



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ADSORVENTE A BASE DE PROBIÓTICO COMO PROTETOR HEPÁTICO**  
**PARA *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* ALIMENTADOS COM DIETAS**  
**CONTENDO AFLATOXINA B1**

**HENRIQUE MOMO ZIEMNICZAK**

Dourados - MS  
Fevereiro - 2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ADSORVENTE A BASE DE PROBIÓTICO COMO PROTETOR HEPÁTICO  
PARA *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* ALIMENTADOS COM DIETAS  
CONTENDO AFLATOXINA B1**

Henrique Momo Ziemniczak

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claucia Aparecida Honorato  
Coorientador: Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Área de Concentração: Produção Animal

Dourados - MS  
Fevereiro 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Z66a Ziemniczak, Henrique Momo

ADSORVENTE A BASE DE PROBIÓTICO COMO PROTETOR HEPÁTICO PARA  
PIARACTUS MESOPOTAMICUS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO  
AFLATOXINA B1 [recurso eletrônico] / Henrique Momo Ziemniczak. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Claucia Aparecida Honorato.

Coorientadora: Jefferson Rodrigues Gandra.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Micotoxina. 2. bactéria. 3. lesão hepática. 4. biomarcadores. 5. histopatologia. I. Honorato, Claucia Aparecida. II. Gandra, Jefferson Rodrigues. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**ADSORVENTE A BASE DE PROBIÓTICO COMO PROTETOR  
HEPÁTICO PARA *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* ALIMENTADOS COM  
DIETAS CONTENDO AFLATOXINA B1**

Por

Henrique Momo Ziemniczak

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do  
título  
de MESTRE EM ZOOTECNIA

Aprovado em: 25/02/2021



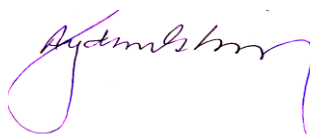
---

Dr. Prof<sup>a</sup>. Cláudia A. Honorato  
Orientadora – UFGD/FCA



---

Dr. Prof<sup>a</sup>. Juliana Rosa Carrijo Mauad  
UFGD



---

Dr. Prof<sup>a</sup>. Ayd Mary Oshiro

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Henrique Momo Ziemniczak, filho de Marlene Terezinha Momo e Claudir Onéssimo Ziemniczak, nasceu na Cidade de Ji-Paraná, Estado de Rondônia, Brasil, em 1989. Em 2007 concluiu o ensino médio e em 2013 ingressou no Curso de Medicina Veterinária pela Faculdade Facimed e em 2014 passou a fazer a graduação na Universidade Federal de Rondônia – UNIR, concluindo em 2018. Em 2019 iniciou o mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal pela Universidade Federal da Grande Dourados, desenvolvendo seu trabalho junto ao grupo de pesquisa “Ecofisiologia em peixes”. É bolsista pela CAPES no período de 2020/2021

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e por me presentear com pessoas maravilhosas durante o caminho da pós graduação.

Aos meus familiares por me apoiarem na realização de um sonho, em especial meus irmãos Jonas Momo e Clávio Momo.

Ao meu querido amigo Arnaldo Tavares que num momento de desamino me deu forças para continuar. Sou muito grato a você.

A minha amiga e patroa Ariana Padua que me deu suporte para que essa pesquisa fosse executada.

A minha amiga Isabela Nóia que teve um papel fundamental durante minha passagem no mestrado. Obrigado por ser uma pessoa tão incrível na minha vida.

Ao meu amigo Jean Kaique que sempre esteve me auxiliando nas publicações científicas. Muito obrigado.

Aos meus amigos Orlando Costa, Cristiane Rebouças, Jessica Carvalho, Sulyvan Oliveira, Janaína Taina, Janaína Palermo, Edgar Jara e Joyce Alves pelos inúmeros momentos prazerosos que passamos juntos.

Ao nosso grupo de estudos em Ecofisiologia em Peixes, por sempre estarem dispostos na execução deste sonho. Agradeço ao Ton Vilhalaba, Larissa Celine, Jean Souza, Wesley Barbieri.

A minha amiga Katyuscia Yanez que me acolheu em sua residência com carinho e respeito possibilitando a para a execução de uma parte deste projeto.

Ao meu coorientador Jeferson Gandra que idealizou a execução deste projeto. Obrigado.

A minha amiga Ariana Padua por ter fornecido suporte para que esse trabalho acontecesse.

Ao meu grande amigo e professor Dr. Klaus Casaro, que desde o início da minha graduação esteve compartilhando os seus conhecimentos. Pelo apoio e confiança que depositou em mim.

E por fim, a minha grande orientadora e amiga Prof<sup>a</sup>. Claucia A. Honorato que me ensinou a conduta da vida acadêmica, com escritas de trabalho, metodologias de pesquisa. Obrigado pela amizade, apoio, confiança e paciência de sempre estar ajudando nos momentos que mais precisei. A melhor orientadora da Pós Graduação, o meu muito obrigado!

*A sabedoria é resplandecente e sempre viçosa. Ela é facilmente contemplada por aqueles que a amam, e é encontrada por aqueles que a procuram. Ela até se antecipa, dando-se a conhecer aos que desejam. Quem por ela madruga não se cansará, pois a encontrará sentada à sua porta.*

***Livro da Sabedoria. 6, 12-15.***

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	12
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	12
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
1.1 Cenário da piscicultura .....	13
1.2 <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	15
1.3 Alimentação do pacu .....	15
1.4 As dietas, níveis de nutrientes e problemas de armazenamento. ....	16
1.5 Legislação sobre as micotoxina .....	17
1.6 Adsorvente probiótico .....	18
1.7 Aflatoxina .....	19
1.8 Patogenia das aflatoxinas .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 Objetivos Específicos .....	22
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	29
<b>Resumo</b> .....	29
<b>1. Introdução</b> .....	30
<b>2. Resultados</b> .....	31
2.1 <i>Ensaio experimental I – Intoxicação de Piaractus mesopotamicus com aflatoxina</i> .....	32
2.2 <i>Ensaio experimental II – uso de adsorvente associado a probióticos em dietas contaminadas com aflatoxina</i> .....	34
<b>3. Discussão</b> .....	36
<b>4. Conclusão</b> .....	40



<b>5. Materiais e Métodos</b> .....	40
5.1 <i>Preparação da AFB1</i> .....	40
5.2 <i>Preparo das dietas experimentais</i> .....	40
5.3 <i>Animais experimentais e manejo</i> .....	41
5.4 <i>Ensaio experimental I – Intoxicação de <i>Piaractus mesopotamicus</i> com aflatoxina B1</i> 41	
5.5 <i>Ensaio experimental II – uso de adsorvente associado a probióticos em dietas contaminadas com aflatoxina</i> .....	42
5.6 <i>Desempenho de crescimento</i> .....	43
5.7 <i>Análises bioquímicas</i> .....	43
5.8 <i>Análise histopatológica do fígado e intestino</i> .....	44
5.9 <i>Análise estatística</i> .....	44
<b>6. Referência</b> .....	45

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Índice desenvolvimento de <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com dietas acrescidas de AFB1.....	32
<b>Tabela 2.</b> Enzimas metabólicas e oxidativas de fígado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidos a alimentação com AFB1.....	33
<b>Tabela 4.</b> Efeito do ABS em resposta hepática desafiada com AFB1 .....	35

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Consumo de dieta. (B) Consumo de AFB1 por *Piaractus mesopotamicus*. (\*) dieta controle ausente de AFB1 .....32
- Figura 2.** A, Controle; Arquitetura hepática preservada com hepatócitos organizados de forma cordonal (seta). Notar núcleo preservado e centralizado (ponta da seta). B, 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; Pontos de necrose focal (traço), congestão dos sinusóides e parte da arquitetura preservada em aspecto cordonal (seta). C, 50  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; Área de necrose multifocalmente. (asterisco). D, 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; Necrose em área mais extensa (linha tracejada) com aumento do espaço sinusoidal (asterisco) e núcleos picnóticos (ponta da seta). E, 200  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; Necrose maciça com pontos de vesiculação citoplasmática (ponta da seta) e perda da arquitetura hepática. F, 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; Citoplasma proeminente com núcleos periféricos (ponta da seta), caracterizando um esteatose hepática.....34
- Figura 3.** (A) Consumo de dieta. (B) Consumo de AFB1 por *Piaractus mesopotamicus*. (\*) dieta controle ausente de AFB1. ....35
- Figura 4.** A, Ração; Arquitetura hepática preservada, núcleos centralizados com citoplasma bem delimitado (ponta da seta). B, 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; Parte da arquitetura preservada (ponta da seta) mas com necrose perivascular (seta). C, 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; Necrose multifocal e perda da arquitetura cordonal (asterisco). D, Ração + ADS; Arquitetura normal com arranjo cordonal dos hepatócitos (linha tracejada). E, 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  + ADS; Ausência de lesão perivascular (seta). F, 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  + ADS; necrose focal (asterisco) e arranjo cordonal parcialmente comprometido. ....36
- Figura 5.** Representação esquemática experimental, com duas fases experimentais .....41

**LISTA DE ABREVIATURAS**

µg	micrograma
ADS	Adsorvente a base de probiótico
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFBO	<i>Exo</i> -AFB1-8,9-epoxide
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CHC	Carcinoma hepatocelular
CYP <sub>450</sub>	Citocromo P450
DL <sub>50</sub>	Dose letal de 50% da população
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FB1	Fumonensina 1
FB2	Fumonensina 1
GSH	Glutationa
Kg	Quilograma
mg/L	Miligrama por litro
OTA	Ocratoxina
SOD	Superóxido desmutase
ZON	Zearalenona

## RESUMO

ZIEMNICZAK, Henrique Momo, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, Novembro de 2020. **Efeitos da aflatoxina B1 na alimentação de pacu com o uso de adsorvente.** Orientadora: Cláucia Aparecida Honorato; Coorientador: Jeferson Rodrigues Gandra.

A aflatoxina B1 (AFB1) é um potente carcinógeno que afeta o desenvolvimento e parâmetros bioquímicos, principalmente do fígado. Contaminações por fungos são frequentes em alimentos armazenados em locais inadequados favorecendo a exposição AFB1 em peixes. O uso de adsorventes a base de probióticos (ADS) têm demonstrado uma boa alternativa, impedindo a ação das micotoxinas e contribuindo para um melhor desempenho zootécnico. Este projeto foi delineado em dois estudos: (1) avaliar o impacto de AFB1 em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) por 10 dias, alimentados com dietas contendo 00, 25, 50, 100, 200, e 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; e (2) avaliar a suplementação de ADS incluso na dieta (0,2%) como estratégia para prevenir a aflatoxicose em peixes alimentados com 0,0, 25 e 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 definidos anteriormente no experimento 1. No estudo 1, a inclusão acima de 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  diminuiu a atividade da AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), ALB (albumina), CAT (catalase) e SOD (superóxido desmutase) além de proporcionar lesões histopatológicas hepáticas. No estudo 2, a inclusão de ADS em dietas contaminadas com AFB1 melhorou a atividade da AST e ALT até 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1, além de não apresentar lesões histopatológicas. A ação hepatoprotetora do ADS em dietas contaminadas com AFB1 foi observada por meio da manutenção da atividade das enzimas e histopatologia hepática, demonstrando uma diminuição nos danos provocados em altas concentrações de AFB1 (400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1). A AFB1 altera parâmetros bioquímicos e histopatológicos a partir de 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . É importante ressaltar que a suplementação de ADS melhorou a atividade enzimática na concentração 25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 e atenuou os efeitos com 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1.

**Palavras-chave:** Micotoxina, bactéria, lesão hepática, biomarcadores, histopatologia

## ABSTRACT

ZIEMNICZAK, Henrique Momo, Federal University of Grande Dourados, Dourados MS, November 2020. **Effects of Aflatoxin B1 on pacu feed using adsorbent.** Advisor: Claucia Aparecida Honorato; Co-Advisor: Jeferson Rodrigues Gandra.

Aflatoxin B1 (AFB1) is a potent carcinogen that affects mainly the liver development and biochemical parameters. Fish production is increasing, requiring good food quality. Fungal contamination is frequent in food stored in inappropriate places favoring exposure to AFB1 in fish. The use of probiotic-based adsorbents (ADS) has demonstrated a good alternative, acting with adsorbent and contributing to a better zootechnical performance. This study was designed in two studies: (1) to evaluate the impact of AFB1 on pacu (*Piaractus mesopotamicus*) for 10 days, fed diets containing 00, 25, 50, 100, 200, and 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of AFB1. (2) to evaluate the supplementation of ADS included in the diet (0.2%) as a strategy to prevent aflatoxicosis in fish fed with 0.00, 25 and 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of AFB1. Aflatoxin B1 decreased the activity of AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), ALB (albumin), CAT (catalase) and SOD (superoxide desmutase) in addition to providing liver histopathological lesions above 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of AFB1. The inclusion of ADS in diets contaminated with AFB1 improved the activity of AST and ALT up to 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of AFB1, in addition to not presenting histopathological lesions. The hepatoprotective action of ADS in diets contaminated with AFB1 was observed by maintaining the activity of liver enzymes and histopathology, demonstrating a decrease in the damage caused in high concentrations of AFB1 (400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of AFB1). It is important to highlight that the supplementation of ADS improved the enzymatic activity in the concentration 25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of AFB1 and attenuated the effects with 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  of AFB1.

**Key words:** Mycotoxin, bacteria, liver damage, biomarkers, histopathology.

## CAPÍTULO 1

### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A aquicultura é a atividade que envolve a criação de organismos aquáticos. Dentro desta atividade, encontra-se uma modalidade que está em expansão, o cultivo de peixes em ambientes confinados. Esse sistema de criação vem ganhando destaque na aquicultura nacional, principalmente por apresentar-se economicamente rentável (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017)

A aquicultura brasileira apresenta padrão semelhante à aquicultura mundial, de crescimento constante. De acordo com os dados estatísticos da piscicultura, o Brasil foi responsável pela produção de 758.006 toneladas no ano de 2019 aumentando em 4,9% a sua produção. Neste cenário o Mato Grosso do Sul está ganhando espaço na aquicultura, apresentou um crescimento de 5% em relação ao ano de 2015, e a estimativa é que o estado se torne um dos principais produtores de peixe nos próximos anos (PEIXE-BR, 2020).

No Brasil, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e seus híbridos, são espécies com bom potencial para criação intensiva, devido a rusticidade ao manejo, boa taxa de crescimento e, principalmente, aceitação no mercado consumidor (VALLADÃO; GALLANI, PILARSKI, 2018). De acordo com o IBGE (2019), a produção brasileira destas espécies foi de 11.570,00 toneladas no ano de 2018.

O cultivo de peixes redondos assim como da maior parte dos organismos aquáticos, depende principalmente de alimentos artificiais, e sua alimentação geralmente constitui a fração mais significativa nos custos operacionais das propriedades dedicadas ao cultivo semi-intensivo ou intensivo de peixes. Muitas pesquisas sobre as exigências nutricionais das espécies neotropicais e como melhorar seu desenvolvimento para o setor produtivo estão cada vez mais em evidência (FERNANDES; CARNEIRO; SAMOMURA, 2000; BELO et al., 2005; SADO; BICUDO; CYRINO, 2014). No entanto, o alimento oferecido a esses animais é passível de contaminantes, como as micotoxinas.

As dietas podem eventualmente conter contaminantes oriundos do armazenamento inadequado ou de contaminação previa dos seus produtos de

manufaturas, como insumos utilizados na elaboração de rações (ANATER et al., 2016). As micotoxinas são consideradas substâncias tóxicas quando presentes em alimentos, sendo frequentemente encontrados em produtos como milho, arroz e vários outros cereais, que podem ser contaminados no campo ou durante seu processamento, armazenamento (SFORZA; DALL'ASTA; MARCHELLI, 2006), evienciando um agravante para a saúde de seres humanos, animais, e conseqüentemente um sério problema econômico para a produção animal (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST, 2003; ROCHA et al., 2014)

Na aquicultura, as principais micotoxinas pertencem aos gêneros fúngicos: *Aspergillus* (aflatoxinas, ocratoxina), *Penicillium* (ocratoxina) e *Fusarium* (tricotecenos, fumonisina, zearalenona) (BENNETT; KLICH, 2003; MATEJOVA et al., 2017). Entre essas micotoxinas a AFB1 provoca diminuição no ganho em peso, e imunossupressão em animais, enquanto aumenta a incidência de carcinoma hepatocelular (MISHRA; DAS, 2003), além de uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (DE FREITAS SOUZA et al., 2020)

A AFB1 é uma toxina de grande importância na produção agrícola e pecuária, e quando presente, resulta em um grande impacto negativo para a cadeia de produção que utiliza cereais como fonte alimentar. O milho é utilizado na alimentação de aves, bovinos, suínos e peixes e, quando expostos a essa toxina, apresentam níveis variáveis de mortalidade e morbidade (ZYCHOWSKI et al., 2013).

Este trabalho tem como objetivo avaliar os danos promovidos por aflatoxina B1 acrescidas à dieta e a utilização de adsorvente como produto para minimizar os efeitos deletérios.

Este estudo será composto por dois capítulos. O primeiro capítulo refere-se a revisão bibliográfica descrita conforme as normas vigentes do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Grande Dourados e o segundo capítulo constará com um experimento de intoxicação (DL<sub>50</sub> de Aflatoxina B1) e outro com uso de adsorvente. O segundo capítulo foi redigido conforme as normas de publicação da Revista *Toxins*.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Cenário da piscicultura**



A aquicultura é a atividade que envolve a criação de organismos aquáticos. Dentro desta atividade, encontra-se uma modalidade que está em grande expansão, a produção de peixes, principalmente por apresentar-se economicamente rentável (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017), uma vez que a pesca extrativista vem sendo substituída por esse modelo de produção, a aquicultura.

Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2020), a produção global de pescados atingiu cerca de 179 milhões de toneladas gerando um valor estimado em US\$ 401 bilhões, sendo 82 milhões de toneladas, avaliadas em US\$ 250 bilhões, oriunda da aquicultura. Do montante total, 157 milhões de toneladas, foram destinadas ao consumo humano equivalente a 20,5 kg per capita, o restante da produção (22 milhões de toneladas) foi utilizado principalmente para produção de farinha de peixe. Com relação aos países produtores, a China continua como a maior produtora de pescado com 35% da produção global, seguida pelos demais países asiáticos (34%), americanos (14%), europeus (10%), africanos (7%) e da Oceania (1%).

A aquicultura brasileira apresenta padrão semelhante à aquicultura mundial, de crescimento constante. De acordo com os dados estatísticos da piscicultura, tabulados pela Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE-BR, 2020), o Brasil foi responsável pela produção de 722.560 toneladas no ano de 2018 e 758.006 toneladas em 2019 com um aumento de aproximadamente 5% em relação ao ano de 2018 e com um aumento de 31% em relação ao ano de 2014. Nesse contexto a tilápia *Oreochromis niloticus* representa cerca de 57% da produção nacional (432.143 toneladas) e é responsável por 81,35% da exportação, gerando movimentação de aproximadamente US\$. 9.750.193,00. Os peixes nativos representam 38% na produção total, obtendo um recuo de 2% em relação ao ano de 2018.

Segundos dados do IBGE (2019) o Brasil produziu um total de 11.570,00 toneladas de pacu, nesse cenário o estado do Mato Grosso do Sul contribuiu com 630 toneladas. A região norte do País é responsável pela grande parte da produção da cadeia de peixes nativos, representada principalmente pelo tambaqui (*Colossoma macroporum*), pacu (*Piaractus mopotamicus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e seus híbridos (PEDROZA FILHO et al., 2016). Porém, ainda é um grande desafio para

esta cadeia se fortalecer devido problemas de legislação, logística e sanitário que a região norte apresenta.

## **1.2 *Piaractus mesopotamicus***

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), um peixe teleósteo de água doce da família Characidae, é utilizado como um dos principais peixes de comércio, além de apresentar rusticidade, adaptabilidade à criação artificial e pesca esportiva (LOPES et al., 2006; VALLADÃO; GALLANI, PILARSKI, 2018). É um peixe onívoro, e de fácil adaptação a dietas artificiais (NUNES et al., 2013), possui adaptação às condições climáticas, e apresenta hábito alimentar onívoro, com tendência a herbívora, sendo capaz de se alimentar de frutas, crustáceos, detritos orgânicos, pequenos peixes e moluscos (VALLADÃO; GALLANI, PILARSKI, 2018). É um peixe endêmico da Bacia dos rios Paraná-Paraguai, sendo uma das espécies de peixes mais criadas na América do Sul. É uma espécie nativa que possui uma forma arredondada e tem grande aceitação no mercado devido sua qualidade de carne (BORGES et al., 2013).

Na fase inicial de alevinos, a espécie pode ser criada em sistema intensivo, que proporciona melhores condições de sobrevivência, pois as larvas permanecem mais tempo em laboratório e quando transferidas para os tanques atingem uma maior taxa de sobrevivência (JOMORI et al., 2005). Em relação ao seu desempenho, essa espécie apresenta boa taxa de conversão alimentar (1,4%) mesmo quando é substituído a farinha de peixe por farelo de soja, o que torna a dieta menos onerosa (FERNANDES et al., 2000).

## **1.3 Alimentação do pacu**

O hábito alimentar pode ter características diferentes entre uma espécie e outra e dentro da mesma espécie, onde dependente do alimento disponível, do local de nutrição e do estágio ontogenético. O pacu (*P. mesopotamicus*) se adapta muito bem a dietas extrusadas (NUNES et al., 2013), pois conta com a adaptação do aparelho digestivo e por possuir uma arcada dentaria que facilita a apreensão dos pellets da ração.

Com relação ao sistema digestório, as adaptações são observadas na disposição, configuração, estrutura, relevo da mucosa, comprimento intestinal e pelas conformações das glândulas anexas (HONORATO et al., 2014). Estes autores ainda relatam que o tipo de dieta fornecida “extrusada ou peletizada” influencia no tempo de permanência do alimento no sistema digestório. Assim, um maior tempo de permanência do alimento pode acarretar uma maior pré-disposição em absorver as micotoxinas. Porém, na literatura os relatos do efeito da patogenicidade da AFB1 estão ligados diretamente com o sistema imune e o hepático e ao desenvolvimento corporal (ZYCHOWSKI et al., 2013; DA ROCHA et al., 2014; BEDOYA-SERNA et al., 2018), não havendo relatos de lesão a nível intestinal.

Assim, a qualidade e a frequência do alimento fornecido podem estar relacionadas diretamente com a ocorrência de intoxicação por micotoxinas em peixes, sendo responsáveis por causar danos às espécies, diminuindo o crescimento e gerando perdas econômicas.

#### **1.4 As dietas, níveis de nutrientes e problemas de armazenamento.**

Entre as principais estratégias para otimizar a nutrição de organismos aquáticos está na inclusão balanceada de fontes energéticas (carboidratos e lipídeos) e proteicas nas dietas, com o intuito de um melhor desenvolvimento (HONORATO et al., 2014). A necessidade proteica para o pacu (*P. mesopotamicus*) conforme reportado por BICUDO et al., (2010) e KHAN et al., (2020) tendem a ser menores que outras espécies, tornando a dieta economicamente viável.

Nesse contexto nutricional, ganha destaque os carboidratos, cuja principal fonte é o amido, em especial o de milho (ABIMORAD et al., 2008). O milho é um dos cereais mais acometidos por micotoxinas (BRYDEN, 2012; RUSHING; SELIM, 2019) devido a fatores biológicos (insetos), ambientais (temperatura, umidade) e pelo tempo de colheita (maturidade da cultura, manuseio) além de um armazenamento inadequado (NEME; MOHAMMED, 2017) refletindo diretamente na qualidade do produto. Fatores como a umidade podem propiciar a contaminação durante o armazenamento do grão, onde teores acima de 13% de umidade são passíveis de contaminação (BRYDEN, 2012).

Assim, as micotoxinas são comumente encontradas em todas as etapas da cadeia produtiva, aparecendo no campo antes da colheita, pós-colheita ou durante o processamento, armazenamento, afetando diretamente a qualidade dos alimentos (SFORZA et al., 2006; NEME; MOHAMMED, 2017).

A contaminação da ração pode ocasionar deterioração por fungos, tornando-a um problema para a segurança do alimento, pois apresentam uma alta umidade além de uma temperatura elevada, favorecendo a produção de micotoxinas (ANATER et al., 2020; KEBEDE et al., 2020) devido o armazenamento inadequado.

### 1.5 Legislação sobre as micotoxina

Os limites de contaminação permitido pela legislação sanitária depende da toxicidade da micotoxina em afetar a saúde. Cada país adota uma legislação independente em relação aos limites permitidos. Existem vários fatores a serem considerados na tomada de decisão para a definição de limites para as micotoxinas, o que inclui; fatores científicos, disponibilidade de dados toxicológicos, distribuição de micotoxinas, quais *commodities* e metodologia analítica (ZAIN, 2011)

Alguns estudiosos relatam a tendência na diminuição da concentração permitida das micotoxinas, em alguns países (Austrália; Nova Zelândia) a tolerância para AFB1 passou de 35  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  no ano de 1995 para 20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  em 2002 (VAN EGMOND; JONKER, 2004), demonstrando uma maior preocupação com os efeitos deletérios dessa micotoxina.

As leis que regulamentam a segurança do alimento tanto humano quanto animal tem o objetivo de proteger os consumidores contra os efeitos nocivos das micotoxinas em alimentos *in natura* e processados, e até mesmo em rações para animais de abate e de estimação. De acordo com a Resolução n 7 de 18 de fevereiro de 2011 do Ministério da Saúde que estabelece os limites tolerados de micotoxinas em alimentos, especialmente em cereais, é descrito que o limite de aflatoxinas (AFB1) é de 20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; de ocratoxina A (OTA) 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; fumonisina (FB1 + FB2) 1500  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; e zearalenona (ZON) 150  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (BRASIL, 2011). A Resolução 274 de 15 de outubro de 2002 do Ministério da Saúde, estabeleceu limites máximos de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) admissíveis no leite, amendoim e no milho, tendo como limite máximo permitido

de 20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  em alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2002), assim como nos Estados Unidos, onde o limite máximo aceitável é de 20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para alimentos utilizados na nutrição animal, exceto para farelo de algodão (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2019)

A AFB1 é a micotoxina de maior importância, visto que em 2003 muitos países europeus já adotavam regulamentações com intuito de prevenir a contaminação (FAO, 2004). Isso demonstra o potencial contaminante AFB1 e a preocupação em cumprir as exigências pelos órgãos governamentais responsáveis pela fiscalização em manter os o controle sobre os níveis aceitáveis de contaminação.

Em um estudo recente sobre o continente Africano, Kebede et al, (2020), relatam a necessidade de uma implementação e lei para a fiscalização dos cereais em relação a contaminação por micotoxinas, visto que os níveis encontrados de micotoxinas estão além dos limites da União Europeia, principalmente para amendoim, onde o teor encontrado foi de 2.526  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1, 1.263 vezes do limite máximo estabelecido pela União Europeia o qual é estipulado de 2  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1.

## 1.6 Adsorvente probiótico

O uso de alimentação funcional é crescente na aquicultura, sendo as dietas formuladas não apenas para satisfazer a necessidade nutricional (HONORATO et al., 2012; FUJIMOTO et al., 2007) mas também, prevenir ou reduzir os riscos que possam prejudicar a saúde do animal (VERAS et al., 2016). Os probióticos atuam como suplemento alimentar microbiano vivo, beneficiando a microbiota intestinal, melhorando assim a saúde do animal. (DORCE et al., 2020; CHAUHAN; SINGH, 2019; CRUZ et al., 2012; HONORATO et al., 2012; TAVARES-DIAS; MARTINS; MORAES, 2000; VERSCHUERE et al., 2000). Dentre esses benefícios, alguns autores relatam o potencial de microrganismos na detoxificação biológica de micotoxinas (VERAS et al., 2016; FUCHS et al., 2008).

Os probióticos utilizados na aquicultura incluem bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*), negativas (*Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio alginolyticus*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (IBRAHEM, 2015).

Os probióticos podem influenciar na taxa de crescimento, esporulação e germinação de esporos de fungos, resultando na diminuição de micotoxinas (VERAS et al., 2016). A contaminação dos alimentos com micotoxinas é frequente, porém, com a incorporação de aditivos alimentares é possível influenciar positivamente o sistema imune do animal/peixe (DAWOOD et al., 2020) atuando como um coadjuvante cujos efeitos benéficos promovem o balanço gastrointestinal, influenciando a atividade de enzimas, melhor utilização do alimento, crescimento corporal, estímulo ao sistema imune entre outros (VERSCHUERE, 2000; IBRAHEM, 2015). No que tange o efeito dos probióticos em relação as micotoxinas já presentes no alimento, está ligada a parede celular dos microrganismos, em especial por polissacarídeo da parede celular e o peptidoglicano conforme descrito por Haskard et al. (2001).

Em outro estudo sobre o efeito de um probiótico no transporte, metabolismo e a toxicidade da AFB1 o uso de ADS diminuiu a absorção e o transporte através dos enterócitos, promovendo uma proteção à membrana e ao DNA celular (GRATZ et al., 2007).

A alimentação dos peixes é feita em grande parte por dietas extrusadas, visando uma melhor disponibilidade de nutrientes (Honorato et al., 2012). Essa dieta é processada em alta temperatura, sendo um fator positivo na inclusão de probióticos (bactérias de ácido lático). O calor é um desnaturante proteico, visto a camada de peptidoglicano ser abundante nesses microrganismos, ocorre uma redução na espessura, reduzindo as ligações cruzadas e conseqüentemente aumentando o tamanho dos poros. Assim, essa alteração na conformidade da parede celular bacteriana favorece a um maior contato da AFB1 para se ligar à parede celular e aos constituintes da membrana plasmática (HASKARD et al., 2001; ŚLIŻEWSKA et al., 2019)

## **1.7 Aflatoxina**

A primeira ocorrência por intoxicação de aflatoxinas aconteceu na Inglaterra, com um surto em perus, e ficou conhecida como a doença “X” (BLOUNT, 1961) devido a inclusão de derivados de amendoim oriundos do Brasil. Após dois anos do surto, foram caracterizados os agentes etiológicos causadores desse incidente, sendo

metabólitos secundário de *Aspergillus flavus*, denominados aflatoxinas (ASAO et al., 1963).

Existem quatro compostos produzidos por *A. flavus* que pertencem à classe das aflatoxinas: aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2), caracterizadas com base na sua fluorescência, B (*blue*) e G (*green*) responsivas a luz ultravioleta e sua mobilidade durante a cromatografia de camada fina (ROCHA et al., 2014).

A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais potente desses compostos e foi bem caracterizada por levar ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) em humanos (KEBEDE, 2020) e animais (MISHRA; DAS, 2003; BEDOYA-SERNA et al., 2018), além de provocar um grande impacto econômico negativo.

A AFB1 é uma toxina de importância na produção agrícola e pecuária, resultando em um impacto negativo para a cadeia de produção que utiliza cereais como fonte alimentar. O milho é utilizado na alimentação de diferentes animais de produção, como: aves, bovinos, suínos e peixes e, quando esses animais ingerem alimentos contendo essa toxina, apresentam níveis variáveis de mortalidade e morbidade (ZYCHOWSKI et al., 2013) dependendo da concentração das aflatoxinas (MATEJOVA et al., 2017).

Sua metabolização ocorre a nível hepático com fase I e II. A fase I utiliza o complexo CYP<sub>450</sub> e suas isoenzimas, as quais são hemoproteínas localizadas principalmente no retículo endoplasmático rugoso e nas mitocôndrias onde catalisam/bioativam a AFB1 em um composto o *exo*-AFB1-8,9-epoxide (AFBO) (BAERTSCHI et al., 1988) o qual seguirá para a fase II ou se ligarão ao DNA ocasionando dano celular. A Fase II acontece com a ligação da AFBO a enzima catalisando a conjugação com glutathione GSH tornado os compostos hidrofóbicos carcinogênicos em metabólitos mais solúveis, sendo facilmente desintoxicados e excretados das células (OAKLEY, 2011).

## **1.8 Patogenia das aflatoxinas**

Um grande problema relacionado as micotoxinas são os agravantes para a saúde de seres humanos e animais, de modo silencioso, tornando-se um sério problema econômico para a produção animal e saúde pública (CAST, 2003; ROCHA et al., 2014).

Em um estudo sobre doenças hepáticas relatados no Quênia, pesquisando crianças de 6 a 17 anos de idade, relataram uma associação entre a exposição à aflatoxina e a hepatomegalia crônica (GONG et al., 2012). Em um estudo sobre as micotoxinas no continente Africano, Kebede et al., (2020) falam da necessidade de acompanhamento sobre micotoxinas, pois às más condições socioeconômicas, obrigam a população a consumir produtos alimentícios contaminados, levando a complicações de saúde. Esses autores relatam que maior prevalência de neoplasias hepatocelular na África está associada às aflatoxinas devido à sua potente propriedade carcinogênica natural.

A principal patogenia ocasionada por aflatoxinas é a formação de uma aduto com AFBO e uma das bases nitrogenadas, a guanina. Essa ligação altera a conformidade do DNA alterando a acessibilidade relativa de grupos funcionais (GROOPMAN et al., 1981; MISHRA; DAS, 2003), além de ocasionar uma maior produção e espécies reativas de oxigênio, aumentando as lesões celulares (DE FREITAS SOUZA et al., 2020) o que pode aumentar a atividade enzimática do estresse oxidativo como a Catalase (CAT) e a Superóxido desmutase (SOD).

Em intoxicação crônica de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) utilizando concentração de  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  AFB1 durante 180 dias, não foram encontradas lesões significativas nos animais, os efeitos encontrados foram apenas no peso e no comprimento, refletindo no baixo desempenho (BEDOYA-SERNA et al., 2018). Resultado semelhante obtido para alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) que na concentração de  $204 \mu\text{g Kg}^{-1}$  durante 45 dias de alimentação causou apenas redução no crescimento (LOPES et al., 2005). O que reforça variações de toxicidade entre e intra espécies descritas anteriormente.

Mahfouz e Sherif (2015) trabalhando com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em intoxicação por aflatoxinas na concentração de  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  por 12 semanas observaram aumento significativo das enzimas AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase), além de verificarem um menor índice hepatossomático (IHS). Na histologia hepática, esses autores encontraram



arranjos irregulares dos hepatócitos, vacuolização hepatocelular leve e picnose com alterações gordurosas moderadas dos hepatócitos por 6 semanas de intoxicação. Já com 12 semanas foram observadas alterações gordurosas pronunciadas, com vacuolização severa e perda da estrutura celular hepática, além de picnose.

Em outro estudo com jundiá (*Rhamdia quelen*), Anater et al., (2020) testaram AFB1 durante 56 dias, na concentração de até 180  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , os autores não verificaram alterações nas enzimas ALT, AST e Albumina, porém foram observadas lesões no fígado como; degeneração hepática, edema, esteatose, hepatócitos eosinofílicos, infiltrado inflamatório e necrose tecidual.

A exposição de pessoas e animais a níveis acima de 15  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de aflatoxinas representam risco para a saúde humana e animal (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2018), afetando a segurança alimentar e nutricional reduzindo o acesso das pessoas a alimentos seguros e nutricionalmente ideais, principalmente em países em desenvolvimento, ou em lugares onde o clima e a alta produção de grãos são fatores predisponentes para a contaminação.

## **2. OBJETIVO**

- Este trabalho teve como objetivo avaliar os danos promovidos por aflatoxina B1 acrescidas à dieta e a utilização de adsorvente como produto para minimizar os efeitos deletérios.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar a inclusão de aflatoxina B1 em diferentes concentrações na alimentação de pacu;
- Avaliar a estrutura morfológica do fígado de pacu alimentados com diferentes concentrações de aflatoxina B1;
- Avaliar a bioquímica sérica das enzimas hepáticas dos pacus submetidos a alimentação com dietas contendo aflatoxina B1;
- Avaliar a eficácia da inclusão de adsorvente na remoção de compostos tóxicos com teste in vivo;

- Comparar a bioquímica sérica das enzimas hepáticas dos pacus submetidos a alimentação com dietas contendo adsorventes e aflatoxina B1;
- Avaliar as alterações histopatológicas dos pacus submetidos a alimentação com dietas contendo adsorventes e aflatoxina B1;

### 3. REFERÊNCIAS

- ABIMORAD, E. G; SQUASSONI, G. H.; CARNEIRO, D. J. Apparent digestibility of protein, energy, and amino acids in some selected feed ingredients for pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture nutrition**, v. 14, n. 4, p. 374-380, 2008.
- ANATER, A; ARAÚJO, C. M. T. D; ROCHA, C. C; OSTRENSKY, A; ENGRACIA FILHO, J. R; RIBEIRO, D. R; PIMPÃO, C.T. Evaluation of growth performance, hematological, biochemical and histopathological parameters of *Rhamdia quelen* fed with a feed artificially contaminated with aflatoxin B1. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100326, 2020.
- ASAO, T; BUCHI, G; ABDEL-KADER, M. M; CHANG, S. B; WICK, E. L; WOGAN, G. N. Aflatoxins b and g. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 11, p. 1706-1707, 1963.
- BAERTSCHI, S. W; RANEY, K. D; STONE, M. P; HARRIS, T. M. Preparation of the 8, 9-epoxide of the mycotoxin aflatoxin B1: the ultimate carcinogenic species. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 23, p. 7929-7931, 1988.
- BEDOYA-SERNA, C.M; MICHELIN, E. C; MASSOCCO, M. M; CARRION, L. C., GODOY, S. H; LIMA, C. G; FERNANDES, A. M. Effects of dietary aflatoxin B1 on accumulation and performance in matrinxã fish (*Brycon cephalus*). **PloS one**, v. 13, n. 8, e0201812, 2018.
- BELO, M. A. A; SCHALCH, S. H. C; MORAES, F. R; SOARES, V. E; OTOBONI, A. M. M. B; MORAES, J. E. R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 2-3, p. 146-154, 2005.
- BENNETT, J. W; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BICUDO, A. J. A; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Growth performance and body composition of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 213-222, 2010.
- BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52-55, 1961.

BORGES, A; CONTE-JUNIOR, C. A; FRANCO R. M; FREITAS, M. Q. Quality Index Method (QIM) developed for pacu *Piaractus mesopotamicus* and determination of its shelf life. **Food Research International**, v. 54, p. 311-317, 2013.

BRASIL. Resolução nº 274, de 15 de outubro de 2002. **Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil

BRASIL. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 134-158, 2012.

CHAUHAN, A; SINGH, R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. **Symbiosis**, v. 77, n. 2, p. 99–113, 2019.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE, CAST. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Council for Agricultural, 2003.

CRUZ, P. M; BÁÑEZ, A. L; MONROY HERMOSILLO, O. A; RAMÍREZ SAAD, H. C. Use of Probiotics in Aquaculture. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 13, 2012.

DA ROCHA, M. E. B; FREIRE, F. D. C. O; MAIA, F. E. F; GUEDES, M. I. F; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159-165, 2014.

DAWOOD, M. A; EWEEDAH, N. M; MOUSTAFA, E. M; FARAHAT, E. M. Probiotic effects of *Aspergillus oryzae* on the oxidative status, heat shock protein, and immune related gene expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under hypoxia challenge. **Aquaculture**, v. 520, 734669, 2020.

DE FREITAS SOUZA, C; BALDISSERA, M. D; BALDISSEROTTO, B; PETROLI, T. G; DA GLÓRIA, E. M; ZANETTE, R. A; DA SILVA, A. S. Dietary vegetable choline improves hepatic health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-contaminated diet. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 227, p. 108614, 2020.

DORCE, L. S; MENDONÇA, W. C. B; SIQUEIRA, M. S; SANTOS, R. F. B; SOUSA, R. M; ZIEMNICZAK, H. M; DA SILVA, C. A. H. Atividade das enzimas digestivas frente a restrição alimentar de peixes ornamentais. **Agrarian**, v. 13, n. 47, p. 107-113, 2020.

FERNANDES, J. B. K; CARNEIRO, D. J; SAKOMURA, N. K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 646-653, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. 2020. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome. pp, 244. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas em los alimentos y las raciones en el año 2003**, Roma, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Compliance Policy Guide, Sec. 683.100 Action Levels for Aflatoxins in Animal Food**. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/121202/download>. Acesso em: 09 Out 2020.

FUCHS, S; SONTAG, G; STIDL, R; EHRLICH, V; KUNDI, M; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1398-1407. 2008.

FUJIMOTO, R. Y; CASTRO, M. P. D; HONORATO, C. A; MORAES, F. R. D. Composição corporal e eficiência de utilização de nutrientes por pacus alimentados com ração suplementada com cromo trivalente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 12, p. 1763-1768, 2007.

GONG, Y. Y; WILSON, S; MWATHA, J. K; ROUTLEDGE, M. N; CASTELINO, J. M; ZHAO, B; WILD, C. P. Aflatoxin exposure may contribute to chronic hepatomegaly in Kenyan school children. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 893-896, 2012.

GRATZ, S; WU, Q. K; EL-NEZAMI, H; JUVONEN, R. O; MYKKÄNEN, H; TURNER, P. C. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, 3958-3964, 2007.

GROOPMAN, J. D; CROY, R. G; WOGAN, G. N. In vitro reactions of aflatoxin B1-adducted DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 9, p. 5445-5449, 1981.

HONORATO, C. A; ALMEIDA, L. C. D; NUNES, C. D. S; CARRILHO, E. N. V. M; MORAES, G. Gastrointestinal transit of extruded or pelletized diets in pacu fed distinct inclusion levels of lipid and carbohydrate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 11, p. 829-835, 2014.

HONORATO, C. A; DA SILVA NUNES, C; DE ALMEIDA, L. C; CARRILHO, E. N. V. M; MORAES, G. Digestibilidade de dietas peletizadas e extrusadas para o pacu: quantificação do óxido de cromo. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 10, n. 3, p. 269-275, 2012.

IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 6, p. 765-791, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA – IBGE, 2019. **Pesquisa da Pecuária Municipal, Tabela 3940 - Produção da aquicultura, por tipo de produto**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>, Acesso em: 06 de Outubro de 2020.

JOMORI, R. K; CARNEIRO, D. J; MARTINS, M. I. E. G; PORTELLA, M. C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v. 243, n. 1-4, p. 175-183, 2005.

HASKARD, C. A; EL-NEZAMI, H. S; KANKAANPÄÄ, P. E; SALMINEN, S; AHOKAS, J. T. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3086-3091, 2001.

KEBEDE, H; LIU, X; JIN, J; XING, F. Current status of major mycotoxins contamination in food and feed in Africa. **Food Control**, v. 110, p. 106975, 2020.

KHAN, K. U; GOUS, R. M; MANSANO, C. F. M; NASCIMENTO, T. M. T; ROMANELI, R. D. S; RODRIGUES, A. T; FERNANDES, J. B. K. Response of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) to balanced digestible protein. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 9, p. 3729-3740, 2020.

LOPES R, B, PARAÍBA, L. C; CECCARELLI, P. S; TORNISIELO, V. L. Bioconcentração do inseticida triclorofom em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**. v. 64, p. 56-62. 2006.

LOPES, P. R.S; RADÜNZ NETO, J; MALLMANN, C. A; LAZZARI, R; PEDRON, F. D. A; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 1029-1034, 2005.

MAHFOUZ, M. E; SHERIF, A. H. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 71, p. 48-59, 2015

MATEJOVA, I; SVOBODOVA, Z; VAKULA, J; MARES, J; MODRA, H. Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 2, p. 186-200. 2017.

MISHRA, H. N; DAS, C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 43, n. 3, p. 245-264, 2003.

NEME, K; MOHAMMED, A.. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**, v. 78, p. 412-425, 2017.

NUNES, C. D. S; MORAES, G; FABRIZZI, F; HACKBARTH, A; ARBELÁEZ-ROJAS, G. A. Growth and hematology of pacu subjected to sustained swimming and fed different protein levels. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 48, p. 645-650, 2013.

OAKLEY, A. Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 2, p. 138-151, 2011.

PEIXE-BR. 2020. **Anuário Peixe BR da piscicultura**. Associação Brasileira de Piscicultura, São Paulo, 136 p.

PEDROZA FILHO, M. X; RODRIGUES, A. P. O; REZENDE, F. P. Dinâmica da produção de tambaqui e demais peixes redondos no Brasil. **Boletim Ativos da Aquicultura**, v. 2, p. 1-5, 2016

ROCHA, M. E. B; FREIRE, F. C. O; MAIA, F. E. F; GUEDES, M. I. F; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159-165. 2014.

RUSHING, B. R; SELIM, M. I. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 81-100, 2019.

SADO, R. Y; BICUDO, A. J; CYRINO, J. E. Growth and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed dietary prebiotics (mannanoligosaccharides-MOS). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1517-1524. 2014.

SCHULTER, E. P; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**, Texto para Discussão, No. 2328, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília. 2017

SFORZA, S; DALL'ASTA, C; MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. **Mass Spectrom. Rev**, v. 25, p. 54-76. 2006.

ŚLIŻEWSKA, K; CUKROWSKA, B; SMULIKOWSKA, S; CIELECKA-KUSZYK, J. The effect of probiotic supplementation on performance and the histopathological changes in liver and kidneys in broiler chickens fed diets with aflatoxin B1. **Toxins**, v. 11, 112. 2019.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossomática e esplenosomática em peixes teleosteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 273-281, 2000.

URBINATI, E. C; GONÇALVES, F. D; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 205-244, 2005.

VALLADÃO, G. M. R; GALLANI, S. U; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369. 2018.

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

VERAS, F. F; CORREA, A. P. F., WELKE, J. E., BRANDELLI, A. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. **International journal of food microbiology**, v. 238, p. 23-32, 2016.

VERSCHUERE, L; ROMBAUT, G; SORGELOOS, P; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2018. **Mycotoxins**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins> , Acesso em 13 de outubro de 2020.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZYCHOWSKI, K. E; HOFFMANN, A. R; LY, H. J; POHLENZ, C; BUENTELLO, A; ROMOSER, A; PHILLIPS, T. D. The effect of aflatoxin-B1 on red drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of NovaSil for the prevention of aflatoxicosis. **Toxins**, v. 5, n. 9, p. 1555-1573, 2013.

## CAPÍTULO 2

### **Adsorvente a base de probiótico como protetor hepático para *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo aflatoxina B1**

**Henrique M. Ziemniczak<sup>1\*</sup>, Welinton V. da Silva<sup>1</sup>, Jean C. S. Melo<sup>1</sup>, Klaus C, Saturnino<sup>2</sup>, Jeferson R. Gandra<sup>3</sup> e Claucia A. Honorato<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados- Faculdade de Ciências Agrárias/UFGD-FAC, Laboratório de Aquicultura, Rodovia Dourados/Itahum, km 12, Unidade II, 79.804-970 Dourados MS, Brasil. weliton\_evam@hotmail.com (W.V.S); jean-melo@outlook.com (J.C.S.M); clauciahonorato@ufgd.edu.br (C.A.H)

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Jataí/UFJ, BR 364 km 195, Setor Parque Industrial nº 3800, 75801-615, Jataí, GO, Brasil. klauscasaro@gmail.com (K.C.S)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará/UNIFESSPA – Instituto de Desenvolvimento Agrário e Regional Quadra Sete (Fl.31), Nova Marabá, 68.5075-90 - Marabá, PA, Brasil. jeffersongandra@unifesspa.edu.br (J.R.G)

\*Autor correspondente: henrique.momo@hotmail.com; Tel.; +55 69 9 96005186

#### **Resumo**

Os alimentos utilizados em rações para organismos aquáticos, estão susceptíveis a contaminações por fungos, dentre esses contaminantes, a aflatoxina B1 (AFB1) é um potente carcinógeno que afeta o desenvolvimento, e os parâmetros bioquímicos, principalmente do fígado dos organismos expostos à micotoxina. Para tentar reduzir esses efeitos, adsorventes a base de probióticos (ADS), são promissores na redução dos efeitos deletérios proporcionados pela aflatoxina. Este trabalho foi delineado em dois estudos: (1) avaliar o impacto de AFB1 em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) por 10 dias, alimentados com dietas contendo 0,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 400,0 µg Kg<sup>-1</sup> de AFB1. (2) avaliar a suplementação de ADS incluso na dieta (0,2%) dos peixes alimentados com 0,0; 25,0 e 400,0 µg Kg<sup>-1</sup> de AFB1. A atividade enzimática da AST,



ALT, ALB, CAT e SOD demonstraram lesões hepáticas acima de 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1. A presença de 0,2% ADS melhorou a atividade da AST e ALT com 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1. A ação hepatoprotetora do ADS em dietas contaminadas com AFB1 foi observada através da manutenção da atividade das enzimas e histopatologia hepáticas, demonstrando uma diminuição nos danos provocados em altas concentrações de AFB1 (400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1). A AFB1 é tóxica para pacus acima de 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , porém com o uso de ADS foi possível reduzir a ação tóxica da micotoxina.

**Palavras-chave:** Micotoxina, bactéria, lesão hepática, biomarcadores, histopatologia.

**Contribuição Chave:** O *P. mesopotamicus* é uma espécie sensível a intoxicação por aflatoxina B1. O uso de adsorvente a base de probiótico é uma alternativa eficaz na proteção contra danos hepáticos provocados pelas intoxicações.

---

## 1. Introdução

Entre os peixes redondos, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma das espécies mais produzidas no Brasil, por apresentar boa rusticidade, adaptabilidade à criação, além de ser utilizada em pesca esportiva [3]. A espécie é normalmente encontrada nos rios da Bacia do Prata e do Pantanal, sendo muito utilizada no mercado devido sua qualidade de carne [4].

A criação de peixes em sistema intensivo ou semi-intensivo requer alimentação de qualidade, a fim de evitar distúrbios durante a fase de produção. [5,6]. De acordo com a qualidade do alimento ofertado, problemas de contaminação por micotoxinas nas rações ou em seus componentes [7,8], podem ocorrer, especialmente em rações com umidade acima de 13% [9].

Na aquicultura, as principais micotoxinas pertencem aos gêneros fúngicos: *Aspergillus*, (aflatoxinas, ocratoxina) *Penicillium* (ocratoxina) e *Fusarium* (tricotecenos, fumonisina, zearalenona) [10,11]. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos. A principal micotoxina é a aflatoxina B1 (AFB1) a

qual tem um impacto negativo para a cadeia de produção que utiliza cereais como fonte alimentar, sendo considerada um dos mais potentes agentes carcinogênicos [12,13] .

O órgão mais acometido pela AFB1 é o fígado, onde é metabolizada. Sua hepatotoxicidade é importante tanto para animais, quanto humanos [12, 14], pois proporciona aumento de transaminases hepáticas (aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) com redução do índice hepatossomático (IHS), e uma maior atividade de enzimas do estresse oxidativo (catalase - CAT e superóxido dismutase - SOD) [16,17].

Na produção animal, a AFB1 está presente principalmente no milho, e como este é um alimento base na formulação de rações para aves, bovinos, suínos e peixes, quando estes animais consomem a toxina, podem ter seu desenvolvimento prejudicado [18]. As micotoxinas são um desafio frente à produção de alimentos, principalmente aqueles utilizados na nutrição animal. Devido a necessidade de métodos preventivos contra a intoxicação por estes compostos, são utilizados os adsorventes com o intuito de minimizar seus efeitos patogênicos [1,19,20].

Os adsorventes podem ser classificados em compostos inorgânicos baseados em sílica (minerais aluminossilicatos) ou polímeros orgânicos baseados em carbono (leveduras/bactérias) [21]. Elas adsorvem as toxinas em sua superfície, reduzindo a sua absorção no intestino e, conseqüentemente, diminuindo efeitos tóxicos para o animal [22]. A eficácia destes compostos depende da área de superfície, tamanho de micro poros [23], osmolaridade, solubilidade, carga iônica e constantes de dissociação [24]. Alguns estudos demonstram a baixa eficiência na utilização dos adsorventes [25], portanto há busca por produtos alternativos com menos efeitos adversos, especialmente em peixes [18,19,26].

Considerando a falta de informações para organismos aquáticos neotrópicos sobre o efeito de utilização de adsorvente probiótico em dietas com aflatoxina, o presente estudo objetivou avaliar a ação deletéria de níveis de aflatoxinas e os benefícios da utilização de adsorvente a base de probiótico, bem como sua influência na atividade antioxidante, nos índices bioquímicos e histopatológicos hepáticos.

## **2. Resultados**

## 2.1 Ensaio experimental I – Intoxicação de *Piaractus mesopotamicus* com aflatoxina

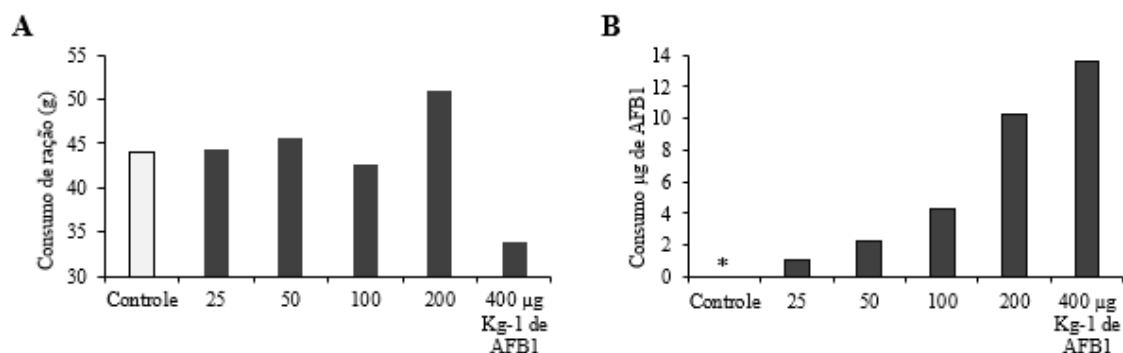
Não foi observada diferença estatística no ganho em peso, conversão alimentar, índice hepatossomático e taxa de crescimento específico. Já o fator de condição obteve diferentes respostas de acordo com o tratamento (Tabela 1). O consumo de dieta foi menor para os peixes alimentados com dietas acrescidas de 400  $\mu\text{g}$ .  $\text{Kg}^{-1}$  de AFB1 (Figura 1). A temperatura ( $27\pm 2$  °C), oxigênio dissolvido ( $5,6\pm 1,2$  mg/L), e pH (6,8 - 7,2) estavam dentro dos níveis adequados.

**Tabela 1.** Índice desenvolvimento de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas acrescidas de AFB1.

	Controle	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	400 $\mu\text{g}$	<i>P</i> *
GP (g)	6,91 $\pm$ 3,86	5,01 $\pm$ 2,00	4,20 $\pm$ 2,31	3,74 $\pm$ 2,08	5,47 $\pm$ 2,76	4,76 $\pm$ 1,73	0,368
CA (g)	1,15 $\pm$ 0,64	1,35 $\pm$ 0,54	1,10 $\pm$ 0,60	1,41 $\pm$ 0,45	1,28 $\pm$ 0,65	1,68 $\pm$ 0,61	0,589
TCE (%)	62,81 $\pm$ 35,11	45,59 $\pm$ 18,24	38,24 $\pm$ 0,28	34,00 $\pm$ 18,92	49,81 $\pm$ 25,16	43,30 $\pm$ 14,74	0,368
RHS	2,04 $\pm$ 0,51	2,30 $\pm$ 0,61	2,14 $\pm$ 0,27	1,96 $\pm$ 0,39	2,36 $\pm$ 0,20	2,54 $\pm$ 0,32	0,177
K	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,33 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	0,16 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,04 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	<0,05

GP, ganho de peso; CA, conversão alimentar; TCE, taxa de crescimento específico; RHS, relação hepatossomática; K, fator de condição alométrico. Médias seguidas de desvio padrão <sup>abc</sup> marcadas com letras diferentes diferem significativamente em  $p < 0,05$  pelo teste Tukey.

O consumo de dieta por tratamento foi menor para os peixes alimentados com dietas acrescidas de 400  $\mu\text{g}$ .  $\text{Kg}^{-1}$  de AFB1 e uma maior ingestão de aflatoxina (Figura 1).



**Figura 1.** (A) Consumo de dieta. (B) Consumo de AFB1 por *Piaractus mesopotamicus*. (\*) dieta controle ausente de AFB1

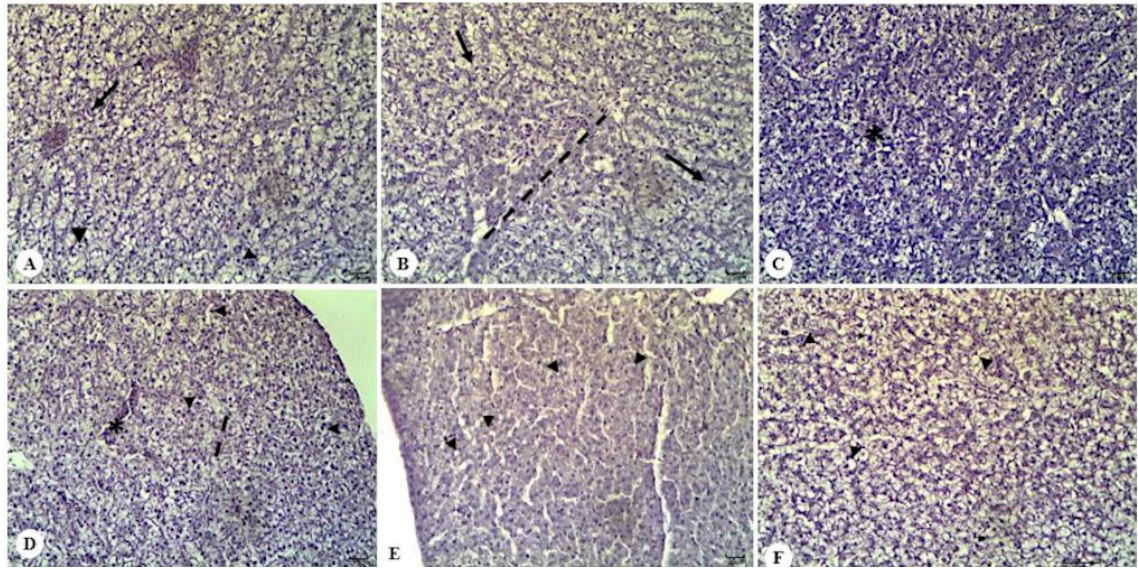
Os níveis hepáticos de AST, ALT, relação AST/ALT foram aumentados pela toxicidade de AFB1 em relação aos peixes alimentados com as dietas controle ( $P < 0,05$ ). A capacidade antioxidante (CAT e SOD) no tecido hepático apresentou uma diminuição da atividade com a presença da AFB1, destacando-se a CAT que diminui a sua atividade conforme aumentou as concentrações de AFB1 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Enzimas metabólicas e oxidativas de fígado de *Piaractus mesopotamicus* submetidos a alimentação com AFB1.

	controle	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	P*
<b>Metabolismo hepático UI/mg proteína</b>							
AST	1,54±0,35 <sup>b</sup>	2,14±0,59 <sup>b</sup>	4,74±1,09 <sup>a</sup>	3,69±0,86 <sup>a</sup>	4,45±1,15 <sup>a</sup>	2,93±1,06 <sup>b</sup>	<0,05
ALT	1,77±0,65 <sup>b</sup>	2,05±1,06 <sup>b</sup>	2,35±1,01 <sup>b</sup>	1,93±0,71 <sup>b</sup>	2,42±0,92 <sup>b</sup>	3,75±0,88 <sup>a</sup>	<0,05
AST/ALT	0,97±0,36 <sup>b</sup>	1,31±0,70 <sup>b</sup>	2,21±0,67 <sup>a</sup>	2,00±0,37 <sup>a</sup>	1,93±0,58 <sup>a</sup>	0,78±0,27 <sup>b</sup>	<0,05
ALB	2,21±0,60 <sup>a</sup>	0,94±0,34 <sup>b</sup>	0,87±0,36 <sup>b</sup>	1,54±0,17 <sup>b</sup>	0,98±0,22 <sup>b</sup>	1,24±0,80 <sup>b</sup>	<0,05
<b>Enzimas oxidativas mmol/min/mg proteína</b>							
CAT	3,62±0,20 <sup>a</sup>	1,73±0,69 <sup>b</sup>	0,88±0,49 <sup>c</sup>	0,39±0,27 <sup>c</sup>	0,29±0,02 <sup>c</sup>	0,27±0,15 <sup>c</sup>	<0,05
SOD	2,48±0,19 <sup>a</sup>	1,3±0,23 <sup>b</sup>	1,89±0,39 <sup>a<sup>b</sup></sup>	1,55±0,72 <sup>b</sup>	1,92±0,37 <sup>ab</sup>	1,69±0,33 <sup>b</sup>	<0,05

AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; ALB, albumina; CAT, catalase; SOD, superóxido desmutase. \*Médias seguidas de desvio padrão <sup>abc</sup> marcadas com letras diferentes diferem significativamente em  $p < 0,05$  pelo teste Tukey.

A inclusão de AFB1 nas dietas para alimentação de *Piaractus mesopotamicus* promoveram lesões hepáticas. Característica de necrose foram observadas a partir do tratamento com 25 µg Kg<sup>-1</sup> de AFB1 (Figura 2B). A concentração de 200 µg Kg<sup>-1</sup> acarretou maior dano hepático, apresentando uma necrose difusa com vesiculação citoplasmática (Figura 2F). A concentração de 400 µg Kg<sup>-1</sup> apresentam um citoplasma proeminente e núcleo periférico, caracterizando esteatose.



**Figura 2.** Histologia de fígado de *P. mesopotamicus*. A, Controle; Arquitetura hepática preservada com hepatócitos organizados de forma cordonal (seta). Notar núcleo preservado e centralizado (ponta da seta). B, 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; Pontos de necrose focal (traço), congestão dos sinusóides e parte da arquitetura preservada em aspecto cordonal (seta). C, 50  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; Área de necrose multifocalmente. (asterisco). D, 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; Necrose em área mais extensa (linha tracejada) com aumento do espaço sinusoidal (asterisco) e núcleos picnóticos (ponta da seta). E, 200  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; Necrose maciça com pontos de vesiculação citoplasmática (ponta da seta) e perda da arquitetura hepática. F, 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; Citoplasma proeminente com núcleos periféricos (ponta da seta), caracterizando um esteatose hepática. (Coloração H&E, Ampliação 200 x)

## 2.2 Ensaio experimental II – uso de adsorvente associado a probióticos em dietas contaminadas com aflatoxina

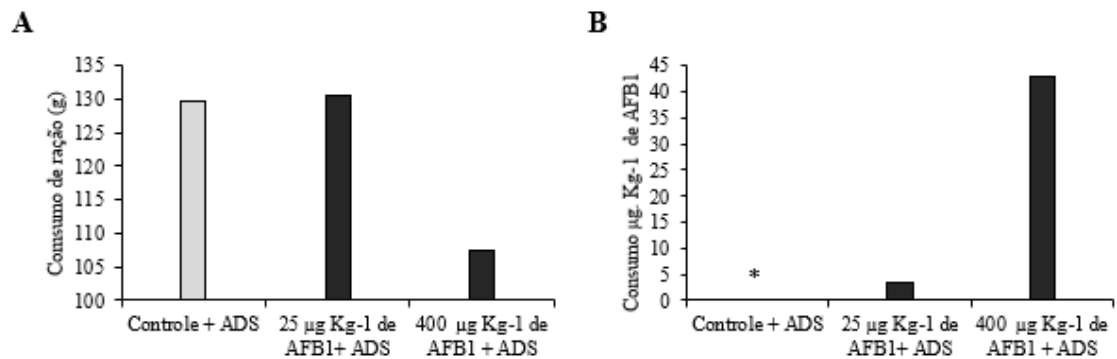
Não foram observadas diferença estatística no ganho em peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e índice hepatossomática (Tabela 3). Porém, o fator de condição teve diferença com a concentração de 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Índice de crescimento de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com adsorvente a base de probiótico

	0 $\mu\text{g} + \text{ADS}$	20 $\mu\text{g} + \text{ADS}$	400 $\mu\text{g} + \text{ADS}$	<i>P</i> *
<b>Desempenho</b>				
GP (g)	10,90 $\pm$ 9,56	9,92 $\pm$ 3,13	9,38 $\pm$ 5,45	0,923
CA (g)	1,01 $\pm$ 0,88	0,91 $\pm$ 0,28	1,04 $\pm$ 0,60	0,930
TCE (%)	0,90 $\pm$ 0,79	1,57 $\pm$ 0,21	0,78 $\pm$ 0,45	0,049
RHS	3,34 $\pm$ 1,02	3,01 $\pm$ 1,54	1,87 $\pm$ 0,45	0,079
K	0,05 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	<0,05

GP, ganho de peso (g); CA, conversão alimentar; TCE, taxa de crescimento específico; RHS, relação hepatossomática; K, fator de condição alométrico. \* Médias seguidas de desvio padrão <sup>abc</sup> marcadas com letras diferentes diferem significativamente em  $p < 0,05$  pelo teste Tukey.

O consumo da dieta por tratamento acrescida de 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  foi menor em relação aos outros tratamentos, porém uma maior ingestão de aflatoxina. (Figura 3).



**Figura 3.** (A) Consumo de dieta. (B) Consumo de AFB1 por *Piaractus mesopotamicus*. (\*) dieta controle ausente de AFB1.

O uso de ADS é eficaz na proteção hepática na concentração de 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 inclusa na ração, por reduzir significativamente a atividade sérica de AST e ALT, além de não influenciar enzimas oxidativas ( $P > 0,05$ ). Os níveis hepáticos de ALT, AST foram maiores para o tratamento com 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 ( $P < 0,05$ ), a relação AST/ALT não foi significativa, apresentando valores próximo a 1. Os níveis de albumina não apresentaram diferença. A capacidade antioxidante (CAT e SOD) no tecido hepático apresentou uma redução com 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1, porém destaca-se o aumento da SOD em sua atividade com as concentrações de AFB1 ( $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

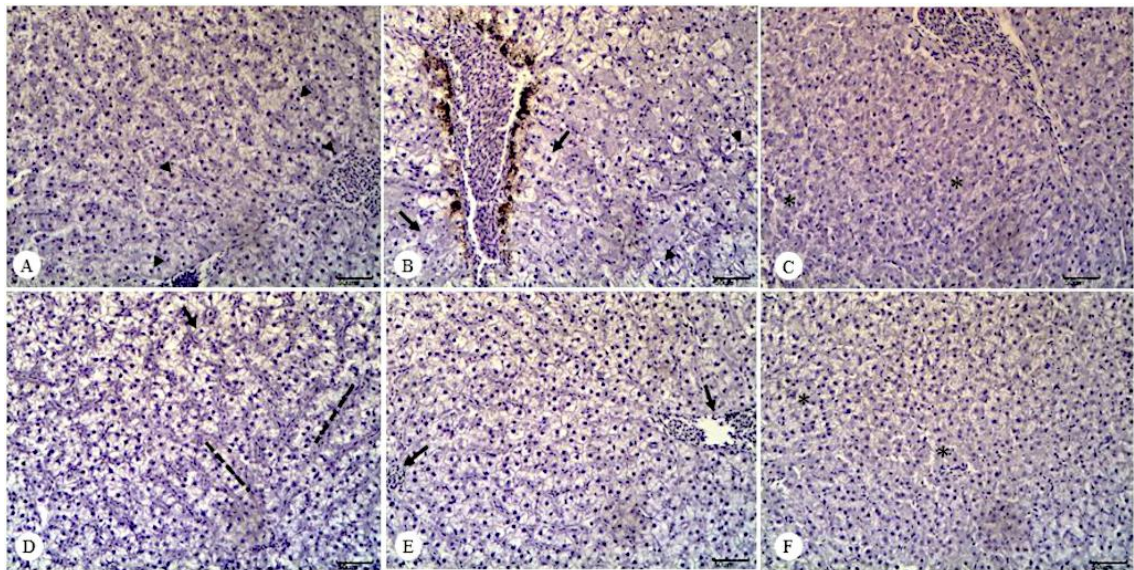
**Tabela 3.** Efeito do ADS em resposta hepática desafiada com AFB1

	0 $\mu\text{g} + \text{ADS}$	25 $\mu\text{g} + \text{ADS}$	400 $\mu\text{g} + \text{ADS}$	<i>P</i> *
<b>Metabolismo hepático UI/mg proteína</b>				
AST	1,33 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	1,09 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	3,17 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	<0,05
ALT	1,38 $\pm$ 0,81 <sup>b</sup>	1,22 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	3,52 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	<0,05
ALB	4,38 $\pm$ 1,52	4,57 $\pm$ 2,43	4,70 $\pm$ 1,06	0,961
AST/ALT	1,05 $\pm$ 0,21	0,88 $\pm$ 0,34	0,90 $\pm$ 0,33	0,143
<b>Enzimas oxidativas mmol/min/mg proteína</b>				
SOD	0,81 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	0,79 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	2,22 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	<0,05
CAT	0,05 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,05	0,635

AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; ALB, albumina; PT, proteína; SOD, superóxido desmutase; CAT, catalase. \* Médias seguidas de desvio padrão <sup>abc</sup> marcadas com letras diferentes diferem significativamente em  $P < 0,05$  pelo teste Tukey.



A inclusão de 0,2% de ADS na dieta para alimentação de *P. mesopotamicus* foi eficaz na concentração de 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 evitando a necrose hepática, principalmente a perivascular (Figura 4E) somados com o valor de ALT e AST (Tabela 4). Porém, em maior concentração (400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) o ADS não foi eficiente, pois ocorrem focos de necrose e perda da arquitetura hepática (Figura 4F) somados com os dados AST e ALT (Tabela 4).



**Figura 3.** Histologia de fígado de *P. mesopotamicus*. A, Controle; Arquitetura hepática preservada, núcleos centralizados com citoplasma bem delimitado (ponta da seta). B, 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; Parte da arquitetura preservada (ponta da seta) mas com necrose perivascular (seta). C, 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1; Necrose multifocal e perda da arquitetura cordonal (asterisco). D, Controle + ADS; Arquitetura normal com arranjo cordonal dos hepatócitos (linha tracejada). E, 25  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 + ADS; Ausência de lesão perivascular (seta). F, 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 + ADS; necrose focal (asterisco) e arranjo cordonal parcialmente comprometido. (Coloração H&E, Ampliação 200 x)

### 3. Discussão

A contaminação por aflatoxina é um problema comum na aquicultura atualmente, resultante do armazenamento inadequado das dietas [15]. *P. mesopotamicus* alimentados com dietas acrescidas de AFB1 apresentaram desequilíbrio no metabolismo antioxidante, hepático e alterações histopatológicas.

A diminuição do consumo de dietas devido à contaminação por AFB1 é refletida pelos baixos índices de crescimento em peixes. Vários estudos reportam a diminuição dos índices zootécnicos de peixes alimentados com dietas contaminadas com AFB1 [7,18,27–30]. Isto pode ser resultado tanto da redução do consumo, como reflexo do processo de intoxicação alimentar [10,29]. Neste estudo, *P. mesopotamicus* submetidos a

400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 à dieta apresentaram diminuição de atividade física, além de apresentarem maior saciedade durante a alimentação. Assim, a voracidade dos peixes em relação aos outros tratamentos foi normal até a inclusão de 200  $\mu\text{g. Kg}^{-1}$  AFB1 na ração, provavelmente não alterando a palatabilidade das dietas. Gonçalves et al. [29] também relatam a diminuição do consumo com concentração superior a 500  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  AFB1 para *Pangasius hypophthalmus*. Esta diminuição do consumo é reportada principalmente pelos danos hepáticos [29,31].

Peixes alimentados com 400  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1 apresentaram perdas de desenvolvimento e menor consumo de dieta o que não impactou no consumo efetivo da toxina. O custo energético para metabolizar a AFB1 é um ponto crítico no processo de desintoxicação [32] e a energia demandada provem preferencialmente do metabolismo aeróbico [33]. As estratégias celulares de metabolização hepática podem ser percebidas pelas alterações bioquímicas e histopatológicas observadas nos peixes alimentados com altas concentrações de AFB1. As lesões hepáticas foram pronunciadas demonstradas pelo aumento da ALT, AST e da relação ALT/AST. A atividade da ALT é citoplasmática, enquanto a AST possui atividade no mitocondrial e citoplasmática [34]. A AST teve uma alta atividade com 200  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  AFB1, caracterizando maior dano hepático, sendo comprovado na histopatologia (Figura 3E).

Zamin Jr. et al. [35] relatam que doenças inflamatórias hepáticas crônicas apresentam aumento da relação AST/ALT. Intoxicações alimentares com compostos tóxicos como éster de forbol apresentam aumentos da AST/ALT para ratos [31] e intoxicações por gossipol [34,36]. A atividade da AST e ALT são reportadas como indicadores de aflatoxicose em peixes [37]. Outros estudos com *Oreochromis niloticus* (100  $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ ) [17], *Pangasius hypophthalmus* (50  $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ ) [29], *Scophthalmus maximus* (500  $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ ) [38] demonstram alteração na atividade das enzimas hepáticas.

Outras espécies de peixes apresentaram alterações hepáticas em baixa concentração de AFB1, como o *Rhamdia quelen* (62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por 56 dias) [7], o híbrido de *Acipenser ruthenus* x *A. baeri* (20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por 35 dias) [39] e *Sciaenops ocellatus* (5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por 49 dias) [18].

O metabolismo da AFB1 no fígado é desenvolvido por meio do complexo citocromo P450, onde é metabolizado em AFB1-8,9-epóxido reativo [40] esse metabólito tem afinidades por macromoléculas nas células (DNA, RNA) formando



adutos celulares, interrompendo os processos de transcrição e tradução [9,10] o que reflete nos danos oxidativos [37,41,42]. A consequência do estresse oxidativo é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) [43] interrompendo a homeostasia celular [25]. A presença de altos níveis hepáticos de radicais hidroxila  $O_2^-$  são reportados como inibidores da CAT [44]. Desta forma, os resultados aqui apresentados revelaram a ocorrência de alteração da CAT evidenciando a hepatotoxicidade indicada pela diminuição da albumina e aumento das enzimas ALT e AST em *P. mesopotamicus* alimentados com dietas contaminadas por AFB1.

A inibição da CAT dos peixes alimentados com AFB1 pode ter contribuído para os aparecimentos das lesões histopatológicas evidenciadas. As observações histopatológicas em *P. mesopotamicus* evidenciam o efeito tóxico do AFB1 e foram relatados para outras espécies de peixes [7,17]. Uma das alterações hepáticas mais descritas após intoxicação com AFB1 é o aumento da vascularização. Estas respostas levam ao aumento no fluxo sanguíneo e maior excreção de catabólitos [43]. A ocorrência de necrose focal pode ser decorrência da maior produção de ROS, devido a ação da AFB1 na mitocôndria celular. A ação deletéria hepática pode ser observada pela maior atividade da AST dos pacus alimentados com AFB1. Estes resultados estão de acordo aos observados na literatura que também relatam aumento da AST hepática [45]. A presença de vacuolização do hepatócito é um sinal de degeneração hepática reportado para peixes contaminados com AFB1 [17] e a deposição de lipídios hepatocelulares [18].

De acordo com os resultados encontrados, há evidências da toxicidade do AFB1 e a perda da capacidade antioxidante. Nossos resultados corroboram os efeitos tóxicos da AFB1 para aves [46], ratos [47] e suínos [48]. envolvendo a diminuição da capacidade antioxidante [17].

A utilização de substâncias que atenuem o efeito da AFB1 vem sendo prospectado para peixes. O uso de adsorventes a base de probiótico (ADS) em dietas contaminadas com AFB1 apresentou efeito positivo nos parâmetros de desempenho e enzimas hepáticas. Os adsorventes tem efeito na degradação/ligação da AFB1 [19]. A presença de probiótico na formulação do adsorvente certamente otimizou os efeitos benéficos. O uso de probiótico na alimentação de peixes estimula a resposta imunológica e reduz o efeito de AFB1 no fígado [38,49]. O uso do adsorvente a base de

probiótico possui estrutura física com uma maior distribuição de carga, tamanho dos poros e a área de superfície [23], facilitando as ligações de hidrogênio e as interações iônicas ou hidrofóbicas com a composição da parede celular probiótica, pois as micotoxinas apresentam diferentes polaridades, solubilidades, formas e distribuição de carga [33].

Outros estudos relatam a eficiência dos adsorventes inorgânicos [18,50], estes compostos podem interagir negativamente na absorção de nutrientes e minerais [25], os adsorventes orgânicos podem, além de diminuir os efeitos da AFB1, proporcionarem melhora à flora microbiológica intestinal favorecendo a absorção de nutrientes e eficácia de utilização [26,37,38,51,52].

A ação hepatoprotetora do ADS em dietas contaminadas com AFB1 foi observada através na manutenção da atividade das enzimas hepáticas. Ressalta-se que em doses muito elevadas ( $400 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1), a manutenção hepática é mais sutil, sugerindo adaptação hepática. Ao incluir o ADS nas dietas contendo  $400 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1, o metabolismo oxidativo responde de forma positiva, pois, a atividade da SOD foi superior a dieta controle. Este aumento da atividade da SOD pode atuar fornecendo substrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para atividade da CAT. A atividade da CAT foi mantida, o que nos sugere que esta foi utilizada no metabolismo lipídico hepático, uma vez que foram observados diminuição dos danos histopatológicos hepáticos. Algumas substâncias são capazes de promover efeito hepatoprotetor diminuindo as enzimas hepáticas (ALT e AST) e melhorando a arquitetura hepática, como a presença de núcleo centralizado [53]. Análises histopatológicas do fígado confirmam sua ação moduladora frente ao alimento fornecido. As adaptações morfológicas no fígado demonstrando o bom funcionamento do órgão, podendo refletir no desempenho da funcionalidade do hepatopâncreas [54]

A utilização de ADS em dietas influencia benéficamente o sistema gastrointestinal, influenciando a atividade de enzimas, melhorando utilização do alimento, crescimento corporal, estímulo do sistema imune além da capacidade de adsorção de aflatoxina B1 [55–57].

Neste estudo foram observados efeitos benéficos do ADS com a presença de AFB1, diminuindo a atividade da ALT, AST além de estimular a SOD, estes resultados benéficos do ADS podem ser comprovados na histologia hepática, onde observamos redução de lesão da arquitetura hepática com  $400 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de AFB1.

#### 4. Conclusão

As dietas com AFB1 apresentam efeitos deletérios graves nas funções hepáticas e perda da capacidade antioxidante. A adição de ADS em dietas contaminadas com AFB1 promoveu o efeito hepatoprotetor evidenciado pela melhora das funções hepáticas e aumentando a capacidade de metabolizar nutrientes.

#### 5. Materiais e Métodos

##### 5.1 Preparação da AFB1

A AFB1 foi adquirida na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Brasil. A concentração da micotoxina foi de 200 mg Kg<sup>-1</sup>, a qual já estava estabelecida. Para facilitar a adição da micotoxina na dieta, foi feito um premix da micotoxina com farelo de arroz desengordurado na proporção de 1 x 1 e utilizado uma balança analítica pesagem até a concentração desejada. O ADS utilizado foi o ANTIMICOX MA, fornecido pela empresa Biomart Nutrição Animal, (Martinópolis-SP, Brasil) e recomendada a inclusão de 0,2% da dieta. A composição estimada foi de: Metionina 10,000 g/kg; Ferro 640,00 mg/kg; Silimarina 250,00 mg/kg; Selênio 50 mg/kg; Vitamina E 5.000,00 UI; *Bacillus subtilis* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg; *Bifidobacterium bifidum* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg; *Enterococcus faecium* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg; *Lactobacillus acidophilus* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg; *Lactobacillus casei* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg; *Lactobacillus lactis* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg; *Lactobacillus plantarum* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg; *Pediococcus acidilactici* 1,0 x 10<sup>12</sup> UFC/kg

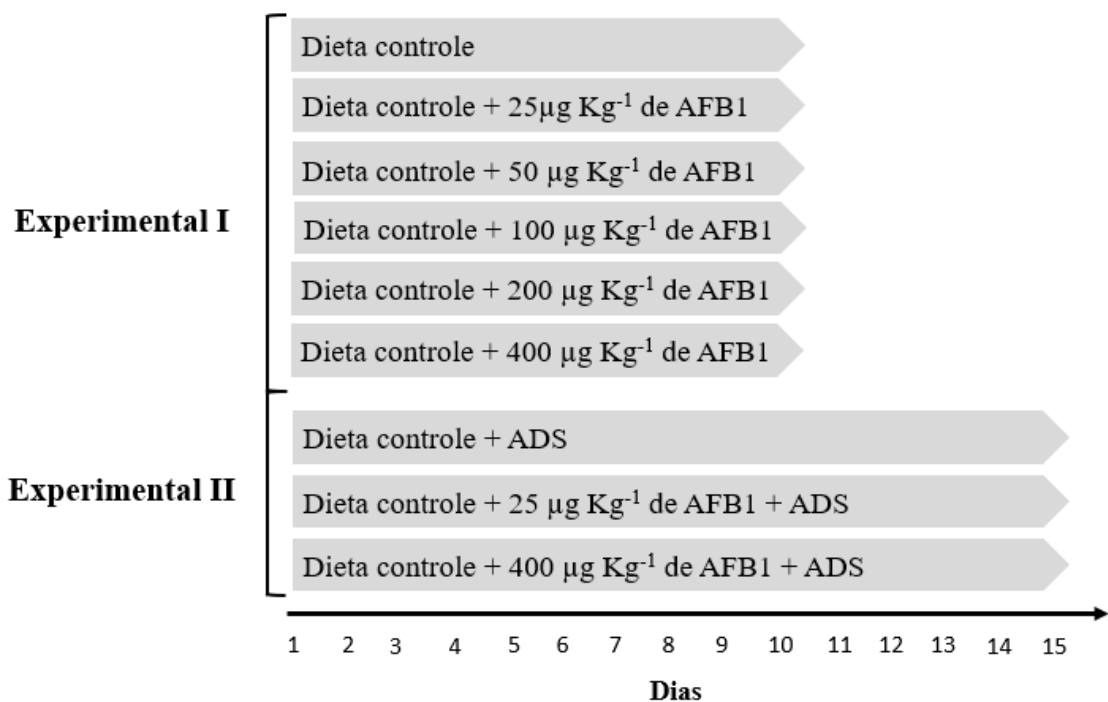
##### 5.2 Preparo das dietas experimentais

A ração foi triturada em moinho de facas tipo Wiley, com peneira de 1 mm e as concentrações ajustadas para obtenção das dietas experimentais adicionando-se farelo de arroz desengordurado (concentração do produto). Estes foram peletizados em moedor de carne com disco moedor de 1,4 mm de diâmetro de orifício. Os grânulos foram secos a 45°C em estufa e armazenados a 4°C até a utilização. Para as dietas

acrescidas com adsorvente a base de probiótico (0,2%), estes foram adicionados a dieta antes do processo de peletização.

### 5.3 Animais experimentais e manejo

Juvenis (n=144) de *P. mesopotamicus* foram adquiridos em piscicultura comercial, localizada no município de Dourados-MS, Brasil. O ensaio de alimentação foi realizado no Laboratório de Produção Aquícola da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD. Os peixes foram previamente aclimatados por 96 horas com dieta comercial (32% PB) em sistema de recirculação de água. Após aclimatação, foram montadas unidades experimentais apresentadas na figura 1.



**Figura 4.** Representação esquemática experimental, com duas fases experimentais

### 5.4 Ensaio experimental I – Intoxicação de *P. mesopotamicus* com aflatoxina B1

Setenta e dois peixes foram pesados e medidos ( $8 \pm 1,04$ g e  $2,7 \pm 0,24$  cm), e mantidos em jejum por 24 horas. Eles foram distribuídos em 12 unidades experimentais de 50L, contendo seis espécimes em cada, em sistema de recirculação. Para cada duas

unidades experimentais, foram administrados os seguintes tratamentos: controle (0,0 µg AFB kg<sup>-1</sup>), 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 400,0 µg de aflatoxina B1 por quilo de ração comercial. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, sempre as 08:00 e 16:00h, até aparente saciedade, por um período de 10 dias. Durante o período experimental, foram obtidos os parâmetros físicos e químicos da água diariamente com uma sonda multiparâmetro, para temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD, mg/L) e pH.

Ao final do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas e aferida a taxa de sobrevivência. Seis espécimes de cada tratamento foram separados para análise enzimática e os outros seis peixes separados para análises histopatológicas.

#### 5.5 *Ensaio experimental II – uso de adsorvente associado a probióticos em dietas contaminadas com aflatoxina*

Com base nos estudos do ensaio experimental I estabeleceram os efeitos negativos de AFB1 em *P. mesopotamicus*, 0 e 25 µg de aflatoxina B1 por quilo de ração (baixa contaminação) e 400 µg de aflatoxina B1 por quilo de ração (alta contaminação). Estes foram incluídos na dieta resultando em três dietas acrescido com adsorvente a base de probiótico (0,2%).

Para tal, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, pesados, medidos (12±1,3g e 3,8±0,25 cm). 72 peixes foram distribuídos em 12 unidades experimentais de 50L em sistema de recirculação. Em cada tanque foi cultivado seis peixes. As três dietas experimentais (Controle, 25 e 400 µg de AFB kg<sup>-1</sup> em dieta comercial acrescidas de 0,2% de adsorvente a base de probiótico. Os peixes foram sempre alimentados as 08:00 e 16:00h, com fornecimento das respectivas dietas até saciedade aparente, por um período de 15 dias. Além disso, realizou-se o acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da água quanto a temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L) e pH, com auxílio de sonda multiparâmetro HANNA.

Ao final do período experimental, os animais passaram por jejum de 24 horas e, em seguida, calculou-se a taxa de sobrevivência. Depois, de cada grupo experimental, foram selecionados aleatoriamente, seis peixes para colheita de material e realização de análise enzimática, e outros seis para análises histopatológicas.

### 5.6 *Desempenho zootécnico*

O desempenho foi obtido a partir das seguintes fórmulas: ganho em peso (GP) = (peso final - peso inicial) / tempo, Consumo (C) = consumo de alimento no período experimental, Conversão alimentar (CA) = consumo/ ganho em peso, Taxa de crescimento específico (TCE) = ((ln peso final - ln peso inicial)/tempo) x 100), Relação hepatossomática (RHS) = (peso fígado / peso corporal) x 100 [58], Fator de condição (K) pelo método alométrico, a partir da expressão  $K = W/L^b$ , onde  $W$  representa o peso,  $L$  o comprimento padrão dos indivíduos, e  $b$ , o coeficiente obtido a partir da análise de regressão da relação peso-comprimento ajustada em logaritmo dos dados dos indivíduos amostrados [59,60].

### 5.7 *Análises bioquímicas*

O tecido hepático (100 mg) foi utilizado para análise de enzimas metabólicas alanina aminotransferase (ALT) e aminotransferase aspartato (AST), albumina e atividade das enzimas do metabolismo oxidativo (CAT – catalase e SOD- superóxido desmutase). Os tecidos hepáticos de cada grupo experimental foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (glicerol v/v em tampão fosfato de sódio 20 mM e Tris 10 mM - pH 7.0) com um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Em seguida, foram centrifugados a 600 g a 4°C por três minutos e o sobrenadante submetido a nova centrifugação a 6000 g a 4°C por oito minutos.

A partir deste produto, o sobrenadante foi coletado para análise enzimática por espectrofotometria (espectrofotômetro semiautomático BIOPLUS S200), em comprimentos de onda adequados para cada teste [61]. A albumina foi estimada com o uso de *kits* comerciais (Gold Analisa Diagnóstica®) conforme as instruções do fabricante, e a determinação do método se deu pela leitura em espectrofotômetro, realizado em equipamento semiautomático BIOPLUS S200.

A SOD foi testada por auto oxidação do pirogalol, que é inibida na presença de SOD [62]. As leituras de absorbância foram realizadas em 420 nm, considerando que 1,0 UI inibe 50% a auto oxidação do pirogalol.

A atividade da CAT foi avaliada pela diminuição da absorbância de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 230 nm [62]. Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária em  $1,0 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$  de oxidação, e a absorvidade molar usada foi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $\epsilon_{\lambda 230} = 0,071 \text{ mM cm}^{-1}$ . A proteína foi determinada com reagente de Bradford contra uma solução padrão de BSA [63].

Concentrações proteicas em extratos brutos enzimáticos foram determinadas conforme Bradford [64] em 450nm, e  $1,0\text{mg mL}^{-1}$  de albumina foi usado como padrão.

### 5.8 *Análise histopatológica do fígado e intestino*

Fragmentos de fígado foram imersos na solução de formol tamponado a 4% por 24 horas e posteriormente lavados em 70% de álcool. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções de etanol crescente (70%, 80%, 90% e 96%), diafanizados e incorporando em parafina com polímero plástico Histosec (Merck). A microtomia foi realizada para obter 5 lâminas com  $5 \mu\text{m}$  de espessura, que foram coradas por hematoxilina-eosina (HE). A análise microscópica e a documentação do material foram realizadas utilizando-se um microscópio (Olympus, BX41). Em primeiro lugar, foram realizadas análises histológicas qualitativas para observar os principais efeitos do tratamento. Com base nessas observações, foram definidas análises quantitativas. Para a morfometria do material foram selecionadas sete lâminas por tratamento e sete seções foram fotografadas com câmera Motic 3.0.

### 5.9 *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software RStudio (versão 1.1.423 – © 2009-2018 RStudio, Inc.). A homogeneidade de normalidade e variância dos dados dos parâmetros hepáticos foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Foi realizada análise de variância (ANOVA) e quando as diferenças foram significativas ( $P < 0,05$ ), as médias foram comparados pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### **Declaração de Ética**

O estudo em animais foi revisado e aprovado pelo Comitê de Cuidados com Animais da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD (Protocolo 03/2019)

**Contribuição dos Autores:** Contextualização, H.M.Z., C.A.H e J.R.G.; metodologia, H.M.Z e C.A.H.; análise formal, H.M.Z e C.A.H.; análise amostral, H.M.Z., W.V.S e J.C.S.M.; escrita original, H.M.Z e C.A.H.; escrita revisada, H.M.Z., C.A.H., J.R.G e K.C.S.; supervisão, C.A.H e J.R.G, administração do projeto, C.A.H. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

**Financiamento:** Este projeto não obteve financiamento.

**Agradecimentos:** Os autores gostariam de agradecer a Dacley Hertes Neu, Vanessa Lewandowski e Ariana Padua pelo apoio durante este estudo.

**Conflito de Interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## 6. Referência

1. Gratz, S.; Wu, Q.K.; El-Nezami, H.; Juvonen, R.O.; Mykkänen, H.; Turner, P.C. *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG Reduces Aflatoxin B<sub>1</sub> Transport, Metabolism, and Toxicity in Caco-2 Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 3958–3964, doi:10.1128/AEM.02944-06.
2. Honorato, C.A.; Da Silva Nunes, C.; De Almeida, L.C.; Vasconcelos Martins Carrilho, E.N.; Moraes, G. Digestibilidade De Dietas Peletizadas E Extrusadas Para O Pacu: Quantificação Do Óxido De Cromo. *Rev. Acadêmica Ciência Anim.* **2012**, *10*, 269, doi:10.7213/academica.7712.
3. Lopes, R.B.; Paraiba, L.C.; Ceccarelli, P.S.; Tornisielo, V.L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Chemosphere* **2006**, *64*, 56–62, doi:10.1016/j.chemosphere.2005.11.029.
4. Borges, A.; Conte-Junior, C.A.; Franco, R.M.; Freitas, M.Q. Quality Index Method (QIM) developed for pacu *Piaractus mesopotamicus* and determination



- of its shelf life. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 311–317, doi:10.1016/j.foodres.2013.07.012.
5. Pahor-Filho, E.; Júnior, J.P.; Pilarski, F.; Urbinati, E.C. Levamisole reduces parasitic infection in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* **2017**, *470*, 123–128, doi:10.1016/j.aquaculture.2016.12.034.
  6. Rushing, B.R.; Selim, M.I. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *124*, 81–100, doi:10.1016/j.fct.2018.11.047.
  7. Anater, A.; Araújo, C.M.T.D.; Rocha, D.C.C.; Ostrensky, A.; Filho, J.R.E.; Ribeiro, D.R.; Pimpão, C.T. Evaluation of growth performance, hematological, biochemical and histopathological parameters of *Rhamdia quelen* fed with a feed artificially contaminated with aflatoxin B1. *Aquac. Reports* **2020**, *17*, 100326, doi:10.1016/j.aqrep.2020.100326.
  8. Neme, K.; Mohammed, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control* **2017**, *78*, 412–425.
  9. Bryden, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *173*, 134–158, doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014.
  10. Matejova, I.; Svobodova, Z.; Vakula, J.; Mares, J.; Modra, H. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. *J. World Aquac. Soc.* **2017**, *48*, 186–200, doi:10.1111/jwas.12371.
  11. Bennett, J.W.; Klich, M.; Mycotoxins, M. Mycotoxins. **2003**, *16*, 497–516, doi:10.1128/CMR.16.3.497.
  12. Squire, R.A. Ranking Animal Carcinogens: A Proposed Regulatory Approach. *Science (80-. )*. **1981**, *214*, 877–880, doi:10.1126/science.7302565.
  13. Anttila, A.; Bhat, R. V.; Bond, J.A.; Bosch, F.X.; Carlson, G.P.; Henry, S.H. Some Mycotoxins. In *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene.*; World Health Organization: Lyon, France., 2002; pp. 171–249. ISBN 9283212827.
  14. Gong, Y.Y.; Wilson, S.; Mwatha, J.K.; Routledge, M.N.; Castelino, J.M.; Zhao,

- B.; Kimani, G.; Curtis Kariuki, H.; Vennervald, B.J.; Dunne, D.W.; et al. Aflatoxin exposure may contribute to chronic hepatomegaly in Kenyan school children. *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 893–896, doi:10.1289/ehp.1104357.
15. Kebede, H.; Liu, X.; Jin, J.; Xing, F. Current status of major mycotoxins contamination in food and feed in Africa. *Food Control* **2020**, *110*, 106975, doi:10.1016/j.foodcont.2019.106975.
  16. de Freitas Souza, C.; Baldissera, M.D.; Baldisserotto, B.; Petrolli, T.G.; da Glória, E.M.; Zanette, R.A.; Da Silva, A.S. Dietary vegetable choline improves hepatic health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-contaminated diet. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *227*, 108614, doi:10.1016/j.cbpc.2019.108614.
  17. Mahfouz, M.E.; Sherif, A.H. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. *J. Basic Appl. Zool.* **2015**, *71*, 48–59, doi:10.1016/j.jobaz.2015.04.008.
  18. Zychowski, K.E.; Rodrigues Hoffmann, A.; Ly, H.J.; Pohlenz, C.; Buentello, A.; Romoser, A.; Gatlin, D.M.; Phillips, T.D. The effect of aflatoxin-B1 on red drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of NovaSil for the prevention of aflatoxicosis. *Toxins (Basel)*. **2013**, *5*, 1555–1573, doi:10.3390/toxins5091555.
  19. Śliżewska, K.; Cukrowska, B.; Smulikowska, S.; Cielecka-Kuszyk, J. The Effect of Probiotic Supplementation on Performance and the Histopathological Changes in Liver and Kidneys in Broiler Chickens Fed Diets with Aflatoxin B1. *Toxins (Basel)*. **2019**, *11*, 1–15, doi:10.3390/toxins11020112.
  20. Fuchs, S.; Sontag, G.; Stidl, R.; Ehrlich, V.; Kundi, M.; Knasmüller, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1398–1407, doi:10.1016/j.fct.2007.10.008.
  21. Xu, R.; Karrow, N.A.; Shandilya, U.K.; Sun, L.H.; Kitazawa, H. In-vitro cell culture for efficient assessment of mycotoxin exposure, toxicity and risk mitigation. *Toxins (Basel)*. **2020**, *12*, 1–31, doi:10.3390/toxins12030146.
  22. Galvano, F.; Piva, A.; Ritieni, A.; Galvano, G. Dietary strategies to counteract

- the effects of mycotoxins: A review. *J. Food Prot.* **2001**, *64*, 120–131, doi:10.4315/0362-028X-64.1.120.
23. Di Natale, F.; Gallo, M.; Nigro, R. Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *J. Food Eng.* **2009**, *95*, 186–191, doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.04.023.
24. Faucet-Marquis, V.; Joannis-Cassan, C.; Hadjeba-Medjdoub, K.; Ballet, N.; Pfohl-Leszkowicz, A. Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: Case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 7583–7596, doi:10.1007/s00253-014-5917-y.
25. Elliott, C.T.; Connolly, L.; Kolawole, O. Potential adverse effects on animal health and performance caused by the addition of mineral adsorbents to feeds to reduce mycotoxin exposure. *Mycotoxin Res.* **2020**, *36*, 115–126, doi:10.1007/s12550-019-00375-7.
26. Pinheiro, R.E.E.; Rodrigues, A.M.D.; Lima, C.E.; Santos, J.T.O.; Pereyra, C.M.; Torres, A.M.; Cavaglieri, L.R.; Lopes, J.B.; Muratori, M.C.S. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic agent and a possible aflatoxin B1 adsorbent in simulated fish intestinal tract conditions. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* **2020**, *72*, 862–870, doi:10.1590/1678-4162-11280.
27. Ayyat, M.S.; Ayyat, A.M.N.; Al-Sagheer, A.A.; El-Hais, A.E.A.M. 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* **2018**, *495*, 27–34, doi:10.1016/j.aquaculture.2018.05.030.
28. Bedoya-Serna, C.M.; Michelin, E.C.; Massocco, M.M.; Carrion, L.C.S.; Godoy, S.H.S.; Lima, C.G.; Ceccarelli, P.S.; Yasui, G.S.; Rottinghaus, G.E.; Sousa, R.L.M.; et al. Effects of dietary aflatoxin B1 on accumulation and performance in matrinxã fish (*Brycon cephalus*). *PLoS One* **2018**, *13*, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0201812.
29. Gonçalves, R.A.; Do Cam, T.; Tri, N.N.; Santos, G.A.; Encarnaç o, P.; Hung, L.T. Aflatoxin B1 (AFB1) reduces growth performance, physiological response, and disease resistance in Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *Aquac. Int.*

- 2018**, 26, 921–936, doi:10.1007/s10499-018-0259-x.
30. Zeng, Z.Z.; Jiang, W.D.; Wu, P.; Liu, Y.; Zeng, Y.Y.; Jiang, J.; Kuang, S.Y.; Tang, L.; Zhou, X.Q.; Feng, L. Dietary aflatoxin B1 decreases growth performance and damages the structural integrity of immune organs in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture* **2019**, 500, 1–17, doi:10.1016/j.aquaculture.2018.09.064.
  31. Honorato, C.A.; Silva, C.J. da; Flores-Quintana, C.I.; Mendonça, S.; Nascimento, C.A.; Marcondes, V.M.; Parente, B.O.; Araújo, M.A.M. de Torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas*): implicações hepatotóxicas. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2017**, 54, 101–108, doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.79390.
  32. Pan, L.; Chang, P.; Jin, J.; Yang, Q.; Xing, F. Dimethylformamide Inhibits Fungal Growth and Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus* by Down-Regulating Glucose Metabolism and Amino Acid Biosynthesis. *Toxins (Basel)*. **2020**, 12, 683, doi:10.3390/toxins12110683.
  33. Afshar, P.; Shokrzadeh, M.; Raeisi, S.N.; Ghorbani-HasanSaraei, A.; Nasiraii, L.R. Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon* **2020**, 178, 50–58, doi:10.1016/j.toxicon.2020.02.007.
  34. Fonseca, N.B. da S.; Gadelha, I.C.N.; Oloris, S.C.S.; Soto-Blanco, B. Effectiveness of albumin-conjugated gossypol as an immunogen to prevent gossypol-associated acute hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 56, 149–153, doi:10.1016/j.fct.2013.02.010.
  35. ZAMIN Jr., I.; MATTOS, A.A. de; PERIN, C.; RAMOS, G.Z. A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não-alcoólica. *Arq. Gastroenterol.* **2002**, 39, 22–26, doi:10.1590/s0004-28032002000100005.
  36. de Carvalho, W.L.; Maioli, M.A.; Mendes, L.C.N.; Rozza, D.B.; Mingatto, F.E. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossypol. *Pesqui. Vet. Bras.* **2013**, 33, 339–344, doi:10.1590/S0100-736X2013000300011.
  37. Abdel-Daim, M.M.; Dawood, M.A.O.; AlKahtane, A.A.; Abdeen, A.; Abdel-Latif, H.M.R.; Senousy, H.H.; Aleya, L.; Alkahtani, S. *Spirulina platensis* mediated the biochemical indices and antioxidative function of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intoxicated with aflatoxin B1. *Toxicon* **2020**, 184, 152–157, doi:10.1016/j.toxicon.2020.06.001.

38. Jinzhu, Y.; Tiantian, W.; Gang, L.; Mingzhu, L.; Ronghua, Z.; Yiannikouris Alexandros; Yanjiao, Z.; Kangsen, M. The Assessment of Diet Contaminated with Aflatoxin B 1 in Juvenile Turbot ( *Scophthalmus maximus* ) and. *Toxins (Basel)*. **2020**, *12*, 597, doi:10.3390/toxins12090597.
39. Rajeev Raghavan, P.; Zhu, X.; Lei, W.; Han, D.; Yang, Y.; Xie, S. Low levels of Aflatoxin B1 could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♂×*A. baeri* ♀. *Aquac. Nutr.* **2011**, *17*, e39–e47, doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00725.x.
40. Evan, G.; David, E. In Vitro Biotransformation of Aflatoxin B1 (AFB1) in Channel Catfish Liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1995**, *132*, 82–90, doi:10.1006/taap.1995.1089.
41. Marin, D.E.; Taranu, I. Overview on aflatoxins and oxidative stress. *Toxin Rev.* **2012**, *31*, 32–43, doi:10.3109/15569543.2012.730092.
42. Da Silva, E.O.; Bracarense, A.P.F.L.; Oswald, I.P. Mycotoxins and oxidative stress: Where are we? *World Mycotoxin J.* **2018**, *11*, 113–133, doi:10.3920/WMJ2017.2267.
43. Venturini, F.P.; de Moraes, F.D.; Rossi, P.A.; Avilez, I.M.; Shiogiri, N.S.; Moraes, G. A multi-biomarker approach to lambda-cyhalothrin effects on the freshwater teleost matrinxa *Brycon amazonicus*: single-pulse exposure and recovery. *Fish Physiol. Biochem.* **2019**, *45*, 341–353, doi:10.1007/s10695-018-0566-1.
44. Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* **2010**, *78*, 294–299, doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047.
45. Abdelhiee, E.Y.; Elbially, Z.I.; Saad, A.H.; Dawood, M.A.O.; Aboubakr, M.; El-Nagar, S.H.; El-Diasty, E.M.; Salah, A.S.; Saad, H.M.; Fadl, S.E. The impact of *Moringa oleifera* on the health status of Nile tilapia exposed to aflatoxicosis. *Aquaculture* **2020**, 736110, doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736110.
46. Ali Rajput, S.; Sun, L.; Zhang, N.; Mohamed Khalil, M.; Gao, X.; Ling, Z.; Zhu, L.; Anwar Khan, F.; Zhang, J.; Qi, D. Ameliorative Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Growth Performance, Immune Function, Antioxidant Capacity, Biochemical Constituents, Liver Histopathology and

- Aflatoxin Residues in Broilers Exposed to Aflatoxin B 1. *Toxins (Basel)*. **2017**, *9*, 371, doi:10.3390/toxins9110371.
47. Abdel-Wahhab, M.A.; El-Nekeety, A.A.; Hathout, A.S.; Salman, A.S.; Abdel-Aziem, S.H.; Hassan, N.S.; Abdel-Aziz, M.S. Secondary metabolites from *Bacillus* sp. MERNA97 extract attenuates the oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity of aflatoxin B1 in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *141*, 111399, doi:10.1016/j.fct.2020.111399.
  48. Taranu, I.; Marin, D.E.; Palade, M.; Pistol, G.C.; Chedea, V.S.; Gras, M.A.; Rotar, C. Assessment of the efficacy of a grape seed waste in counteracting the changes induced by aflatoxin B1 contaminated diet on performance, plasma, liver and intestinal tissues of pigs after weaning. *Toxicon* **2019**, *162*, 24–31, doi:10.1016/j.toxicon.2019.02.020.
  49. Cruz, P.M.; Ibáñez, A.L.; Monroy Hermosillo, O.A.; Saad, H.C.R. Use of Probiotics in Aquaculture. *Int. Sch. Res. Netw. ISRN Microbiol.* **2012**, *2012*, 13, doi:10.5402/2012/916845.
  50. Selim, K.M.; El-hofy, H.; Khalil, R.H. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B1-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Aquac. Int.* **2014**, *22*, 523–540, doi:10.1007/s10499-013-9661-6.
  51. Veras, F.F.; Correa, A.P.F.; Welke, J.E.; Brandelli, A. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *238*, 23–32, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.035.
  52. Imani, A.; Salimi Bani, M.; Noori, F.; Farzaneh, M.; Moghanlou, K.S. The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. *Aquaculture* **2017**, *476*, 160–167, doi:10.1016/j.aquaculture.2017.04.023.
  53. do Carmo Ota, E.; Honorato, C.A.; Heredia-Vieira, S.C.; Flores-Quintana, C.I.; de Castro Silva, T.S.; Inoue, L.A.K.A.; Cardoso, C.A.L. Hepatic and gastroprotective activity of *Serjania marginata* leaf aqueous extract in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol. Biochem.* **2019**, *45*, 1051–1065, doi:10.1007/s10695-019-00622-9.
  54. Fuentes-Quesada, J.P.; Viana, M.T.; Rombenso, A.N.; Guerrero-Rentería, Y.;

- Nomura-Solís, M.; Gomez-Calle, V.; Lazo, J.P.; Mata-Sotres, J.A. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture* **2018**, *495*, 78–89, doi:10.1016/j.aquaculture.2018.05.025.
55. Martinez, M.P.; Gonzalez Pereyra, M.L.; Pena, G.A.; Poloni, V.; Fernandez Juri, G.; Cavaglieri, L.R. *Pediococcus acidolactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from a rainbow trout ecosystem have probiotic and ABF1 adsorbing/degrading abilities in vitro. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2017**, *34*, 2118–2130, doi:10.1080/19440049.2017.1371854.
56. Dawood, M.A.O.; Eweedah, N.M.; Moustafa, E.M.; Farahat, E.M. Probiotic effects of *Aspergillus oryzae* on the oxidative status, heat shock protein, and immune related gene expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under hypoxia challenge. *Aquaculture* **2020**, *520*, 734669, doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734669.
57. Haskard, C.A.; El-Nezami, H.S.; Pasi, †; Kankaanpa“a“, E.; Kankaanpa“a, K.; Kankaanpa“a“, K.; Seppo Salminen, ‡; Ahokas, J.T. Surface Binding of Aflatoxin B 1 by Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 3086–3091, doi:10.1128/AEM.67.7.3086-3091.2001.
58. Tavares-Dias, M.; Martins, M.L.; Moraes, F.R. Relação hepatossomática e esplenossomática em peixes teleosteos de cultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.* **2000**, *17*, 273–281, doi:10.1590/S0101-81752000000100024.
59. Le Cren, E. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch ( *Perca fluviatilis* ) Author ( s ): E . D . Le Cren Source : Journal of Animal Ecology , Vol . 20 , No . 2 ( Nov . , 1951 ), pp . 201-219 Published by : British Ec. *J. Anim. Ecol.* **1951**, *20*, 201–219.
60. Lima-Junior, S.E.; Cardone, I.B.; Goitein, R. Determination of a method for calculation of allometric condition factor of fish. *Acta Sci. - Biol. Heal. Sci.* **2002**, *24*, 397–400, doi:10.4025/actascibiols.v24i0.2311.
61. Reitman, S.; Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* **1957**, *28*, 56–63, doi:doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56.

62. Beutler, E. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*; 3rd ed.; Grune & Stratton: New York, 1984; ISBN 0808916726.
63. Kruger, N.J. The Bradford Method For Protein Quantitation. In *The Protein Protocols Handbook*; Walker, J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2009 ISBN 978-1-60327-474-6.
64. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254, doi:10.1006 / abio.1976.9999.