

27 A 29 DE  
OUTUBRO DE  
2020



ONLINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

REALIZAÇÃO  
sbCTA-RS

ORGANIZAÇÃO  
office  
EVENTOS

## OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> EM RAÇÕES E AVALIAÇÃO DE RISCO PARA *Oreochromis niloticus*

W.V. Nogueira<sup>1</sup>, M.M. Souza<sup>2</sup>, M.B. Tesser<sup>3</sup>, J. Garda-Bufferon<sup>4</sup>

1 - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos - CEP: 96203-000 - Rio Grande - RS - Brasil, Telefone: +55 (53) 9 81395918 - e-mail: (wesclenvilar@gmail.com)

2 - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos - CEP: 96203-000 - Rio Grande - RS - Brasil, Telefone: +55 (53) 9 81323681 - e-mail: (mcsouza@furg.br)

3 - Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia - CEP: 96203-000 - Rio Grande - RS - Brasil, Telefone: +55 (53) 9 81205486 - e-mail: (mbtesser@gmail.com)

4 - Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos - CEP: 96203-000 - Rio Grande - RS - Brasil, Telefone: +55 (53) 32336987 - e-mail: (jaquelinebufferon@furg.br)

**RESUMO** - Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) foi determinada em amostras de rações destinadas a diferentes fases de desenvolvimento de *Oreochromis niloticus*. A extração foi realizada segundo QuEChERS modificado e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. A recuperação para o método foi de 87,5 e 108,3%, dentro dos limites recomendados pelas diretrizes da Comissão Europeia. A AFB<sub>1</sub> foi detectada para todas as fases de desenvolvimento, variando de 0,3 µg/kg em rações para juvenil I, e 3,6 e 8,7 µg/kg em rações para juvenil II e adultos, respectivamente. Ao avaliar a exposição alimentar tendo como referência as concentrações de AFB<sub>1</sub> reportadas neste estudo, analisando em termos de ingestão mínima, média e máxima, juvenil I e juvenil II estão expostos a concentrações mais elevadas de AFB<sub>1</sub>. Além disso, independente da fase de desenvolvimento, quanto maior a concentração de AFB<sub>1</sub> na ração, maior será a exposição da espécie a este contaminante.

**ABSTRACT** - Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) was determined in feed samples for different stages of development of *Oreochromis niloticus*. The extraction was performed according to modified QuEChERS and quantified by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The recovery for the method was 87.5 and 108.3%, within the limits recommended by the European Commission guidelines. AFB<sub>1</sub> was detected for all stages of development, ranging to 0.3 µg/kg in diets for juvenile I, and 3.6 and 8.7 µg/kg in diets for juvenile II and adults, respectively. When assessing food exposure using the AFB<sub>1</sub> concentrations reported in this study as a reference, analyzing in terms of minimum, average and maximum intake, juvenile I and juvenile II are exposed to higher concentrations of AFB<sub>1</sub>. In addition, regardless of the development phase, the higher the concentration of AFB<sub>1</sub> in the feed, the greater the species exposure to this contaminant.

**PALAVRAS-CHAVE:** Brasil, micotoxina; piscicultura; região sul.

**KEYWORDS:** Brazil, mycotoxin; pisciculture; south region.

REALIZAÇÃO

sbCTA-RS

ORGANIZAÇÃO

office 30  
EVENTOS

www.officeeventos.com.br

27 A 29 DE  
OUTUBRO DE  
2020



ONLINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

REALIZAÇÃO

sbCTA-RS

ORGANIZAÇÃO

office  
EVENTOS

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos alimentos são susceptíveis ao ataque fúngico seja no campo, durante transporte ou armazenamento. Sob condições favoráveis, uma variedade de gêneros fúngicos podem sintetizar compostos tóxicos, as chamadas micotoxinas (Marijani et al., 2017). Apesar de serem considerados compostos não essenciais para manutenção primária desses organismos, a síntese de micotoxinas confere vantagens competitivas sobre a microbiota presente no ambiente. Entretanto, grande parte desses metabólitos podem interferir na ruptura de membranas celulares e na síntese de DNA e RNA ocasionando efeitos carcinogênicos para humanos e animais (Chitarrini et al., 2014).

Dentre as micotoxinas, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é considerada de grande importância, apresentando todas as características anteriormente citadas (Nogueira et al., 2020). Além disso, apresenta elevada ocorrência e altas concentrações em alimentos, inclusive em rações para peixes (Barbosa et al., 2013). Apesar do elevado consumo de ração destinada a aquicultura na última década (Schulter; Vieira Filho, 2017), dados sobre a ocorrência de micotoxinas são incipientes e escassos. Desta forma, é de fundamental importância uma abordagem sobre o impacto da qualidade sanitária de rações destinadas a piscicultura, bem como enfatizar os riscos da presença de micotoxinas para peixes. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de AFB<sub>1</sub> em rações destinadas a alimentação de *Oreochromis niloticus* e estabelecer o risco de exposição a espécie.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

**Amostras:** Foram coletadas amostras de ração destinadas a diferentes fases de desenvolvimento de *Oreochromis niloticus*. As amostras foram adquiridas no comércio local das cidades de Rio Grande e Pelotas, localizadas no estado do Rio Grande do Sul. As coletas foram realizadas de acordo com regulamento nº 401/2006 da Comissão Europeia (CE) de 23 de fevereiro de 2006 (CE, 2006). Após as coletas, as amostras foram embaladas, identificadas, vedadas em sacos plásticos estéreis, e mantidas a - 4 °C até a análise.

**Padrão analítico e reagentes:** O padrão de AFB<sub>1</sub> (Saint Louis, MO, EUA) foi adquirido da Sigma-Aldrich (pureza > 98%). Acetonitrila (MeCN), metanol (MeOH) e cloreto de sódio (pureza > 99%) foram adquiridos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). O ácido acético (pureza > 99%) foi adquirido da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). O sulfato de magnésio (pureza > 95%) foi adquirido da Caledon Laboratory (Georgetown, Canadá). Hexano (pureza > 96%) e tolueno (pureza > 99%) foram obtidos na Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida através da purificação em um sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MΩ.cm) (Millipore, Bedford, USA). Todos os solventes foram filtrados em filtro Millipore, com poros de 0,45 µm de diâmetro antes de sua utilização. Todos os componentes da fase móvel foram previamente desgaseificados em banho ultrassônico. A solução-trabalho de as micotoxinas foram preparadas solubilizando os padrões em tolueno:acetonitrila (98:2, v/v) (AOAC, 2000). A fase móvel recém-preparada foi desgaseificada por 30 minutos antes do uso com um banho ultra-sônico UniQup (frequência USC-1850 EUA: 250 KHz, Brasil).

REALIZAÇÃO

sbCTA-RS

ORGANIZAÇÃO

office 30  
EVENTOS ANOS

www.officeeventos.com.br

## 2.2 Métodos

Extração das micotoxinas: A extração de AFB<sub>1</sub> foi determinada pelo método de QuEChERS descrito por Anastassiades et al., (2003) modificado por Seus-Arraché et al. (2018). Para execução do método, as amostras foram trituradas e separadas em partículas de aproximadamente 0,5 mm.

Quantificação e condições cromatográficas: Para a quantificação utilizou-se as condições estabelecidas por Massarolo et al. (2018), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector fluorescência (FL) e derivatizador pós-coluna fotoquímico (Romer Derivatization Unit RDU TM). O método foi validado quanto a exatidão e precisão (European Commission, 2006). A exatidão (recuperação) foi realizada em dois níveis de concentração (0,12 e 0,24 ng/g) em triplicata. Amostras fortificadas permaneceram em repouso por 24 horas antes da extração. Para o estudo da repetibilidade foi realizada a extração pelo método de QuEChERS, adaptado neste estudo em diferentes níveis de fortificação, em triplicata, e cada nível foi injetado três vezes.

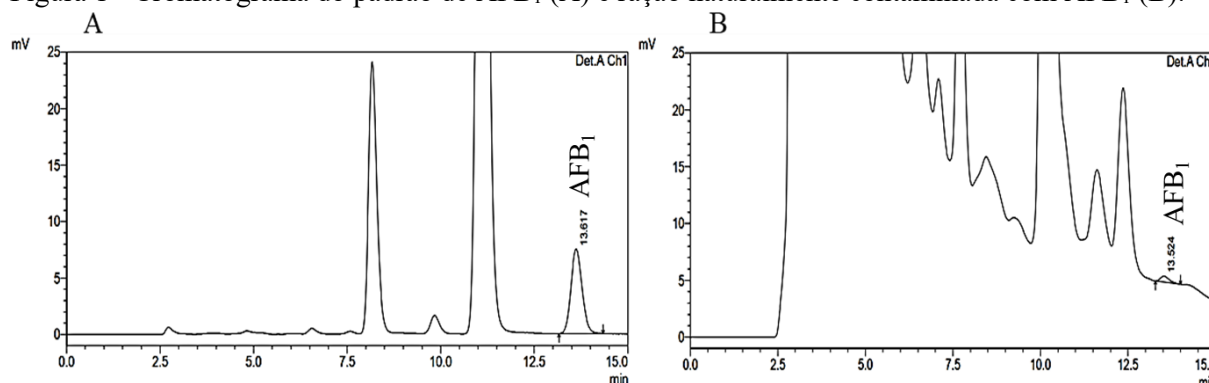
Estimativa da ingestão diária (ID): a ID foi calculada usando os níveis de AFB<sub>1</sub> nas rações, ingestão média de ração (kg) e massa corporal para diferentes fases de desenvolvimento (alevino, juvenil e adultos). Os resultados foram expressos de acordo com a Equação 1. Onde, IMR é a ingestão média de ração, CMR é a concentração da micotoxina na ração e MC é a massa corporal. Para o cálculo da ID, o peso e a ingestão média de ração foram estabelecido para juvenil I (0,01 kg e 0,0008 kg/dia), juvenil II (0,07 kg e 0,003 kg/dia) e adultos (0,3 kg e 0,004 kg/dia) com base nos valores disponibilizados na NRC (1993) para tilápia.

$$ID \mu\text{g/kg/day} = (\text{IMR (kg/dia)} \times \text{CMR} (\mu\text{g/kg}))/\text{MC (kg)} \quad (1)$$

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições de temperatura e vazão do método propiciou a separação dos analitos. Os cromatogramas de eluição estão ilustrados na Figura 1, onde para a AFB<sub>1</sub> o tempo de retenção foi de 13,6 minutos. O procedimento cromatográfico foi adequado para quantificação das micotoxinas, pois apresentou valores de recuperação (87,5 e 108,3%) para os níveis testados, dentro dos limites recomendados pelas diretrizes internacionais (European Commission, 2006).

Figura 1 - Cromatograma do padrão de AFB<sub>1</sub> (A) e ração naturalmente contaminada com AFB<sub>1</sub> (B).





Os resultados de ocorrência para AFB<sub>1</sub> estão apresentados na Tabela 1. Os níveis de contaminação nas rações não ultrapassam os limites máximos tolerados (50 µg/kg) conforme regulamentado pela legislação nacional (Portaria MA/SNAD/SFA nº. 07, de 09 de novembro de 1988) (Brasil, 2003). Entretanto, quando comparado aos limites máximos estabelecidos pela legislação da União Europeia (5 µg/kg), os níveis de contaminação em rações destinadas a peixes adultos (50%) apresentam-se acima do permitido.

Tabela 1 - Ocorrência de AFB<sub>1</sub> nas amostras de rações.

Fase de desenvolvimento	Aflatoxina B <sub>1</sub> (µg/kg)
Juvenil I	0,3 (0,1)
Juvenil II	3,6 (2,9)
Adulto	8,7 (8,4)

Dados apresentados como percentual da média (desvio padrão).

Vários estudos demonstraram a presença de AFB<sub>1</sub> na alimentação de peixe a nível nacional e internacional (Barbosa et al., 2013; Olorunfemi et al., 2013; Gonçalves-Nunes et al., 2015; Mwihi et al., 2018). A incidência de micotoxinas nas rações pode estar relacionada à tendência em substituir as fontes proteicas de origem animal por fontes proteicas de origem vegetal (Gonçalves et al., 2017), bem como condições inadequadas de transporte e armazenamento. Embora existam essas constatações, estudos demonstrando os efeitos tóxicos para as espécies utilizadas nos sistemas de produção piscícola ainda são limitados (Barbosa et al., 2013).

Desta forma, no contexto de avaliação de risco, a ocorrência de micotoxinas em rações é de grande importância uma vez que ao serem liberadas diretamente no trato gastrointestinal podem ocasionar danos graves aos animais (Adesso et al., 2017). Logo, estimar esses valores é primordial para garantir a segurança alimentar, procurando determinar limites de exposição às micotoxinas presentes nas rações, abaixo dos quais não são esperados efeitos adversos a saúde dos peixes. Tais valores podem ser regulamentadas com base em cálculos de sua ingestão diária. A Tabela 2 apresenta a ingestão diária estimada em termos de concentração mínima (0,3 µg/kg), média (3,6 µg/kg) e máxima (8,7 µg/kg) para cada fase de desenvolvimento.

Tabela 2 – Exposição estimada à AFB<sub>1</sub> para *Oreochromis niloticus* (µg/kg/dia).

Estágio de vida	Ingestão mínima	Ingestão média	Ingestão máxima
Juvenil I	0,024	0,288	0,696
Juvenil II	0,131	1,542	3,728
Adulto	0,001	0,048	0,116

Os dados permitem verificar que peixes jovens (juvenil I e juvenil II) estão expostos a concentrações mais elevadas de AFB<sub>1</sub> ao consumir rações contendo as concentrações analisadas. Desta forma, apesar de não existirem regulamentações que determinem aos valores de ingestão de micotoxinas para espécies ícticas, os valores de ID reportados podem ser considerados de grande risco para a espécie.

Autores como Rahman et al. (2017), Ayyata et al. (2018) e Deng et al. (2020), conduzindo ensaios alimentares para avaliar os efeitos de AFB<sub>1</sub> em *Oreochromis niloticus*, constataram que concentrações similares ou inferiores às encontradas nas rações em estudo podem provocar efeitos negativos às células imunitárias dos animais em um curto período de exposição, além de influenciar na redução do ganho de peso, baixa conversão alimentar, diminuição das concentrações de hemoglobina, eritrócitos totais, proteínas totais, albumina e globulinas.

Os efeitos ocasionados por essa micotoxina são decorrentes da epoxidação da dupla ligação 8,9 encontrada na forma de éter vinil no anel terminal furano da AFB<sub>1</sub>. Este composto apresenta capacidade de interagir com sítios nucleofílicos de macromoléculas (e.g. ácido desoxirribonucleico,



ribonucléico e proteínas). Estas ligações ocasionam as lesões bioquímicas primárias, os chamados adutos, induzindo a modificação de processos metabólicos normais e outros processos vitais, ocasionando a mutagenicidade e carcinogenicidade (Vlastimil; Wu; Kuca, 2014).

## 4. CONCLUSÃO

A ocorrência de AFB<sub>1</sub> em rações apresentaram uma concentração de 0,3 µg/kg em rações destinadas a juvenil I, e 3,6 e 8,7 µg/kg em rações para juvenil II e adultos, respectivamente.

A exposição alimentar tendo como referência as concentrações de AFB<sub>1</sub> reportadas neste estudo, analisando a ingestão mínima, média e máxima, juvenil I e juvenil II estão expostos a concentrações mais elevadas de AFB<sub>1</sub> e, independente da fase de desenvolvimento, quanto maior a concentração de AFB<sub>1</sub> na ração, maior será a exposição da espécie a este contaminante.

Portanto, este levantamento da contaminação apresenta-se como uma referência útil para a avaliação de risco relativo ao consumo de ração contaminada para *Oreochromis niloticus*. Além de acrescentar informações importantes para o desenvolvimento da piscicultura no Brasil, contribuindo com dados concretos para o aprimoramento da legislação nacional para o setor piscícola.

## 5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro - código de financiamento 001.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesso, D., Autore, G., Quaroni, A., Popolo, A., Severino, L., & Marzocco, S. (2017). The food contaminants nivalenol and deoxynivalenol induce inflammation in intestinal epithelial cells by regulating reactive oxygen species release. *Nutrients*, 9(1), 1-17.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (2000). *Official methods of analysis of international*. 17th, 2000. CD-ROM.
- Ayyata, M. S., Ayyat, A. M. N., Al-Sagheera, A. A., & El-Haisc, A. E. M. (2018). Effect of some safe feed additives on growth performance, blood biochemistry, and bioaccumulation of aflatoxin residues of Nile tilapia fed aflatoxin-B1 contaminated diet. *Aquaculture*, 495(1), 27-34.
- Barbosa, T. S., Pereyra, C. M., Soleiro, C. A., Dias, E. O., Oliveira, A. A., Keller, K. M., Silva, P. P. O., Cavaglieri, L. R., & Rosa, C. A. R. (2013). Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. *International Aquatic Research*, 5(1), 2-9.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09 de novembro de 1988. Diário Oficial da União, Seção I, página 21.968, 1988.
- Chitarrini, G., Nobili, C., Pinzari, F., Antonini, A., De Rossi, P., Del Fiore, A., Procacci, S., Tolaini, V., Scala, V., Scarpari, M., & Reverberi, M. (2014). Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 189(1), 1-10.
- Deng, Y., Deng, Q., Wang, Y., Sun, L., Wang, R., Ye, L., Liao, J. & Gooneratne R. (2020). Tolerance and bio-accumulation of aflatoxin B<sub>1</sub> in invertebrate *Litopenaeus vannamei* and vertebrate *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 1(1), 1-10.
- Gonçalves-Nunes, E. M. C., Gomes-Pereira, M. M., Raposo-Costa, A. P., Rocha-Rosa, C. A., Pereyra C. M., Calvet, R. M., Alves-Marques, A. L., Cardoso-Filho, F., & Sanches-Muratori, M. C. (2015).



- Screening of aflatoxin B<sub>1</sub> and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1), 595-600.
- Gonçalves, R. A., Schatzmayr, D., Hofstetter, U., & Santos, G. A. (2017). Occurrence of mycotoxins in aquaculture: preliminary overview of Asian and European plant ingredients and finished feeds. *World Mycotoxin Journal*, 10(1), 183-194.
- Marijani, E., Wainaina, J. M., Charo-Karisa, H., Nzayisenga, L., Munguti, J., Gnonlonfin, G. J. B., Kigadye, E., & Okoth, S. (2017). Mycoflora and mycotoxins in finished fish feed and feed ingredients from smallholder farms in East Africa. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 169-176.
- Massarolo, K.C., Ferreira, C. F. J., Kupski, L., & Badiale-Furlong, E. (2018). Optimization of matrix solid-phase dispersion method for extraction of aflatoxins from cornmeal. *Food Analytical Methods*, 1(1), 1-10.
- Mwihia, E. W., Mbutia, P. G., Eriksen, G. S., Gathumbi, J. K., Maina, J. G., Mutoloki, S., Waruiru, R. M., Mulei, I. R., & Lyche, J. L. (2018). Occurrence and levels of aflatoxins in fish feeds and their potential effects on fish in Nyeri, Kenya. *Toxins*, 10(1), 1-16.
- Nogueira, W. V., Oliveira, F. K., Garcia, S. O., Marimón-Sibaja, K. V., Tesser, M. B., & Garda-Bufferon J. (2020). Sources, quantification techniques, associated hazards, and control measures of mycotoxin contamination of aquafeed. *Critical Reviews in Microbiology*, 1(1), 1-12.
- National Research Council - NRC. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. (1. ed.). Washington: National Academic Press.
- Olorunfemi, M. F., Odebo, A. C., Joseph, O. O., Ezekiel, C., Sulyok, M., Krska, R., & Oyedele, A. (2013) *Multi-mycotoxin contaminations in fish feeds from different agro-ecological zones in Nigeria*. In. Tielkes, E. (1. ed). Cuvillier Verlag: Göttingen.
- Rahman, A. N. A., Abdellatif, S. A., & Mahboub, H. H. H. (2017). Protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* from aflatoxin B<sub>1</sub> toxicity by dietary supplementation with Fennel essential oil and *Saccharomyces cerevisiae*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 235-240.
- Seus-Arraché, E. R., Fontes, M. R. V., Garda-Bufferon, J., & Badiale-Furlong, E. (2018). Trichothecenes in wheat: Methodology, occurrence and human exposure risk. *Journal of Cereal Science*, 82(1), 129-137.
- Schulter, P. E., & Vieira Filho, J. E. R. (2017). *Evolução da piscicultura no brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia*. (1. ed). Rio de Janeiro: IPEA.
- União Europeia – EU. (2006). Regulamento N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, 1(1), 12-34.
- Vlastimil, D., Wu, Q., & Kuca, K. (2014). Metabolism of aflatoxin: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*, 88(1), 1635-1644.