peixes alimentados durante 56 dias consecutivos com ração peletizada. Os parâmetros avaliados nos dias +28, +42 e +56 foram pesos individuais, tamanhos totais e tamanhos padrão, ganho de peso médio diário (GPD), ganho de biomassa (GB), fator de condição corporal (FCC), relação hepatossomática (RHS) e conversão alimentar (CA). Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA seguido por teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's. **Resultados:** Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) em GPD, GB, FCC, RHS e CA. Os animais do G4 apresentaram um maior tamanho total e um maior tamanho padrão ($p<0,05$) em relação ao G1, no dia +42. Aos 56 dias, os animais do G2

apresentaram um menor peso individual, tamanho total e tamanho padrão ($p<0,05$), quando comparado aos G1, G3 e G4. **Conclusão:** Pode-se concluir que os diferentes níveis de AFB_1 utilizados na ração não afetam o desempenho zootécnico dos animais de forma linear.

Palavras chaves: Aquicultura; *Aspergillus flavus*; Desenvolvimento Físico; Ganho de Peso Diário; Micotoxina.

ABSTRACT

Introduction: Aflatoxins are composed of low molecular weight produced mainly by moulds *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, which are usually found in warm and humid climates. The toxicity of aflatoxin B_1 (AFB_1) has been associated with a low growth of the animals, behavior abnormalities, inhibition of immunity, necrotic hepatocytes and reproductive losses. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of AFB_1 provided by feed during 56 days, in parameters of growth performance in jundiá's fingerlings (*Rhamdia quelen*). **Methods:** 624 jundiá's fingerlings were used, divided into 4 different groups (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 and G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ of AFB_1 in feed), fish were randomly divided into 24 aquariums (n=26 fingerlings/aquarium) and were fed for 56 consecutive days with pelleted feed. The measured parameters in the experimental days +28, +42 and +56 were individual weights, total and standard sizes of fish, average daily weight gain (DWG), biomass gain (BG), body condition factor (BCF), hepatosomatic ratio (HSR) and feed conversion (FC). For statistical analysis was used ANOVA followed by Tukey test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests. **Results:** There was no significant difference ($p>0.05$) in DWG, BG, BCF, HSR and FC. The animals of G4 had a higher overall size and a larger standard size ($p<0.05$) compared to G1, on the +42 day. After 56 days, the fish of G2 showed a smaller individual weight, overall size and standard size ($p<0.05$) when compared to G1, G3 and G4. **Conclusion:** It can be concluded that the AFB_1 levels up to 180 $\mu g.kg^{-1}$ of feed do not affect linearly the growth performance of jundiá.

Keywords: Aquaculture; *Aspergillus flavus*; Daily weight gain; Growth; Immune system; Mycotoxins.

2.1 INTRODUÇÃO

A constante evolução nos estudos sobre a qualidade dos alimentos destinados à alimentação dos peixes, demonstram que qualquer fator que afete a composição nutricional das rações pode ocasionar prejuízos ao produtor. Dessa forma, deve-se ressaltar a importância de contaminantes naturais como os fungos produtores de micotoxinas, que podem acarretar perdas consideráveis na piscicultura (Vieira et al., 2006).

As aflatoxinas (AFs) são compostos de baixo peso molecular produzidos principalmente pelos fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que geralmente são encontrados em climas quentes e úmidos (Huang et al., 2014).

Atualmente, a aflatoxina B_1 (AFB_1) é classificada como a substância com maior potencial carcinogênico para humanos (IARC, 2012), também apresenta características mutagênicas e teratogênicas, sendo a principal forma de contaminação através da ingestão de alimentos contaminados (Ferreira et al., 2006).

Essa micotoxina apresenta efeitos negativos sobre a produção animal, reduzindo o consumo de ração, conversão alimentar, além de deixar o animal susceptível às doenças por sua ação imunossupressora (Lopes et al., 2010).

A AFB_1 pode ser um problema potencialmente grave para animais aquáticos cultivados, uma vez que a intensificação da alimentação desses animais demanda maior consumo de ração, as quais podem apresentar algum nível de contaminação, e consequentemente resíduos nas carcaças, e seu consumo pode representar uma ameaça para os seres humanos (Manning et al., 2005a; El-Sayed & Khalil, 2009; Raghavan et al., 2011). No entanto, existem poucos levantamentos a respeito dos níveis de contaminação de rações utilizadas na aquicultura, e consequentemente poucos estudos sobre o impacto dessa contaminação na aquicultura brasileira (Barbosa et al., 2013).

O *Rhamdia quelen* é um peixe que tem distribuição neotropical, sendo encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, cujo cultivo vem se intensificando no sul do Brasil (Gomes et al., 2000; Baldisserotto & Radünz, 2004; Pamplona, 2009; Pamplona et al., 2011).

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de AFB_1 fornecidas via ração por um período de 56 dias sobre o desempenho zootécnico de alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), com duração de 56 dias. As análises dos ingredientes e das concentrações de AFB_1 na ração foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da PUCPR e no Laboratório de Toxicologia Alimentar da Universidade de Valência/Espanha, respectivamente.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob protocolo de número 886 – 2ª versão.

624 alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) com 7,44 g ± 2,18 de peso corporal médio, oriundos do LAPEP/PUCPR, foram utilizados para realização deste estudo. Para a divisão dos grupos, os animais foram submetidos a um jejum de 24h, com objetivo de padronizar o peso e evitar regurgitações de alimento. Após o jejum, os animais foram pesados em grupo e alojados em 24 caixas de polipropileno contendo 26 alevinos cada, sendo 6 caixas por grupo experimental, com densidade populacional inicial média de 2,41 $g.L^{-1}$. As caixas foram distribuídas aleatoriamente em 4 bancadas, mantidas em ambiente fechado e controlado (oxigênio dissolvido, salinidade, pH e temperatura). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, longitudinal e prospectivo.

As 24 caixas de polipropileno com capacidade para 100 L cada, foram abastecidas com 80 L de água em um sistema de circulação aberta e termorregulado. O sistema com capacidade de 1.920 L de água foi abastecido por meio de um reservatório escavado externo. A entrada de água nas unidades experimentais foi mantida em aproximadamente 1,0 $L.minuto^{-1}$, ininterruptamente.

A limpeza das caixas foi realizada a cada dois dias com uso de sifão, retirando-se cerca de 20% do volume de água. Diariamente os animais foram observados para presença de eventuais sinais clínicos, bem como, a verificação de mortalidade e a retirada destes das caixas.

Também foram monitorados diariamente os parâmetros de qualidade da água nas unidades experimentais, como, oxigênio dissolvido, salinidade, pH e temperatura, com auxílio de oxímetro e medidor de pH digitais. A amônia total e o nitrito foram monitorados semanalmente com auxílio de kit colorimétrico.

Os grupos experimentais foram formados com base em 4 diferentes concentrações de aflatoxina B_1 (AFB_1), fornecidas aos animais via ração. Os níveis de AFB_1 e os respectivos grupos foram de 0 (G1), 45 (G2), 90 (G3) e 180 (G4) $\mu g.kg^{-1}$ de ração, respectivamente. No Brasil o limite máximo de AFs permitido em alimentos para animais é de 50 $\mu g.kg^{-1}$ (Brasil, 1988). As concentrações utilizadas neste trabalho objetivaram trabalhar com um grupo abaixo do limite permitido, além de dois outros grupos com duas e quatro vezes a mais do que à concentração inicial de 45 $\mu g.kg^{-1}$.

A AFB_1 purificada foi adquirida da Sigma Chemical Co., USA (AFB_1/A6636), dissolvida em clorofórmio, posteriormente adicionada em óleo de canola, o qual foi utilizado na formulação da ração.

A ração experimental foi formulada de forma a ser isoprotéica e isocalórica, contendo 38,01% de proteína bruta e 3.655 $kcal.kg^{-1}$ de energia digestível (Tabela 01), conforme composição descrita por Coldebella & Radünz Neto (2002).

Os ingredientes utilizados na ração experimental permaneceram isentos de contaminação, conforme análise realizada no Laboratório de Toxicologia Alimentar. Esse cuidado se explica por tratar-se de inclusão artificial de aflatoxina na ração sem que haja interferência de toxinas do próprio alimento. A mistura do óleo de canola e clorofórmio (contendo aflatoxinas) foi mantida em estufa à 40º C por 24h, para evaporação do clorofórmio. Após a evaporação, o óleo foi misturado aos demais ingredientes da ração em misturador tipo Y com capacidade para aproximadamente 50 kg.

As rações foram preparadas no LAPEP/PUCPR e para cada quilo de material misturado foi acrescentado 300 mL de água a 50º C, com imediato processamento em moinho tipo extrusora, para obtenção de pellets de 3 mm de diâmetro. As rações peletizadas foram mantidas em estufa de circulação forçada à 50º C por 48h. Sequencialmente, foram mantidas em lugar seco, escuro e resfriado para evitar qualquer tipo de aparecimento e proliferação de fungos.

As rações experimentais prontas foram amostradas para quantificação da AFB_1 através de cromatografia líquida de alta performance, realizadas no Laboratório de Toxicologia Alimentar.

Tabela 01. Composição da ração-base experimental.

Ingredientes	Inclusão (%)	Níveis Nutricionais	% da MS
Farelo de soja 45%	38,200	Proteína Bruta	38,010
Farinha de Vísceras 50%	18,300	Gordura Bruta	13,252
Farinha de Peixe 55%	16,900	Matéria Mineral	13,495
Óleo Vegetal de Canola	8,200	Fibra Bruta	3,499
Farelo de Trigo 16%	7,500	Amido	12,331
Arroz Pré-Cozido	4,000	Cálcio	3,099
Milho 8,0%	3,225	Fósforo Total	1,601
Calcário 36%	1,60	Sódio	0549
Sal comum	0,760	Potássio	1,026
DL-Metionina 99%	0,450	Cloro	0,862
L-Lisina 78%	0,280	Lisina	2,578
Antioxidante	0,015	Metionina	1,154
Premix vitamínico e mineral[1]	0,500	Metionina +Cistina	1,653
		Energia Digestível, kcal/kg	3.655,341

[1] Composição do premix vitamínico e mineral por kg: vit. A: 1.860.000 UI; vit. D_3: 48.000 UI; vit. E: 20.000; vit. K_3: 520 mg; vit. B_1: 1.600 mg; vit. B_2: 1.400 mg; vit. B_6: 2.500 mg; vit. B_{12}: 4.000 mcg; niacina: 36 g; inositol: 2.000 mg; biotina: 600 mcg; colina: 60 mg; ácido fólico: 950 mg; vit. C: 49 g; pantotenato de cálcio: 8.800 mg; ferro: 1.250 mg; manganês: 6.240 mg; zinco: 7.500 mg; iodo: 64 mg; selênio: 21 mg; BHT: 20 g.

Após o alojamento, os animais passaram por um período de aclimatação de 15 dias. Em seguida, todos os peixes foram mantidos em jejum de 24h, para garantir uma ingestão imediata da ração. No decorrer do experimento, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (9 e 17h) até completa saciedade.

Aos 28, 42 e 56 dias experimentais, após jejum de 3 horas, foi realizada a biometria e a pesagem de 36 animais aleatórios por grupo, sendo 6 de cada caixa, para a aferição dos pesos individuais, tamanhos totais e tamanhos padrão. Além disso, foram aferidos ganho de peso médio diário (peso médio final – peso médio inicial/período experimental), ganho de biomassa (peso final – peso médio inicial*número final de peixes), fator de condição corporal (peso médio total/comprimento médio total^3*100) e relação hepatossomática (peso do

fígado/peso individual*100). A taxa de sobrevivência e a conversão alimentar também foram mensuradas (Lopes et al., 2009).

Para as análises estatísticas dos dados paramétricos foi utilizado ANOVA (one way) seguido por teste de Tukey e para os dados não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's. O teste de normalidade usado foi Kolmogorov-Smirnov. Os dados estão apresentados em médias e desvios padrão. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha<0,05$) utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 5.00 para Macintosh, São Diego – Califórnia, EUA.

2.3 RESULTADOS

Durante o período experimental a água utilizada nos aquários apresentou os seguintes parâmetros em valores médios seguidos de desvio padrão: temperatura da água: 27,77 ± 1,55º C, pH: 7,26 ± 0,26, salinidade: 0,19 ± 0,30 ppm, oxigênio dissolvido: 4,35 ± 0,55 $mg.L^{-1}$, amônia tóxica (NH_3): 0,005 ± 0,006 ppm; nitrito (NO_2): 0,191 ± 0,457 ppm.

Após as análises cromatográficas, os níveis de AFB_1 encontrados nas rações experimentais foram de 0 $\mu g.kg^{-1}$ no G1 (controle), 37 $\mu g.kg^{-1}$ no G2 (45 $\mu g.kg^{-1}$), 62 $\mu g.kg^{-1}$ no G3 (90 $\mu g.kg^{-1}$) e 180 $\mu g.kg^{-1}$ no G4 (180 $\mu g.kg^{-1}$), diferindo em partes dos níveis calculados para cada uma das rações experimentais. Essas variações são aceitáveis devido a possíveis diferenças nos processos de homogeneização e amostragem das rações.

Não foram observados quaisquer sinais clínicos nos animais dos diferentes grupos expostos as diferentes concentrações de AFB_1 via ração, durante os 56 dias experimetais.

Os animais alimentados com ração contendo 180 $\mu g.kg^{-1}$ (G4) apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) para tamanhos totais e padrão, aos 42 dias, em relação ao grupo controle (G1); o G4 apresentou maior tamanho total (17,25 ± 1,46) e maior tamanho padrão (14,60 ± 1,27) em relação ao G1, o qual apresentou média ± desvio padrão de 16,21 ± 1,17 para tamanho total e 13,55 ± 1,00 para tamanho padrão, como demonstra as Figuras 01 e 02, respectivamente.

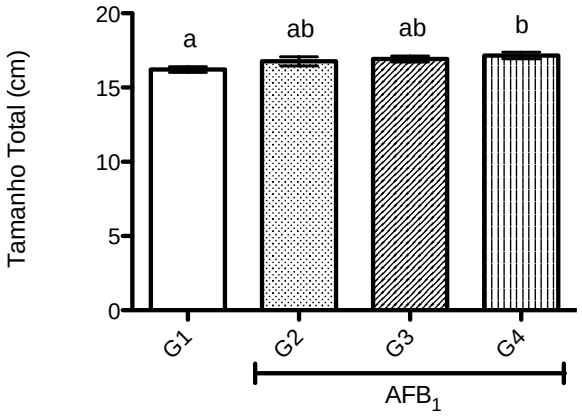
Os pesos individuais, tamanhos totais e tamanhos padrão dos jundiás (por grupo) utilizados nas coletas estão apresentados na Tabela 02.

Tabela 02. Pesos individuais, tamanhos totais e padrão (Média ± Desvio Padrão) dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos expostos a AFB_1 (G1, G2, G3 e G4) nos dias +28, +42 e +56.

Parâmetros	Dia +28				p-valor ANOVA
	G1	G2	G3	G4	
	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	
Peso Individual (g)	36,11 ± 13,89^{a}	37,90 ± 9,65^{a}	35,02 ± 13,13^{a}	35,73 ± 13,02^{a}	0,3985
Tamanho Total (cm)	14,58 ± 1,50^{a}	15,23 ± 1,12^{a}	14,71 ± 1,55^{a}	14,90 ± 1,64^{a}	0,2719
Tamanho Padrão (cm)	12,18 ± 1,25^{a}	12,88 ± 1,27^{a}	12,30 ± 1,29^{a}	12,40 ± 1,44^{a}	0,1294
Dia +42					
Peso Individual (g)	46,46 ± 11,78^{a}	51,34 ± 14,47^{a}	52,68 ± 15,46^{a}	55,15 ± 17,23^{a}	0,0944
Tamanho Total (cm)	16,21 ± 1,17^{a}	16,76 ± 1,86^{ab}	17,04 ± 1,32^{ab}	17,25 ± 1,46^{b}	0,0415
Tamanho Padrão (cm)	13,55 ± 1,00^{a}	14,06 ± 1,61^{ab}	14,19 ± 1,03^{ab}	14,60 ± 1,27^{b}	0,0026
Dia +56					
Peso Individual (g)	62,97 ± 14,52^{a}	50,32 ± 11,21^{b}	63,80 ± 15,68^{a}	61,90 ± 17,94^{a}	0,0002
Tamanho Total (cm)	17,63 ± 1,34^{a}	16,54 ± 1,03^{b}	18,14 ± 1,51^{a}	17,61 ± 1,64^{a}	< 0,0001
Tamanho Padrão (cm)	14,74 ± 1,14^{a}	13,83 ± 0,85^{b}	14,96 ± 1,24^{a}	14,69 ± 1,36^{a}	< 0,0001

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).
Nota: G: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.

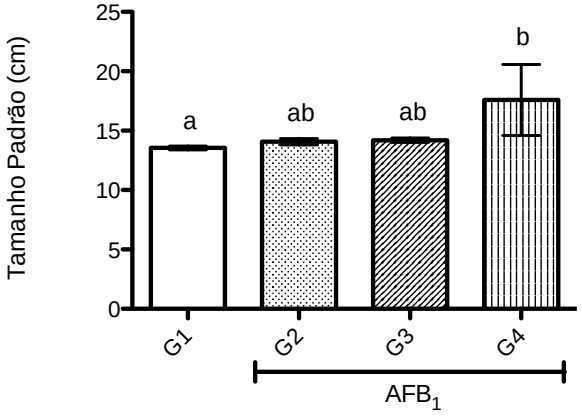
Figura 01. Tamanho total dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após a ingestão de AFB_1 durante 42 dias consecutivos.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Figura 02. Tamanho padrão dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após a ingestão de AFB_1 durante 42 dias consecutivos.

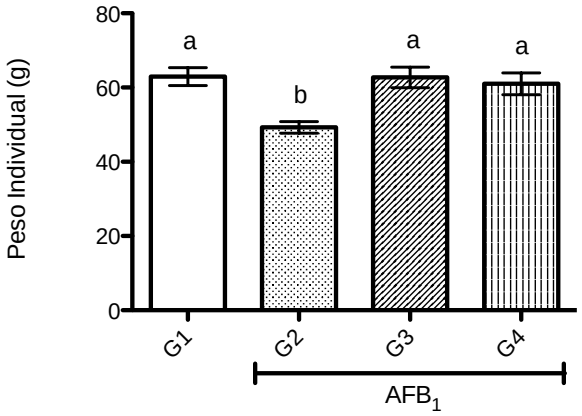


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Aos 56 dias, os peixes do G2 apresentaram peso individual menores (p<0,05) do que os peixes do G1, G3 e G4 (Figura 03), os quais apresentaram médias ± desvios padrão de 50,32 ± 11,21, 62,97 ± 14,52, 63,80 ± 15,68 e 61,90 ± 17,94, respectivamente.

Figura 03. Peso individual dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após a ingestão de AFB_1 durante 56 dias consecutivos.

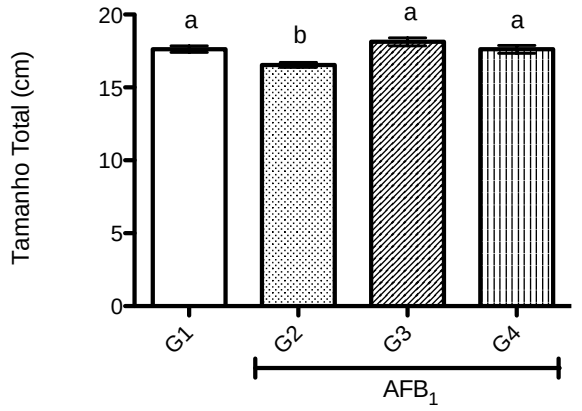


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

O animais do G2 também apresentaram um menor (p<0,05) tamanho total do que quando comparado com os animais do G1, G3 e G4 (Figura 04), os quais apresentaram médias ± desvios padrão de 16,54 ± 1,03, 17,63 ± 1,34; 18,14 ± 1,51; 17,61 ± 1,64, respectivamente.

Figura 04. Tamanho total dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após a ingestão de AFB_1 durante 56 dias consecutivos.

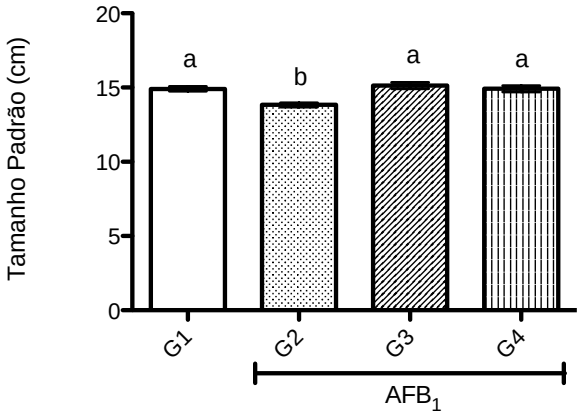


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

O G2 também apresentou um menor tamanho padrão (p<0,05) do que quando comparado com o G1, G3 e G4 (Figura 05), os quais apresentaram médias ± desvios padrão de 13,83 ± 0,85, 14,74 ± 1,14, 14,96 ± 1,24 e 14,69 ± 1,36, respectivamente.

Figura 05. Tamanho padrão dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após a ingestão de AFB_1 durante 56 dias consecutivos.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

O ganho diário de peso (GPD), o ganho de biomassa (GB), a conversão alimentar (CA), o fator de condição corporal (FCC) e a relação hepatossomática (RHS) não diferiram significativamente (p>0,05) entre os grupos (Tabela 03).

Tabela 03. Ganho de peso diário, ganho de biomassa total, conversão alimentar, fator de condição corporal e a relação hepatossomática (Média ± Desvio Padrão) dos diferentes grupos expostos a AFB_1 (G1, G2, G3 e G4) nos dias +28, +42 e +56.

Parâmetros	**Dia +28**				**p-valor ANOVA**
	G1	**G2**	**G3**	**G4**	
	Média ± Des. Padr.	**Média ± Des. Padr.**	**Média ± Des. Padr.**	**Média ± Des. Padr.**	
GPD (g/dia)	1,03 ± 0,23[a]	1,08 ± 0,17[a]	0,88 ± 0,38[a]	1,01 ± 0,22[a]	0,8159
GB (g)	172,45 ± 38,89[a]	182,27 ± 29,15[a]	147,98 ± 64,47[a]	169,83 ± 37,76[a]	0,8190
CA (kg/dia)	1,72 ± 0,29[a]	1,80 ± 0,17[a]	1,66 ± 0,36[a]	1,66 ± 0,38[a]	0,8613
FCC (Kn)	1,15 ± 0,05[a]	1,07 ± 0,05[a]	1,08 ± 0,068[a]	1,07 ± 0,03[a]	0,0598
RHS (%)	2,05 ± 0,44[a]	1,85 ± 0,30[a]	2,01 ± 0,50[a]	1,87 ± 0,26[a]	0,1069

Dia +42					
GPD (g/dia)	1,40 ± 0,17[a]	1,57 ± 0,33[a]	1,41 ± 0,69[a]	1,70 ± 0,39[a]	0,3632
GB (g)	234,57 ± 28,89[a]	262,95 ± 56,53[a]	280,97 ± 47,27[a]	245,45 ± 66,73[a]	0,3639
CA (kg/dia)	1,13 ± 0,08[a]	1,28 ± 0,17[a]	1,34 ± 0,13[a]	1,33 ± 0,18[a]	0,1132
FCC (Kn)	1,09 ± 0,04[a]	1,08 ± 0,02[a]	1,03 ± 0,08[a]	1,06 ± 0,06[a]	0,4171
RHS (%)	1,69 ± 0,30[a]	1,76 ± 0,29[a]	1,70 ± 0,20[a]	1,76 ± 0,31[a]	0,6869
Dia +56					
GPD (g/dia)	1,99 ± 0,33[a]	1,53 ± 0,32[a]	1,63 ± 0,99[a]	1,95 ± 0,48[a]	0,1523
GB (g)	333,59 ± 56,06[a]	256,80 ± 54,54[a]	338,14 ± 68,60[a]	326,85 ± 81,00[a]	0,1501
CA (kg/dia)	0,85 ± 0,04[a]	0,82 ± 0,07[a]	0,87 ± 0,08[a]	0,82 ± 0,12[a]	0,7206
FCC (Kn)	1,14 ± 0,03[a]	1,09 ± 0,05[a]	1,06 ± 0,10[a]	1,12 ± 0,05[a]	0,2841
RHS (%)	1,70 ± 0,31[a]	1,56 ± 0,27[a]	1,51 ± 0,28[a]	1,58 ± 0,24[a]	0,5151

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).
Nota: G: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04; GPD: ganho de peso diário; GB: ganho de biomassa; CA: conversão alimentar; FCC: fator de condição corporal; RHS: relação hepatossomática.

A taxa de sobrevivência dos animais dos diferentes grupos expostos a AFB_1 via ração, após 56 dias consecutivos, estão descritos na Tabela 04.

Tabela 04. Taxa de sobrevivência dos diferentes grupos expostos a AFB_1 (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias consecutivos de ingestão de AFB_1 via ração.

Grupos	**Taxa de Sobrevivência** (%)
G1	98,08[a]
G2	99,36[a]
G3	100,00[a]
G4	100,00[a]

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).
Nota: G: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04

2.4 DISCUSSÃO

Os sinais clínicos associados com aflatoxicoses, como lesões de pele, icterícia da superfície corporal, natação anormal, hemorragias na cabeça e cataratas foram relatados em peixes com intoxicação artificial (Cagauan et al., 2004; Farabi et al., 2006; El-Sayed & Khalil, 2009). Neste estudo, alguns jundiás apresentaram apenas degeneração de nadadeiras. Não foram observadas alterações comportamentais como letargia, perda de equilíbrio e movimentos operculares rápidos.

O ganho de peso diário, o ganho de biomassa, a conversão alimentar e os tamanhos padrão e total, geralmente diminuem gradativamente com o aumento dos níveis de AFB_1 fornecida via ração e também da duração do período de exposição (Deng et al., 2010).

No presente estudo não foram observadas diminuições significativas ($p>0,05$) nos parâmetros de GPD, GB e CA, assemelhando-se assim aos resultados obtidos por Huang et al. (2014; 2011) que não relataram quaisquer alterações no crescimento de carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*) alimentadas com dietas contendo 2.000 e 1.000 $\mu g.kg^{-1}$, por um período de 24 e 12 semanas, respectivamente.

Mahfouz & Sherif (2015), ao alimentarem tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com rações contendo 20 e 100 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 por 12 semanas, observaram uma redução significativa ($p<0,05$) nos índices de crescimento, os quais incluíam ganho de peso total, ganho de peso diário e tamanhos totais e padrão, assemelhando-se parcialmente com os resultados obtidos no presente estudo, onde os jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com concentrações de 37 $\mu g.kg^{-1}$ apresentaram peso médio individual e tamanhos totais padrão menores ($p<0,05$) do que os do grupo controle (0 $\mu g.kg^{-1}$) após 56 dias de exposição a AFB_1.

Toxinas dietéticas são por vezes conhecidas por terem propriedades estimulantes. Microcistinas na dieta tem sido relatadas por aumentarem a taxa de crescimento em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Zhao et al., 2006a) e carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*) (Zhao et al., 2006b). Han et al. (2009), também relataram que AFB_1 na ração pode possuir propriedades estimulantes, conduzindo assim à um aumento nas taxas de crescimento de carpa Gibel (*Carassius auratus gibelio*). No presente estudo foram observados

aumentos significativos ($p<0,05$) nos tamanhos padrão e total dos jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com 180 $\mu g.kg^{-1}$ quando comparados ao grupo controle, confirmando as possíveis propriedades estimulantes que a AFB_1 pode apresentar. Entretanto, essas propriedades estimulantes podem variar principalmente devido as diferentes espécies expostas a AFB_1 (Han et al., 2009).

Hendricks et al. (1980) sugeriram que os efeitos negativos sobre o crescimento de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a AFB_1 via ração, só poderiam ser observados após longos períodos de alimentação (em média 16 meses). Em outro estudo, não foram observadas reduções significativas ($p>0,05$) no ganho de peso de bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com dietas experimentais contendo níveis que variavam de 100 à 2.154 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 (Jantrarotai & Lovell, 1990). Manning et al. (2005b) ao alimentarem alevinos de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) com 20 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 não observaram diminuição significativa ($p>0,05$) no ganho de peso e conversão alimentar, demonstrando assim ser uma espécie resistente a essa toxina. Da mesma forma, as reduções no crescimento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) só foram observadas após 8 semanas de alimentação com rações contendo níveis de 10.000 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 (Tuan et al., 2002).

Alterações nos valores do fator de condição corporal têm sido relatadas em função das variações e características intrínsecas das espécies, além de diferenças nas condições ambientais e/ou relacionadas ao período reprodutivo dos peixes (Lizama & Ambrósio, 2002; Froese, 2006). Estudos anteriores indicam que o fator de condição pode ser considerado um índice corporal que reflete as alterações entre o peixe e os fatores bióticos e abióticos que o cercam (Tavares-Dias et al., 2008).

No presente estudo, no parâmetro FCC, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) quando comparados os grupos expostos a AFB_1 com o grupo controle, indicando assim boas condições de higidez no cultivo, pois quanto maior os valores do FCC, melhores são as condições de bem-estar dos peixes no ambiente (Scorvo et al., 2004; Tavares-Dias et al., 2006), dessa forma a densidade populacional e as condições de alimentação dentro de cada grupo estavam adequadas.

O tamanho do fígado varia entre as diferentes espécies de peixes (Ranzani-Paiva & Tavares-Dias, 2002; Tavares-Dias, 2004) e a melhor medida relativa estabelecida para avaliar o tamanho desses órgãos pode ser obtida pela relação hepatossomática, que é uma relação do peso do fígado ao peso corporal. A determinação dos valores padrão da RHS é de grande importância para compreensão dos distúrbios que podem ocorrer durante condições ambientais adversas (Ranzani-Paiva & Tavares-Dias, 2002; Tavares-Dias, 2004; Tavares-Dias & Mataqueiro, 2004).

Reduções na RHS podem estar associadas à utilização de reservas energéticas, necessárias para a manutenção da homeostasia (Ranzani-Paiva & Tavares-Dias, 2002).

Mahfouz & Sherif (2015) relataram que a RHS de peixes expostos à 100 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 na ração foram significativamente inferiores aos peixes alimentados com 20 $\mu g.kg^{-1}$; e que o aumento do tempo de exposição diminui ainda mais essa relação. Esses resultados assemelham-se aos encontrados em tilápias vermelhas (*Oreochromis niloticus* Linn.) (Usanno et al., 2005), tilápias híbridas (*Oreochromis aureus*) (Deng et al., 2010) e *red fish* (*Sciaenops ocellatus*) (Zychowski et al., 2013), alimentadas com níveis que variavam de 85 à 5.000 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1.

A diminuição na RHS foi atribuída a uma indicação de desordem hepática ou degeneração do fígado (Deng et al., 2010; Zychowski et al., 2013). No presente estudo não foram observadas reduções significativas ($p>0,05$) na RHS, assemelhando-se ao resultados encontrados por Huang et al. (2014), que ao alimentarem carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*) com diferentes concentrações de AFB_1 nas dietas, não observaram redução deste parâmetro nos animais; demostrando assim que os jundiás (*Rhamdia quelen*) do presente estudo não estavam com desordens hepáticas evidentes através da avaliação do tamanho hepático.

Em relação à taxa de sobrevivência, pode-se afirmar que os jundiás (*Rhamdia quelen*) apresentam alta tolerância à exposição à AFB_1. A menor taxa de sobrevivência se deu no grupo 01 (98,08%), porém sem diferenças significativas ($p>0,05$) com relação aos demais grupos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lopes et al. (2005) em jundiá (*Rhamdia quelen*) expostos por 35 dias com níveis de aflatoxina de 41 à

204 μg.kg^{-1}, que apresentaram 100% de sobrevivência. Mahfouz & Sherif (2015), Huang et al. (2011; 2014) relataram 100% de sobrevivência de carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*) alimentadas com níveis que variavam de 20 à 2.000 μg.kg^{-1} de AFB_1; Tuan et al. (2002) constataram mortalidade de 60% em alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados por 8 semanas com rações contendo AFB_1, entretanto a dose utilizada (100.000 μg.kg^{-1}) foi bastante superior a deste estudo.

2.5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos os níveis de AFB_1 utilizados na ração não alteram de forma consistente o desempenho zootécnico dos jundiás (*Rhamdia quelen*). As únicas variáveis afetadas foram encontradas no grupo com menor concentração de AFB_1 (37 μg.kg^{-1}), demonstrando um resultado inesperado em relação as concentrações crescentes de AFB_1.

2.6 REFERÊNCIAS

Baldisserotto B, Radünz Neto J. Criação de jundiá. Santa Maria: EFSM; 2004.

Barbosa TS, Pereyra CM, Soleiro CA, Dias EO, Oliveira AA, Keller KM, Silva PPO, Cavaglieri LR, Rosa CAR. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. International Aquatic Research. 2013; 5: 1-9.

Brasil, 1988. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, de 09/11/88. Seção I, p. 21968.

Cagauan AG, Tayaban RH, Somga JR, Bartolome RM. Effect of aflatoxin contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*). Proceedings of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture; 2004; p. 172-178.

Coldebella I, Radünz Neto J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Ciência Rural. 2002; 32: 499-503.

Deng SX, Tian LX, Liu FJ, Jin SJ, Liang GY, Yang HJ, Du ZY, Liu YJ. Toxic effects and residue of aflatoxin B_1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) during long-term dietary exposure. Aquaculture. 2010; 307: 233-240.

El-Sayed YS, Khalil RH. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). Food and Chemical Toxicology. 2009; 47: 1606-1609.

Farabi SM, Yousefian M, Hajimoradloo A. Aflatoxicosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. Journal Applied of Ichthyology. 2006; 22: 234-237.

Ferreira H, Pittner E, Sanches HF, Monteiro MC. Aflatoxinas: Um risco a saúde animal. Ambiência. 2006; 2: 113-127.

Froese R. Cube law, condition factor and weight-length relationship: History, meta-analysis and recommendations. Journal Applied of Ichthyology. 2006; 22: 241-253.

Gomes LC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. Biologia do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Teleostei, Pimelodidae). Ciência Rural. 2000; 30: 179-185.

Han D, Xie S, Zhu X, Yang Y, Guo Z. Growth and hepatopancreas in gibel carp fed diets containing low levels of aflatoxin B_1. Aquaculture Nutrition. 2009; 16: 335-342.

Hendricks JD, Putnam TP, Sinnhuber RO. Null effect of dietary Aroclor 1254 on hepatocellular carcinoma incidence in rainbow trout *Salmo gairdneri* exposed to aflatoxin B_1 as embryos. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 1980; 4: 6-16.

Huang Y, Han D, Xiao X, Zhu X, Yang Y, Jin J, Chen Y, Xie S. Effect of dietary aflatoxin B_1 on growth, fecundity and tissue accumulation in gibel carp during the stage of gonad development. Aquaculture. 2014; 428-429: 236-242.

Huang Y, Han D, Zhu XM, Yang YX, Jin JY, Chen YF, Xie SQ. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B_1. Aquaculture. 2011; 319: 89-97.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Chemical agents and related ocupations: A review of human carcinogens. 2012; 100F. Lyon, France.

Jantrarotai W, Lovell RT. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B_1 to channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health. 1990; 2: 248-254.

Lizama MAP, Ambrósio AM. Condition factor in nine species of fish of the Characidae Family in the upper Paraná River floodplain, Brazil. Brazilian Journal of Biology. 2002; 62: 113-124.

Lopes PRS, Pouey JLFO, Enke DBS, Camargo SGO, Correa GF, Ribeiro CLG, Mallmann CA, Portleninha MK, Freita M. Efeitos das aflatoxinas sobre os parâmetros eritrocitários de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia. 2010; 17: 1-13.

Lopes PRS, Pouey JLOF, Enke DBS, Mallmann CA, Kich HA, Soquetta MB. Utilização de adsorvente em rações contendo aflatoxina para alevinos de jundiá. Revista Brasileira de Zootecnia. 2009; 38: 589-595.

Lopes PRS, Radünz Neto J, Mallmann CA, Lazzari R, Pedron FA, Veiverberg CA. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2005; 40: 1029-1034.

Mahfouz ME, Sherif AH. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. The Journal of Basic & Applied Zoology. 2015; 71: 48-59.

Manning BB, Li MH, Robinson EH. Aflatoxins from mouldy corn cause no reductions in Channel catfish *Ictalurus punctatus* performance. Journal of the World Aquaculture Society. 2005b; 36: 59-67.

Manning BB, Li MH, Robinson EH. Feedborne mycotoxins in aquaculture feeds: Impact and management of aflatoxin, fumonisin, and moniliformin. In: Abbas HK, editor. Aflatoxin and Food Safety. Boca Raton: CRC; 2005a. p. 555-565.

Pamplona JH, Oba ET, Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, Ribeiro CAO, Zampronio AR, Assis HCS. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011; 74: 342–334.

Pamplona JH. Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen*: Estudo bioquímico, hematológico e histopatológico (Dissertação de Mestrado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2009.

Raghavan PR, Zhu X, Lei W, Han D, Yang Y, Xie S. Low levels of aflatoxin B_1 could cause mortalities in juvbenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♀ x *A. baerii* ♂. Aquaculture Nutrition. 2011; 13: 39-47.

Ranzani-Paiva MJT, Tavares-Dias M. Eritrograma, relação viscerosomática, hepatosomática e esplenosomática em tainhas *Mugil platanus* (Osteichthyes: Mugilidae) parasitadas. Revista Brasileira de Zoologia. 2002; 19: 807-818.

Scorvo-Filho JD, Rojas NET, Silva CM, Konoike T. Criação de *Arapaima gigas* (Teleostei Osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no Estado de São Paulo. Boletim do Instituto de Pesca. 2004; 30: 161-170.

Tavares-Dias M, Marcon JL; Lemos JRG; Fim JDI, Affonso EG, Ono EA. Índices de condição corporal em juvenis de *Brycon amazonicus* (Spix &

Agassiz, 1829) e *Colossomoma macropomum* (Cuvier, 1818) na Amazônia. Boletim do Instituto de Pesca. 2008; 34: 197-204.

Tavares-Dias M, Mataqueiro MI. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. Acta Scientiarum. 2004; 26: 157-162.

Tavares-Dias M, Moraes FR, Martins ML. Equação da relação peso-comprimento, fator de condição, relação hepato e esplenosomática de 11 teleósteos dulciaqüícolas cultivados no Brasil. CIVA. 2006; 713-720.

Tavares-Dias M. Características biométricas de *Brycon amazonicus* e *Brycon orbignyanus* (Characidae) oriundos de cultivo intensivo no Brasil. CIVA. 2004; 286-289.

Tuan NA, Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB, Rottinghaus GE. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B_1. Aquaculture. 2002; 212: 311-319.

Usanno O, Chaisilapasung S, Sukrakanchana N, Supamattaya K. Effects of aflatoxin B_1 on sex reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus Linn.* x *O. mossambicus Peters*) Songklanakarin. Journal of Science and Technology. 2005; 27: 187-197.

Vieira VLP, Radünz Neto J, Lopes PRS, Lazzari R, Fonseca MB, Menezes CC. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. Ciência Animal Brasileira. 2006; 7: 49-55.

Zhao M, Xie S, Zhu X, Yang Y, Gan L, Song L. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 2006a; 261: 960-966.

Zhao M, Xie S, Zhu X, Yang Y, Gan L, Song L. Effect of inclusion of blue green algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carrasius auratus gibelio*). Journal Applied of Ichthyology. 2006b; 22: 72-78.

Zychowski KE, Hoffmann AR, Ly HJ, Pohlenz C, Buentello A, Romoser A, Gatlin DM, Phillips TD. The effect of aflatoxin-B_1 on Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of NovaSil for the prevention of aflatoxicosis. Toxins. 2013; 5: 1555-1573.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AFLATOXINA B_1 NA RAÇÃO, SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS SÉRICOS DE ALEVINOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)

Evaluation of Effects of Different Aflatoxin B_1 Concentrations in Feed, on Haematological and Serum Biochemical Parameters in Jundiá's (Rhamdia quelen) Fingerlings

ANATER A.[1], BARBOSA C.K.[2], IACHINSKI E. A.[3], ARAÚJO C.M.T.D.[4], ROCHA D.C.C.[5], RÉGIO R.R.[6], RIBEIRO D.R.[7], PIMPÃO C.T[8].

[1]Mestranda em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, amanda_anater@hotmail.com;
[2]Graduanda em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, carolinakonkel@gmail.com.br
[3]Graduando em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, edevaldoia@hotmail.com;
[4]Mestranda em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, chiara.domingues@hotmail.com;
[5]Médico Residente em Patologia Clínica – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, daniel.coatti@gmail.com;
[6]Graduando em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, reinaldoregio@hotmail.com;
[7]Mestrando em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, deividrr@hotmail.com;
[8]Professora Titular – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, claudia.pimpao@pucpr.br.

RESUMO

Introdução: As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*. Em peixes, a concentração de aflatoxina B_1 (AFB_1) pode desencadear diversos sinais clínicos inespecíficos. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são considerados ferramentas de diagnóstico importantes para avaliar alterações metabólicas e de processos celulares nessas espécies. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contaminada com diferentes níveis de AFB_1. **Método:** Foram utilizados 624 jundiás, distribuídos em 4 grupos distintos (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 e G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 na ração), os grupos foram separados aleatoriamente em 24 aquários (n=26 alevinos/aquário) e os peixes alimentados durante 56 dias consecutivos com ração peletizada. Foram avaliados parâmetros eritrocitários, leucocitários, além das concentrações séricas de albumina e das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT) e albumina. Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA seguido por teste de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis

seguido por teste de Dunn's. **Resultados:** Houve um aumento ($p<0,05$) na contagem total de leucócitos, linfócitos, células granulocíticas especiais, neutrófilos e trombócitos do G2 e G4 em relação ao G1, nos dias +28 e +42, porém observou-se uma redução ($p<0,05$) nestes parâmetros no dia +56. No entanto o G3, apresentou uma redução destes valores ($p<0,05$) em relação ao G1, nos dias +28 e +42, porém no dia +56 ocorreu um aumento ($p<0,05$) destes valores. Nos parâmetros bioquímicos, foi observado um aumento ($p<0,05$) de FA do G3 em relação ao G4 no dia +42. Uma diminuição ($p<0,05$) de ALT dos G2, G3 e G4 em relação ao G1, no dia +56, e uma diminuição ($p<0,05$) de FA e AST nos G3 e G4 em relação ao G1. **Conclusão:** A AFB_1 afetou negativamente a imunidade celular do jundiá, pois a adaptação do sistema imune variou de acordo com a concentração da AFB_1 na ração. As diferentes concentrações de AFB_1 causaram diferentes graus de comprometimento hepático.

Palavras chaves: Enzimas hepáticas; Hepatotoxicidade; Parâmetros eritrocitários; Parâmetros leucocitários; Micotoxinas.

ABSTRACT

Introduction: Aflatoxins are produced by *Aspergillus fungi*. In fish, the concentration of aflatoxin B_1 (AFB_1) can produce many nonspecific clinical signs. Hematologic and biochemical parameters are considered important tools of diagnostic to assess metabolic and cellular processes in these species. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the hematological and biochemical parameters on jundiá (*Rhamdia quelen*) fed contaminated feed with different levels of AFB_1. **Methods:** 624 jundiá's fingerlings were used, they was divided into 4 different groups (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 and G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ of AFB_i in feed) that was randomly divided into 24 aquariums (n=26 fingerlings/aquarium), the fish was fed for 56 consecutive days with pelleted feed. The parameters evaluated were the erythrocytary and leukocytary, as well the serum concentrations of albumin and liver enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl transferase (GGT). Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Bonferroni test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests. **Results:** There was an increase ($p<0.05$) in the total number leukocytes, lymphocytes, special granulocytic cells, neutrophils and platelets in the G2 and G4 in relation to G1 on days +28 and +42, but there was a reduction ($p<0.05$) in these same parameters at day +56. However, G3 showed a reduction in these values ($p<0.05$) compared to G1 on days +28 and +42, but on day +56, there was an increase ($p<0.05$) of these values. In the biochemical parameters, was observed an increase ($p<0.05$) in ALP on G3 in relation to G4 on day +42. A decrease ($p<0.05$) in ALT on G2, G3 and G4 in relation to G1 on day +56, and also a decrease ($p<0.05$) ALP and AST on G3 and G4 in relation to G1. **Conclusion:** The AFB_1 affected negatively the cellular immunity of jundiá, because the adjustment of the immune system varied according to the concentration of AFB_1 in feed. The different concentrations of AFB_1 caused some degree of hepatic compromising.

Keywords: Liver enzymes; Hepatotoxicity; Erythrocyte Parameters; Leukocyte Parameters; Mycotoxins.

3.1 INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 25% dos cereais presentes no mundo estejam contaminados por micotoxinas, enquanto uma porcentagem ainda maior pode estar contaminada com micotoxinas ainda desconhecidas, por tanto nenhuma região no mundo está livre do impacto negativo dessas micotoxinas na produtividade animal e saúde humana (Lopes et al., 2010).

A aflatoxina B_1 (AFB_1) é um metabólito secundário produzido principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que apresenta efeitos negativos sobre a produção animal, reduzindo o consumo de ração, conversão alimentar, além de deixar o animal susceptível às doenças por sua ação imunossupressora (Lopes et al., 2010). As micotoxinas atuam sistemicamente sobre o fígado, os rins e acarretam danos sobre parâmetros hematológicos. Conforme Lumlertdacha et al. (1995), o perfil hematológico dos peixes pode sofrer redução pela ação de toxinas.

Os peixes teleósteos são desprovidos de linfonodos e medula óssea, apresentando tecido hematopoiético localizado principalmente nos rins e baço, importantes órgãos eritropoiéticos, trombopoiéticos e leucopoiéticos nesses vertebrados (Tavares-Dias & Moraes, 2004). O fígado pode ser considerado um tecido hematopoiético (Tavares-Dias & Moraes, 2004) com menor papel no sistema de defesa, embora haja evidências de sua participação na eliminação de antígenos (Dalmo et al., 1997), além da sua capacidade de armazenar grandes quantidades de lipídios e glicogênio como reserva energética (Germam & Kozlovskaya, 2001).

Os parâmetros hematológicos vem sendo utilizado no Brasil e no exterior como fator confiável de indicação de qualidade ambiental e saúde de organismos (Seriani et al., 2010). Nos peixes de clima temperados, as pesquisas hematológicas tiveram início no século passado e no Brasil, a partir da década de 80 (Tavares-Dias & Moraes, 2004). A literatura afirma que peixes que estão expostos aos pesticidas, metais pesados e efluentes contaminados apresentam alterações hematológicas tanto em seus habitats naturais quanto em laboratórios (Pimpão et al., 2007; Seriani et al., 2010). Dessa forma, análises hematológicas de peixes expostos a contaminantes podem ser importantes no sentido de avaliar e monitorar a saúde da espécie animal em questão (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A variação nas características hematológicas em peixes depende da espécie, idade, sexo, alimentação e ambiente a que estão expostos. Portanto, constitui importante avaliação a ser realizada quando os animais são expostos a produtos químicos (Pimpão et al., 2007; 2008), ao estresse (Martins et al., 2004), a infecções (Benli & Yildis, 2004) a parasitos (Tavares-Dias et al., 2002) e a micotoxinas (Vieira et al., 2006).

Os parâmetros bioquímicos sanguíneos em peixes podem ser de difícil interpretação devido às amplas variações em seus valores, mas são sensíveis na resposta a substâncias tóxicas e evidenciados com bastante antecedência a alterações macroscópicas do ambiente ou do organismo estudado (Thrall et al., 2007; Galeb, 2010; Ramsdorf, 2011).

As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são as aminotransferase mais importantes relacionadas ao metabolismo de aminoácidos no fígado de peixes teleósteos (Coz-Rakovac & Smuc, 2008). A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima encontrada no hepatopâncreas de peixes e possui função na detoxificação de substâncias. A gama glutamiltransferase (GGT) é oriunda do fígado e é considerada um bom marcador enzimático para desordens do sistema hepatobiliar, pois indica colestase. A albumina é uma das principais proteínas plasmáticas, sendo importante para manutenção da pressão osmótica do sangue, é sintetizada no fígado e sua diminuição geralmente é observada em quadros de doenças hepáticas, quando há perda de 60 a 80% da função hepática (Thrall et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do fornecimento de diferentes concentrações de AFB_1 através de ração sobre os parâmetros eritrocitários, leucocitários e bioquímicos de alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), com duração de 56 dias. As análises dos ingredientes e das concentrações de AFB_1 na ração foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da PUCPR e no Laboratório de Toxicologia Alimentar da Universidade de Valência/Espanha,

respectivamente. As análises hematológicas e bioquímicas, foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da PUCPR.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob protocolo de número 886 – 2ª versão.

624 alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) com 7,44 g ± 2,18 de peso corporal médio, oriundos do LAPEP/PUCPR, foram utilizados para realização deste estudo. Para a divisão dos grupos, os animais foram submetidos a um jejum de 24h, com objetivo de padronizar o peso e evitar regurgitações de alimento. Após o jejum, os animais foram pesados em grupo e alojados em 24 caixas de polipropileno contendo 26 alevinos cada, sendo 6 caixas por grupo experimental, com densidade populacional inicial média de 2,41 $g.L^{-1}$. As caixas foram distribuídas aleatoriamente em 4 bancadas, mantidas em ambiente fechado e controlado (oxigênio dissolvido, salinidade, pH e temperatura). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, longitudinal e prospectivo.

As 24 caixas de polipropileno com capacidade para 100 L cada, foram abastecidas com 80 L de água em um sistema de circulação aberta e termorregulado. O sistema com capacidade de 1.920 L de água foi abastecido por meio de um reservatório escavado externo. A entrada de água nas unidades experimentais foi mantida em aproximadamente 1,0 $L.minuto^{-1}$, ininterruptamente.

A limpeza das caixas foi realizada a cada dois dias com uso de sifão, retirando-se cerca de 20% do volume de água. Diariamente os animais foram observados para presença de eventuais sinais clínicos, bem como, a verificação de mortalidade e a retirada destes das caixas.

Também foram monitorados diariamente os parâmetros de qualidade da água nas unidades experimentais, como, oxigênio dissolvido, salinidade, pH e temperatura, com auxílio de oxímetro e medidor de pH digitais. A amônia total e o nitrito foram monitorados semanalmente com auxílio de kit colorimétrico.

Os grupos experimentais foram formados com base em 4 diferentes concentrações de aflatoxina B_1 (AFB_1), fornecidas aos animais via ração. Os níveis de AFB_1 e os respectivos grupos foram de 0 (G1), 45 (G2), 90 (G3) e 180 (G4) $\mu g.kg^{-1}$ de ração, respectivamente. No Brasil o limite máximo de AFs permitido em alimentos para animais é de 50 $\mu g.kg^{-1}$ (Brasil, 1988). As

concentrações utilizadas neste trabalho objetivaram trabalhar com um grupo abaixo do limite permitido, além de dois outros grupos com duas e quatro vezes a mais do que à concentração inicial de 45 $\mu g.kg^{-1}$.

A AFB_1 purificada foi adquirida da Sigma Chemical Co., USA (AFB_1/A6636), dissolvida em clorofórmio, posteriormente adicionada em óleo de canola, o qual foi utilizado na formulação da ração.

A ração experimental foi formulada de forma a ser isoprotéica e isocalórica, contendo 38,01% de proteína bruta e 3.655 $kcal.kg^{-1}$ de energia digestível, conforme composição descrita por Coldebella & Radünz Neto (2002).

O preparo das rações foi realizado no LAPEP/PUCPR e após sua finalização foram coletadas amostras para quantificação da AFB_1 através de cromatografia líquida de alta performance, realizadas no Laboratório de Toxicologia Alimentar.

Após o alojamento, os animais passaram por um período de aclimatação de 15 dias. Em seguida, todos os peixes foram mantidos em jejum de 24h, para garantir uma ingestão imediata da ração. No decorrer do experimento, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (9 e 17h) até completa saciedade.

Aos 28, 42 e 56 dias experimentais os peixes foram submetidos a jejum de 3h para coleta de sangue, quando 24 animais por grupo (4 por caixa) foram capturados aleatoriamente. Os animais foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína à 2%, após completa sedação foi realizada punção sanguínea da veia caudal obtendo amostras de aproximadamente 0,8 mL por animal. De cada caixa, o sangue de 2 peixes foi coletado sem uso de anticoagulante para posterior utilização nas análises bioquímicas, outros 2 peixes tiveram seu sangue coletado com auxilio de seringas descartáveis contendo EDTA à 3%, o qual foi utilizado para as análises hematológicas.

Para as análises bioquímicas as amostras de sangue foram inseridas em tubos tipo Eppendorf® e centrifugadas durante 5 minutos a 3500 rpm para obtenção do soro, o qual foi congelado para posterior análises.

Para as análises hematológicas, foram realizadas extensões sanguíneas, coradas pelo método de Rosenfeld (1947) e May-Grunwald-Giemsa para o diferencial leucocitário, avaliação morfológica e visualização de agregados

trombocíticos. As contagens totais de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foram determinadas manualmente com Câmara de Neubauer em microscópio óptico após diluição 1:200 do sangue em corante Natt/Herrick's (1952). O hematócrito foi determinado utilizando-se tubos capilares em centrífuga de microhematócrito (SISLAB/MH) operada a 11.000 rpm por 5 minutos e a proteína plasmática total por meio de refratômetro (KERNCO – OS1270). O conteúdo de hemoglobina, expressa em $g.dL^{-1}$, foi determinado espectrofotometricamente usando a reação de cianometahemoglobina após centrifugação (FANEM – EXCELSA BABY II – MOD. 206-R) a 3500 rpm por 5 minutos.

Os testes bioquímicos realizados por espectrofotometria (Drake – mod. Quick lab/ Siel – mod. EPECTROMATIC 710) foram: dosagem de aspartato aminotransferase (AST – UI/L – Labtest liquiform), alanina aminotransferase (ALT – UI/L – Labtest liquiform), fosfatase alcalina (FA – UI/L – Labtest liquiform), gama glutamiltransferase (GGT – UI/L – Labtest liquiform); albumina (ALBUMINA – g/dL – Labtest colorimétrica).

Para as análises estatísticas dos dados paramétricos foi utilizado ANOVA (one way) seguido por teste de Bonferroni e para os dados não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's. O teste de normalidade usado foi Kolmogorov-Smirnov. Os dados estão apresentados em médias e desvios padrão. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha<0,05$) utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 5.00 para Macintosh, São Diego – Califórnia, EUA.

3.3 RESULTADOS

Durante o período experimental a água utilizada nos aquários apresentou os seguintes parâmetros em valores médios seguidos de desvio padrão: temperatura da água: 27,77 ± 1,55º C, pH: 7,26 ± 0,26, salinidade: 0,19 ± 0,30 ppm, oxigênio dissolvido: 4,35 ± 0,55 $mg.L^{-1}$, amônia tóxica (NH_3): 0,005 ± 0,006 ppm; nitrito (NO_2): 0,191 ± 0,457 ppm.

Após as análises cromatográficas, os níveis de AFB_1 encontrados nas rações experimentais foram de 0 $\mu g.kg^{-1}$ no G1 (controle), 37 $\mu g.kg^{-1}$ no G2 (45 $\mu g.kg^{-1}$), 62 $\mu g.kg^{-1}$ no G3 (90 $\mu g.kg^{-1}$) e 180 $\mu g.kg^{-1}$ no G4 (180 $\mu g.kg^{-1}$), diferindo em partes dos níveis calculados para cada uma das rações

experimentais. Essas variações são aceitáveis devido a possíveis diferenças nos processos de homogeneização e amostragem das rações.

A contagem total de eritrócitos (CTE), os valores de hemoglobina, de hematócrito, VGM, HCM, CHGM e a dosagem de proteínas plasmáticas (PP) não apresentaram diferença significativa (p>0,05) entre os grupos (G1, G2, G3 e G4) nos diferentes períodos avaliados (+28, +42 e +56) (Tabela 01).

Tabela 01. Parâmetros eritrocitários (Média ± Desvio Padrão) dos diferentes grupos expostos a AFB_1 (G1, G2, G3 e G4) nos dias +28, +42 e +56.

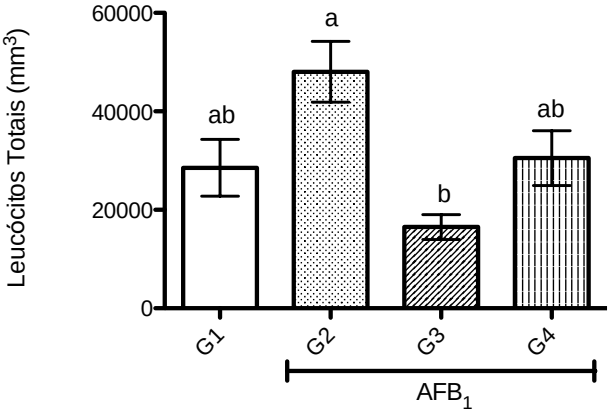
Parâmetros	Dia +28				p-valor ANOVA
	G1	G2	G3	G4	
	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	
Eritrócitos (milhões/mm³)	1643636 ± 217682[a]	1656667 ± 141571[a]	1683636 ± 246871[a]	1661667 ± 518772[a]	0,9589
Hemoglobina (g/dL)	3,03 ± 0,82[a]	3,38 ± 0,73[a]	3,38 ± 1,04[a]	3,12 ± 1,16[a]	0,7575
Hematócrito (%)	22,83 ± 2,32[a]	26,41 ± 2,23[a]	23,54 ± 3,77[a]	23,41 ± 6,78[a]	0,1738
VGM (fL)	14,22 ± 2,41[a]	16,01 ± 1,61[a]	14,08 ± 2,07[a]	14,57 ± 2,29[a]	0,1213
HCM (pg)	1,88 ± 0,56[a]	2,04 ± 0,44[a]	1,99 ± 0,49[a]	2,37 ± 2,17[a]	0,7704
CHGM (%)	13,02 ± 2,70[a]	12,75 ± 2,22[a]	14,07 ± 2,36[a]	15,26 ± 10,46[a]	0,7249
PP (g/dL)	4,41 ± 0,53[a]	4,45 ± 0,63[a]	4,49 ± 0,56[a]	4,68 ± 1,14[a]	0,9954
Dia +42					
Eritrócitos (milhões/mm³)	1844167 ± 393434[a]	1693333 ± 252743[a]	1787182 ± 264718[a]	2000000 ± 415736[a]	0,3880
Hemoglobina (g/dL)	5,30 ± 0,79[a]	5,29 ± 0,59[a]	5,63 ± 0,91[a]	5,33 ± 0,84[a]	0,7033
Hematócrito (%)	25,83 ± 3,07[a]	25,50 ± 2,54[a]	26,09 ± 4,50[a]	26,91 ± 2,02[a]	0,6830
VGM (fL)	14,51 ± 2,97[a]	15,25 ± 1,75[a]	14,99 ± 3,76[a]	13,76 ± 1,69[a]	0,4069
HCM (pg)	2,97 ± 0,67[a]	3,20 ± 0,35[a]	3,23 ± 0,78[a]	2,74 ± 0,53[a]	0,1927
CHGM (%)	20,58 ± 2,39[a]	20,65 ± 0,79[a]	21,76 ± 2,47[a]	19,85 ± 2,77[a]	0,3276
PP (g/dL)	4,86 ± 0,50[a]	4,45 ± 0,82[a]	4,74 ± 0,31[a]	4,70 ± 0,56[a]	0,3712

Dia +56					
Eritrócitos (milhões/mm³)	1937500 ± 217177[a]	1805000 ± 292994[a]	1845000 ± 221773[a]	1829167 ± 450464[a]	0,7478
Hemoglobina (g/dL)	5,73 ± 0,82[a]	5,10 ± 0,84[a]	5,53 ± 0,68[a]	5,26 ± 0,68[a]	0,2010
Hematócrito (%)	27,50 ± 3,75[a]	26,91 ± 3,57[a]	26,80 ± 3,45[a]	25,66 ± 4,20[a]	0,6878
VGM (fL)	14,22 ± 1,60[a]	15,12 ± 2,16[a]	14,55 ± 1,22[a]	14,50 ± 2,90[a]	0,7633
HCM (pg)	2,96 ± 0,32[a]	2,84 ± 0,34[a]	3,03 ± 0,46[a]	2,98 ± 0,62[a]	0,7783
CHGM (%)	20,87 ± 0,86[a]	18,95 ± 2,17[a]	20,92 ± 3,55[a]	20,67 ± 1,89[a]	0,1240
PP (g/dL)	4,86 ± 0,50[a]	4,51 ± 0,67[a]	4,66 ± 0,43[a]	4,55 ± 0,71[a]	0,4889

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05) e letras iguais não demonstram diferença significativa (p>0,05).
Nota: G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04; VGM: volume globular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; PP: proteínas plasmáticas.

Na contagem total de leucócitos (CTL), aos 28 dias de fornecimento da ração contaminada com AFB_1, foi evidenciada uma diminuição significativa (p<0,05) no G3 (16500 ± 8045) quando comparado ao G2 (48042 ± 21391), conforme a Figura 01.

Figura 01. Contagem total de leucócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 28 dias de ingestão de AFB_1.

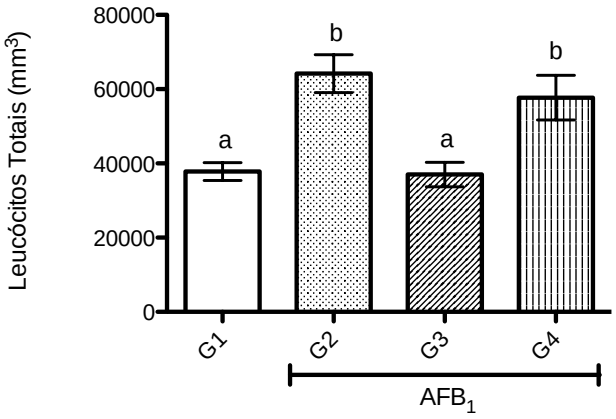


As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

A Figura 02 demostra que aos 42 dias, houve aumento significativo (p<0,05) da CTL no G2 (64208 ± 17671) e G4 (57708 ± 20880) com relação ao G1 (37833 ± 8343); foi evidenciada também uma diminuição significativa

(p<0,05) do G3 (37000 ± 10865) quando comparado com o G2 (64208 ± 17671).

Figura 02. Contagem total de leucócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 42 dias de ingestão de AFB_1.

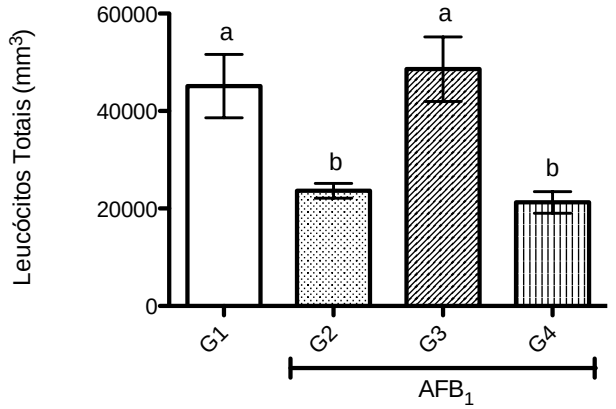


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Aos 56 dias, houve diminuição significativa (p<0,05) na CTL do G2 (23667 ± 5254) e G4 (21250 ± 7739) quando comparados com o G1 (45125 ± 22544) e o G3 (48600 ± 20926) (Figura 03).

Figura 03. Contagem total de leucócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias de ingestão de AFB_1.

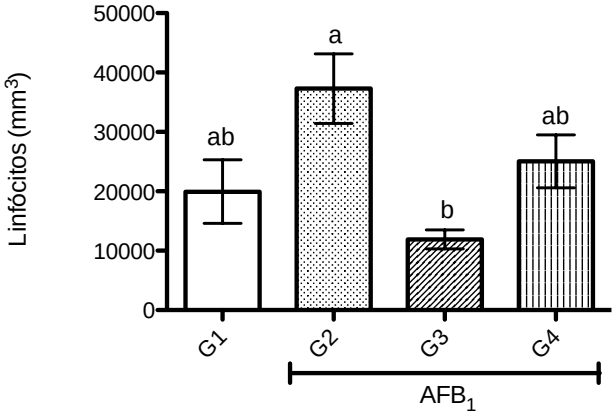


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Na contagem de linfócitos, no 28º dia de fornecimento de ração contaminada com AFB_1, foi evidenciado um aumento significativo ($p<0,05$) do G2 (37298 ± 20300) comparado ao G3 (11905 ± 5084), conforme a Figura 04.

Figura 04. Contagem de linfócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 28 dias de ingestão de AFB_1.

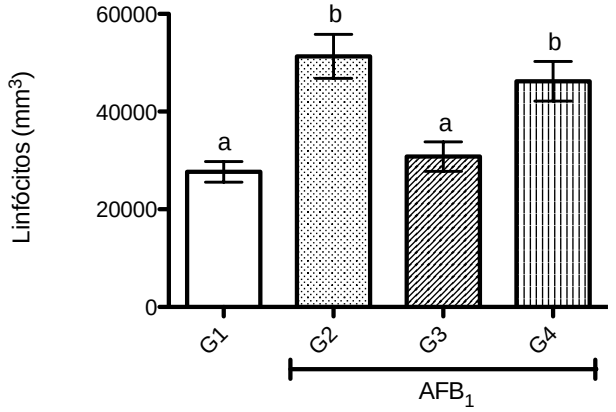


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes $p<0,05$;
Letras iguais $p>0,05$.

A Figura 05 demostra que ao 42 dias, houve um aumento significativo ($p<0,05$) da contagem de linfócitos do G2 (51341 ± 15578) e G4 (46229 ± 14032) com relação ao G1 (27688 ± 7308) e G3 (30812 ± 10045).

Figura 05. Contagem de linfócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 42 dias de ingestão de AFB_1.

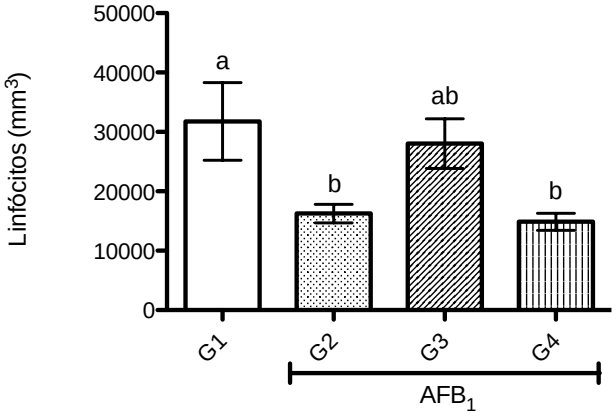


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes $p<0,05$;
Letras iguais $p>0,05$.

Ao 56º dia, houve diminuição significativa (p<0,05) dos linfócitos no G2 (16259 ± 5374) e G4 (14884 ± 4946) quando comparados ao G1 (31769 ± 22646), conforme a Figura 06.

Figura 06. Contagem de linfócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias de ingestão de AFB_1.

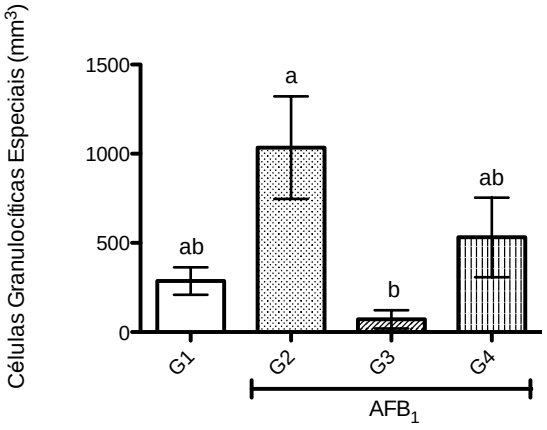


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Na contagem de células granulocíticas especiais (CGE), foi evidenciado um aumento significativo (p<0,05) do G2 (1034 ± 995) com relação ao G3 (72 ± 171), no dia +42 (Figura 07).

Figura 07. Contagem de células granulocíticas especiais (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 42 dias de ingestão de AFB_1.

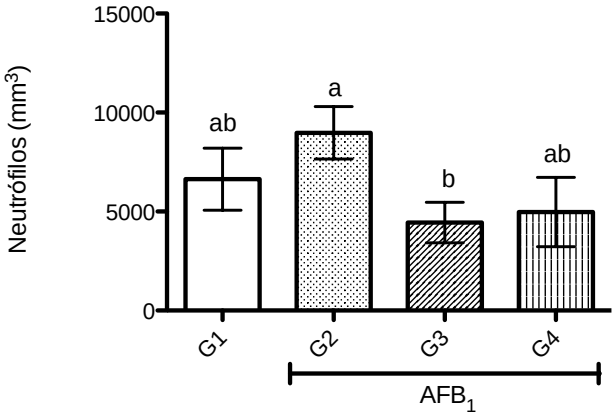


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

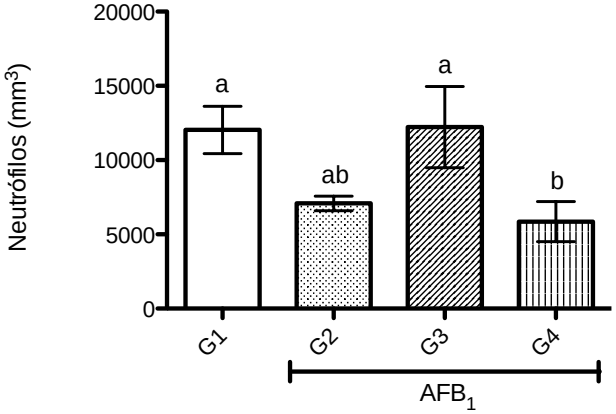
Ao avaliar a contagem de neutrófilos, foi evidenciado um aumento significativo (p<0,05) do G2 (8984 ± 8279) em relação ao G3 (4448 ± 3244), no dia +28 do estudo (Figura 08). Houve também diferença significativa (p<0,05) no dia +56, entre o G4 (5855 ± 4671) quando comparado ao G1 (12034 ± 5528) e G3 (12223 ± 8633), conforme a Figura 09.

Figura 08. Contagem de neutrófilos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 28 dias de ingestão de AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

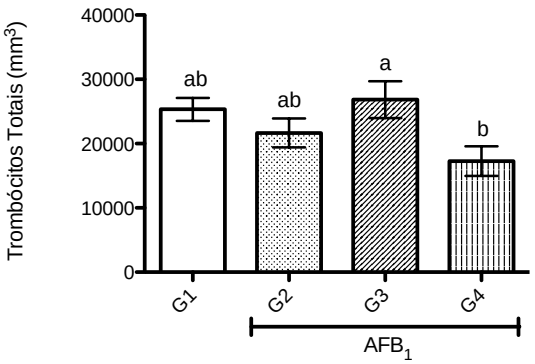
Figura 09. Contagem de neutrófilos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias de ingestão de AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

A Figura 10 demostra um aumento significativo (p<0,05) na contagem total de trombócitos (CTT) do G3 (26850 ± 9111) em relação ao G4 (17292 ± 7953) foi evidenciado após 56 dias de ingestão de AFB_1 via ração.

Figura 10. Contagem total de trombócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias de ingestão de AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Foram também avaliados contagem de heterócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos, porém não foram evidenciadas diferenças significativas (p>0,05) entre os grupos nos dias avaliados (+28, +42 e +56) (Tabela 02).

Tabela 02. Parâmetros leucocitários (Média ± Desvio Padrão) dos diferentes grupos expostos a AFB_1 (G1, G2, G3 e G4) nos dias +28, +42 e +56.

Parâmetros	Dia +28				p-valor ANOVA
	G1	G2	G3	G4	
	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	
Leucócitos Totais (mm^3)	28545 ± 19163^{ab}	48042 ± 21391^{a}	16500 ± 8045^{b}	30500 ± 19358^{ab}	0,0016
Heterócitos (mm^3)	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	-
Linfócitos (mm^3)	19958 ± 17782^{ab}	37298 ± 20300^{a}	11905 ± 5084^{b}	25060 ± 15408^{ab}	0,0053
Monócitos (mm^3)	1465 ± 4321^{a}	542 ± 1025^{a}	60 ± 120^{a}	46 ± 120^{a}	0,8719
Basófilos (mm^3)	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	-
Eosinófilos (mm^3)	391 ± 745^{a}	1125 ± 1746^{a}	40 ± 66^{a}	245 ± 329^{a}	0,1771
Células Granulocíticas Especiais (mm^3)	93 ± 308^{a}	110 ± 212^{a}	48 ± 116^{a}	168 ± 275^{a}	0,4080
Neutrófilos (mm^3)	6639 ± 5187^{ab}	8984 ± 8279^{a}	4448 ± 3244^{b}	4982 ± 6076^{ab}	0,0437
Trombócitos Totais (mm^3)	14864 ± 8658^{a}	19833 ± 7808^{a}	12591 ± 7509^{a}	13125 ± 7374^{a}	0,1161

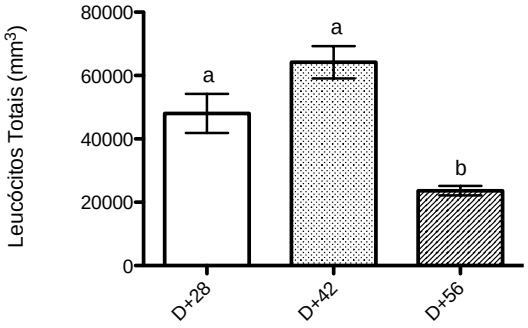
Dia +42					
Leucócitos Totais (mm^3)	37833 ± 8343[a]	64208 ± 17671[b]	37000 ± 10865[a]	57708 ± 20880[b]	< 0,0001
Heterócitos (mm^3)	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	-
Linfócitos (mm^3)	27688 ± 7308[a]	51341 ± 15578[b]	30812 ± 10045[a]	46229 ± 14032[b]	< 0,0001
Monócitos (mm^3)	30 ± 102[a]	63 ± 217[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0,5807
Basófilos (mm^3)	85 ± 202[a]	74 ± 257[a]	62 ± 143[a]	127 ± 230[a]	0,7864
Eosinófilos (mm^3)	661 ± 865[a]	1571 ± 1885[a]	190 ± 320[a]	1410 ± 3219[a]	0,1540
Células Granulocíticas Especiais (mm^3)	286 ± 265[ab]	1034 ± 995[a]	72 ± 171[b]	532 ± 773[ab]	0,0076
Neutrófilos (mm^3)	9297 ± 5018[a]	10125 ± 10808[a]	5865 ± 3826[a]	9411 ± 8612[a]	0,3560
Trombócitos Totais (mm^3)	30292 ± 9134[a]	34667 ± 12576[a]	32636 ± 5891[a]	35208 ± 8092[a]	0,5634
Dia +56					
Leucócitos Totais (mm^3)	45125 ± 22544[a]	23667 ± 5254[b]	48600 ± 20926[a]	21250 ± 7739[b]	< 0,0001
Heterócitos (mm^3)	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	-
Linfócitos (mm^3)	31769 ± 22646[a]	16259 ± 5374[b]	28054 ± 13268[ab]	14884 ± 4946[b]	0,0081
Monócitos (mm^3)	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	-
Basófilos (mm^3)	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	10 ± 35[a]	0,4180
Eosinófilos (mm^3)	455 ± 973[a]	222 ± 374[a]	309 ± 619[a]	150 ± 262[a]	0,9954
Células Granulocíticas Especiais (mm^3)	868 ± 1472[a]	103 ± 144[a]	248 ± 339[a]	80 ± 172[a]	0,1226
Neutrófilos (mm^3)	12034 ± 5528[a]	7083 ± 7142[ab]	12223 ± 8633[a]	5855 ± 4671[b]	0,0019
Trombócitos Totais (mm^3)	25333 ± 6136[ab]	21667 ± 7837[ab]	26850 ± 9111[a]	17292 ± 7953[b]	0,0257

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).
Nota: G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.

Nas análises estatísticas dentro dos grupos (G1, G2, G3 e G4) nos diferentes períodos avaliados (+28, +42 e +56), não houve diferença significativa (p>0,05) nos parâmetros eritrocitários (CTE, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM, CHGM e PP).

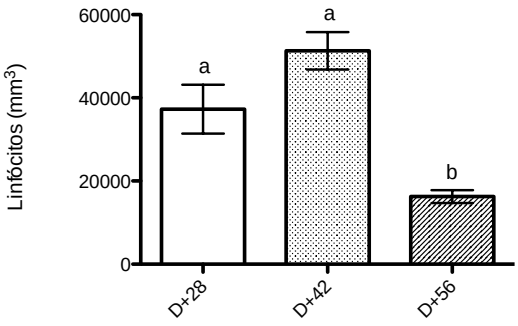
Na CTL do G2 houve aumento significativo (p<0,05) nos dias +28 (48042 ± 21391) e +42 (64208 ± 17671) quando comparados ao dia +56 (23667 ± 5254) (Figura 11). Houve também um aumento significativo (p<0,05) na contagem de linfócitos quando comparado os dias +28 (37298 ± 20300) e +42 (51341 ± 15578) com o dia +56 (16259 ± 5374) (Figura 12); já na CTT, houve um aumento significativo (p<0,05) entre o dia +42 (34667 ± 12576) com os dias +28 (19833 ± 7808) e +56 (21667 ± 7837), conforme a Figura 13.

Figura 11. Contagem total de leucócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 02 (37 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



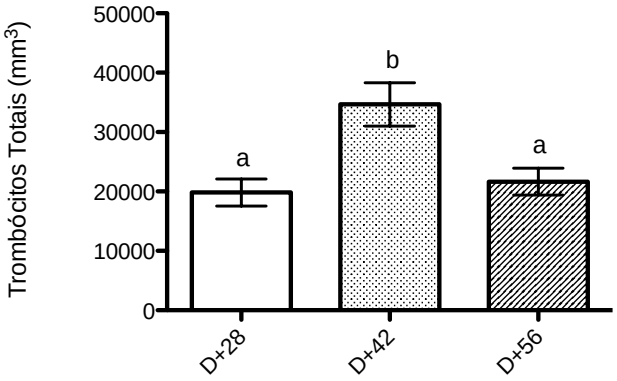
As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Figura 12. Contagem total de linfócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 02 (37 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Figura 13. Contagem total de trombócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 02 (37 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.

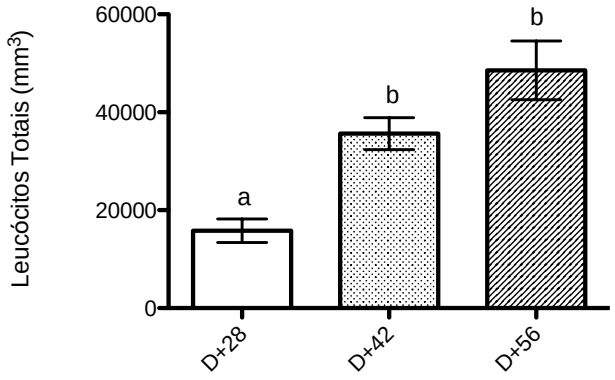


As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Na CTL do G3, houve um aumento significativo (p<0,05) quando comparado o dia +42 (37000 ± 10865) e +56 (48600 ± 20926) com o dia +28 (16500 ± 8045) (Figura 14). A Figura 15 demostra que contagem de linfócitos também mostrou-se elevada (p<0,05) quando comparado o dia +42 (30812 ± 10045) e +56 (28054 ± 13268) com o dia +28 (11905 ± 5084).

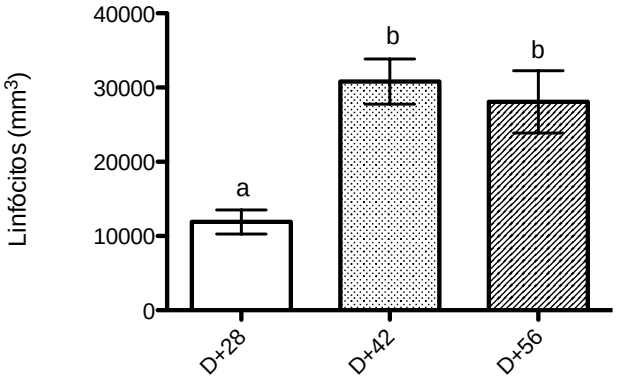
Na CTT do G3 houve aumento significativa (p<0,05) quando comparando o dia +42 (32636 ± 5891) e +56 (26850 ± 9111) com o dia +28 (12591 ± 7509) (Figura 16).

Figura 14. Contagem total de leucócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 03 (62 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



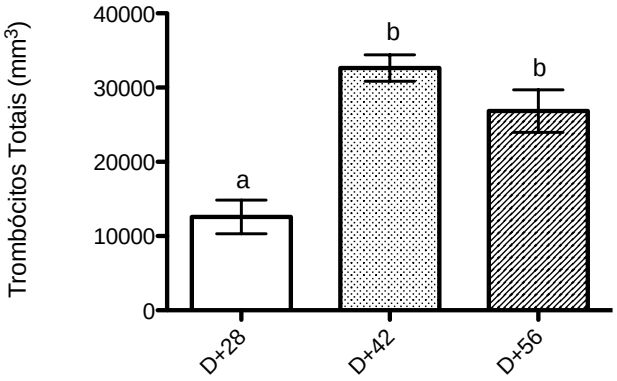
As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Figura 15. Contagem total de linfócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 03 (62 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Figura 16. Contagem total de trombócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 03 (62 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.

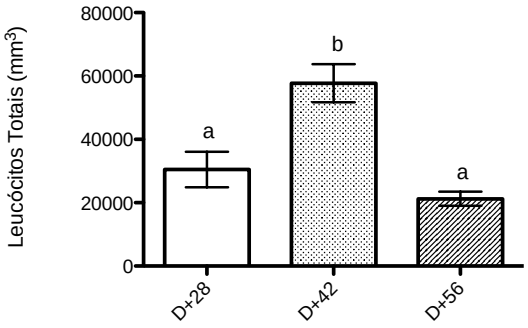


As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

A Figura 17 demostra que os animais do grupo G4 apresentaram-se com as CTL elevadas (p<0,05), quando comparado o dia +42 (57708 ± 20880) com os dias +28 (30500 ± 19358) e +56 (21250 ± 7739). A contagem de linfócitos também mostrou-se elevada (p<0,05), quando comparado o dia +42 (46229 ± 14032) com os dias +28 (25060 ± 15408) e +56 (14884 ± 4946), conforme a Figura 18.

Na CTT do G4 houve um aumento significativo (p<0,05) quando comparado o dia +42 (35208 ± 8092) com os dias +28 (13125 ± 7374) e +56 (17292 ± 7953) (Figura 19).

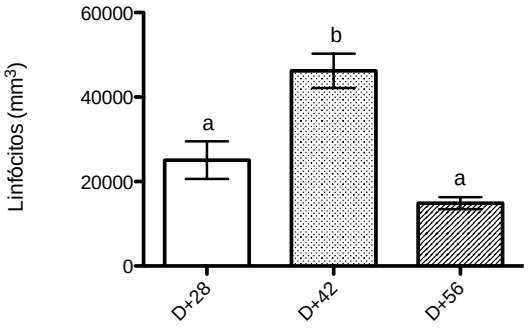
Figura 17. Contagem total de leucócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 04 (180 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

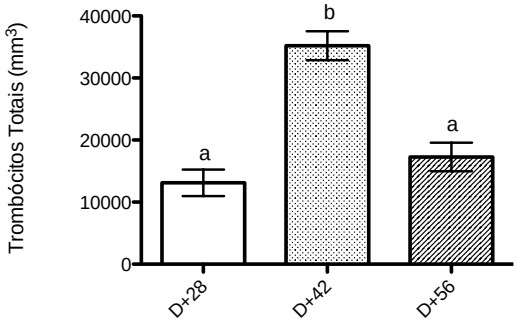
Figura 18. Contagem total de linfócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 04 (180 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Figura 19. Contagem total de trombócitos dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 04 (180 µg.kg^{-1}), nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Nos demais parâmetros leucocitários (contagem de heterócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e CGE) não foram evidenciadas diferenças significativas (p>0,05) dentro dos diferentes grupos nos dias avaliados (+28, +42 e +56).

Nas análises bioquímicas do dia +28 de exposição, não foram evidenciadas diferenças significativas (p>0,05) em nenhum dos parâmetros avaliados (ALT, AST, FA, GGT e albumina), nas comparações entres os grupos experimentais, conforme demonstra a Tabela 03.

Tabela 03. Parâmetros de bioquímica sanguínea (Média ± Desvio Padrão) dos diferentes grupos expostos a AFB_1 (G1, G2, G3 e G4) no dia +28.

Parâmetros	Dia +28				p-valor ANOVA
	G1	G2	G3	G4	
	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	
ALT (UI)	18,72 ± 20,75[a]	9,93 ± 6,96[a]	9,34 ± 4,42[a]	10,95 ± 5,70[a]	0,2614
AST (UI)	72,00 ± 20,05[a]	71,50 ± 27,80[a]	76,36 ± 36,96[a]	76,00 ± 32,41[a]	0,9822
Fosfatase Alcalina (UI)	67,08 ± 35,82[a]	78,83 ± 38,58[a]	60,72 ± 25,08[a]	69,00 ± 35,44[a]	0,6503
Gama GT (U/L)	8,22 ± 7,29[a]	6,70 ± 3,17[a]	7,60 ± 4,41[a]	6,38 ± 2,43[a]	0,9963
Albumina (g/dL)	0,67 ± 0,11[a]	0,73 ± 0,09[a]	0,71 ± 0,14[a]	0,68 ± 0,14[a]	0,6418

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05) e letras iguais não demonstram diferença significativa (p>0,05).
Nota: G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04; ALT: alanino aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; Gama GT: gama glutamiltransferase.

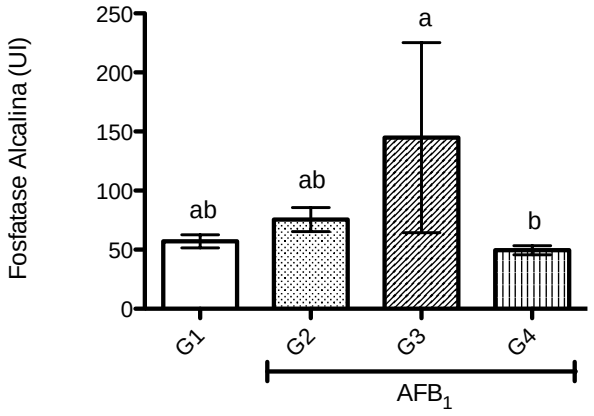
Aos 42 dias de fornecimento da ração contaminada com AFB_1, somente a FA apresentou aumento significativo (p<0,05) quando comparado os animais do G3 (144,90 ± 266,96) em relação aos animais do G4 (57,16 ± 19,13), conforme mostra a Figura 20. Não foram evidenciadas quaisquer outras diferenças significativas (p>0,05) nos demais parâmetros avaliados para o mesmo dia experimental (Tabela 04).

Tabela 04. Parâmetros de bioquímica sanguínea (Média ± Desvio Padrão) dos diferentes grupos avaliados (G1, G2, G3 e G4) no dia +42.

Parâmetros	Dia +42				p-valor ANOVA
	G1	G2	G3	G4	
	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	
ALT (UI)	12,17 ± 7,81[a]	7,21 ± 5,59[a]	14,55 ± 20,98[a]	11,69 ± 10,12[a]	0,3033
AST (UI)	98,33 ± 57,38[a]	62,66 ± 26,89[a]	83,27 ± 68,20[a]	137,83 ± 208,10[a]	0,2090
Fosfatase Alcalina (UI)	57,16 ± 19,13[ab]	75,50 ± 35,27[ab]	144,90 ± 266,96[a]	49,66 ± 13,31[b]	0,0381
Gama GT (U/L)	10,73 ± 9,11[a]	10,06 ± 6,48[a]	16,44 ± 18,74[a]	28,19 ± 35,93[a]	0,6965
Albumina (g/dL)	0,66 ± 0,12[a]	0,73 ± 0,10[a]	0,73 ± 0,14[a]	0,73 ± 0,11[a]	0,3840

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05) e letras iguais não demonstram diferença significativa (p>0,05).
Nota: G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04; ALT: alanino aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; Gama GT: gama glutamiltransferase.

Figura 20. Valores de FA dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 42 dias de ingestão de AFB_1.

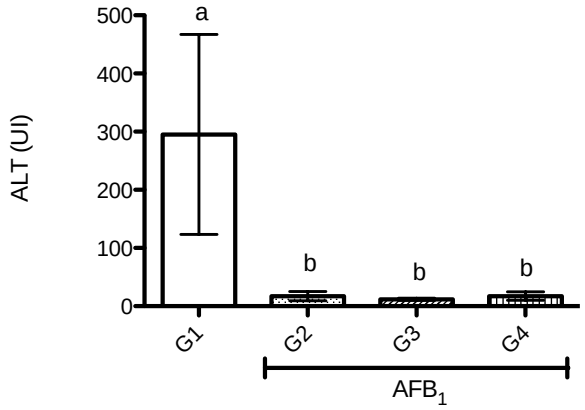


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

No dia +56, foram observadas diminuições significativas (p<0,05) nas dosagens de ALT dos grupos expostos a diferentes concentrações de AFB_1 (G2, G3 e G4) em relação ao grupo controle (Figura 21), os quais apresentam médias ± desvios padrão de 17,26 ± 25,90, 12,02 ± 6,59, 16,93 ± 24,36 e 295,40 ± 515,20, respectivamente.

Figura 21. Valores de ALT dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias de ingestão de AFB_1.

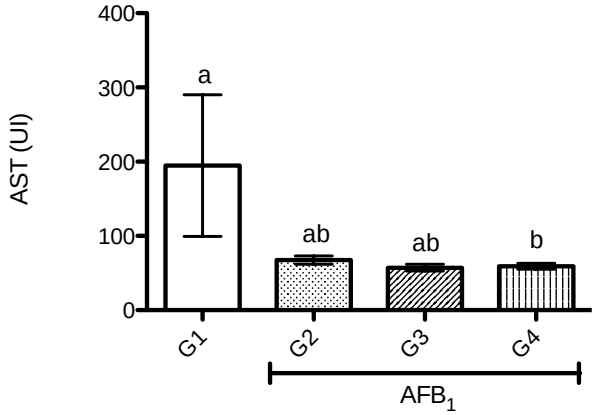


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

As dosagens de AST apresentaram diminuições significativas (p<0,05) quando comparado o G4 (59,16 ± 14,38) ao G1 (194,83 ± 330,37) no dia +56, conforme demonstra a Figura 22.

Figura 22. Valores de AST dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias de ingestão de AFB_1.

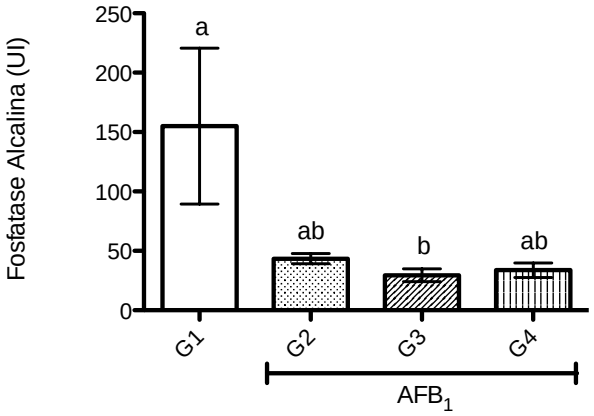


As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

As dosagens de FA do G3 (29,47 ± 15,23) em relação ao G1 (155,10 ± 196,70) (Figura 23) também apresentaram diminuições significativas (p<0,05) no dia +56. Nas dosagens de GGT e albumina não foram observadas quaisquer alterações significativas (p>0,05) aos 56 dias (Tabela 05).

Figura 23. Valores de FA dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) após 56 dias de ingestão de AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.

Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Tabela 05. Parâmetros de bioquímica sanguínea (Média ± Desvio Padrão) dos diferentes grupos expostos a AFB_1 (G1, G2, G3 e G4) no dia +56.

Parâmetros	Dia +56				p-valor ANOVA
	G1	G2	G3	G4	
	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	
ALT (UI)	295,40 ± 515,20^{a}	17,26 ± 25,90^{b}	12,02 ± 6,59^{b}	16,93 ± 24,36^{b}	0,0346
AST (UI)	194,83 ± 330,37^{a}	67,45 ± 18,91^{ab}	57,25 ± 12,74^{ab}	59,16 ± 14,38^{b}	0,0165
Fosfatase Alcalina (UI)	155,10 ± 196,70^{a}	43,50 ± 14,16^{ab}	29,47 ± 15,23^{b}	33,77 ± 20,46^{ab}	0,0146
Gama GT (U/L)	59,81 ± 125,59^{a}	7,12 ± 2,65^{a}	12,83 ± 17,26^{a}	6,74 ± 3,28^{a}	0,5289
Albumina (g/dL)	0,87 ± 0,19^{a}	0,75 ± 0,08^{a}	0,79 ± 0,20^{a}	0,80 ± 0,12^{a}	0,3008

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05) e letras iguais não demonstram diferença significativa (p>0,05).
Nota: G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04; ALT: alanino aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; Gama GT: gama glutamiltransferase.

Nas análises estatísticas dentro dos grupos (G1, G2, G3 e G4), não foram evidenciadas diferenças significativas (p>0,05) nas dosagens de ALT, AST e GGT quando comparando-se diferentes dias (+28, +42 e +56) (Tabela 06).

Tabela 06. Parâmetros de bioquímica sanguínea (Média ± Desvio Padrão) do grupo 01 (0 $\mu g.kg^{-1}$), 02 (37 $\mu g.kg^{-1}$), 03 (62 $\mu g.kg^{-1}$) e 04 (180 $\mu g.kg^{-1}$) expostos a AFB_1, nos diferentes dias avaliados (+28, +42 e +56).

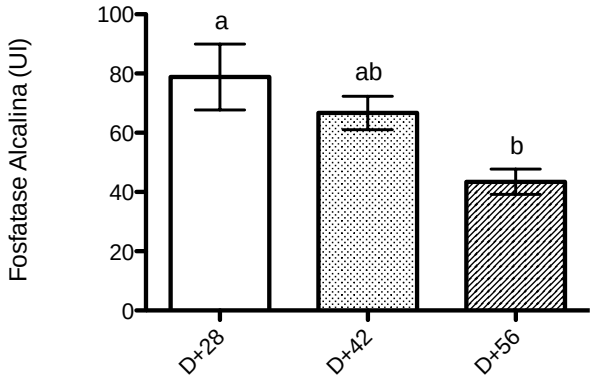
Parâmetros	G1			p-valor ANOVA
	D+28	D+42	D+56	
	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	Média ± Des. Padr.	
ALT (UI)	18,72 ± 20,75[a]	12,17 ± 7,81[a]	295,40 ± 515,20[a]	0,5705
AST (UI)	72,00 ± 20,05[a]	98,33 ± 57,38[a]	194,83 ± 330,37[a]	0,6687
Fosfatase Alcalina (UI)	67,08 ± 35,82[a]	57,16 ± 19,13[a]	155,10 ± 196,70[b]	0,0037
Gama GT (U/L)	8,22 ± 7,29[a]	10,73 ± 9,11[a]	59,81 ± 125,59[a]	0,5741
Albumina (g/dL)	0,67 ± 0,11[a]	0,66 ± 0,12[a]	0,87 ± 0,19[b]	0,0029
G2				
ALT (UI)	9,93 ± 6,96[a]	7,21 ± 5,59[a]	17,26 ± 25,90[a]	0,3933
AST (UI)	71,50 ± 27,80[a]	62,66 ± 26,89[a]	67,45 ± 18,91[a]	0,5456
Fosfatase Alcalina (UI)	78,83 ± 38,58[a]	75,50 ± 35,27[ab]	43,50 ± 14,16[b]	0,0114
Gama GT (U/L)	6,70 ± 3,17[a]	10,06 ± 6,48[a]	7,12 ± 2,65[a]	0,1089
Albumina (g/dL)	0,73 ± 0,09[a]	0,73 ± 0,10[a]	0,75 ± 0,08[a]	0,8672
G3				
ALT (UI)	9,34 ± 4,42[a]	14,55 ± 20,98[a]	12,02 ± 6,59[a]	0,4655
AST (UI)	76,36 ± 36,96[a]	83,27 ± 68,20[a]	57,25 ± 12,74[a]	0,5571
Fosfatase Alcalina (UI)	60,72 ± 25,08[a]	144,90 ± 266,96[a]	29,47 ± 15,23[a]	0,0722
Gama GT (U/L)	7,60 ± 4,41[a]	16,44 ± 18,74[a]	12,83 ± 17,26[a]	0,4522
Albumina (g/dL)	0,71 ± 0,14[a]	0,73 ± 0,14[a]	0,79 ± 0,20[a]	0,6026

		G4		
ALT (UI)	10,95 ± 5,70[a]	11,69 ± 10,12[a]	16,93 ± 24,36[a]	0,5685
AST (UI)	76,00 ± 32,41[a]	137,83 ± 208,10[a]	59,16 ± 14,38[a]	0,1878
Fosfatase Alcalina (UI)	69,00 ± 35,44[a]	49,66 ± 13,31[ab]	33,77 ± 20,46[b]	0,0031
Gama GT (U/L)	6,38 ± 2,43[a]	28,19 ± 35,93[a]	6,74 ± 3,28[a]	0,2123
Albumina (g/dL)	0,68 ± 0,14[a]	0,73 ± 0,11[a]	0,80 ± 0,12[a]	0,0856

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05) e letras iguais não demonstram diferença significativa (p>0,05).
Nota: G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04; ALT: alanino aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; Gama GT: gama glutamiltransferase.

A Figura 14 demostra que a FA do G2 mostrou-se reduzida (p<0,05) quando comparado o dia +56 (43,50 ± 14,16) com o +28 (78,83 ± 38,58).

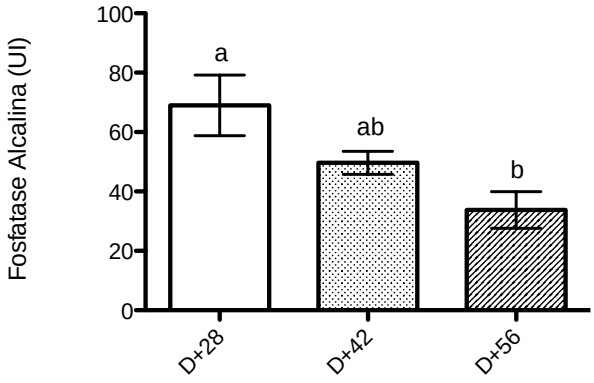
Figura 24. Valores de FA dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 02 (37 µg.kg^{-1}) nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Aos 56º dia experimental, a FA do G4 mostrou-se diminuída quando comparado o dia +56 (33,77 ± 20,46) com o dia +28 (69,00 ± 35,44), conforme a Figura 25.

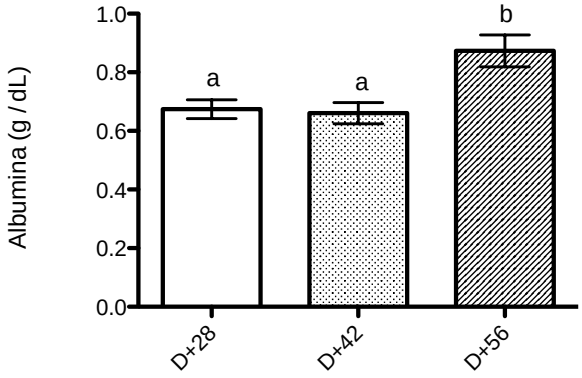
Figura 25. Valores de FA dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 04 (180 µg.kg^{-1}) nos diferentes dias avaliados, após ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Conforme a Figura 26, a albumina no G1 mostrou-se elevada (p<0,05) quando comparado o dia +56 (0,87 ± 0,19) com ambos +28 (0,67 ± 0,11) e +42 (0,66 ± 0,12).

Figura 26. Valores de albumina dos jundiás (*Rhamdia quelen*) do grupo 01 nos diferentes dias avaliados, após a ingestão de ração contendo AFB_1.



As barras indicam as médias e os desvios padrão.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

3.4 DISCUSSÃO

O conhecimento dos parâmetros hematológicos dos peixes auxilia na determinação da influência de dietas, enfermidades, situações de estresse ambiental, compreensão da fisiologia comparativa e relação filogenética sobre

a homeostasia animal. Parâmetros hematológicos podem ser influenciados tanto pelo crescimento do peixe como pelas características ecofisiológicas (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Muitos fatores podem afetar a análise hematológica, tais como estação do ano, qualidade da água, gênero, idade, medicamentos, infestação por parasitos e a manipulação do animal (Bolasina, 2006; Galeb et al., 2013; Montanha et al., 2014).

Segundo Tuan et al. (2002) a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas pelos peixes pode causar redução do crescimento, alterações nos parâmetros hematológicos e supressão do sistema imune dos peixes.

Os resultados da CTE dos jundiás (*Rhamdia quelen*) nos diferentes grupos não demonstrou diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos. De acordo com Pimpão et al. (2007), alterações nas taxas de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos podem ser atribuídas ao mecanismo de reativação da eritropoese induzida pelo baço e fígado em resposta à hipóxia cerebral e estresse, este último também relacionado à diminuição do número de eritrócitos por Tavares-Dias et al. (2001). Os parâmetros de hematócrito variam conforme as espécies de peixes, sendo menores em animais mais primitivos, de ambiente e comportamento calmo, e apresenta-se mais alto em espécies marinhas mais ativas (Borges, 2005).

Tuan et al. (2002), ao testarem dietas contaminadas com 100.000 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 por um período de 56 dias, para alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pesando 2,7 g em sistema fechado, observaram redução significativa nas taxas de hematócrito. Poston (1983) e Jantrarotai & Lovell (1991) também encontraram reduções significativas ($p<0,05$) nas taxas de hematócrito e hemoglobina de alevinos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), quando foram submetidos a dietas contendo 15.000 $\mu g.kg^{-1}$ de micotoxina T-2 e 10.000 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 respectivamente. Entretanto no presente trabalho essas diminuições não foram evidenciadas ($p>0,05$), quando comparado os grupos expostos à AFB_1 e o grupo controle.

Assim como a dosagem de hemoglobina, os valores de PP obtidos nos jundiás do presente estudo não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos.

Sabe-se muito pouco sobre a origem e o desenvolvimento de leucócitos em teleósteos, podendo a leucopenia ser gerada por doenças virais, infecções bacterianas severas, drogas e químicos tóxicos, além de neoplasias (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Lopes et al., 2007; Pimpão et al., 2007), que por sua vez deixa o peixe vulnerável a infecções.

Situações de desafio imunológico tendem a refletir um aumento na CTL devido ao estresse e inflamação gerados (Galeb, 2010), sua diminuição pode ser associada à diminuição da capacidade imunológica do organismo desafiado pela exposição a algumas substância tóxica, sendo que os praguicidas são os únicos relacionados a diminuição de CTL no jundiá (*Rhamdia quelen*). Além disso, a libertação de neutrófilos para a corrente sanguínea é conhecida por ocorrer como uma resposta não específica a uma variedade de estímulos de estresse nos mamíferos e peixes (Singh et al., 2008).

No presente estudo, a CTL revelou diminuição significativa ($p<0,05$) dos valores obtidos no grupo 03 nos dias +28 e +42, demonstrando a ineficácia do sistema imune dos animais frente à exposição prolongada com 62 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, porém aos 56 dias de fornecimento da ração contaminada, os animais do mesmo grupo parecem reagir, aumentando sua CTL, demonstrando assim que depois de certo período os animais podem apresentar uma evolução positiva frente a essa forma de exposição.

A CTL nos grupos 02 e 04 revelaram um aumento significativo ($p<0,05$) nos dias +28 e +42 da ingestão continua de ração contaminada com AFB_1, demonstrando assim que os animais destes grupos estavam reagindo frente a essa exposição, porém no dia +56 esse valor reduziu, indicando assim uma exaustão do sistema imune. Com isso, pode-se perceber que os animais que foram expostos a menor e a maior dose (37 e 180 $\mu g.kg^{-1}$, respectivamente), não conseguiram adaptar-se a essa condição.

Esse mesmo comportamento de resposta dos indivíduos frente à exposição com AFB_1 foi observado nas contagens de linfócitos, CGE, neutrófilos e trombócitos.

Mahfouz & Sherif (2015), observaram, em seus estudos, diminuição significativa ($p<0,05$) na CTL e contagem de linfócitos, além de um aumento significativo ($p<0,05$) na contagem de neutrófilos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo 20 e 100 $\mu g.kg^{-1}$ de

AFB_1, por um período de 12 semanas (84 dias), eles notaram que em ambos os grupos (20 e 100 $\mu g.kg^{-1}$), esse padrão não foi apenas dependente da concentração administrada, mas também do tempo de exposição (12 semanas), mostrando valores mais baixos (CTL e linfócitos) e mais altos (neutrófilos) do que após 6 semanas de exposição, demostrando uma similaridade parcial com os resultados do presente estudo, já que a CTL e contagem de linfócitos apresentou o mesmo comportamento de queda no decorrer das semanas (G2 e G4), porém houve um comportamento inverso na contagem de neutrófilos os quais diminuíram com a evolução do tempo. Esse comportamento não se repetiu no G3 reafirmando a possibilidade de adequação do sistema imune desses animais a dose fornecida.

Estas alterações também são semelhantes as relatadas em aflatoxicoses em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Tuan et al., 2002; Selim et al., 2014), tilápias azuis (*Oreochromis aureus*) (Rizkalla et al., 1997), e carpas rohu (*Labeo rohita*) (Mohapatra et al., 2011), bem como outros animais, incluindo frangos de corte (Raju & Devegowda, 2000), coelhos (Donmez & Keskin, 2009) e carneiros (Donmez et al., 2012).

Os trombócitos não estão relacionados somente à coagulação sanguínea, mas também à homeostasia e à resposta a patógenos como células de defesa do organismo (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Diminuição significativa na CTT de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a concentrações de praguicidas e outras substâncias tóxicas também é relatada por Velisek et al. (2006) e Pamplona et al. (2011), sendo relacionada por Galeb (2010) ao grau de estresse dos peixes no momento do manejo para a coleta de sangue, levando em consideração que o cortisol liberado durante as reações ao estresse é um importante causador de diminuição da quantidade e qualidade de trombócitos. Drogas e químicos utilizados como terapêuticos também podem afetar a produção de trombócitos. No entanto, no presente trabalho a CTT também apresentou-se elevada em alguns momentos.

As provas bioquímicas realizadas no soro dos animais apresentam excelente subsídio ao diagnóstico das enfermidades hepáticas, sendo esses exames reunidos em baterias de provas referidas como avaliadores da função hepática ou/e biomarcadores de hepatoxicidade. Para avaliar os possíveis efeitos da exposição à diferentes concentrações de AFB_1 sobre a função e a

integridade hepática dos animais submetidos desse estudo, optou-se por determinar as atividades séricas de albumina e das enzimas ALT, AST, FA e GGT.

O fígado é conhecido por ser o principal órgão-alvo para aflatoxicoses em peixes (Santacroce et al., 2008). Após a entrada das aflatoxinas no fígado, seus metabólitos reagem negativamente com diferentes proteínas celulares, as quais podem levar à inibição da síntese de carboidratos e de proteínas, bem como alterar o metabolismo lipídico, além de finalmente induzir necrose e neoformações hepáticas (Huang et al., 2011).

Com relação ao distúrbio da função hepática, há também um desarranjo do mecanismo de coagulação do sangue, icterícia e uma diminuição nas proteínas séricas e no colesterol total sintetizados pelo fígado (Joner, 2000).

As enzimas ALT e AST são as aminotransferase mais importantes relacionadas ao metabolismo de aminoácidos no fígado de peixes teleósteos (Coz-Rakovac & Smuc, 2008).

As alterações nos níveis séricos de ALT e AST são específicas do fígado e foram consideradas como uma ferramenta para a viabilidade celular e para as alterações na permeabilidade da membrana celular (Huang et al., 2011).

A ALT é uma enzima presente em maior concentração nos hepatócitos. Enfermidades que causem lesões hepáticas, aumentam o extravasamento de ALT na circulação sanguínea (Thrall et al., 2007).

A AST é uma enzima de extravasamento presente em sua maior parte nos hepatócitos. Se encontra também em uma ampla variedade de tecidos, como células do músculo cardíaco e esquelético. Apesar de ser amplamente utilizada para diagnóstico de lesões hepáticas, a determinação desta enzima também é feita para diagnosticar doenças musculares, pois ela não é considerada hepato-específica (Thrall et al., 2007).

O aumento na atividade sérica de ALT e AST está relacionada a danos ao parênquima hepático e sugere um reforço no catabolismo proteico e danos hepatocelulares no organismo (Begum, 2005), situação previsível como resposta elevada dos organismos sob efeito de intoxicação aguda.

No presente estudo, os peixes dos grupos alimentados com diferentes concentrações de AFB_1 apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,05$) nas dosagens das enzimas ALT, AST quando comparadas ao grupo controle.

Abd El-Baki et al. (2002) e Shehata et al. (2009), dosaram AST e ALT de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta contendo 100 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 e também encontram os níveis dessa enzimas diminuídas. Porém, Mahfouz & Sherif (2015), trabalharam com a mesma espécie e observaram um aumento significativo ($p<0,05$) destas enzimas após a ingestão de ração contaminada com 20 e 100 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 por 12 semanas consecutivas, discordando assim dos resultados encontrados no presente estudo.

Deng et al. (2010) e Huang et al. (2011), não encontraram diferenças significativas ($p>0,05$) nas dosagens de ALT e AST em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com 1.641 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 e em carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*) alimentadas com rações contendo até 1.000 $\mu g.kg^{-1}$, respectivamente.

Essa redução nos níveis de ALT e AST pode ser devido à hepatose tóxica sofrida pelo fígado (Abdelhamid & Dorra, 1993), porém há a necessidade de mais estudos a respeito da diminuição destas enzimas em peixes expostos à agressores químicos.

A FA é uma enzima mitocondrial que pode ser encontrada em vários tecidos, principalmente tecido ósseo, hepatobiliar e mucosa gastrointestinal. A FA é uma enzima encontrada no hepatopâncreas de peixes e que possui função na detoxificação de substâncias, quando o hepatopâncreas excreta grandes quantidades de substâncias tóxicas o resultado é uma atividade elevada de FA nesse órgão (Thrall et al., 2007).

Os hepatócitos respondem pela maior parte da atividade sérica normal de FA (Thrall et al., 2007; Lopes et al., 2007). Esta enzima também está relacionada a danos ao parênquima hepático e seu aumento sugere danos hepatocelulares no organismo (Begum, 2005). A aflatoxina é capaz de induzir o dano celular oxidativo, através da qual exerce efeitos citotóxicos e carcinogênicos (Madhusudhanan et al., 2004).

No presente estudo, foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) dos níveis de FA do grupo 03 (62 $\mu g.kg^{-1}$) após 42 dias de ingestão de AFB_1, porém após 56 dias de ingestão ocorreu um decréscimo significativo ($p<0,05$) nesses valores. Mahfouz & Sherif (2015), observaram um aumento significativo ($p<0,05$) desta enzima após a ingestão de ração contaminada com 20 e 100

$\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 por 12 semanas consecutivas em tilápia do Nilo (*Oreochromys niloticus*).

A redução desta enzima pode indicar uma possível insuficiência hepática, porém há necessidade de uma avaliação histopatológica dos fígados destes animais para que se tenha a confirmação desta insuficiência.

A GGT é oriunda do fígado, é considerada um bom marcador enzimático para desordens do sistema hepatobiliar, indicando colestase. No presente estudo, não foi encontrada diferença significativa ($p>0,05$) na dosagem de GGT entre os grupos alimentados com AFB_1 e o grupo controle. Galeb (2013) observou uma tendência ao aumento de GGT em jundiás (*Rhamdia quelen*) intoxicados com deltametrina em doses baixas, porém, em sua pesquisa, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamento.

A albumina é sintetizada no fígado, e sua diminuição geralmente é observada em quadros de doenças hepáticas, quando ocorre perda de 60 a 80% da função hepática. Porém, parece haver algumas diferenças entre as espécies (Thrall et al., 2007; Lopes et al., 2007). No presente estudo não foram evidenciadas diferenças significativas nas dosagens de albumina sérica quando comparados os peixes dos diferentes grupos expostos a AFB_1.

Em relação as avaliações dentro dos grupos, pode ser observado um aumento significativo ($p<0,05$) na dosagem de albumina do grupo 01 (controle) após 56 dias de ingestão da ração controle (sem aflatoxina B_1), mostrando assim que a síntese proteica dos respectivos animais não foi afetada negativamente durante todo estudo.

3.5 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, a imunidade celular do jundiá (*Rhamdia quelen*) foi afetada negativamente pela exposição a AFB_1, porém os parâmetros eritrocitários destes animais permaneceram inalterados.

Doses de AFB_1 mais baixas (37 $\mu g.kg^{-1}$) ou mais elevadas (180 $\mu g.kg^{-1}$) não permitiram uma adaptação do sistema imune. Entretanto, em uma dose intermediária (62 $\mu g.kg^{-1}$) levou à adaptação do sistema imune desses animais.

Através dos resultados de bioquímica sérica, conclui-se que a exposição à AFB_1 causa um grau leve de hepatotoxicidade, comportamento que ocorreu independente da concentração a qual os animais foram expostos.

3.6 REFERÊNCIAS

Abd El-Baki SM, Nowar MS, Hassona EA, Bassuny SM, Shehata SA. Clays in animal nutrition: 10. Detoxification of aflatoxin B_1 by tafla clay in rabbit feeds. Proceedings of the 3rd Scientific Conference of Rabbit Production in Hot Climates: 2002 Oct 8-11; Hurghada, Egypt. P. 557-567.

Abdelhamid AM, Dorra TM. Effect of feedborne pollution with some mycotoxins combination on broiler chicks. Archives of Animal Nutrition. 1993; 44: 29-40.

Begum G. In vivo biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure. Pesticide Biochemical and Physiology. 2005; 82: 185-196.

Benli ACK, Yildis HY. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L*.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. Aquactic Reserach. 2004; 35: 1388-1390.

Bolasina SN. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. Aquaculture International. 2006; 14: 569-575.

Borges A. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeito de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Tese de Doutorado). Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

Brasil, 1988. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, de 09/11/88. Seção I, p. 21968.

Coldebella I, Radünz Neto J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Ciência Rural. 2002; 32: 499-503.

Coz-Rakovac R, Smuc T. Novel methods for assessing fish blood biochemical data. Journal of Applied Ichthyology. 2008; 24: 77-80.

Dalmo RA, Igebregstsen K, Bogwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Diseases. 1997; 20: 241-273.

Deng SX, Tian LX, Liu FJ, Jin SJ, Liang GY, Yang HJ, Du ZY, Liu YJ. Toxic effects and residue of aflatoxin B_1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). Aquaculture. 2010; 307: 233-240.

Donmez N, Donmez HHD, Keskin E, Kisadere I. Effects of aflatoxin on some haematological parameters and protective effectiveness of esterified glucomannan in Merino rams. The Scientific World Journal. 2012; 2012: 1-4.

Donmez N, Keskin E. The effects of aflatoxin and glucomannan on coagulation parameters in rabbits. Veterinarski Arhiv. 2009; 79: 555-560.

Galeb LAG, Ganeco LN, Fredianelli AC, Wagner R, D'amico Fam ALP, Rocha DCC, Kirschnik PG, Pimpão CT. Acute intoxication by deltamethrin in jundiá: Emphasis on clinical, biochemical and haematological effects. Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology. 2013; 2: 60-67.

Galeb LAG. Avaliação dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativa jundiá (*Rhamdia quelen*) (Dissertação de

Mestrado). São José dos Pinhais, PR: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2010.

Germam AV, Kozlovskaya VI. Hepatosomatic index e the biochemical composition of the liver in Abramis brama in the Sheksna Stretch of the Rybinsk reservoir at different levels of toxicant accumulation. Journal of Ichthyology. 2001; 41: 160-163.

Huang Y, Han D, Zhu XM, Yang YX, Jin JY, Chen YF, Xie SQ. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B_1. Aquaculture. 2011; 319: 89-97.

Jantrarotai W, Lovell BT. Subchronic toxicity of aflatoxin B_1 to channel catfish. Journal Aquatic Animal Health. 1991; 2: 248-275.

Joner A. Mycotoxins. 2000. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/courses/as625/1999term/toner/aflatoxins.html>.

Lopes PRS, Pouey JLFO, Enke DBS, Camargo SGO, Correa GF, Ribeiro CLG, Mallmann CA, Portleninha MK, Freita M. Efeitos das aflatoxinas sobre os parâmetros eritrocitários de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia. 2010; 17: 1-13.

Lopes STA, Biondo AW, Santos AP. Manual de Patologia Clínica Veterinária. 3ª ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2007.

Lumlertdacha S, Lovell RT, Shelby RA, Lenz SD, Kemppainen BW. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. Aquaculture. 1995; 130: 201-218.

Madhusudhanan N, Kavithalakshmi SN, Shanmugasundaram KR, Shanmugasundaram ERB. Oxidative damage to lipids and proteins induced by aflatoxin B_1 in fish (*Labeo rohita*) – Protective role of Amrita Bindu. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2004; 17: 73-77.

Mahfouz ME, Sherif AH. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. The Journal of Basic & Applied Zoology. 2015; 71: 48-59.

Martins ML, Tavares-Dias M, Fujimoto RY, Onaka EM, Nomura DT. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2004; 56: 640-646.

Mohapatra S, Sahu NP, Pal AK, Prusty AK, Kumar V, Kumar S. Haemato-immunology and histo-architectural changes in *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary aflatoxin and mould inhibitor. Fish Physiology and Biochemistry. 2011; 37: 177-186.

Montanha FP, Fredianelli AC, Wagner R, Sacco SR, Rocha DCC, Pimpão CT. Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2014; 66: 697-704.

Pamplona JH, Oba ET, Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, Ribeiro CAO, Zampronio AR, Assis HCS. Subchronic effects of dipyrone on the

fish species *Rhamdia quelen*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011; 74: 342–334.

Pimpão CT, Zampronio AR, Assis HCS. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007; 88: 122-127.

Pimpão CT, Zampronio AR, Assis HCS. Exposure of *Ancistrus multispinis* (Regan, 1912, Pisces, Teleostei) to deltamethrin: Effects on cellular immunity. Fish & Shellfish Immunology. 2008; 25: 528-532.

Poston HA. Biological effects of dietary T2 toxins on *Rainbow trout*. Aquatic Toxicology. 1983; 2: 79-88.

Raju MVLN, Devegowda G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T2 toxin). British Poultry Science. 2000; 41: 640-650.

Ramsdorf W. Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes (Tese de Doutorado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2011.

Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI. Métodos para análise hematologia de peixes. 1ª ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá; 2013.

Rizkalla EH, Zahra MH, Deab A, Farag MF. Hematological responsiveness of *Oreochromis aureus* to dietary aflatoxins contamination and the role of selenium and vitamin E. Alexandria Journal of Veterinary Sciences. 1997; 13: 423-438.

Santacroce MP, Conversano MC, Casalino E, Lai O, Zizzadoro C, Centoducati G, Crescenzo G. Aflatoxins in aquatic species: Metabolism, toxicity and perspectives. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2008; 18: 99-130.

Selim KM, El-Hofy H, Khalil RH. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B_1-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. Aquaculture International. 2014; 22: 523-540.

Seriani R, Moreira LB, Abessa DMS, Abujamara LD, Carvalho NSB, Maranho LA, Kirschbaum AA, Ranzani-Paiva MJT. Hematological analysis of *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Scianidae, from two Estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Oceanography. 2010; 58: 87-92.

Shehata SA, El-Melegy KM, Ebrahim MS. Toxicity reduction of aflatoxin B_1 by vitamin C in fish. Journal of the Arabian Aquaculture Society. 2009; 4: 73-86.

Singh D, Nath K, Trivedi SP, Sharma YK. Impact of copper on haematological profile of freshwater fish, *Channa punctatus*. Journal of Environmental Biology. 2008; 29; 253-257.

Tavares-Dias M, Melo JFB, Moraes G, Moraes FR. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). Ciência Rural. 2002; 32: 693-698.

Tavares-Dias M, Moraes FR. Hematologia de peixes teleósteos. 1ª ed. Ribeirão Preto: Villimpress; 2004.

Tavares-Dias M, Sandrim EFS, Moraes FR, Carneiro PCF. Physiological responses of “tambaqui” Colossoma macropomum (Characidae) to acute stress. Boletim do Instituto de Pesca. 2001; 27: 43-48.

Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, Denicola D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Editora Roca; 2007.

Tuan NA, Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB, Rottinghaus GE. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B_1. Aquaculture. 2002; 212: 311-319.

Velisek J, Wlasow T, Gomulka P, Svobodova Z, Dobsikova R, Novotny L, Dudzik M. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Medicine. 2006; 51: 469-476.

Vieira VLP, Radünz Neto J, Lopes PRS, Lazzari R, Fonseca MB, Menezes CC. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. Ciência Animal Brasileira. 2006; 7: 49-55.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DOS DANOS HISTOLÓGICOS PROVOCADOS PELA AFLATOXINA B_1 EM ALEVINOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)

Evaluation of Histological Damage Caused by Aflatoxin B_1 in Jundiá's (Rhamdia quelen) Fingerlings

ANATER A[1]., BARBOSA C.K.[2], IACHINSKI E.A.[3], SANTOS, A.L.[4], MIRANDA, S.F.[5], RIBEIRO D.R.[6], ENGRACIA FILHO, J.R.[7], PIMPÃO C.T.[8]

[1]Mestranda em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, amanda_anater@hotmail.com;
[2]Graduanda em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, carolinakonkel@gmail.com.br;
[3]Graduando em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, edevaldoia@hotmail.com;
[4]Graduanda em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, andria_ls@hotmail.com;
[5]Graduando em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, sergey.miranda@hotmail.com;
[6]Mestrando em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, deividrr@hotmail.com;
[7]Professor Titular – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, jair.engracia@pucpr.br;
[8]Professora Titular – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, claudia.pimpao@pucpr.br.

RESUMO

Introdução: As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* sp., e são capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em vertebrados, incluindo o homem. A contaminação ocorre através da ingestão de alimentos naturalmente contaminados pelos fungos produtores. Em peixes, a contaminação por aflatoxina B_1 (AFB_1) pode desencadear diversos sinais clínicos inespecíficos, sendo que parâmetros histológicos são considerados importantes ferramentas diagnósticas para avaliar alterações metabólicas e celulares. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos deletérios em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo diferentes níveis de AFB_1, através de avaliações histológicas. **Métodos:** Foram utilizados 624 alevinos de jundiás, distribuídos em 4 grupos distintos (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 e G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ AFB_1 de na ração), os quais foram separados aleatoriamente em 24 aquários (n=26 alevinos/aquário), foram alimentados durante 56 dias consecutivos com as respectivas rações. As coletas dos órgãos (fígado, rins e brânquias) foram realizadas nos dias experimentais +28, +42 e +56. Nas amostras de tecido buscou-se quaisquer alterações histológicas entre os grupos. Nas análises estatísticas foi utilizada ANOVA seguida de Bonferroni, ou utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. **Resultados:** Não foram observadas diferenças

significativas (p>0,05) nas lesões teciduais encontradas nos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) em todos os períodos avaliados (+28, +42 e +56). **Conclusão:** O fornecimento de diferentes níveis de AFB_1 para jundiás não causou alterações específicas e significativas passíveis de detecção através de histologia nas estruturas teciduais dos diferentes órgãos avaliados. Provavelmente isso ocorreu pois o tempo de exposição não foi suficiente para o possível agravamento de lesões nos animais expostos a AFB_1.

Palavras chave: Fígado; Hepatotoxicidade; Micotoxinas; Peixes; Toxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Aflatoxins are secondary metabolites produced by fungi *Aspergillus* sp., that is capable to generating a wide variety of toxic effects on vertebrate animals, including humans. In fish, contamination by aflatoxin B_1 (AFB_1) can lead to many nonspecific clinical signs. Histological parameters are considered important diagnostic tools to evaluate metabolic and cellular changes. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the possible deleterious effects in histological parameters of jundiá (*Rhamdia quelen*) fed with contaminated feed containing different concentrations of AFB_1. **Methods:** 624 jundiá's fingerlings were used. The fish were divided into 4 different groups (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 and G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ of AFB_1 in feed) and randomly assigned into 24 aquariums (n=26 fingerlings/aquarium), the feed was offered for 56 consecutive days. The organs (liver, kidneys and gills) were taken on +28, +42 and +56 days. The tissue samples was used to look for pathological alterations. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Bonferroni or Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests. **Results:** No significant differences (p>0,05) was observed in tissue lesions found in the different groups (G1, G2, G3 and G4) in all the periods that were evaluated (+28, +42 and +56). **Conclusion:** The supplying of different levels of AFB_1 to jundiá caused not specific and significant changes capable of detection by histology in tissue structures of different organs evaluated. This probably occurred because the exposure time was not enough for the possible aggravation lesions in animals exposed to AFB_1.

Keywords: Fish; Hepatotoxicity; Liver; Mycotoxins; Toxicity.

4.1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, que são capazes de produzir efeitos deletérios nos seres humanos e nos animais (Pitt & Hocking, 2009).

De um modo geral já foram identificadas mais de 400 micotoxinas, sendo que as de maior impacto são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Cada um destes gêneros pode produzir diferentes tipos de micotoxinas. Da mesma forma, diferentes espécies de fungos podem produzir o mesmo tipo de toxina (Pinheiro et al., 2015).

As micotoxinas apresentam, de modo geral, grande estabilidade química, que permite a sua persistência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem. Os fungos toxigênicos podem contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento, desde o cultivo até o transporte e armazenagem (Lopes et al., 2005). Conforme relatado por Sabino et al. (1988), por apresentar um clima tropical, o Brasil propicia condições ideais para a proliferação dos fungos responsáveis pela produção de micotoxinas.

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* (Moss, 1998), sendo que seu principal efeito tóxico é sobre o tecido hepático. Os principais produtos alimentícios susceptíveis ao desenvolvimento destes fungos incluem milho e trigo, que normalmente são utilizados na fabricação de rações (Leeson et al., 1995).

São conhecidos, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém os principais tipos são os identificados como B_1, B_2, G_1 e G_2 (Coulombe, 1991), variando entre si no grau de toxicidade.

A aflatoxina B_1 (AFB_1) é a micotoxina com maior potencial carcinogênico conhecido (Klich, 2007), responsável por desencadear toxicidade aguda e crônica e gerar danos cancerígenos, mutagênicos, hepatotóxicos e imunossupressores aos homens e animais (Ferreira et al., 2006; Lazicka & Orzechowski, 2010). Aflatoxicoses crônicas resultam em câncer no fígado, órgão alvo primário desta toxina, sendo que em ambas as formas aguda e crônica, pode ocorrer o óbito (Bennett & Klich, 2003).

A hepatocarcinogenicidade de AFB_1 foi demonstrada em peixes através de experimentos com fornecimento de doses conhecidas da micotoxina (Sinnhuber et al., 1977; Hendricks, 1982), observando-se ampla variação da toxicidade e do potencial carcinogênico entre as espécies de peixes (Plakas et al., 1996). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a exposição prolongada à 320 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 por um período de 6 meses, causou neoplasma hepático, necrose de hepatócitos e degeneração em tecido pancreático e renal (Halver, 1969). Entretanto, para que as mesmas alterações fossem encontradas em bagres do canal (*Ictalurus punctatus s*) foi necessária uma DL_{50} intraperitoneal de 11.500 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 durante 10 dias consecutivos (Jantrarotai & Lovell, 1990).

O objetivo do presente estudo foi determinar, através de parâmetros histológicos, os efeitos deletérios de AFB_1 em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo diferentes níveis dessa micotoxina.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), com duração de 56 dias. As análises dos ingredientes e das concentrações de AFB_1 na ração foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da PUCPR e no Laboratório de Toxicologia Alimentar da Universidade de Valência/Espanha, respectivamente. As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia Veterinária da PUCPR.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob protocolo de número 886 – 2ª versão.

624 alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) com 7,44 g ± 2,18 de peso corporal médio, oriundos do LAPEP/PUCPR, foram utilizados para realização deste estudo. Para a divisão dos grupos, os animais foram submetidos a um jejum de 24h, com objetivo de padronizar o peso e evitar regurgitações de alimento. Após o jejum, os animais foram pesados em grupo e alojados em 24 caixas de polipropileno contendo 26 alevinos cada, sendo 6 caixas por grupo experimental, com densidade populacional inicial média de 2,41 $g.L^{-1}$. As caixas foram distribuídas aleatoriamente em 4 bancadas, mantidas em ambiente fechado e controlado (oxigênio dissolvido, salinidade, pH e

temperatura). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, longitudinal e prospectivo.

As 24 caixas de polipropileno com capacidade para 100 L cada, foram abastecidas com 80 L de água em um sistema de circulação aberta e termorregulado. O sistema com capacidade de 1.920 L de água foi abastecido por meio de um reservatório escavado externo. A entrada de água nas unidades experimentais foi mantida em aproximadamente 1,0 $L.minuto^{-1}$, ininterruptamente.

A limpeza das caixas foi realizada a cada dois dias com uso de sifão, retirando-se cerca de 20% do volume de água. Diariamente os animais foram observados para presença de eventuais sinais clínicos, bem como, a verificação de mortalidade e a retirada destes das caixas.

Também foram monitorados diariamente os parâmetros de qualidade da água nas unidades experimentais, como, oxigênio dissolvido, salinidade, pH e temperatura, com auxílio de oxímetro e medidor de pH digitais. A amônia total e o nitrito foram monitorados semanalmente com auxílio de kit colorimétrico.

Os grupos experimentais foram formados com base em 4 diferentes concentrações de aflatoxina B_1 (AFB_1), fornecidas aos animais via ração. Os níveis de AFB_1 e os respectivos grupos foram de 0 (G1), 45 (G2), 90 (G3) e 180 (G4) $\mu g.kg^{-1}$ de ração, respectivamente. No Brasil o limite máximo de Afs permitido em alimentos para animais é de 50 $\mu g.kg^{-1}$ (Brasil, 1988). As concentrações utilizadas neste trabalho objetivaram trabalhar com um grupo abaixo do limite permitido, além de dois outros grupos com duas e quatro vezes a mais do que à concentração inicial de 45 $\mu g.kg^{-1}$.

A AFB_1 purificada foi adquirida da Sigma Chemical Co., USA (AFB_1/A6636), dissolvida em clorofórmio, posteriormente adicionada em óleo de canola, o qual foi utilizado na formulação da ração.

A ração experimental foi formulada de forma a ser isoprotéica e isocalórica, contendo 38,01% de proteína bruta e 3.655 $kcal.kg^{-1}$ de energia digestível, conforme composição descrita por Coldebella & Radünz Neto (2002).

O preparo das rações foi realizado no LAPEP/PUCPR e após sua finalização foram coletadas amostras para quantificação da AFB_1 através de

cromatografia líquida de alta performance, realizadas no Laboratório de Toxicologia Alimentar.

Após o alojamento, os animais passaram por um período de aclimatação de 15 dias. Em seguida, todos os peixes foram mantidos em jejum de 24h, para garantir uma ingestão imediata da ração. No decorrer do experimento, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (9 e 17h) até completa saciedade.

Aos 28, 42 e 56 dias experimentais os peixes foram submetidos a jejum de 3h para coleta de órgãos, quando foram capturados aleatoriamente 24 animais por grupo (4 por caixa). Os animais foram retirados das caixas experimentais e anestesiados por imersão em solução de benzocaína à 2%, após completa sedação foi realizada a eutanásia dos animais através de secção medular. Em seguida à eutanásia, os órgãos (fígado, rins e brânquias) foram coletados e fixados em solução tamponada de formalina à 10% (Luna, 1968), para posterior avaliação histológica.

Posteriormente, os órgãos foram submetidos às etapas de desidratação em banhos de concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina, procedimento de rotina no processamento de tecidos para confecção de lâminas histológicas (Luna, 1968). Foram então confeccionados blocos de parafina com os três órgãos incluídos para o corte em micrótomo manual na espessura de 5 µm e montagem das lâminas. Após a secagem, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) (Behmer et al., 1976) para posterior análise em microscopia de luz para descrição morfológica dos órgãos avaliados. Foram analisadas 6 lâminas por grupo.

Todas as lesões encontradas foram classificadas em escores (E) de 0 à 4, variando em porcentagem de comprometimento do órgão, onde o escore 0 = 0% indica ausência de alteração; escore 1 = até 25% indica alteração leve; escore 2 = 26 à 50% indica alteração leve à moderada; escore 3 = 51 à 75% indica alteração moderada à intensa e escore 4 = acima de 75% indica alteração intensa.

No fígado foi avaliado quanto a presença de: congestão, cristais, degeneração, edema, esteatose, hepatócitos eosinofílicos, infiltrado inflamatório e necrose tecidual. Nas brânquias foram buscadas as seguintes alterações: aneurismas, congestão vascular, degeneração celular, edema,

fusão completa e hiperplasia lamelar, lamelas distorcidas e necrose. Nos rins foi avaliada a presença de: aplasia hematopoiética, degeneração, necrose, edema e vacuolização tubular, hiperplasia e degeneração glomerular, edema intersticial, inflamação e hemorragia.

Para análise estatística dos dados paramétricos foi utilizado ANOVA (one way) seguido por teste de Bonferroni e para os dados não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's. O teste de normalidade usado foi Kolmogorov-Smirnov. Os dados estão apresentados em médias e desvios padrão. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha<0,05$) utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 5.00 para Macintosh, São Diego – Califórnia, EUA.

4.3 RESULTADOS

Durante o período experimental a água utilizada nos aquários apresentou os seguintes parâmetros em valores médios seguidos de desvio padrão: temperatura: 27,77 ± 1,55º C, pH: 7,26 ± 0,26, salinidade: 0,19 ± 0,30 ppm, oxigênio dissolvido: 4,35 ± 0,55 $mg.L^{-1}$, amônia tóxica (NH_3): 0,005 ± 0,006 ppm; nitrito (NO_2): 0,191 ± 0,457 ppm.

Após as análises cromatográficas, os níveis de AFB_1 encontrados nas rações experimentais foram de 0 $\mu g.kg^{-1}$ no G1 (controle), 37 $\mu g.kg^{-1}$ no G2 (45 $\mu g.kg^{-1}$), 62 $\mu g.kg^{-1}$ no G3 (90 $\mu g.kg^{-1}$) e 180 $\mu g.kg^{-1}$ no G4 (180 $\mu g.kg^{-1}$), diferindo em partes dos níveis calculados para cada uma das rações experimentais. Essas variações são aceitáveis devido a possíveis diferenças nos processos de homogeneização e amostragem das rações.

Nas análises histológicas dos órgãos coletados, não foram encontradas alterações significativas ($p>0,05$) entre os grupos expostos à AFB_1 (G2, G3 e G4) quando comparados com o grupo controle (G1).

As principais lesões observadas no fígado dos animais foram: congestão, cristais, degeneração hepática, edema, esteatose, hepatócitos eosinofílicos, infiltrado inflamatório e necrose tecidual, conforme Tabelas 01, 02 e 03.

No tecido branquial, foram observadas alterações como: aneurismas, congestão vascular, degeneração celular, edema, fusão completa e hiperplasia lamelar, lamelas distorcidas e necrose (Tabelas 04, 05 e 06).

As Tabelas 07, 08, 09 mostram as principais alterações encontradas no tecido renal, como: aplasia hematopoiética, degeneração, necrose, edema e

vacuolização tubular, hiperplasia e degeneração glomerular, edema intersticial, inflamação e hemorragia.

As Figuras 01, 02 e 03 ilustram algumas alterações histológicas encontradas nos tecido hepático, branquial e renal, respectivamente, observados nas amostras de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a AFB_1 via ração, durante 56 dias consecutivos.

Tabela 01. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido hepático de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 28 dias consecutivos.

Alteração	Dia +28																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Congestão	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Cristais	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Hepática	33,34[a]	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Esteatose	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hepatócitos Eosinofílicos	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Infiltrado Inflamatório	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]
Necrose Tecidual	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]

E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 02. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido hepático de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 42 dias consecutivos.

Alteração	Dia +42																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Congestão	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Cristais	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Hepática	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema	50,01[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Esteatose	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hepatócitos Eosinofílicos	50,01[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Infiltrado Inflamatório	50,01[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]
Necrose Tecidual	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]

E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 03. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido hepático de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 56 dias consecutivos.

Alteração	Dia +56																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Congestão	16,67[a]	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]
Cristais	50,01[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]
Degeneração Hepática	16,67[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	50,01[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Esteatose	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hepatócitos Eosinofílicos	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]
Infiltrado Inflamatório	16,67[a]	16,67[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Necrose Tecidual	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]

E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 04. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido branquial de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 28 dias consecutivos.

Alteração	Dia +28																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Aneurismas	50,01[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Congestão Vascular	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Celular	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema de Lamela	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]
Fusão de Lamelas	83,35[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	16,67[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hiperplasia de Lamela	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]
Lamelas Distorcidas	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	33,34[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]
Necrose	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]

E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 05. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido branquial de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 42 dias consecutivos.

Alteração	Dia +42																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	
Aneurismas	50,01[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67 [a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]
Congestão Vascular	16,67[a]	16,67[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Celular	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema de Lamela	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	83,35[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Fusão de Lamelas	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	50,01[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]
Hiperplasia de Lamela	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	33.34[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Lamelas Distorcidas	00,00[a]	16,67[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]
Necrose	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]

E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 06. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido branquial de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 56 dias consecutivos.

Alteração	Dia +56																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Aneurismas	50,01ª	00,00ª	33,34ª	16,67ª	00,00ª	50,01ª	16,67ª	33,34ª	00,00ª	00,00ª	33,34ª	16,67ª	33,34ª	00,00ª	16,67ª	16,67ª	16,67ª	50,01ª	16,67ª	00,00ª
Congestão Vascular	16,67ª	00,00ª	50,01ª	33,34ª	00,00ª	16,67ª	33,34ª	33,34ª	16,67ª	00,00ª	16,67ª	33,34ª	33,34ª	00,00ª	16,67ª	16,67ª	33,34ª	16,67ª	33,34ª	00,00ª
Degeneração Celular	16,67ª	50,01ª	33,34ª	00,00ª	00,00ª	50,01ª	00,00ª	50,01ª	00,00ª	00,00ª	33,34ª	33,34ª	00,00ª	33,34ª	00,00ª	66,68ª	00,00ª	16,67ª	16,67ª	00,00ª
Edema de Lamela	66,68ª	00,00ª	33,34ª	00,00ª	00,00ª	33,34ª	16,67ª	33,24ª	16,67ª	00,00ª	16,67ª	66,68ª	16,67ª	00,00ª	00,00ª	16,67ª	33,34ª	16,67ª	33,34ª	00,00ª
Fusão de Lamelas	50,01ª	33,34ª	16,67ª	00,00ª	00,00ª	66,68ª	33,34ª	00,00ª	00,00ª	00,00ª	66,68ª	16,67ª	16,67ª	00,00ª	00,00ª	66,68ª	16,67ª	16,67ª	00,00ª	00,00ª
Hiperplasia de Lamela	00,00ª	16,67ª	50,01ª	33,34ª	00,00ª	16,67ª	33,34ª	33,34ª	16,67ª	00,00ª	00,00ª	33,34ª	50,01ª	00,00ª	16,67ª	33,34ª	16,67ª	33,34ª	16,67ª	00,00ª
Lamelas Distorcidas	16,67ª	33,34ª	33,34ª	00,00ª	16,67ª	00,00ª	00,00ª	66,68ª	16,67ª	16,67ª	16,67ª	16,67ª	16,67ª	50,01ª	00,00ª	00,00ª	66,68ª	16,67ª	16,67ª	00,00ª
Necrose	100,00ª	00,00ª	00,00ª	00,00ª	00,00ª	66,68ª	33,34ª	00,00ª	00,00ª	00,00ª	66,68ª	33,34ª	00,00ª	00,00ª	00,00ª	83,35ª	16,67ª	00,00ª	00,00ª	00,00ª

E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 07. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido renal de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 28 dias consecutivos.

Alteração	Dia +28																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Aplasia Hematopoiética	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Glomerular	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	50,01[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	100,00 [a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,32[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Tubular	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema Intersticial	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema Tubular	00,00[a]	16,67[a]	83,35[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hemorragia Renal	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hiperplasia Glomerular	83,35[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Inflamação Renal	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Necrose Tubular	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Vacuolização Tubular	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]

E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 08. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido renal de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 42 dias consecutivos.

Alteração	Dia +42																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Aplasia Hematopoiética	50,01[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Glomerular	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]
Degeneração Tubular	16,67[a]	33,34[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]
Edema Intersticial	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Edema Tubular	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]
Hemorragia Renal	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	50,01[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hiperplasia Glomerular	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Inflamação Renal	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]
Necrose Tubular	50,01[a]	33,34[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]
Vacuolização Tubular	33,34[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	33,34[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]

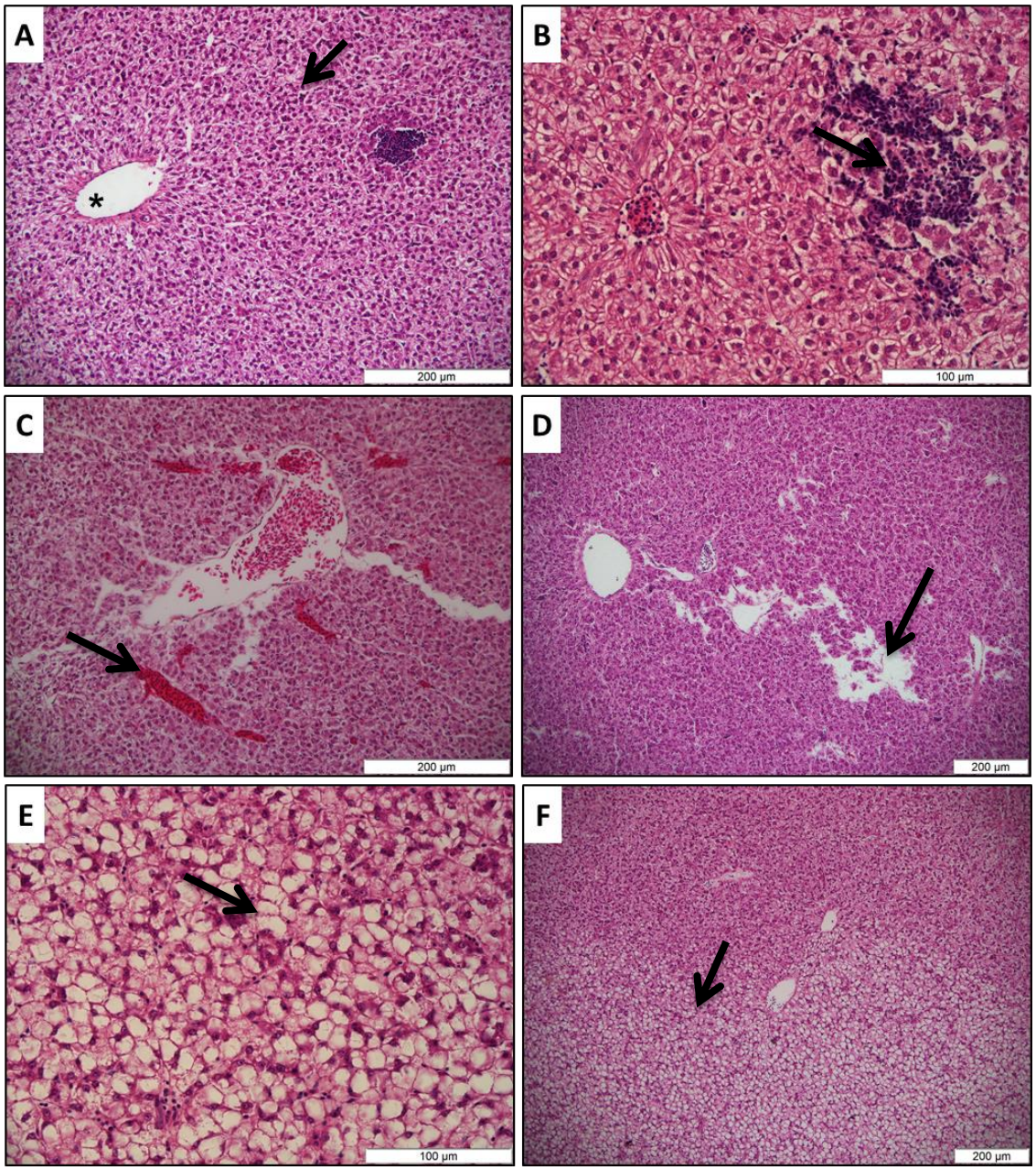
E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 09. Porcentagem dos diferentes escores das alterações encontradas no tecido renal de jundiás (*Rhamdia quelen*) dos G1, G2, G3 e G4, após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 56 dias consecutivos.

Alteração	Dia +56																			
	G1					G2					G3					G4				
	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4	E0	E1	E2	E3	E4
Aplasia Hematopoiética	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Glomerular	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Degeneração Tubular	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	00,00[a]	16,67[a]	33,34[a]	00,00[a]	66,68[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]
Edema Intersticial	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]
Edema Tubular	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	16,67[a]	33,34[a]	16,67[a]	16,67[a]	16,67[a]	66,68[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]
Hemorragia Renal	16,67[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	83,35[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	00,00[a]	33,34[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Hiperplasia Glomerular	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	33,34[a]	33,34[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]
Inflamação Renal	83,35[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Necrose Tubular	66,68[a]	16,67[a]	00,00[a]	16,67[a]	00,00[a]	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	66,68[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]
Vacuolização Tubular	66,68[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	50,01[a]	33,34[a]	00,00[a]	00,00[a]	16,67[a]	50,01[a]	16,67[a]	16,67[a]	16,67[a]	00,00[a]	100,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]	00,00[a]

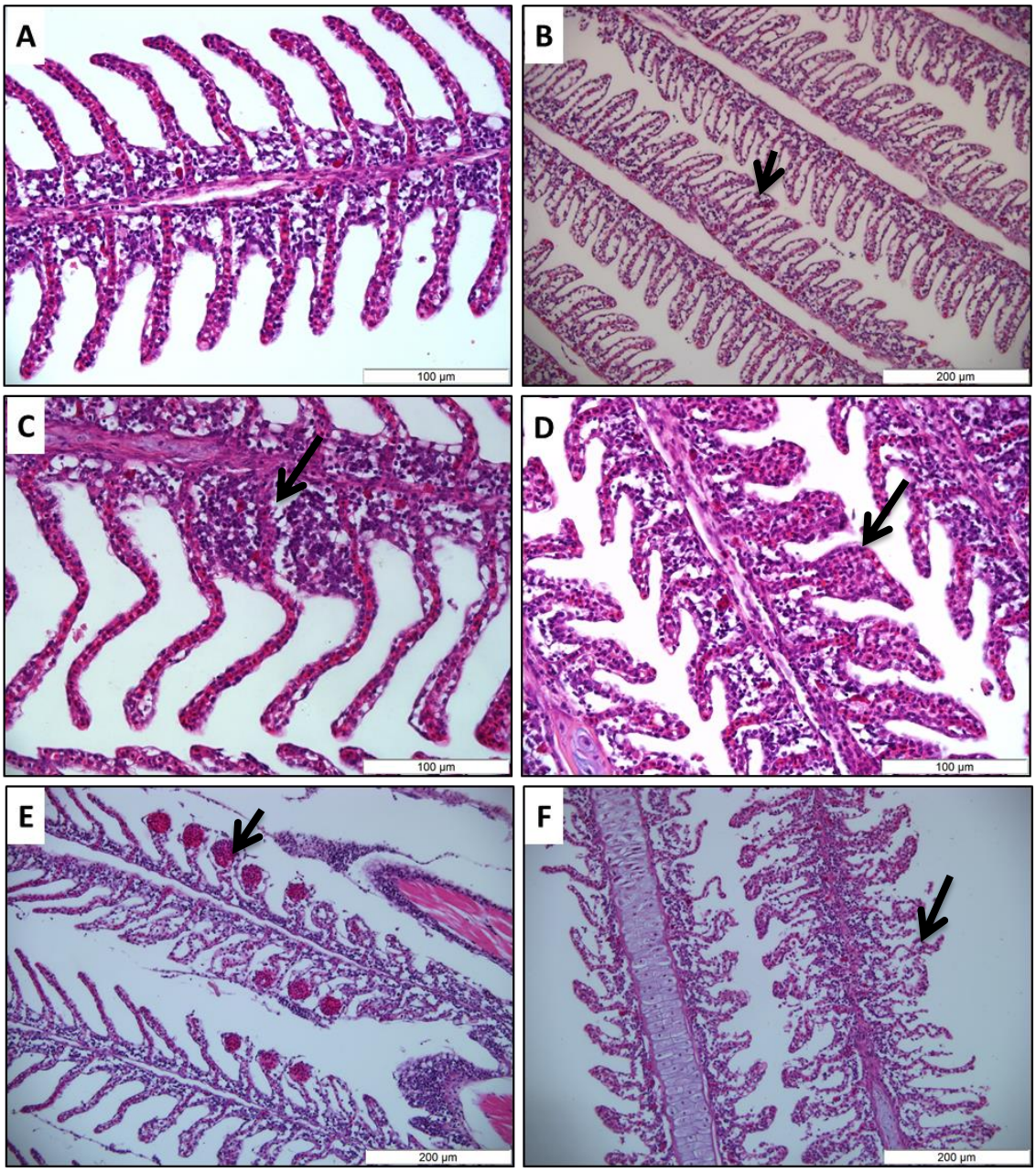
E: escore de lesão; 0 à 4: gravidade da lesão; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.
Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$) e letras iguais não demonstram diferença significativa ($p>0,05$).

Figura 01. Alterações gerais observadas no tecido hepático dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4), após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 56 dias consecutivo – Coloração HE.



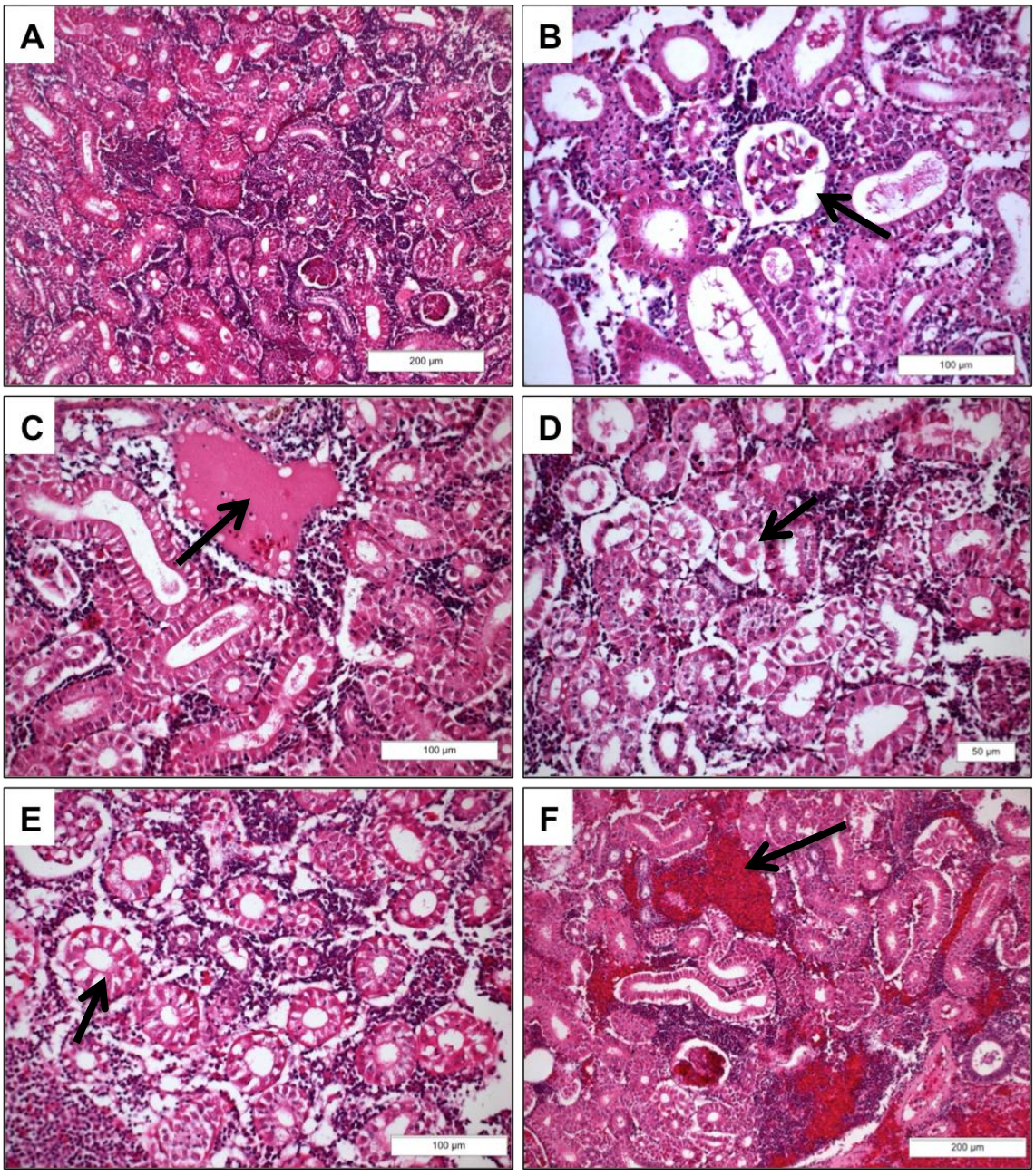
Nota: (A) Tecido hepático normal, evidenciando o arranjo dos cordões hepáticos (seta) em um jundiá (*Rhamdia quelen*) do grupo controle e um vaso sanguíneo de elevado calibre [*]; (B) Infiltrado inflamatório (seta); (C) Congestão vascular (seta); (D) Necrose (seta); (E) Degeneração celular; (F) Degeneração celular (seta).

Figura 02. Alterações gerais observadas no tecido branquial dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4), após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 56 dias consecutivo – Coloração HE.



Nota: (A) Tecido branquial normal; (B) Edema lamelar (seta); (C) Fusão lamelar (seta); (D) Hiperplasia das células basais (seta); (E) Aneurisma (seta); (F) Desestruturação lamelar (seta).

Figura 03. Alterações gerais observadas no tecido renal dos jundiás (*Rhamdia quelen*) dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4), após a ingestão de ração contaminada com aflatoxina B_1, durante 56 dias consecutivo – Coloração HE.

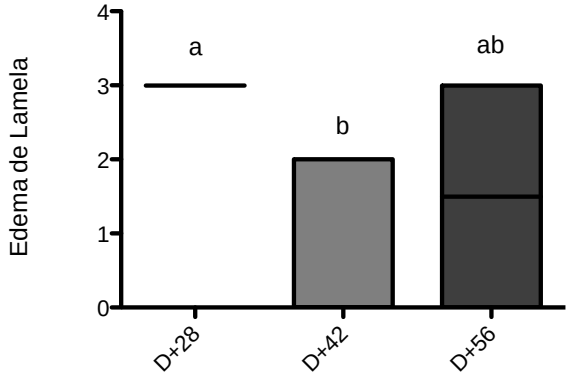


Nota: (A) Tecido renal normal; (B) Degeneração glomerular (seta); (C) Edema intersticial (seta); (D) Degeneração tubular (seta); (E) Vacuolização tubular (seta); (F) Hemorragia (seta).

Quando se avaliou um mesmo grupo (G1, G2, G3 e G4) nos diferentes momentos de exposição à AFB_1 (+28, +42 e +56), houve diferença significativa ($p<0,05$) nos seguintes grupos:

O G2 apresentou edema lamelar maior ($p=0,0056$) no dia +28 quando comparado com o dia +42 (Figura 04), as medianas foram 3,00 e 0,00, respectivamente; maior fusão lamelar também foi observada ($p=0,0154$) quando comparado o dia +28 com o dia +42 (Figura 05), as medianas foram 2,00 e 0,00, respectivamente.

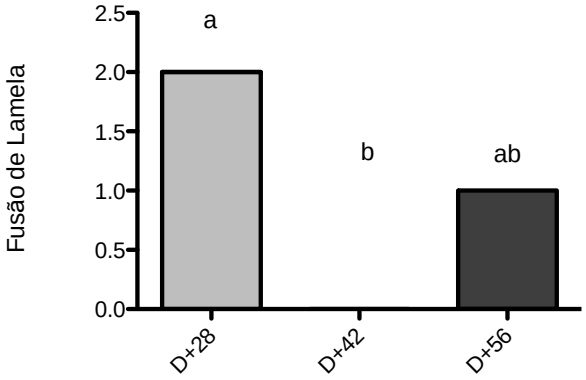
Figura 04. Edema lamelar nas brânquias em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo 37 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, por 56 dias consecutivos.



As linhas dentro dos blocos representam as medianas.

Letras diferentes $p<0,05$;
Letras iguais $p>0,05$.

Figura 05. Fusão lamelar nas brânquias em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo 37 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, por 56 dias consecutivos.

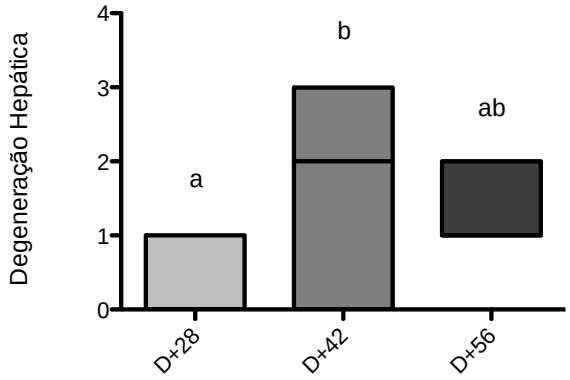


As linhas dentro dos blocos representam as medianas.

Letras diferentes $p<0,05$;
Letras iguais $p>0,05$.

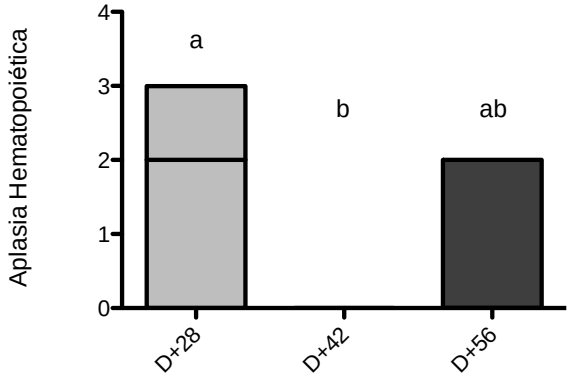
Além disso, os fígados dos animais do G2 apresentaram degeneração hepática maior (p=0,0252) no dia +42 quando comparado com o dia +28 (Figura 06), as medianas foram de 2,00 e 0,00, respectivamente; uma redução na aplasia hematopoiética também foi observado (p=0,0075), quando comparado o dia +42 com o dia +28 (Figura 07), as medianas foram de 0,00 e 2,00, respectivamente.

Figura 06. Degeneração hepática em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo 37 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, por 56 dias consecutivos.



As linhas dentro dos blocos representam as medianas.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

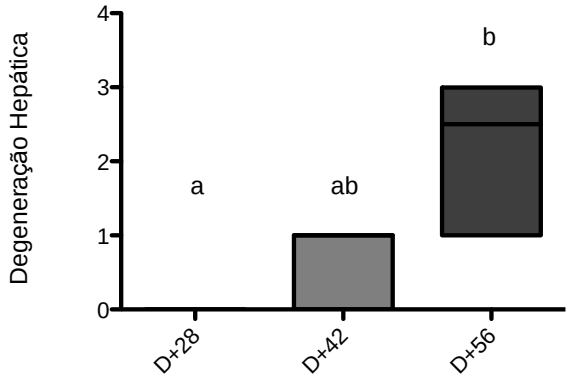
Figura 07. Aplasia hematopoiética em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo 37 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, por 56 dias consecutivos.



As linhas dentro dos blocos representam as medianas.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

No G3 os animais apresentaram maior degeneração hepática (p=0,0026) no dia +56 quando comparado com o dia +28 (Figura 08), as medianas foram de 2,50 e 0,00, respectivamente.

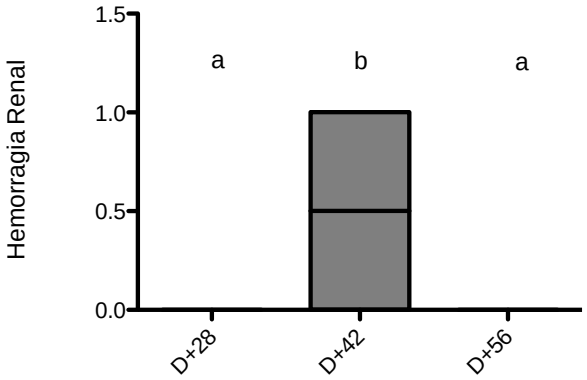
Figura 08. Degeneração hepática em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo 62 µg.kg^{-1} de AFB_1, por 56 dias consecutivos.



As linhas dentro dos blocos representam as medianas.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Os animais do G4 apresentaram hemorragia renal maior (p=0,0334) quando comparado o dia +42 com os dias +28 e +56 (Figura 09), as medianas foram de 0,50, 0,00 e 0,00, respectivamente.

Figura 09. Hemorragia renal em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo 180 µg.kg^{-1} de AFB_1, por 56 dias consecutivos.



As linhas dentro dos blocos representam as medianas.
Letras diferentes p<0,05;
Letras iguais p>0,05.

Nos demais parâmetros branquiais (aneurismas, congestão vascular, degeneração celular, hiperplasia lamelar, lamelas distorcidas, necrose e vacuolização), hepáticos (congestão, cristais, edema, esteatose, glicogênio aumentado e/ou diminuído, hepatócitos eosinofílicos, infiltrado inflamatório, necrose tecidual e núcleos picnóticos) e renais (degeneração, necrose, edema e vacuolização tubular, hiperplasia e degeneração glomerular, edema intersticial e inflamação) não foram evidenciadas diferenças significativas ($p>0,05$) dentro de um mesmo grupo (01, 02, 03 e 04) nos diferentes momentos avaliados (+28, +42 e +56).

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, os jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a diferentes concentrações de AFB_1 durante 56 dias apresentaram lesões histológicas nas amostras de brânquias, fígado e rins analisadas, porém essas alterações não foram significativas ($p>0,05$) quando comparados os grupos.

As brânquias representam importante porta de entrada para patógenos aos organismos dos peixes, já que apenas uma fina camada de muco e um epitélio simples separam seu sistema circulatório do ambiente externo (Bols et al., 2001). Substâncias tóxicas podem afetar as células da mucosas da superfície branquial, gerando uma produção exacerbada de muco, o qual tende a se tornar mais espesso (Lichtenfels et al., 1996), além de tornar a superfície branquial mais susceptível ao parasitismo e gerar um influxo de leucócitos ao tecido branquial.

Lesões estruturais e morte celular detectáveis em analises histológicas e ultraestruturais das brânquias após a exposição dos peixes a praguicidas são relatadas frequentemente em estudos de toxicologia aquática, entre elas: elevação do epitélio branquial, necrose, hiperplasia, hipertrofia e ruptura tecidual (Bols et al., 2001). As alterações morfológicas das brânquias afetadas decorrem do colapso de células pilares e quebra da integridade vascular, o que gera extravasamento sanguíneo e consequente espessamento do epitélio lamelar (Annabi et al., 2011), em uma tentativa de afastar o xenobiótico da corrente sanguínea.

Annabi et al. (2011) relatam desorganização de células epiteliais branquiais, congestão, hipertrofia, hiperplasia, telangiectasia e fusão de

lamelas secundárias, além de edema no tecido branquial de peixe-mosquito (*Gambusia affinis*) exposto cronicamente a metais pesados. Fusão de lamelas secundárias também foram encontradas por Pereira (2009) em amostras provenientes curimbatá (*Prochilodus lineatus*) expostas à agua com diferentes contaminantes.

Nas avaliações de tecido branquial não foram evidenciadas alterações significativas ($p>0,05$), nas lesões avaliadas (aneurismas, hiperplasia e fusão lamelar) quando comparados os grupos expostos a AFB_1 com o grupo controle, concordando assim com Ghisi (2010) que em ensaio de toxicidade crônica com fipronil utilizando a mesma espécie, não observaram diferença significativa ($p>0,05$) no aparecimento das mesmas lesões branquiais entre os grupos tratados e o grupo controle.

Em peixes teleósteos, o rim posterior é responsável pela excreção e manutenção da homeostasia dos fluidos corporais, produzindo urina como via de excreção de metabólitos de xenobióticos (Pamplona, 2009). Tendo em vista que um grande volume sanguíneo flui através do rins, lesões encontradas nesse órgão podem estar relacionadas à possíveis intoxicações, atuando como indicadores de contaminação ambiental (Silva & Martinez, 2007).

Alterações descritas comumente no rim caudal de peixes expostos a praguicidas são degenerações tubulares e glomerulares, como dilatação dos vasos sanguíneos glomerulares, aumento ou redução do espaço da cápsula de bowman e necrose. Pamplona et al. (2011) e Annabi et al. (2011) relatam estas alterações características de exposição a xenobióticos (dipirona e cádmio, respectivamente) em estudos de toxicidade aguda com peixes, além de presença de clusters e vacuolização celular em túbulos proximais e distais, distorção e aumento do espaço da cápsula de bowman e necrose.

Um aspecto da biologia dos macrófagos a ser considerada nos estudos ecotoxicológicos é sua agregação. Nos agregados os macrófagos contêm pigmentos como a hemosiderina, lipofuscina e melanina. Esses acúmulo focais de macrófagos pigmentados são conhecidos como centros de melanomacrófagos (CMM) e são vistos comumente no baço, rins e fígado dos peixes. CMMs têm diversas funções, incluindo papéis pouco elucidados na imunidade inata e adquirida, mas que podem estar relacionados ao sequestro, destruição e detoxificação de substâncias exógenas, variando em intensidade

de acordo com a substância tóxica em questão. Apesar da maior tendência ao aumento dos CMMs após exposição a substâncias tóxicas, durante essas intoxicações há uma maior quantidade de debris celulares, o que pode afetar a capacidade dos macrófagos de procurar, fagocitar e digerir o material endógeno (Annabi et al., 2011).

No presente estudo não foram relatadas alterações significativas ($p>0,05$) no tecido renal dos peixes expostos a AFB_1 quando comparado com o grupo controle, o que se assemelha aos resultados encontrados por Tuan et al. (2002), onde eles avaliaram rins de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a 250 e 2.500 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 durante um período de 8 semanas.

O processo inflamatório é formado por um complexo grupo de eventos moleculares e celulares que têm a finalidade de limpar o tecido danificado, facilitar o processo de reparação e proteger o hospedeiro da invasão de diferentes tipos de patógenos. Envolve reações de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação da coagulação e infiltração de células fagocíticas no tecido lesado. Substâncias tóxicas frequentemente desencadeiam um processo inflamatório através da irritação e do dano tecidual, mais frequente quando em concentrações elevadas e têm a capacidade de modular a inflamação iniciada por outros agentes.

A associação entre intoxicação e lesões externas profundas, algumas atingindo a cavidade celomática foram relatadas por Munkittrick (1992), sugerindo que substâncias tóxicas podem inibir a resposta inflamatória e reduzir a cicatrização, aumentando o número de peixes lesionados. Neste estudo, foi possível observar degeneração de nadadeiras em alguns animais, o que pode estar associado à infecções bacterianas secundárias devido à diminuição da imunidade gerada pela AFB_1. Substâncias ecotóxicas causam alterações no muco produzido pelas células caliciformes da pele dos peixes, tornando-o uma barreira menos eficiente e facilitando a entrada de microorganismos patogênicos. O aumento da produção de muco pode ser favorável à instalação de algumas bactérias que usam o carbono como fonte de energia, sendo o muco rico em glicoproteínas (Bordas et al., 1996).

Substâncias tóxicas podem interferir na capacidade do fígado de ajustar uma resposta inflamatória aguda, já que o este é um tecido de atuação e acúmulo de muitos xenobióticos, podendo afetar os hepatócitos que são

amplamente responsáveis pela produção de proteínas de fase aguda (Bols et al., 2001). Para Cattaneo (2009), alterações como vacuolização de hepatócitos, depleção de oxigênio, inflamação, alteração morfológica de sinusóides e neoplasmas podem ser justificados como respostas ao estresse ambiental por toxinas.

No presente estudo foi observado no tecido hepático dos animais degeneração hepática, infiltrado inflamatório, hepatócitos eosinofílicos, esteatose e pinocitose, semelhantes ao encontrado por Mahfouz & Sherif (2015), que ao analisarem fígados de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo 20 e 100 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, por um período de 12 semanas (84 dias), mostraram que nas dietas com 20 $\mu g.kg^{-1}$ foram encontrados arranjos irregulares dos hepatócitos, leve vacuolização hepatocelular e picnose com moderada esteatose, já nas dietas com 100 $\mu g.kg^{-1}$, após 6 semanas, foram encontradas alterações evidentes de esteatose, e após 12 semanas houve vacuolização e perda da estrutura celular hepática juntamente com picnose, porém sem diferença significativa ($p>0,05$).

Huang et al. (2011; 2014), ao avaliarem tecido hepático de carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*) expostas a níveis de AFB_1 variando de 10 à 2.000 $\mu g.kg^{-1}$, por períodos de 12 e 24 semanas, não observaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos. No grupo controle, os hepatócitos e os núcleos estavam uniformes em tamanho e forma; também haviam vacúolos citoplasmáticos proeminentes presentes na maioria dos hepatócitos. Todos os peixes alimentados com AFB_1 (20 a 2.000 $\mu g.kg^{-1}$) também mostraram vacuolização hepatocelular similar.

Raghavan et al. (2011) relataram que a contaminação por AFB_1 pode levar à presença de hepatócitos basófilos com núcleos hipertróficos, hipercromáticos e pleomórficos, vacúolos citoplasmáticos, presença de células inflamatórias, necrose focal de hepatócitos, extensa hiperplasia biliar e ocasionalmente grandes hepatócitos multinucleados, que indicam uma progressão em direção ao hepatoma ou carcinoma hepatocelular. No presente trabalho, não foram encontradas estas alterações.

Deng et al. (2010) relataram que os fígados de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com 638 e 793 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 na dieta foram infiltrados por muitas células inflamatórias e materiais eosinofílicos; trutas

arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com uma ração contendo uma concentração de 0,5 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, durante 6 meses, apresentaram tumores hepáticos (Halver, 1969).

Os resultados histológicos do presente estudo coincidem com as respostas fisiológicas dos jundiás (*Rhamdia quelen*), confirmando que o *Rhamdia quelen* é uma espécie mais resistente frente a exposição aos xenobióticos, podendo ser menos susceptível a AFB_1, mesmo com a ocorrência de necrose hepática e função hepática desorganizada. Santacroce et al. (2008) sugeriram que embora a AFB_1 seja mal oxidada por microssomas em bagres do canal (*Ictalurus punctatus*), ela é rapidamente convertida em aflatoxicol, permitindo uma rápida eliminação de AFB_1 livre, explicando assim a resistência desses peixes aos efeitos tóxicos da AFB_1.

4.5 CONCLUSÃO

O fornecimento de diferentes níveis (37, 62 e 180 $\mu g.kg^{-1}$) de AFB_1 para jundiás (*Rhamdia quelen*) pelo período de tempo utilizado no presente estudo, não causa alterações específicas e significativas das estruturas teciduais em fígado, rins e brânquias, as quais possam ser detectadas através de microscopia óptica convencional, uma vez que as alterações histopatológicas foram encontradas em todos os grupos, não permitindo assim o correto diagnóstico dessa aflatoxicose.

4.6 REFERÊNCIAS

Annabi, A, Messaoudi I, Kerkeni A, Said KH. Cadmium accumulation and histological lesion in mosquitofish (*Gambusia affinis*) tissues following acute and chronic exposure. International Journal of Environmental Research. 2011; 5: 745-756.

Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual techniques for normal and pathological histology. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1976.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews. 2003; 16: 497-516.

Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunology. 2001; 25: 853-873.

Bordas MA, Balebona MC, Zorrilla I, Borrego JJ, Moriñigo MA. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic Vibrio strains to skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata L.*). Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62: 3650-3654.

Brasil, 1988. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, de 09/11/88. Seção I, p. 21968.

Cattaneo R. Parâmetros metabólicos e histológicos de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a formulação comercial do herbicida 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) (Dissertação de Mestrado). Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria; 2009.

Coldebella I, Radünz Neto J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Ciência Rural. 2002; 32: 499-503.

Coulombe RA. Aflatoxins. In: Sharma RP, Salunkhe DK, editores. Mycotoxins and phytoalexins. Boca Raton: CRC; 1991. P.103-143.

Deng SX, Tian LX, Liu FJ, Jin SJ, Liang GY, Yang HJ, Du ZY, Liu YJ. Toxic effects and residue of aflatoxin B_1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) during long-term dietary exposure. Aquaculture. 2010; 307: 233-240.

Ferreira H, Pittner E, Sanches HF, Monteiro MC. Aflatoxinas: Um risco à saúde animal. Ambiência. 2006; 2: 113-127.

Ghisi NC. Avaliação genotóxica em *Rhamdia quelen* após contaminação sub-crônica com fipronil (Dissertação de Mestrado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2010.

Halver JE. Aflatoxicosis and trout hepatoma. In: Goldblatt LA, editor. Aflatoxin scientific background, control, and implications. New York: Academic Press; 1969. P. 265-306.

Hendricks JD. Chemical carcinogenesis in fish. In: Weber LJ, editor. Aquatic toxicology. New York: Raven Press; 1982. P. 149-211.

Huang Y, Han D, Xiao X, Zhu X, Yang Y, Jin J, Chen Y, Xie S. Effect of dietary aflatoxin B_1 on growth, fecundity and tissue accumulation in gibel carp during the stage of gonad development. Aquaculture. 2014; 428-429: 236-242.

Huang Y, Han D, Zhu XM, Yang YX, Jin JY, Chen YF, Xie SQ. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B_1. Aquaculture. 2011; 319: 89-97.

Jantrarotai W, Lovell RT. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B_1 to channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health. 1990; 2: 248-254.

Klich MA. *Aspergillus flavus*: The major producer of a aflatoxin. Molecular Plant Pathology. 2007; 8: 713-722.

Lazicka K, Orzechovwski S. The characteristics of the chosen mycotoxins and their toxic influence on the human and animal metabolism. Natural Science. 2010; 2: 544-550.

Leeson S, Diaz GJ, Summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph: University Books; 1995.

Lichtenfels AJFC, Lorenzi-Filho G, Tigre E, Saldiva PHN. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. Journal of Comparative Pathology. 1996; 115: 47-60.

Lopes PRS, Radünz Neto J, Mallmann CA, Lazzari R, Pedron FA, Veiverberg CA. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2005; 40: 1029-1034.

Luna LG. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of 100impão100100y. 3ª ed. New York: McGraw Hill; 1968.

Mahfouz ME, Sherif AH. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. The Journal of Basic & Applied Zoology. 2015; 71: 48-59.

Moss MO. Recent studies of mycotoxins. Journal of Applied Microbiology Symposium. 1998; 84: 62S-76S.

Munkittrick KR. A review and evaluation of study design considerations for site-specifically assessing the health of fish populations. Journal of Aquatic Ecosystem Health 1992; 1: 283-293.

Pamplona JH, Oba ET, Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, Ribeiro CAO, Zampronio AR, Assis HCS. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011; 74: 342–334.

Pamplona JH. Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe Rhamdia quelen: estudo bioquímico, hematológico e histopatológico (Dissertação de Mestrado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2009.

Pereira BF. Histologia comparada de brânquias, fígado e sangue em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos a águas contaminadas (Dissertação de Mestrado). Rio Claro, SP: Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho; 2009.

Pinheiro REE, Rodrigues AMD, Ribeiro MN, Cavalcante DH, Pereyra CM, Muratori MCS. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. Nutri Time. 2015; 12: 4268-4279.

Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. 3ª ed. New York: Springer; 2009.

Plakas SM, Said KR, El Stehly GR, Gingerich WH, E-Allen JL. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Canadian Journal of Fishery and Aquatic Sciences. 1996; 1427-1433.

Raghavan PR, Zhu X, Lei W, Han D, Yang Y, Xie S. Low levels of aflatoxin B_1 could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♀ x *A. baerii* ♂. Aquaculture Nutrition. 2001; 13: 39-47.

Sabino M, Lamardo LCA, Inomat G. Ocorrência de aflatoxina B_1 em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 à 1987. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 1988; 48: 81-85.

Santacroce MP, Conversano MC, Casalino E, Lai O, Zizzadoro C, Centoducati G, Crescenzo G. Aflatoxins in aquatic species: Metabolism, toxicity and perspectives. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2008; 18: 99-130.

Silva AG, Martinez CBR. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2007; 23: 85.

Sinnhuber RO, Wales JH, Hendricks JD, Putnam GB, Nixon JE, Pawlowski NE. Trout biossay of mycotoxins. In: Rodricks JD, editor. Mycotoxins in human and animal health. Chicago: Pathotox; 1997. P. 731-744.

Tuan NA, Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB, Rottinghaus GE. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B_1. Aquaculture. 2002; 212: 311-319.

CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE AFLATOXINA B_1 EM MÚSCULO, ORGÃOS, PLASMA E NA ÁGUA DE *Rhamdia quelen* (JUNDIÁS)

Chromatographic Determination of Aflatoxin B_1 in Muscle, Organs, Plasma and Water of Rhamdia quelen (Jundiás)

ANATER A.[1], IACHINSKI E.A.[2], LUCIANO, F.B.[3], MECCA G.[4], FERRER E.G.[5], TOLOSA J.[6], RIBEIRO D.R.[7], PIMPÃO C.T.[8]

[1]Mestranda em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, amanda_anater@hotmail.com;
[2]Graduando em Medicina Veterinária – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, edevaldoia@hotmail.com;
[3]Professor Titular – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, fernando.luciano@pucpr.br;
[4]Professor Titular – Universidade de Valência/Espanha, giuseppe.meca@uv.es;
[5]Professora Titular – Universidade de Valência/Espanha, emilia.ferrer@uv.es;
[7]Doutoranda – Universidade de Valência/Espanha, Médica Veterinária, josefa.tolosa@uv.es;
[7]Mestrando em Ciência Animal – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médico Veterinário, deividrr@hotmail.com;
[8]Professora Titular – Escola de Ciências da Vida/PUCPR, Médica Veterinária, claudia.pimpao@pucpr.br.

RESUMO

Introdução: A presença de aflatoxinas em matérias-primas utilizadas na alimentação animal pode acarretar em resíduos no produto final. A ingestão desses produtos contaminados pelos seres humanos pode oferecer riscos a saúde humana. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi determinar a presença de aflatoxina B_1 (AFB_1) em músculo, órgãos, conteúdo intestinal e plasma e na água de jundiás (*Rhamdia quelen*), alimentados com ração contaminada com AFB_1 durante 56 dias consecutivos. **Método:** Foram utilizados 624 alevinos de jundiás, distribuídos em 4 grupos distintos (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 e G4 – 180 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 na ração), os grupos foram separados aleatoriamente em 24 aquários (n=26 alevinos/aquário) e os peixes alimentados durante 56 dias consecutivos com ração peletizada. Para a quantificação de AFB_1 na água, foram coletadas amostras de 2 mL de cada aquário semanalmente, além do D0. A cada semana, todas amostras de cada grupo foram mescladas, formando uma só amostra por grupo. Ao término do período experimental, foram obtidas 36 amostras de água no total. Para a quantificação de AFB_1 em músculo, órgãos (fígado, rins, brânquias, intestinos e conteúdo intestinal) e plasma, foi realizado um *pool* de 12 animais/grupo nos dias +28, +42 e +56, totalizando 12 amostras ao término do período experimental. As amostras foram analisadas através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). A determinação cromatográfica foi efetuada com coluna de fase reversa Gemini NX C_{18} (150 x 2,0 mm, 5 m). **Resultados:** Não foi detectada presença de AFB_1 em nenhuma das amostras de órgãos, músculos e água analisados. A AFB_1 mostrou-se presente somente nas

amostras de plasma nos grupos G3 e G4. Os níveis encontrados foram de 0,87, 0,61 e 3,79 μg.kg^{-1} de AFB_1 no G3 e de 6,22, 5,81 e 7,08 μg.kg^{-1} de AFB_1 no G4, nos dias +28, +42 e +56, respectivamente. **Conclusão:** AFB_1 é absorvida e distribuída pelo organismo uma vez que é detectada no plasma, porém não há acúmulo visceral nem muscular da mesma. Os diferentes níveis e tempos de consumo não apresentam um comportamento linear e crescente nas quantidades de AFB_1 absorvidas e acumuladas pelo organismo do jundiá.

Palavras chave: Aflatoxicol; Bioacumulação; LC-MS/MS; Micotoxinas; Peixes.

ABSTRACT

Introduction: The presence of aflatoxins in raw materials used in animal feed can result in residues in the final product. The intake of these products contaminated by humans may present a risk to human health. **Objective:** The aim of this study was to investigate the possible accumulation of aflatoxin B_1 (AFB_1) in musculature, organs, instestinal content, plasma and water of jundiá's (*Rhamdia quelen*) fed with AFB_1 contaminated feed for 56 consecutive days. **Methods:** 624 jundiás fingerlings were used. The fish was divided into 4 different groups (G1 – 0; G2 – 45; G3 – 90 and G4 – 180 μg.kg^{-1} of AFB_1 in feed) randomly divided into 24 aquariums (n=26 fingerlings/aquarium) and fed for 56 consecutive days with pelleted feed. For quantification of AFB_1 on water, 2 mL samples were collected of each aquarium weekly, plus D0. Each week, all samples of each group were merged, forming a single sample per group. At the end of the trial period were obtained a total of 36 samples. For quantification of AFB_1 in muscle, organs (liver, kidneys, gills and intestine), intestinal content and plasma, a pool of 12 animals/group was made on days +28, +42 and +56, totaling 12 samples at the end of the trial period. The samples were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). The chromatographic determination was performed with reversed phase column, Gemini NX C_{18} column (150 x 2.0 mm, 5 m). **Results:** The presence of AFB_1 was not detected in the organs, musculature and water analyzed. AFB_1 was present only in plasma samples in G3 and G4. The found levels were 0.87, 0.61, 3.79 and 6.22, 5.81 and 7.08 μg.kg^{-1} of AFB_1 in G3 and G4, respectively, on +28, +42 and +56 days. **Conclusion:** AFB1 was absorbed and distributed throughout the organism since it was detected in plasma, but there is no visceral or muscle accumulation. The different levels and consumption times do not have a linear behavior and increasing the amounts of AFB_1 absorbed and accumulated by jundiá's organism.

Keywords: Aflatoxicol; Bioaccumulation; LC-MS/MS; Mycotoxins; Fish.

5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem grande potencial para a aquicultura, devido as suas condições naturais, clima favorável e pela sua matriz energética a base de hidrelétricas, o que contribui com diversos lagos passíveis de utilização, além da extensa área costeira, vasta extensão territorial e a imensa quantidade de água doce disponível para uso (Rocha et al., 2013).

Sendo a piscicultura um dos principais setores da aquicultura e devido ao uso intenso de rações nessa atividade, torna-se necessário o monitoramento de contaminantes naturais, entre eles as micotoxinas que podem estar presente nas rações para peixes. Tais contaminações podem interferir no desempenho zootécnico e inclusive levar a morte dos animais (Tuan et al., 2002), bem como acarretar danos ao ser humano ao consumir carne de peixe contaminada.

As micotoxinas são metabólitos secundários naturalmente produzidos por fungos que colonizam uma grande variedade de alimentos e rações. Apresentam de modo geral, uma grande estabilidade química, o que permite a sua permanência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (Cruz, 2010).

No entanto, amostras de material orgânico proveniente do solo e também amostras naturais de água podem apresentar-se contaminados por micotoxinas (Schenzel et al., 2010; Wettstein & Bucheli, 2010; Maragos, 2012; Kolpin et al., 2014).

Uma das classes mais importantes dentro das micotoxinas são as aflatoxinas, as quais são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* sp., sendo os seus principais tipos B_1, B_2, G_1 e G_2, e seus produtos de hidroxilação conhecidos como M_1 e M_2 (D'Mello & Macdonald, 1997).

A toxicidade da AFB_1 tem sido associada a baixo crescimento dos animais, à alterações comportamentais, à imunodepressão, a hepatócitos necróticos, a danos reprodutivos e a resíduos de aflatoxinas no fígado e outros tecidos como a musculatura de peixes, com a gravidade dessas alterações dependendo das concentrações de exposição (Sahoo & Mukherjee, 2001; Bintvihok et al., 2002; Farabi et al., 2006; Binder et al., 2007; Deng et al., 2010).

Estudos recentes no continente europeu têm relatado a presença de micotoxinas em rações para peixes (Nácher-Mestre et al., 2013; Pietsch et al.,

2013; Tolosa et al., 2014). O contato entre os alimentos contaminados e o habitat em que estes animais vivem pode levar à intoxicação dos peixes e à contaminação da água (Tolosa et al., 2016).

Como ocorre em amostras de água, estudos em plasma, órgãos e músculos analisam uma única micotoxina ou um grupo reduzido delas e também seus metabólitos (Ivanova et al., 2014; Saengtienchai et al., 2014; Winkler et al., 2014). Entretanto, as análises de resíduos nesse tipo de material são realizadas principalmente em animais terrestres (Corcuera et al., 2011; Devreese et al., 2012.), sendo que os trabalhos com peixes são escassos ou mesmo inexistentes.

O objetivo deste estudo foi analisar cromatograficamente músculo, órgãos e plasma de jundiás expostos à AFB_1 via ração, assim como a água em que estes animais permaneceram, em busca de possíveis resíduos dessa micotoxina.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura (LAPEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), com duração de 56 dias. As análises dos ingredientes e das concentrações de AFB_1 na ração foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da PUCPR e no Laboratório de Toxicologia Alimentar da Universidade de Valência/Espanha, respectivamente.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob protocolo de número 886 – 2ª versão.

624 alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) com 7,44 g ± 2,18 de peso corporal médio, oriundos do LAPEP/PUCPR, foram utilizados para realização deste estudo. Para a divisão dos grupos, os animais foram submetidos a um jejum de 24h, com objetivo de padronizar o peso e evitar regurgitações de alimento. Após o jejum, os animais foram pesados em grupo e alojados em 24 caixas de polipropileno contendo 26 alevinos cada, sendo 6 caixas por grupo experimental, com densidade populacional inicial média de 2,41 $g.L^{-1}$. As caixas foram distribuídas aleatoriamente em 4 bancadas, mantidas em ambiente fechado e controlado (oxigênio dissolvido, salinidade, pH e

temperatura). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, longitudinal e prospectivo.

As 24 caixas de polipropileno com capacidade para 100 L cada, foram abastecidas com 80 L de água em um sistema de circulação aberta e termorregulado. O sistema com capacidade de 1.920 L de água foi abastecido por meio de um reservatório escavado externo. A entrada de água nas unidades experimentais foi mantida em aproximadamente 1,0 $L.minuto^{-1}$, ininterruptamente.

A limpeza das caixas foi realizada a cada dois dias com uso de sifão, retirando-se cerca de 20% do volume de água. Diariamente os animais foram observados para presença de eventuais sinais clínicos, bem como, a verificação de mortalidade e a retirada destes das caixas.

Também foram monitorados diariamente os parâmetros de qualidade da água nas unidades experimentais, como, oxigênio dissolvido, salinidade, pH e temperatura, com auxílio de oxímetro e medidor de pH digitais. A amônia total e o nitrito foram monitorados semanalmente com auxílio de kit colorimétrico.

Os grupos experimentais foram formados com base em 4 diferentes concentrações de aflatoxina B_1 (AFB_1), fornecidas aos animais via ração. Os níveis de AFB_1 e os respectivos grupos foram de 0 (G1), 45 (G2), 90 (G3) e 180 (G4) $\mu g.kg^{-1}$ de ração, respectivamente. No Brasil o limite máximo de Afs permitido em alimentos para animais é de 50 $\mu g.kg^{-1}$ (Brasil, 1988). As concentrações utilizadas neste trabalho objetivaram trabalhar com um grupo abaixo do limite permitido, além de dois outros grupos com duas e quatro vezes a mais do que à concentração inicial de 45 $\mu g.kg^{-1}$.

A AFB_1 purificada foi adquirida da Sigma Chemical Co., USA (AFB_1/A6636), dissolvida em clorofórmio, posteriormente adicionada em óleo de canola, o qual foi utilizado na formulação da ração.

A ração experimental foi formulada de forma a ser isoprotéica e isocalórica, contendo 38,01% de proteína bruta e 3.655 $kcal.kg^{-1}$ de energia digestível, conforme composição descrita por Coldebella & Radünz Neto (2002).

O preparo das rações foi realizado no LAPEP/PUCPR e após sua finalização foram coletadas amostras para quantificação da AFB_1 através de

cromatografia líquida de alta performance, realizadas no Laboratório de Toxicologia Alimentar.

Após o alojamento, os animais passaram por um período de aclimatação de 15 dias. Em seguida, todos os peixes foram mantidos em jejum de 24h, para garantir uma ingestão imediata da ração. No decorrer do experimento, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (9 e 17h) até completa saciedade.

Aos 28, 42 e 56 dias experimentais os peixes foram submetidos a jejum de 3h para coleta de sangue, órgãos, conteúdo intestinal e músculo, após o qual foram capturados aleatoriamente 12 animais por grupo (2 por caixa). Os animais foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína a 2%, após completa sedação foi realizada punção sanguínea da veia caudal, com auxilio de seringas descartáveis contendo EDTA à 3%, obtendo amostras de aproximadamente 0,8 mL por animal.

Logo após coleta de sangue os animais foram eutanasiados através de secção medular, em seguida os órgãos (fígado, rins, brânquias e intestinos), conteúdo intestinal e músculos foram coletados e congelados a 20º C negativos até a realização das análises.

A cada dia de coleta, foi formado um *pool* por tipo de amostra (plasma, órgãos, conteúdo intestinal e músculo) por grupo (n=12), obtendo assim 4 amostras por dia de coleta (uma por grupo), totalizando 12 amostras, utilizadas para determinação de AFB_1.

Para a extração de AFB_1 do plasma foi utilizada uma alíquota de 250 µL da amostra na qual foram adicionados 750 µL de acetonitrila; após centrifugação à 4500 rpm durante 5 minutos, à 4º C foi retirado o sobrenadante e adicionado a ele 0,2g de cloreto de sódio, seguido por uma agitação em vórtex durante 1 minuto; após agitação foram adicionados 475 µL de acetonitrila + 350 µL de acetato de etilo seguido de centrifugação à 4500 rpm durante 5 minutos, à 4º C; novamente, o sobrenadante foi retirado e colocado em um tubo tipo Falcon® de 15 mL; este foi colocado em um evaporador contendo vapor de nitrogênio até completa evaporação do solvente; a amostra foi reconstituída com 250 µL de solução de metanol à 50%, posteriormente filtrada (filtro 0,22 µm) e armazenada em um vial para posterior análise em

cromatógrafo. Todas as extrações que utilizaram plasma foram realizadas em triplicatas.

Para a extração da AFB_1 das amostras de fígado, brânquias, rins, intestino, conteúdo intestinal e músculo, foi utilizada uma alíquota de 5g de cada amostra previamente homogeneizada, na qual foram adicionados 10 mL de solução de ácido fórmico à 2%, seguida de agitação durante 30 minutos em agitador rotativo à 350 rpm; após a etapa inicial foram adicionados 10 mL de acetonitrila com posterior agitação durante 30 minutos em agitador rotativo à 350 rpm; após isto foram adicionados 4g de sulfato de magnésio mais 1g de cloreto de sódio, seguidos por vigorosa agitação manual durante 30 segundos, e posteriormente por centrifugação à 5000 rpm durante 10 minutos à 5º C; após completa centrifugação uma fração de 2 mL da amostra foi transferida para um tubo tipo Falcon® de 15 mL, onde foram acrescentados 0,1g de C_{18} mais 0,3g de cloreto de sódio, essa mistura foi então centrifugada à 5000 rpm durante 10 minutos à 5º C; a amostra então foi filtrada (filtro nylon 0,22 µm) e armazenada em um vial para posterior análise em cromatógrafo.

Para a quantificação de AFB_1 na água, foram coletadas amostras de 2 mL de cada aquário semanalmente, além do D0. A cada semana, todas amostras de cada grupo foram mescladas, formando uma só amostra por grupo. Ao término do período experimental, foram obtidas 36 amostras de água no total.

Para extração de AFB_1 da água, foi utilizada uma alíquota de 5 mL da amostra, na qual foi adicionado 1g de cloreto de sódio, seguido por agitação em vórtex durante 1 minuto; após isto, foram adicionados 900 µL de acetonitrilo e 700 µL de acetato de etilo; que novamente foram agitados em vórtex durante 1 minuto; após centrifugação à 4500 rpm durante 5 minutos, à 4º C; o sobrenadante foi transferido para um tubo tipo Falcon® de 15 mL; e colocado em um evaporador contendo vapor de nitrogênio até completa volatilização do solvente; a amostra foi reconstituída com 250 µL de solução de metanol à 50%, posteriormente filtrada (filtro 0,22 µm) e armazenada em um vial para posterior análise em cromatógrafo.

Todos os solventes (acetonitrila, metanol, clorofórmio e acetato de etilo) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água deionizada (>18 MΩ cm de resistividade) foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA). O formiato de amônia

(HCO_2NH_4, 97%) e ácido fórmico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

Os métodos foram validados de acordo com as regulamentações da União Europeia, decidida através da Comissão 2002/657/CE. As análises de LC-MS/MS-LIT foram conduzidas por um sistema de cromatografia Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), acoplada a um espectrómetro de massa 3200 QTRAP® (AB Sciex, Foster City, CA, EUA), equipado com uma interface turbo de ionização por eletropulverização (ESI). O analisador QTRAP® combina um triplo quadrupolo totalmente funcional e um espectrômetro de massa de armadilha de íons lineares dentro do mesmo instrumento. A separação dos analíticos foi realizada utilizando uma coluna LC-Gemini-NX (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha) (150 mm x 2 mm I.D., tamanho de partícula 3 µm).

A taxa de fluxo foi ajustada para 0,8 $mL.min^{-1}$ e a temperatura do equipamento foi de 40º C, com um eluente de água ligeiramente acidificada com 0,1% de ácido fórmico e formiato de amónio 5 mM (fase móvel A), e eluente contendo metanol, formiato de amónio 5 mM e ácido fórmico a 0,1% (fase móvel B). O gradiente de diluição começou com 0% de solvente B, aumentando para 100% em 10 minutos, diminuindo para 80% em 5 minutos e, finalmente, diminuindo para 70% em 2 minutos. Durante os subsequentes 6 minutos, a coluna foi limpa, reajustado para as condições iniciais e equilibrado durante 7 minutos. O volume das injeções foi de 20 µL.

5.3 RESULTADOS

Durante o período experimental a água utilizada nos aquários apresentou os seguintes parâmetros em valores médios seguidos de desvio padrão: temperatura da água: 27,77 ± 1,55º C, pH: 7,26 ± 0,26, salinidade: 0,19 ± 0,30 ppm, oxigênio dissolvido: 4,35 ± 0,55 $mg.L^{-1}$, amônia tóxica (NH_3): 0,005 ± 0,006 ppm; nitrito (NO_2): 0,191 ± 0,457 ppm.

Após as análises cromatográficas, os níveis de AFB_1 encontrados nas rações experimentais foram de 0 $\mu g.kg^{-1}$ no G1 (controle), 37 $\mu g.kg^{-1}$ no G2 (45 $\mu g.kg^{-1}$), 62 $\mu g.kg^{-1}$ no G3 (90 $\mu g.kg^{-1}$) e 180 $\mu g.kg^{-1}$ no G4 (180 $\mu g.kg^{-1}$), diferindo em partes dos níveis calculados para cada uma das rações

experimentais. Essas variações são aceitáveis devido a possíveis diferenças nos processos de homogeneização e amostragem das rações.

5.3.1 Concentrações de AFB_1 na água:

Não foram detectadas concentrações de AFB_1 na água de todos os grupos (G1, G2, G3 e G4) em nenhum dos dias de amostragem, conforme mostra a Tabela 02.

5.3.2 Concentrações de AFB_1 em órgãos, conteúdo intestinal e músculos:

Não foram detectadas concentrações de AFB_1 em nenhum dos órgãos analisados (fígado, rins brânquias e intestino), conteúdo intestinal e musculatura dos animais de todos os grupos (G1, G2, G3 e G4) em nenhum dos dias de amostragem, conforme mostra a Tabela 02.

5.3.3 Concentrações de AFB_1 em plasma sanguíneo:

Não foram detectadas concentrações de AFB_1 nos plasmas dos animais no grupo G1 e G2. No G3 foram encontrados níveis de 0,87, 0,61 e 3,79 $ng.mL^{-1}$ e no grupo G4 foram detectados níveis de 6,22, 5,81 e 7,08 $ng.mL^{-1}$, nos dias +28, +42 e +56, respectivamente, conforme mostra a Tabela 01.

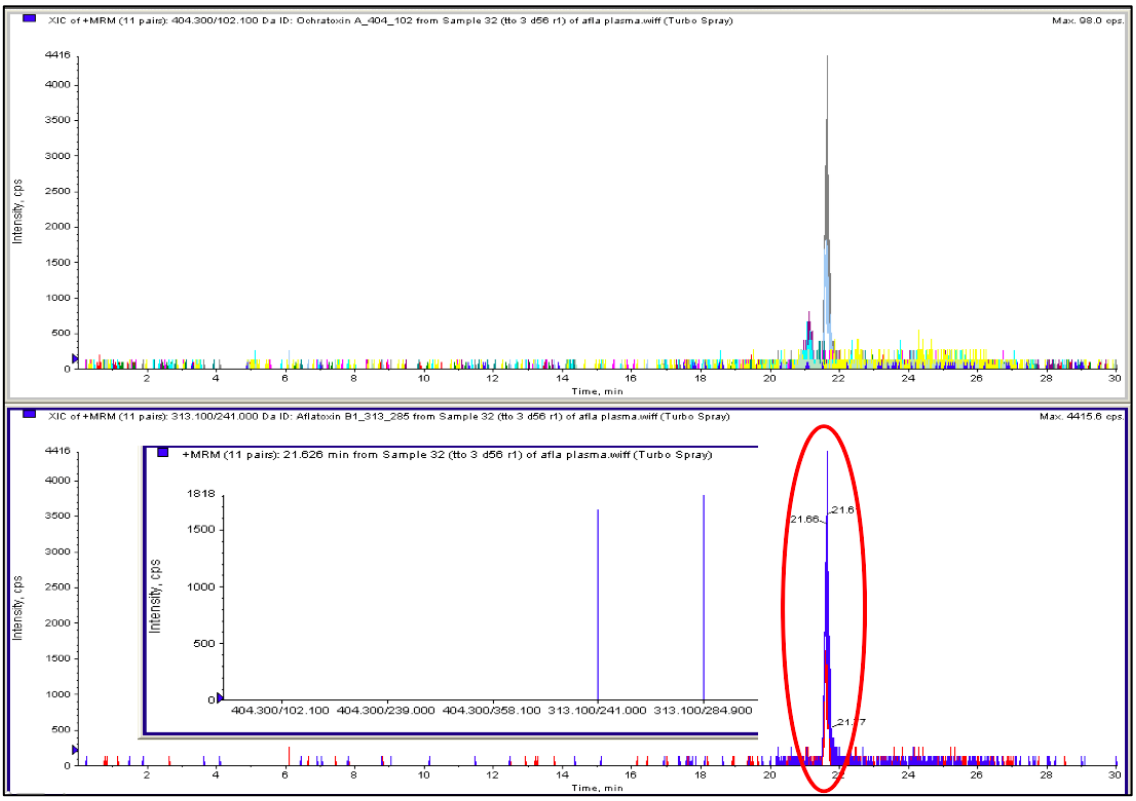
Tabela 01. Deposição de resíduos de aflatoxina B_1 em água de aquário, órgãos, conteúdo intestinal, musculatura e plasma de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo 0, 37, 62 e 180 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, durante um período de 56 dias.

Parâmetro	Dia +28			
	G1	G2	G3	G4
Água	ND	ND	ND	ND
Fígado	ND	ND	ND	ND
Rins	ND	ND	ND	ND
Brânquias	ND	ND	ND	ND
Intestino	ND	ND	ND	ND
Conteúdo Intestinal	ND	ND	ND	ND
Músculo	ND	ND	ND	ND
Plasma Sanguíneo	ND	ND	0,87	6,22
	Dia +42			
	G1	**G2**	**G3**	**G4**
Água	ND	ND	ND	ND
Fígado	ND	ND	ND	ND
Rins	ND	ND	ND	ND
Brânquias	ND	ND	ND	ND
Intestino	ND	ND	ND	ND
Conteúdo Intestinal	ND	ND	ND	ND
Músculo	ND	ND	ND	ND
Plasma Sanguíneo	ND	ND	0,61	5,81
	Dia +56			
	G1	**G2**	**G3**	**G4**
Água	ND	ND	ND	ND
Fígado	ND	ND	ND	ND
Rins	ND	ND	ND	ND
Brânquias	ND	ND	ND	ND
Intestino	ND	ND	ND	ND
Conteúdo Intestinal	ND	ND	ND	ND
Músculo	ND	ND	ND	ND
Plasma Sanguíneo	ND	ND	3,79	7,08

Nota: ND: Não detectado; G1: grupo 01; G2: grupo 02; G3: grupo 03; G4: grupo 04.

A Figura 01 ilustra o cromatograma referente às análises de AFB_1 no plasma dos animais do grupo G3 no dia +56 de exposição.b

Figura 01. Cromatograma do plasma de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos à AFB_1 durante 56 dias consecutivos, através de ração contaminada.



Nota: O pico destacado refere-se ao grupo 03 (67 $\mu g.kg^{-1}$) no dia +56, indicando a concentração de aflatoxina B_1 (3,79 $ng.mL^{-1}$).

5.4 DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar os resíduos de AFB_1 em aves e mamíferos (Cook et al., 1986; Fernández et al., 1997; Bintvihok & Kositcharoenkul, 2006), porém, em peixes, a literatura é escassa.

A deposição de aflatoxinas (AFs) nos peixes é residual e cumulativa, sendo os músculos e o fígado os mais afetados (Plakas et al., 1991). Um estudo comparativo entre trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), realizado por Ngethe et al. (1992), demonstrou que o fígado de trutas acumula menores quantidades de AFs do que o de tilápias, quando expostos às mesmas doses e pelo mesmo período de tempo.

A medida que os peixes vão sendo expostos a um período de recuperação (sem exposição as AFs), o organismo vai se desintoxicando. O fígado é o principal órgão responsável pela desintoxicação, já que as AFs são primeiramente biotransformadas pelo sistema oxidase misto, presente nesse

órgão (Oga, 1996). A detoxificação das AFs ocorre por hidroxilação e permite ser conjugada pelo ácido glicurônico.

Ao ser absorvida, a AFB_1 é imediatamente ligada, de forma reversível, à albumina e também, em menor escala, a outras proteínas. Formas de aflatoxinas ligadas e não-ligadas a proteínas séricas, distribuem-se pelos tecidos, principalmente no fígado (Wyatt, 1991), o que foi evidenciado por Deng et al. (2010), que ao alimentarem tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com concentrações crescentes de AFB_1 via ração durante 20 semanas, demostraram que resíduos de AFB_1 no fígado foram superiores aos encontrados em músculos no mesmo período e dose.

Boonyaratpalin et al. (2001), relataram que os resíduos de AFB_1 podem ser detectados em diferentes tecidos de camarões e a detecção mais elevada foi de 14,2 $\mu g.kg^{-1}$ no músculo, quando estes foram alimentados com rações contendo 100 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 durante um período de 4 semanas. El-Sayed & Khalil (2009), em seus estudos, observaram a presença de 4,25 ± 0,85 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 em músculos comestíveis de robalos (*Dicentrarchus labrax* L.) dessa forma, os seres humanos, via cadeia alimentar, eventualmente, podem ser expostos às toxinas.

Huang et al. (2011), relataram que ao alimentar carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*), durante 12 semanas, com rações contaminadas com AFB_1 em doses menores ou iguais a 20 $\mu g.kg^{-1}$, foram detectados resíduos em concentrações maiores de 5 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 em hepatopâncreas. No entanto, os peixes alimentados com níveis de 1.000 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 apresentaram uma concentração menor que 2,5 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 em músculos comestíveis.

Han et al. (2009), ao estudarem carpas Gibel (*Carassius auratus gibelio*) sugeriram que a ingestão de rações contaminadas com mais do que 3,2 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 poderia resultar em resíduos superiores à 20 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 em hepatopâncreas demostrando assim seu efeito cumulativo ao longo do tempo de ingestão.

Mahfouz & Sherif (2015) relataram que ao alimentar tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante 12 semanas com rações contendo 20 e 100 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1, foram detectados resíduos de 5 e 10 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 em fígado, respectivamente, após 6 semanas de exposição. Na 12ª semana de exposição houve aumento desses resíduos para concentrações de 10 e 15

$\mu g.kg^{-1}$, respectivamente. Resíduos de 5 $\mu g.kg^{-1}$ em músculo foram detectados somente no grupo que recebeu a maior concentração de AFB_1 durante 12 semanas.

Dessa forma, no presente estudo, o tempo de exposição dos jundiás (*Rhamdia quelen*) à AFB_1 pode justificar a não detecção da AFB_1 no músculo dos animais, além da toxicocinética que pode ser diferente nas duas espécies. Uma característica importante que deve ser considerada é a possível capacidade adaptativa dos jundiás (*Rhamdia quelen*) para manutenção da homeostase, como à diminuição do dano oxidativo no tecido cerebral e renal e o aumento da atividade mitocondrial no tecido hepático e branquial (Dolci et al., 2013).

Essas adaptações destacam a capacidade do jundiá (*Rhamdia quelen*) de reduzir a toxicidade e a bioacumulação de um tóxico durante uma exposição crônica (Dolci et al., 2013), podendo assim não ocorrer acumulação de AFB_1 tanto em musculatura como nos órgãos analisados.

Outra possibilidade a ser considerada, é de que o jundiá (*Rhamdia quelen*) apresenta uma capacidade de desintoxicação semelhante ao do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), o qual após cerca de 24 horas da administração oral de AFB_1 apresentou resíduos da mesma somente nos sistemas excretores, principalmente no sistema biliar (Plakas et al. 1991), isso demonstra uma eliminação rápida da AFB_1 dos tecidos, diminuindo a possibilidade de uma bioacumulação nessa espécie.

As AFs presentes na água onde os animais são criados e alimentados podem ser absorvidas e consequentemente acumuladas pelo organismo animal. Assim, a presença das AFs na água deve ser investigada e suas concentrações determinadas para esclarecer a via metabólica que AFB_1 apresenta e também para estimar a concentração dos derivados das AFs que podem contaminar o ambiente em situações de criação intensiva (Tolosa et al., 2016).

Nomura et al. (2011), observaram a presença de AFB_1 e aflatoxicol em águas provenientes de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dietas contendo 100, 300 e 1.000 $\mu g.kg^{-1}$ criadas em sistema semi-estático de circulação de água. As concentrações de AFB_1 e aflatoxicol detectadas, demonstraram que ao longo do tempo houve um acúmulo dessas substâncias

na água, ou seja, elas não são degradadas quando em água durante 21 dias; as maiores concentrações de AFB_1 na ração apresentaram também as maiores concentrações de AFB_1 e aflatoxicol na água: 28 e 52 $ng.L^{-1}$, respectivamente, esse comportamento se repete para os demais tipos de aflatoxinas (B_2, G_1 e G_2), porém elas só foram detectadas no 21º dia de fornecimento.

Shelton et al. (1986), Plakas et al. (1991), Toledo et al. (1987) e Troxel et al. (1997), estudaram o metabolismo de AFB_1 usando respectivamente truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), medaka japonês (*Oryzias latipes*) e peixe-zebra (*Danio rerio*). Estes estudos demonstraram que a AFB_1 foi metabolizada em aflatoxicol e este excretado na água.

No presente estudo não foi detectada a presença da AFB_1 na água dos grupos experimentais, provavelmente, devido a utilização de um sistema aberto de circulação de água com renovação constante, o acúmulo de AFB_1 não ocorreu, ou ainda manteve-se abaixo dos limites de detecção (0,1 $\mu g.kg^{-1}$).

Estudos farmacocinéticos de deposição tecidual em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) com administração oral de AFB_1 marcada com C14, revelaram que as maiores concentrações de AFB_1 foram encontradas entre 2 à 4 horas após a administração, 95% da AFB_1 absorvida foi encontrada ligada às proteínas plasmáticas. Após a absorção, a AFB_1 é capturada pelos hepatócitos, onde ocorre a metabolização e síntese do aflatoxicol, principalmente, que posteriormente é excretado por via biliar e renal, nessa espécie a produção e excreção desse metabólito é importante, chegando a ser cerca de 4 vezes maior do que em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Outra característica interessante é a baixa absorção da AFB_1, demonstrada pela elevada concentração fecal dessa toxina encontrada até 48 horas após o fornecimento oral, (em torno de 85%) (Plakas et al., 1991).

No presente estudo, foram detectadas diferentes concentrações de AFB_1 no plasma dos peixes do grupo 03 (67 $\mu g.kg^{-1}$) e em maior quantidade no grupo 04 (180 $\mu g.kg^{-1}$) nos dias +28, +42 e +56, demostrando assim que elas podem ser absorvidas e distribuídas pela circulação sanguínea, porém não foi detectada a presença de AFB_1 nas fezes, diferindo parcialmente dos resultados encontrados por Plakas et al. (1991), que encontraram tanto em plasma quanto em fezes. Isso pode ser justificado talvez pelo menor intervalo do fornecimento

da ração contaminada até a coleta das fezes (cerca de 3h) utilizado no presente estudo.

5.5 CONCLUSÃO

A AFB_1 é absorvida e distribuída pelo organismo uma vez que foi detectada no plasma, entretanto não há bioacumulação da mesma no jundiá (*Rhamdia quelen*), pois não foram dectados resíduos em quaisquer dos órgãos analisados.

Em um sistema aberto de circulação de água com renovação constante de água na criação de jundiás (*Rhamdia quelen*), assim como o utilizado no presente estudo, não há acúmulo de AFB_1 na água de alojamento destes animais, porém há necessidade de pesquisar o aflatoxicol, pois este pode estar presente neste tipo de sistema, já que é um produto da metabolização da AFB_1 pelo organismo.

5.6 REFERÊNCIAS

Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Animal Feed Science and Techonology. 2007; 137: 265-282.

Bintvihok A, Kositcharoenkul S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B_1. Toxicon. 2006; 47: 41-46.

Bintvihok A, Thiengnin S, Doi K, Kumagai S. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. Journal of Veterinary Medical Science. 2002. 64: 1037-1039.

Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D. Effects of aflatoxin B_1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*). Aquaculture Research. 2001; 32: 388-398.

Brasil, 1988. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/88. Diário Oficial da União, de 09/11/88. Seção I, p. 21968.

Coldebella I, Radünz Neto J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Ciência Rural. 2002; 32: 499-503.

Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Union. 2002; 221: 8. L221/8 (17.8.2002).

Cook WO, Richard JL, Osweiller GD, Trampell DW. Clinical and pathologic changes in acute aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B_1 and M_1. Journal Veterinary Research. 1986; 47: 1817-1825.

Corcuera LA, Ibañez-Vea M, Vettorazzi A, Gonzalez-Peñas E, De Cerain AL. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B_1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. Journal of Chromatography B. 2011; 879: 2733-2740.

Cruz JVS. Ocorrência das aflatoxinas e fumonisinas em produtos a base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, estado de São Paulo (Tese de Mestrado). Pirassununga, SP: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos; 2010.

D'Mello JPF, Macdonald AMC. Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology. 1997; 6: 155-166.

Deng SX, Tian LX, Liu FJ, Jin SJ, Liang GY, Yang HJ, Du ZY, Liu YJ. Toxic effects and residue of aflatoxin B_1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) during long-term dietary exposure. Aquaculture. 2010; 307: 233-240.

Devreese M, De Baere S, De Backer P, Croubels S. Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multimycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-

tandem mass spectrometric methods. Journal of Chromatography A. 2012; 1257: 74-80.

Dolci GS, Dias VT, Roversi K, Roversi Kr, Pase CS, Segat HJ, Teixeira AM, Benvegnu DM, Trevizol F, Barcelos RCS, Riffel APK, Nunes MAG, Dressler VL, Flores EMM, Baldisserotto B, Bürger ME. Moderate hypoxia is able to minimize the manganese-induced toxicity in tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2013; 91: 103-109.

El-Sayed YS, Khalil RH. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B_1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). Food and Chemical Toxicology. 2009; 47: 1606-1609.

Farabi SM, Yousefian M, Hajimoradloo A. Aflatoxicosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. Journal of Applied Ichthyology. 2006; 22: 234-237.

Fernández A, Belío R, Ramos JJ, Sanz MC, Sáez T. Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1997; 74: 161-168.

Han D, Xie S, Zhu X, Yang Y, Guo Z. Growth and hepatopancreas in gibel carp fed diets containing low levels of aflatoxin B_1. Aquaculture Nutrition. 2009; 16: 335-342.

Huang Y, Han D, Zhu XM, Yang YX, Jin JY, Chen YF, Xie SQ. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B_1. Aquaculture. 2011; 319: 89-97.

Ivanova L, Faeste CK, Delezie E, Van Pamel E, Daeseleire E, Callebaut A, Uhlig S. Presence of enniatin B and its hepatic metabolites in plasma and liver samples from broilers and eggs from laying hens. World Mycotoxin. 2014; 7: 167-175.

Kolpin DW, Schenzel J, Meyer MT, Phillips PJ, Hubbard LE, Scott TM, Bucheli TD. Mycotoxins: Diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. Science of the Total Environment. 2014; 470: 669-676.

Mahfouz ME, Sherif AH. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on Oreochromis niloticus health status. The Journal of Basic & Applied Zoology. 2015; 71: 48-59.

Maragos CM. Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois, USA. Food Additives & Contaminants: Part B. 2012; 5: 55-64.

Nacher-Mestre J, Ibañez M, Serrano R, Perez-Sanchez J, Hernandez F. Qualitative screening of undesirable compounds from feeds to fish by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013; 61: 2077-2087.

Ngethe S, Horsberg TE, Ingebrigtsen K. The disposition of 3H-aflatoxin B_1 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after oral and intravenous administration. Aquaculture. 1992; 108: 323-332.

Nomura H, Yamashita MOM, Takaku H, Kimura A, Chikasou M, Nakamura Y, Fujii S, Watai M, Yamada H. Uptake by dietary exposure and elimination of

aflatoxins in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011; 59: 5150-5158.

Oga S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu; 1996.

Pietsch C, Kersten S, Burkhardt-Holm P, Valenta H, Daenicke S. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in commercial fish feed: An initial study. Toxins. 2013; 5: 184-192.

Plakas SM, Loveland PM, Bailey GS, Blazer VS, Wilson GL. Tissue disposition and excretion of 14C-labelled aflatoxin B_1 after oral administration in channel catfish. Food and Chemical Toxicology. 1991; 29: 805-808.

Rocha CMC, Resende EK, Routledge EAB, Lundstedt LM. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2013; 48: 4-6.

Saengtienchai T, Poapolathep S, Isariyodom S, Ikenaka Y, Ishizuka M, Poapolathep A. Toxicokinetics and tissue depletion of fusarenon-X and its metabolite nivalenol in piglets. Food and Chemical Toxicology. 2014; 66: 307-312.

Sahoo PK, Mukherjee SC. Immunosuppressive effects of aflatoxin B_1 in Indian major carp *Labeo rohita*. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease. 2001; 24: 143-149.

Schenzel J, Schwarzenbach RP, Bucheli TD. Multi-residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58: 11207-11217.

Shelton DW, Goeger DE, Hendricks JD, Bailey GS. Mechanisms of anti-carcinogenesis: The distribution and metabolism of aflatoxin B_1 in rainbow trout fed Aroclor 1254. Carcinogenesis. 1986; 7: 1065-1071.

Toledo C, Hendricks J, Loveland J, Wilcox J, Bailey GS. Metabolism and DNA-binding in vivo of aflatoxin B_1 in medaka (*Oryzias latipes*). Comparative Biochemistry and Physiology: Part C. 1987; 87: 275-281.

Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Multimycotoxin analysis in water and fish plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chemosphere. 2016; 145: 402-408.

Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Natural occurrence of emerging *Fusarium mycotoxins* in feed and fish from aquaculture. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014. 62: 12462-12470.

Troxel CM, Reddy AP, O'Neal PE, Hendricks JD, Bailey GS. In vivo aflatoxin B_1 metabolisms and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*). Toxicology and Applied Pharmacology. 1997; 143: 213-220.

Tuan NA, Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB, Rottinghaus GE. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B_1. Aquaculture. 2002; 212: 311-319.

Wettstein FE, Bucheli TD. Poor elimination rates in waste water treatment plants lead to continuous emission of deoxynivalenol into the aquatic environment. Water Research. 2010; 44: 4137-4142.

Winkler J, Kersten S, Meyer U, Engelhardt U, Daenicke S. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed *Fusarium* contaminated maize and their relationships to performance parameters. Food and Chemical Toxicology. 2014; 65: 196-204.

Wyatt RD. Poultry. In: Smith JE, Henderson RS, editores. Mycotoxins and animal foods. Boca Raton: CRC; 1991. p. 553-605.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desempenho zootécnico dos jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo diferentes concentrações de AFB_1, não foi alterado de forma consistente. Mostrando assim que os jundiás (*Rhamdia quelen*) podem apresentar resistência à essa micotoxina, em níveis de até 180 $\mu g.kg^{-1}$ de AFB_1 na ração.

Deve-se levar em conta que possíveis efeitos negativos no desenvolvimento e na produtividade de peixes, podem ocorrer quando estes forem expostos à concentrações mais elevadas da AFB_1 e/ou por um período de tempo mais longo. Os níveis de micotoxinas nos ingredientes que compõem as rações, devem ser monitorados periodicamente, afim de evitar que níveis superiores aos testados possam causar queda no desempenho zootécnico ou mesmo morte dos animais.

Da mesma maneira, as diferentes concentrações de AFB_1 fornecidas aos jundiás (*Rhamdia quelen*) via ração, não afetam de maneira significativa as estruturas teciduais de fígado, rins e brânquias avaliados através de histologia. Entretanto, os resultados da bioquímica sérica demonstraram grau leve de comprometimento hepático independente da dose de AFB_1 administrada via ração, demonstrando assim uma maior sensibilidade no diagnóstico de aflatoxicoses quando comparada à histopatologia. Essas diferenças podem não ter ocorrido devido ao tempo utilizado, talvez com um tempo maior de exposição, essas alterações podem tornar-se significativas.

Já nos parâmetros hematológicos, a exposição a AFB_1 afetou negativamente a imunidade celular do jundiá (*Rhamdia quelen*). A adaptação do sistema imune varia de acordo com a concentração da AFB_1 na ração, entretanto essa adaptação não foi linear com os níveis crescentes de AFB_1 fornecidas via ração.

A AFB_1 foi absorvida e distribuída pelo organismo, uma vez que a mesma foi detectada no plasma dos animais expostos, porém os diferentes níveis e tempos de consumo não apresentaram um comportamento linear e crescente nas quantidades de AFB_1 absorvidas e acumuladas pelo organismo do jundiá (*Rhamdia quelen*).

Não foi encontrado acúmulo de AFB_1 na água devido ao sistema de circulação aberto com renovação constante, porém em um sistema de circulação fechada essa acumulação pode ocorrer e aumentar o risco de exposição dos peixes a essa micotoxina.

É importante dar continuidade a esse tipo de investigação para buscar resultados frente a exposição a outras micotoxinas e suas associações, suas diferentes biodisponibilidades no organismo dos peixes, além dos possíveis efeitos tóxicos causados em seres humanos devido a ingestão de pescado possivelmente contaminado.