

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Efeito da inclusão de níveis baixos de fumonisinas na dieta de
truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*)**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Sara Pires de Sousa Basto

Orientador: Professor Doutor Paulo Rema

Co-Orientador: Professor Doutor José Almeida



VILA REAL, Maio de 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Efeito da inclusão de níveis baixos de fumonisinas na dieta de
truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*)**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Sara Pires de Sousa Basto

Orientador: Professor Doutor Paulo Rema

Co-Orientador: Professor Doutor José Almeida



VILA REAL, Maio de 2015

DECLARAÇÃO

A autora declara que:

- (1) todo o conteúdo das páginas seguintes é de autoria própria, decorrendo do estudo, investigação e trabalho da autora;
- (2) quaisquer materiais utilizados para produção deste trabalho não colocam em causa direitos de Propriedade Intelectual de terceiras entidades ou sujeitos e, finalmente, que
- (3) este trabalho não foi previamente submetido como elemento de avaliação nesta ou em outra instituição de ensino/formação.

UTAD, Março de 2015

(Sara Pires de Sousa Basto)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmão e avó Ana e avô Artur por todo o apoio que sempre me deram durante todo o curso, pelo interesse que sempre tiveram e os sacrifícios que fizeram para que pudesse ter acabado este longo percurso.

Ao meu namorado Sandro em especial que sempre me deu forças todos os dias para continuar a escrever, que sempre me fez feliz e ajudou nos momentos mais difíceis que apareceram no caminho em todos estes anos.

Ao Professor Doutor Paulo Rema e ao Professor Doutor José Almeida por todo o apoio que tive, pela disponibilidade em me ajudarem em todas as dúvidas que surgiram ao longo do meu trabalho e por todos os conselhos dados. A conclusão do trabalho não teria sido possível sem o seu suporte.

À Professora Doutor Anabela Alves pela ajuda dada na parte das necrópsias e histologia.

À minha amiga especial, a Raquel, que sempre esteve ao meu lado durante estes anos e me ajudou em tudo, animou e me deu esperanças.

Ao meu amigo Professor Doutor António Sousa Dias, por me esclarecer sempre e ajudar nas minhas infindáveis dúvidas, sempre com o seu bom humor.

Ao Doutor Jorge Dias e à Doutora Vera Rodrigues pelo apoio prestado ao meu trabalho.

RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários provenientes de fungos e são produzidas essencialmente por três géneros de fungos, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Estas substâncias aparecem quando são reunidas certas condições específicas em relação ao alimento e ao meio exterior, sendo que a exposição por parte dos animais a estas pode dar origem a doença (micotoxicose).

O trabalho que se apresenta foi centrado nas fumonisinas, que constituem um grupo de micotoxinas produzidas por fungos do género *Fusarium*, principalmente pelas espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. O objectivo principal foi avaliar, até que ponto, um nível bastante baixo destas micotoxinas ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$), mas possivelmente expectável em dietas com uma componente de ingredientes de origem vegetal, poderia ter efeitos no crescimento, na eficiência alimentar e na anatomopatologia de juvenis de truta arco-íris.

Para o efeito, foram utilizadas quatro dietas experimentais para juvenis de truta arco-íris, formuladas de modo a respeitar as suas exigências nutricionais. Foi utilizada uma dieta controlo (CTRL) que continha farinha e óleo de peixe como principais fontes de proteína e de gordura. Esta dieta serviu de base para a formulação das outras dietas experimentais: uma dieta (FUM) que diferiu na sua composição devido à inclusão de um nível bastante reduzido de fumonisina ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$); uma terceira dieta (MFI) onde foi utilizado um composto que teria como função contrariar o efeito da micotoxina e uma quarta dieta (FUM+MFI) com inclusão da micotoxina e do produto previamente referido. Foram utilizados doze grupos homogéneos de cinquenta peixes (peso médio inicial: $19 \pm 0,3 \text{ g}$), distribuídos aleatoriamente por doze tanques de fibra de vidro, constituindo, assim, triplicados de cada tratamento. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 58 dias.

No final do ensaio foram avaliados os parâmetros do crescimento e da eficiência alimentar, a composição corporal final dos peixes, bem como a sua análise anatomopatológica. Após a análise dos resultados, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para o crescimento e eficiência do alimento. Todavia, foram detectadas diferenças significativas no que diz respeito ao índice hepatossomático e à análise anatomopatológica.

Partindo do principio que este trabalho se trata de uma primeira abordagem a esta espécie, face aos resultados obtidos, estes sugerem que esta espécie, a esta idade e peso (19 gramas), se mostra sensível em termos hepáticos a concentrações baixas de fumonisinas.

Após consulta bibliográfica, cremos que este trabalho é a primeira abordagem do género realizada em truta arco-íris.

Palavras-chave:

Micotoxinas; fumonisinas; truta arco-íris; índice hepatossomático; análise anatomopatológica

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites originated from fungi, being produced essentially by three genera of fungi, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp. These substances appear when specific conditions are fulfilled regarding the food and the environment and, in consequence, the exposure of these to animals may lead to disease (mycotoxicosis).

The work presented here focused on fumonisins, which are a group of mycotoxins produced by fungi of the *Fusarium* genera, mainly by the species *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. The main objective was to evaluate, to what extent, a rather low level of these mycotoxins (0.05 mg kg^{-1}), although expected in diets with a component of plant ingredients, could have effects on growth, feed efficiency and anatomopathology of juvenile rainbow trout.

To this end, there were used four experimental diets for rainbow trout juveniles. These were formulated to meet their nutritional requirements. A diet control (CTRL) containing fish meal and fish oil as the main source of protein and fat was used. This diet was the basis for the formulation of the other experimental diets: a diet (FUM) that differed in composition due to the inclusion of a very low level of fumonisin (0.05 mg kg^{-1}); a third diet (MFX) containing a compound counteracting the effect due to the presence of mycotoxin and a fourth diet (FUM + MFX) with inclusion of the mycotoxin and the before mentioned compound. Twelve homogeneous groups of fifty fish were used (average weight: $19 \pm 0.3\text{g}$) and randomly distributed over twelve fibreglass tanks, thus constituting triplicates of each treatment. The fish were fed with the experimental diets for 58 days.

Finally, we evaluated the growth parameters and feed efficiency, the final body composition of the fish and its anatomopathology analysis. According to the results analysis, no significant differences were observed ($P>0.05$) for growth and feed efficiency. However, significant differences were found regarding the hepatosomatic index and the histopathological analysis.

Assuming that this work represents a first approach to this specie, and given the results obtained, it suggests that this specie and for its age and weight (19 grams), the liver seems to be sensitive to low concentrations of fumonisin.

After bibliographic research, it seems that this work is the first of its kind held in rainbow trout.

Keywords:

mycotoxins; fumonisin; rainbow trout; hepatosomatic index; histopathological analysis

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Introdução Geral.....	1
1.2	Desenvolvimento mundial do sector da aquacultura.....	2
1.3	O sector da indústria de alimentos compostos para peixes	3
1.4	Utilização de ingredientes vegetais em dietas para peixes.....	4
1.5	Limitações na utilização de ingredientes vegetais em dietas para peixes	5
1.6	Micotoxinas.....	7
1.6.1	Condições para o desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas.....	7
1.6.2	Micotoxicoses.....	8
1.6.3	Fumonisinas.....	9
1.7	Metodologia de prevenção e combate ao aparecimento de micotoxinas	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1	Dietas experimentais	15
2.2	Ensaio de crescimento.....	16
2.3	Análise proximal das dietas e carcaças	17
2.4	Análise anatomopatológica	18
2.4.1	Avaliação Anatomopatológica Macroscópica	18
2.4.2	Análise histológica	18
2.5	Cálculos.....	19
2.6	Análise estatística.....	20
3	RESULTADOS.....	21
3.1	Dietas experimentais	21
3.2	Parâmetros do crescimento e da eficiência alimentar	22

3.3	Análise da composição corporal	25
3.4	Análise anatomopatológica	26
3.4.1	Avaliação Anatomopatológica Macroscópica	26
3.4.2	Análise Histológica.....	28
4	DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÃO	36
6	BIBLIOGRAFIA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Imagem 1 – Exemplar de truta arco-íris (foto: José Almeida).....	26
Imagem 2– Procedimento de abertura de um peixe (foto: José Almeida).	27
Imagem 3– Exposição interna do peixe com visualização do fígado (foto: José Almeida).	27
Imagem 4– Fígado com aspecto normal (dieta CTRL) (foto: José Almeida).....	27
Imagem 5 – Fígado com aspecto normal (dieta MFIX) (foto: José Almeida).....	27
Imagem 6–Fígado (dieta FUM), onde se observa uma área com coloração mais pálida (cerca de 2/3 do órgão) (foto: José Almeida).....	28
Imagem 7 –Fígado (dieta FUM+MFIX) com coloração heterogénea (zonas castanho-avermelhadas e zonas vermelhas-alaranjadas) (foto: José Almeida).	28
Imagem 8– Fígado (dieta FUM+MFIX) com coloração vermelho escuro difusa e presença de vários vasos evidentes (foto: José Almeida).	28
Imagem 9 – Corte histológico de fígado (dieta CTRL) com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).....	29
Imagem 10 – Corte histológico de fígado (dieta MFIX), com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 20x) (foto: Anabela Alves).....	29
Imagem 11 – Corte histológico de fígado (dieta FUM+MFIX) com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 60x) (foto: Anabela Alves).....	29
Imagem 12 – Corte histológico de fígado (dieta FUM), com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 10x) (foto: Anabela Alves).....	29
Imagem 13 – Corte histológico de fígado (dieta CTRL) com arquitectura normal (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).	30
Imagem 14 – Corte histológico de fígado (dieta MFIX) com arquitectura normal (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).	30
Imagem 15 – Corte histológico de fígado (dieta FUM) com arquitectura alterada (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).	30
Imagem 16 – Corte histológico de fígado (dieta FUM+MFIX) com arquitectura alterada (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).	30
Imagem 17 – Corte histológico de fígado (dieta FUM) com formação de sincícios nos ductos biliares (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).	31
Imagem 18 – Corte histológico de fígado (dieta FUM+MFIX) com formação de sincícios nos ductos biliares (H-E; 10x) (foto: Anabela Alves).	31
Imagem 19 – Corte histológico de fígado (dieta FUM) com uma zona focal de necrose de liquefacção (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).....	31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela para auxílio na avaliação anatomopatológica macroscópica.	18
Tabela 2 –Composição em ingredientes das dietas experimentais (CTRL, FUM, MFIX e FUM+MFIX).	21
Tabela 3 –Composição das dietas experimentais (CTRL, FUM, MFIX e FUM+MFIX).	22
Tabela 4 – Parâmetros do crescimento, eficiência alimentar, índice hepatossomático e taxa de mortalidade dos juvenis de truta após 58 dias de alimentação com as dietas experimentais.	23

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Evolução do peso médio corporal dos juvenis de trutas arco-íris durante 58 dias de ensaio (D – dia).....	24
Gráfico 2 – Evolução da taxa de conversão do alimento durante 58 dias de alimentação (D - dia).	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

Num relatório recente da FAO emitido em 2009, com o título “ *How to Feed the World in 2050*”, fica expressa a preocupação de como alimentar nove mil milhões de pessoas em 2050 com recursos finitos, uma produção tradicional de alimento que não consegue crescer muito, com a erosão dos solos, carência de água e possíveis alterações ambientais (FAO 2009; Merino et al. 2012). Apesar de uma aparente maior disponibilidade de alimento a nível Mundial, face a algumas décadas atrás, uma em cada sete pessoas no Mundo não têm acesso à quantidade mínima de alimento capaz de suportar as suas necessidades nutricionais (Godfray et al. 2010a). Paradoxalmente, um número aproximadamente igual de pessoas encontra-se em situação de sobrealimentação (Godfray et al. 2010a).

Um relatório das Nações Unidas divulgado muito recentemente (16 de Setembro 2014), refere que cerca de 805 milhões de pessoas no mundo, uma em cada nove, sofrem de fome (FAO et al. 2014a). No entanto, o Estado da Insegurança Alimentar no Mundo (SOFI 2014, na sigla em inglês) confirma uma tendência positiva de decréscimo global do número de pessoas que passam fome, que diminuiu em mais de 100 milhões na última década e em mais de 200 milhões desde 1990-1992 (FAO et al. 2014a). Neste relatório são elencados 7 casos de estudo - Bolívia, Brasil, Haiti, Indonésia, Madagáscar, Malawi e Iêmen – que destacam algumas das estratégias que os países adoptaram para combater a fome e como os eventos externos podem influenciar a sua capacidade de atingir objectivos de segurança alimentar e nutrição (FAO et al. 2014a).

Desde os anos cinquenta do século passado até à actualidade, tanto a produção de peixe como o consumo de peixe *per capita* têm vindo a aumentar (FAO 2014b). A produção de peixe tem

vindo a crescer a uma taxa média anual de 3,2% ao ano e o consumo de peixe *per capita* aumentou em 9,3kg desde a década de 60 até 2012, sendo a China o país responsável pelo maior crescimento do sector da aquacultura (FAO 2014b).

Esta situação é potencialmente interessante pois, presentemente e segundo a FAO, a aquacultura pode constituir uma excelente fonte de fornecimento de alimento, devido ao seu desenvolvimento crescente e grande impacto na economia Mundial (FAO et al. 2014a).

O trabalho que se apresenta teve como objectivo principal avaliar o possível efeito da incorporação na dieta de peixes de uma dose extremamente moderada de uma micotoxina (fumonisina), ao nível dos parâmetros do crescimento e da eficiência alimentar, bem como de alterações macroscópicas e histológicas associadas. Estes dois últimos indicadores são especialmente importantes pois as fumonisina estão descritas como sendo responsáveis por causar alterações no fígado (Lumlertdacha et al. 1995). Além da avaliação dos potenciais efeitos das micotoxinas, foi utilizado um composto (MFIIX), comercializado pela Empresa BIOMIN, para uma avaliação preliminar da sua eficiência em peixes.

1.2 Desenvolvimento mundial do sector da aquacultura

A criação de organismos aquáticos é uma actividade ancestral praticada pelo homem desde, pelo menos, o ano 3500 a.C. onde se terá iniciado, na China, com a produção de carpa (*Cyprinus carpio*), sendo que outras referências apontam para a utilização da tilápia-do-Nilo (*Sarotherodon niloticus*) desde o ano 2000 a. C. (Parker 2000). Durante alguns milhares de anos, a prática aquícola foi encarada mais como uma actividade recreativa e de ornamento do que produtiva, propriamente dita (Parker 2000).

Com efeito, a partir da revolução industrial e dada a necessidade de produzir de forma sistemática alimento para uma população humana em crescimento (Godfray et al. 2010b), as pescas em geral e a aquacultura em particular passaram a ser perspectivadas de uma outra maneira. Assim, a aquacultura tem crescido ao longo dos anos, ultrapassando as outras áreas da produção animal para consumo humano (FAO 2014b). A procura global de alimentos de

origem aquática aumentou, como referido, devido ao aumento e pressão demográfica e outros factores relacionados como, por exemplo, a exploração excessiva das reservas naturais (FAO 2007). Por outro lado, o aumento da procura de peixe pela população humana está intimamente relacionado com os benefícios para a saúde associados ao consumo de pescado (FAO 2007).

A tendência para a alteração dos hábitos alimentares dos consumidores, numa procura de alimentos mais saudáveis, sugere uma maior participação do pescado na dieta alimentar, uma vez que os peixes e moluscos estão naturalmente identificados como fontes importantes de nutrientes (Chern & Rickertsen 2003; FAO 2007). O pescado é constituído por proteína de elevada digestibilidade e valor biológico, vitaminas (A, D, niacina e B12), oligoelementos e ácidos gordos insaturados (Chern and Rickertsen 2003). Em particular, os lípidos de origem marinha são ricos em ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa (n-3 PUFA – polyunsaturated fatty acids Steffens 1997). Estas características estão associadas a papéis importantes relacionados com a protecção e prevenção de inúmeras doenças humanas, em particular de doenças cardiovasculares (He 2009).

Na medida em que grande parte do oceano se encontra com as suas reservas naturais completamente esgotadas ou em forte grau de exploração, incapazes de sustentar a procura crescente de pescado pela população humana, a aquacultura assumiu um forte protagonismo e parece ser uma potencial alternativa à diminuição brutal dos recursos naturais aquáticos (FAO 2007). A contribuição desta actividade para a produção total de peixe, crustáceos e moluscos aumentou de 3,9%, em 1970, para 27,1%, em 2000 e 32,4% em 2004 (FAO 2007). Em relação aos últimos anos devemos referir que, à escala global, o crescimento da aquacultura deve ser considerado impressionante, apesar de uma ligeira diminuição na última década (FAO 2012; FAO 2014b).

1.3 O sector da indústria de alimentos compostos para peixes

É lícito prever que a expansão do sector da indústria aquícola implicou um aumento concomitante da produção de alimentos compostos para peixes, sendo que o alimento

artificial utilizado na produção é essencialmente constituído por farinhas e óleos de peixe, principalmente para as espécies mais valorizadas em termos comerciais e que são produzidas em regimes intensivos (Tacon & Metian 2008).

O incremento da utilização de farinhas de peixe para alimentação dos peixes aumentou de 1882 mil toneladas em 1995 para 4300 mil toneladas em 2005 (Tacon & Metian 2008), e espera-se que possa atingir cerca de 70% do total da produção mundial em 2015 (FAO 2002). Para manter os consumos *per capita* em pescado, e tendo como base as previsões para o ano de 2030, além dos 148 milhões de toneladas actualmente utilizados será necessário produzir, pelo menos, mais 23 milhões de toneladas através da actividade aquícola (FAO 2012).

A elevada dependência da aquacultura em produtos de origem marinha levou a uma acentuada utilização de ingredientes, como as farinhas e óleos de peixe, no mercado Mundial e, simultaneamente, a procura sistemática de ingredientes alternativos a estas farinhas e óleos de peixe (FAO 2012). No caso particular das fontes protéicas de origem animal, os problemas relacionados com a presença de poluentes orgânicos e de doenças importantes, com destaque para a BSE (encefalopatia espongiforme bovina), vieram colocar uma maior pressão na procura de alternativas de origem vegetal (FAO 2011; Fuertes et al. 2013)

1.4 Utilização de ingredientes vegetais em dietas para peixes

Na última década tem-se assistido a um esforço enorme de investigação no sentido de reduzir a dependência da utilização das farinhas e óleos de peixe nas dietas comerciais (Naylor et al. 2009), recorrendo a fontes vegetais alternativas fornecedoras de proteína e de gordura, como já foi referido (Béraud 2013).

Os ingredientes mais utilizados nos alimentos para peixes incluem: cereais e seus subprodutos, proteaginosas e concentrados protéicos (Tacon et al. 2011). Nos cereais, o milho, trigo, arroz, soja e cevada são os mais produzidos e utilizados (Tacon et al. 2011). Outras fontes, potencialmente fornecedoras de gorduras (soja, semente de algodão e girassol),

também têm sido estudadas, sendo que a ervilha e o tremço parecem ser, dentro das proteaginosas, as mais disponíveis no mercado (Tacon et al. 2011).

De um modo geral, os ingredientes vegetais apresentam valor nutricional constante e elevada disponibilidade nos mercados (Pereira & Oliva-Teles 2002). Não admira que sejam muitos os trabalhos realizados na área tendo em vista a substituição total ou parcial da proteína e gordura animal da dieta dos peixes por proteína e óleos de origem vegetal (Torstensen et al. 2008; Reis et al. 2014). Em termos de espécies, podemos referir as revisões realizadas por Gatlin et al. (2007), Rana et al. (2009), Hardy (2010), Welch (2010) em espécies como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), a cobia (*Rachycentron canadum*), o rodvalho (*Psetta maxima*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*), a dourada (*Sparus aurata*) e a truta (*Oncorhynchus mykiss*), apenas para citar algumas.

1.5 Limitações na utilização de ingredientes vegetais em dietas para peixes

Apesar da sua utilização alargada, os ingredientes de origem vegetal apresentam algumas limitações quando comparados com as farinhas e óleos de peixe. Essas limitações relacionam-se com níveis mais baixos de proteína, com desequilíbrios em aminoácidos e com a presença de factores anti-nutricionais endógenos (Francis et al. 2001; Nizza & Piccolo 2009). Estes últimos interferem com a eficiência de utilização do alimento, diminuição da palatabilidade das dietas, inibição do crescimento, disfunções intestinais e alterações hepáticas, entre outras (Krogdahl et al. 2010).

Em relação ao conteúdo em proteína a soja apresenta, aproximadamente, um teor idêntico ao das farinhas de origem animal com um perfil em aminoácidos essenciais próximo das necessidades dos peixes (Reinertsen & Haaland 1995). No que respeita aos cereais, estes apresentam teores em proteína de 6-14%, constituindo as fontes vegetais com menor teor deste elemento, comparados com valores de 20-50% de proteína das oleaginosas e leguminosas (Liener 2012). Além disso, segundo o mesmo autor, os cereais carecem, no geral, de certos aminoácidos, particularmente a lisina (Liener 2012).

Deve, no entanto, ser referido que alguns concentrados de proteína de origem vegetal (e.g. mistura de óleo de colza, de soja e de linhaça) podem apresentar-se como substitutos integrais das farinhas de peixe nos alimentos compostos para peixes (Reis et al. 2014).

Algumas das desvantagens da utilização de proteínas de origem vegetal podem ser ultrapassadas através da utilização de suplementações específicas (complementares) em outras fontes vegetais e/ou determinados aminoácidos limitantes (Gómez-Requeni et al. 2003; Nizza & Piccolo 2009) ou através da utilização de atractantes no caso de dietas de baixa palatabilidade (Oliveira et al. 2004). Por outro lado, a eficácia de processos tecnológicos (aquecimento, extração de água, melhoramento genético da planta, etc...) que removem e/ou desactivam alguns dos factores antinutricionais presentes nas fontes vegetais é discutível (Francis et al. 2001). No entanto, estão descritos certos tratamentos para vários vegetais que permitem diminuir a quantidade de factores antinutricionais sendo o mais usado o aquecimento, (Kumar 2012).

O uso de proteínas de origem vegetal pode expor os animais a compostos potencialmente perigosos (Liener 2012). Apesar de alguns desses compostos e substâncias não causarem uma reacção agressiva e imediata por parte dos organismos vivos, subsiste a ideia de que alguns dos efeitos podem ter um efeito perniciosos (por acumulação) nos animais, resultando em doenças ou performance de crescimento inferior ao ideal (Liener 2012). É expectável, segundo Krogh et al. (2010), que algumas manifestações relacionadas com doenças emergentes na indústria aquícola que envolvem disfunções digestivas, respostas imunitárias deficientes, alterações na digestibilidade dos nutrientes (proteína e lípidos), hipertrofia pancreática e alterações hepáticas possam estar relacionadas com a utilização de alguns destes ingredientes de origem vegetal.

Segundo Milani & Maleki (2014), os cereais podem constituir veículos importantes de micotoxinas. Alguns dos vegetais que podem ser utilizados como fonte de proteína nas dietas dos peixes, como é o caso do farelo de algodão (Kleeman et al. 2011), são particularmente sensíveis à contaminação fúngica (Mazen et al. 1990). Uma correcta utilização destes ingredientes pressupõe que micotoxinas e outros contaminantes, tais como metais pesados e poluentes orgânicos persistentes (Du et al. 2012), que possam aparecer nos ingredientes das dietas, não ultrapassem os valores máximos estipulados por lei. Neste aspecto particular

torna-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes que permitam comprovar a existência de possíveis tipos de contaminantes, tal como refere a metodologia proposta por Nácher-Mestre et al. (2013).

1.6 Micotoxinas

As micotoxinas são metabolitos secundários, provenientes de fungos (Ferrando 1981), sendo produzidas essencialmente por três géneros de fungos, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp (Matejova et al. 2014). Estas toxinas podem estar contidas nos esporos, no talo dos fungos ou, ainda, serem segregadas no substrato onde se desenvolvem os fungos (Ferrando 1981).

As micotoxinas constituem um potencial problema em termos de contaminantes a nível da aquacultura, a par dos metais pesados e poluentes orgânicos persistentes, tais como o DDT e PCB7 (Du et al. 2012), *Salmonellae* (Elhadi 2014), entre outros.

As micotoxinas responsáveis por contaminar alimentos dos peixes são várias, sendo as mais estudadas as aflatoxinas (Altug & Beklevik 2003; Fallah et al. 2014), o deoxinivalenol e a zearalenona (Pietsch et al. 2013), as fumonisinas e as ocratoxinas A (Barbosa et al. 2013).

1.6.1 *Condições para o desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas*

Nem todos os fungos têm a capacidade de produzir micotoxinas, o que significa que a detecção de fungos nem sempre se traduz na detecção de micotoxinas. Além disso, os fungos podem produzir micotoxinas em diferentes quantidades consoante o substrato, o que pode complicar a detecção das micotoxinas de acordo com a quantidade presente (Huwig 2001).

O crescimento de fungos nos cereais pode ocorrer em diversas fases, desde antes da colheita até à fase de transporte, armazenamento e processamento (Jouany 2007).

Os fungos são capazes de produzir micotoxinas apenas se se verificarem óptimas condições de temperatura, humidade e ainda a presença de um substrato adequado (Wood 1992). Os países tropicais e sub-tropicais apresentam condições que favorecem o crescimento de micotoxinas (Milani et al 2013), pelo seu clima caracteristicamente quente e húmido (Myers 1992). Em relação ao substrato, o crescimento dos fungos depende de certos factores presentes nos alimentos, entre eles a actividade da água, a concentração de iões de hidrogénio, a temperatura, a pressão parcial do gás (oxigénio e dióxido de carbono), a consistência, o estado nutritivo, os efeitos específicos de soluto e os conservantes (Pitt and Hocking 2009).

Especificamente para as fumonisinas, um estudo recente indica que as condições óptimas de temperatura são de 20°C para a FB1 e 20-25°C para a FB2, e a actividade da água ideal é de 0.98–0.995 a_w (Medina et al. 2013).

1.6.2 Micotoxicoses

As micotoxicoses resultam da exposição de um ser vivo a uma ou mais micotoxinas, sendo caracterizadas por estarem geralmente associadas à ingestão de alimento, podendo também ser transmitidas através do contacto pela pele e absorção através das vias respiratórias. (Bennett & Klich 2003; Zain 2011). Além disso, não apresentam carácter infeccioso ou contagioso e são produzidas por fungos (Zain 2011).

As micotoxicoses podem-se manifestar de diferentes formas, sendo estas a subclínica, a subaguda, a aguda, a subcrónica ou a crónica (Haschek et al. 2001).

Os sinais clínicos e lesões induzidas pelas micotoxinas dependem de inúmeros factores, entre eles a duração da exposição, a quantidade de micotoxina à qual o animal é exposto, a sua idade, o sexo, o nível de imunidade, os eventuais efeitos sinérgicos ou antagonistas com outras substâncias químicas, a espécie animal, a presença de outros tóxicos, a temperatura da água e a fase da vida (Smith & Henderson 1991; Bennett & Klich 2003). Animais imunodeprimidos ou com uma nutrição deficiente são mais susceptíveis de padecerem de micotoxicoses do que animais saudáveis (Haschek et al. 2001).

A literatura publicada relacionada com os efeitos de micotoxinas em peixes é muito escassa. Seguidamente são referenciados exemplos das afecções que diferentes micotoxinas causam nestes animais, com a excepção das fumonisinas que se apresentam descritas em detalhe no próximo capítulo. As aflatoxinas apresentam um efeito carcinogénico e o ácido ciclopiazónico está associado a problemas neurológicos (Lovell 1998). A ocratoxina encontra-se associada a lesões nos rins e fígado (Manning et al. 2003), o deoxinivalenol a lesões nos rins, no fígado, no estômago e no intestino (Matejova et al. 2014) e a zearalenona está associada a problemas do foro reprodutivo (Schwartz et al. 2010; Wozny et al. 2013; Schwartz et al. 2013).

Os efeitos causados nos peixes poderão depender da micotoxina e ainda da espécie do peixe. Sendo assim, não é totalmente correcta a extrapolação dos dados de outras micotoxinas para as fumonisinas. Como não estão estudados os efeitos das fumonisinas em trutas arco-íris do modo que estudamos no nosso trabalho, iremos apresentar os resultados destas micotoxinas em peixes de diferentes espécies, apesar de que para resultados mais concretos são necessários estudos futuros nas trutas arco-íris.

1.6.3 Fumonisin

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas por fungos do género *Fusarium*, principalmente pelas espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, tendo sido identificadas, pelo menos, vinte e oito tipos diferentes de fumonisinas, sendo as FB1, FB2 e FB3 as mais comuns (Rheeder et al. 2002; Prudente Jr 2008).

Estas micotoxinas apresentam uma estrutura idêntica à esfingosina, base constituinte dos esfingolípidos, sendo que estes desempenham papéis essenciais nas membranas celulares (Wang et al. 1991; Tolleson et al. 1999). O seu mecanismo de acção passa também pela inibição de uma enzima importante na síntese dos esfingolípidos, a ceramida sintetase, interrompendo o *de novo* biossíntese da ceramida e do metabolismo dos esfingolípidos; (Wang et al. 1991; Tolleson et al. 1999; Voss et al. 2007). A inibição da ceramida sintetase tem como consequência o aumento celular da esfinganina (SA) em relação à concentração de esfingosina (SO), com a sua acumulação nos tecidos, soro e urina (Solfrizzo et al. 2001a;

Voss et al. 2007). Esta razão entre SA/SO pode ser utilizada como um biomarcador para detectar a exposição dos animais às fumonisinas (Solfrizzo et al. 1997).

Há apenas dois estudos das fumonisinas em trutas arco-íris, em que um deles estudou os efeitos desta micotoxina juntamente com aflatoxina B1 e com N-metil- N' - nitro – nitrosoguanidina, não sendo indicado para comparações com o ensaio que realizamos (Carlson et al. 2001). O outro analisou, através das bases esfingóides livres no fígado, rins e soro, se a fumonisina se encontrava biologicamente disponível (Meredith et al. 1998). Neste trabalho, o aumento elevado da esfinganina livre poderá estar associado a toxicidade do fígado, comparando com estudos realizados em mamíferos (Meredith et al. 1998).

A maioria dos estudos acerca das fumonisinas foram realizados em peixes da espécie *Ictalurus punctatus*. Estes estudos demonstraram que as fumonisinas ingeridas na dieta causaram uma diminuição no ganho de peso dos peixes, comparativamente ao grupo controlo, a partir de concentrações de 20 mg kg⁻¹ (Lumlertdacha et al. 1995; Yildirim et al. 2000). Esta diminuição no ganho de peso aparenta ser dependente da dose/idade, isto é, a concentrações de 20 mg kg⁻¹ há uma diferença estatisticamente significativa nos peixes com peso inicial de 1,2 gramas (um mês) em relação ao grupo controlo, enquanto que nos peixes com 31 gramas esta diferença só é estatisticamente significativa a partir de doses de 80 mg kg⁻¹ (Lumlertdacha et al. 1995). Li et al. (1994) afirmaram que, a concentrações de 20 mg kg⁻¹, não se observou uma diminuição no ganho de peso dos peixes, o que poderá ser justificado pelo facto de neste estudo os peixes começarem com um peso inicial de 6,1 gramas, enquanto que nos anteriores o peso inicial foi de 1,2 gramas (Lumlertdacha et al. 1995) e 1,5 gramas (Yildirim et al. 2000). Com doses altas de fumonisinas observou-se uma marcada diminuição na ingestão do alimento (Li et al. 1994).

Segundo Lumlertdacha et al. (1995), as fumonisinas afectaram exclusivamente o fígado a nível microscópico, identificando-se alterações mais exuberantes com o aumento das concentrações desta micotoxina nas dietas. A nível macroscópico observaram-se alterações apenas a concentrações elevadas nos peixes com peso inicial de 31 gramas (Lumlertdacha et al. 1995). Ocorreram ainda alterações a nível neurológico com concentrações de 40 mg kg⁻¹ e um aumento do glicogénio no fígado (Li et al. 1994).

Contrariamente a estes autores, Brown et al. (1994) não detectaram alterações significativas a nível histológico em nenhum dos órgãos estudados (cérebro, coração, fígado, baço, brânquias, cabeça e tronco, rins, estômago, intestinos, pele, gónadas), mesmo a doses elevadas. Como não existe indicação da idade nem peso inicial dos peixes neste estudo (Brown et al. 1994), não podemos elaborar uma correcta comparação com os estudos anteriormente mencionados, sendo que provavelmente uma idade mais avançada com um maior peso inicial e uma menor duração do ensaio (cinco semanas, enquanto que os outros foram de dez semanas) poderá ser uma explicação para estes resultados distintos.

Em relação à mortalidade, não se observou uma correlação entre esta e os tratamentos das dietas com fumonisinas (Li et al. 1994; Yildirim et al. 2000; Tuan et al. 2003). Contudo, Lumlertdacha et al. (1995) registou mortalidade elevada com concentrações de 320 mg kg⁻¹ e superiores devido à bactéria *Cytophaga columnaris*.

No que diz respeito à hematologia, houve uma diminuição do hematócrito a concentrações de 40 mg kg⁻¹ pelos autores Yildirim et al. (2000) e de 80 mg kg⁻¹ pelos autores Li et al. (1994). Lumlertdacha et al. (1995) detectaram anemia e leucopenia nos peixes com peso inicial de 1.2 gramas a partir de concentrações de 80 mg kg⁻¹, sendo que nos peixes de 31 gramas esta diminuição no hematócrito e anemia verificaram-se a partir de concentrações de 320 mg kg⁻¹, havendo ainda uma leucocitose (Lumlertdacha et al. 1995).

Identificou-se um aumento significativo na razão esfinganina livre / esfingosina livre que foi ainda mais evidente com o aumento das concentrações de fumonisinas (Yildirim et al. 2000).

Para além dos estudos na espécie acima referidos, efectuaram-se outros em diferentes espécies, onde se verificou uma diminuição no ganho de peso a partir de concentrações de fumonisina de 40 mg kg⁻¹ (Tuan et al. 2003) e de 5 mg kg⁻¹ (Gbore et al. 2010), sendo esta diminuição mais acentuada com o aumento das concentrações (Tuan et al. 2003; Gbore et al. 2010). Foi ainda verificada uma diminuição no hematócrito e um aumento significativo na razão esfinganina livre / esfingosina livre apenas a uma concentração de 150 mg kg⁻¹ (Tuan et al. 2003). Gbore et al. (2010), para além da diminuição do hematócrito, estudou ainda os eritrócitos, a hemoglobina, o VCM (volume corpuscular médio), a HCM (hemoglobina corpuscular média), a proteína total, a albumina e a globulina, encontrando-se todos estes

parâmetros diminuídos significativamente, mais pronunciadamente com o aumento das concentrações de fumonisinas. Não se detectaram alterações histológicas em nenhum órgão estudado (fígado, baço, estômago, intestino, coração e rim) depois das oito semanas de ensaio, e a mortalidade apresentada não foi relacionada com a incorporação de fumonisinas na dieta (Tuan et al. 2003).

Gbore et al. (2010) constataram que o pH e o DO₂ (oxigénio dissolvido) diminuíram com o aumento das concentrações de fumonisinas e o NH₃ (amoníaco) aumentou.

Em conclusão, os resultados em relação aos parâmetros descritos acima podem variar de acordo com a espécie, idade, peso inicial, duração do ensaio, temperatura, pH, oxigénio dissolvido, manuseamento e condições gerais dos locais onde se encontram os peixes. Deste modo, quando comparamos ensaios, temos que ter presente que nem sempre é uma comparação exacta.

1.7 Metodologia de prevenção e combate ao aparecimento de micotoxinas

A prevenção constitui o método ideal para combater o aparecimento das micotoxinas, impedindo as perdas económicas que advêm da contaminação por estas substâncias (Smith & Henderson 1991).

No entanto, não é possível prevenir totalmente o aparecimento destes contaminantes, quer seja na pré-colheita, armazenamento ou processamento (Wood 1992). De qualquer modo, qualquer método que permita a redução do crescimento dos fungos nos alimentos é desejável e deve ser aplicado sempre que possível.

Sendo o milho um constituinte abundante nas dietas dos peixes, a prevenção específica para este cereal é importante (Voss et al. 2007), aliado ao facto de que as fumonisinas são encontradas mais frequentemente neste cereal ou produtos derivados deste cereal (Li et al. 1994; Piva et al. 2005). Deste modo, passamos a enumerar medidas eficazes de prevenção neste cereal, tanto na pré-colheita como na pós-colheita.

Na pré-colheita deve-se fazer uma selecção rigorosa de variedades do milho, evitando o uso de híbridos de miolo mole, evitar uma alta densidade de cultivo, efectuar uma fertilização adequada, semear na época correcta, evitar a colheita tardia e adoptar um controlo eficaz de pragas (Magan & Aldred 2007).

Em relação às medidas a realizar após a colheita destacam-se a minimização do espaço de tempo entre a colheita e a secagem, sendo que esta deve ser adequada ao alimento com tempo e temperatura específicos, fazer uma limpeza correcta do cereal antes do armazenamento, fazer uma boa higiene e gestão dos silos, uma boa rastreabilidade e especificações claras em termos da identificação e rejeição de material segundo contaminações e adoptar um controlo eficaz de pragas, à semelhança das medidas anteriormente referidas (Magan and Aldred 2007).

Um estudo recente indica que os sacos de silagem usados para armazenamento de cereais e outros alimentos é eficaz na redução da contaminação por fungos, e consequentemente de micotoxinas, desde que se mantenham hermeticamente fechados e sem trocas de gás e água com o exterior ao longo do período de armazenamento (Gregori et al. 2013).

Se depois de desejavelmente terem sido tomadas todas as medidas de prevenção de desenvolvimento fúngico, ainda forem detectadas micotoxinas nas matérias primas ou alimento, o ideal é que seja possível aplicar métodos de descontaminação que fossem garantir o valor nutritivo dos alimentos sem alterações tecnológicas do produto e devem inactivar ou destruir as micotoxinas sem a produção de produtos tóxicos (Jard et al. 2011).

Uma das abordagens utilizadas é o recurso a substâncias adsorventes ou com capacidade de se ligarem às moléculas de micotoxinas, com o objectivo de diminuir a biodisponibilidade destas micotoxinas (Jard et al. 2011). É importante ter em consideração as propriedades tanto das substâncias adsorventes como das micotoxinas, sendo que o complexo destes dois agentes necessita de se manter estável no tracto gastrointestinal para poder ser correctamente eliminado do organismo (Jard et al. 2011).

Como o nosso trabalho se centra nas fumonisinas, irei mencionar algumas substâncias cuja eficácia, ou falta desta, na diminuição da sua biodisponibilidade está descrita na literatura.

Como métodos de combate de fumonisinas, Galvano et al. (1997) demonstraram a eficácia de vários tipos de carvão activado *in vitro*, havendo uma relação entre a capacidade de adsorção e os parâmetros físico-químicos destes componentes (área de superfície específica, índice de iodo e índice de azul de metileno). Apesar disto, estudos feitos *in vivo* sugerem que o carvão activado não é eficaz em ratos, usando como biomarcador a razão SA/SO (Solfrizzo et al. 2001a), nem em porcos recém nascidos a uma taxa de 1% deste material (Piva et al. 2005).

Outros materiais como o aluminossilicato de cálcio e o sódio hidratado, a sepiolita (Galvano et al. 1997) e o celite (Solfrizzo et al. 2001b), não se mostraram eficazes na capacidade de ligação às fumonisinas.

Foi observado que as bactérias produtoras de ácido láctico são eficientes contra a espécie *Fusarium*, na medida em que se ligaram às micotoxinas ou inibiram o crescimento destas (Khalil et al. 2013), bem como as argilas organicamente modificadas *in vitro* (Baglieri et al. 2013), as plaquetas de nanosílica (Liao et al. 2014) e a bentonite (Solfrizzo et al. 2001b).

A colestiramina também se demonstrou eficiente a adsorver as fumonisinas *in vitro* e *in vivo*, recorrendo ao biomarcador da razão SA/SO já referido (Solfrizzo et al. 2001b).

A desaminação é um método utilizado especificamente para as fumonisinas que consiste na remoção da amina primária desta substância, levando à diminuição da sua toxicidade (Lemke 2001).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Dietas experimentais

Neste ensaio que a seguir se descreve foram utilizadas quatro dietas experimentais (tabela 2), para juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), formuladas de modo a respeitar as suas exigências nutricionais. As dietas isoenergéticas e isoprotéicas apresentaram valores médios de 48% de proteína, 22% de lípidos e 21 kJ g⁻¹ de energia. Foi utilizada uma dieta controlo (CTRL) que continha farinha e óleo de peixe como principais fontes de proteína e gordura. Nesta dieta não foi acrescentado qualquer composto ao contrário do que ocorreu nas restantes dietas.

A dieta FUM diferiu na sua composição devido à inclusão muito moderada de uma fumonisina a 0,05 mg kg⁻¹ (BIOMIN). Numa terceira dieta (MFIX) foi utilizado um composto fornecido pela BIOMIN que, supostamente, teria como função contrariar o efeito da micotoxina. Uma última dieta (FUM+MFIX) incluiu a micotoxina e o produto previamente referido de modo a tentar avaliar a sua eficácia em relação à micotoxina.

As dietas foram produzidas pela SPAROS Lda., sendo que o método de fabrico envolveu a prévia moagem dos ingredientes, num “moinho de martelo micropulverizer” (Hosokawa Alpine, modelo SH1, Alemanha), que foram seguidamente colocados num misturador de 90 litros de dupla hélice. Nesta fase não foram adicionados os óleos. As misturas foram extrudidas (15 milímetros), utilizando para o efeito uma extrusora (escala piloto) de dupla rosca (diâmetro: 55,5 milímetros) Clextal BC45 (Clextal, França), a uma temperatura que oscilou entre os 105-110°C. Posteriormente, os lotes de alimentos extrudidos foram secos num forno de convecção (OP-750 UF, LTE Scientifics, Reino Unido), a 60°C durante 2 h.

Após o arrefecimento dos pellets, incorporou-se o óleo, em condições de revestimento a vácuo (coating), num misturador de vácuo (PG-10VCLAB, Dinnisen, Países Baixos). Ao longo do ensaio as dietas permaneceram armazenadas à temperatura ambiente, tendo sido retirada uma amostra de cada dieta para posterior análise.

2.2 Ensaio de crescimento

Os juvenis de truta arco-íris (*O. mykiss*) utilizados neste ensaio de crescimento foram produzidos na divisão de Aquacultura do Departamento de Zootecnia da UTAD (Universidade de Trás os Montes e Alto Douro). O ensaio realizou-se sob a supervisão de cientistas treinados e acreditados pela Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), de acordo com a Federação das Associações Europeias de Ciência Animal de Laboratório (FELASA), seguindo as recomendações da categoria C e na sequência da Directiva Europeia 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos.

No início do ensaio foram constituídos doze grupos homogêneos de cinquenta peixes que apresentavam um peso médio individual de $19 \pm 0,3$ g. Os grupos de peixes foram divididos, de modo aleatório, por doze tanques (250 L capacidade) de fibra de vidro, constituindo triplicados de cada tratamento. No decorrer da experiência, os parâmetros da água foram mantidos dentro de valores apropriados para a espécie (temperatura: $15,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$; oxigénio dissolvido: $7,1 \pm 0,1$ mg/L e pH: $7,2 \pm 0,1$) através da utilização de um sistema de circulação de água em regime completamente aberto. Semanalmente foram efectuadas medições aos compostos azotados da água (amónia e nitritos), utilizando para o efeito kits colorimétricos (SERA). As quatro dietas experimentais foram atribuídas aleatoriamente pelos doze tanques, sendo que o alimento foi fornecido manualmente até à saciedade aparente, duas vezes por dia (9:00 e 16:00), durante os 58 dias de duração do ensaio, e os animais foram submetidos a fotoperíodo natural.

No início do ensaio foram recolhidos doze peixes para a avaliação da composição proximal da carcaça. Efectuaram-se pesagens de grupo mensais para avaliar o crescimento dos peixes e

para contabilizar o alimento que foi ingerido. No final do ensaio, os peixes permaneceram em jejum durante 24 horas antes de serem sujeitos à pesagem final. Na amostragem final foram abatidos (por excesso de anestésico – MS222/Sigma) cinco peixes, que foram seguidamente congelados para posterior determinação da composição proximal das carcaças. Em cada tanque foram escolhidos, aleatoriamente, três peixes, que foram sacrificados/eutanasiados, através de concussão, para serem sujeitos a análise anatomopatológica. Após a referida análise, foram retirados os fígados para determinação do índice hepatossomático. Os fígados foram fotografados e colocados em tubos de ensaio com formol tamponado a 10% para posterior fixação.

2.3 Análise proximal das dietas e carcaças

Na análise da composição corporal, os procedimentos foram executados de acordo com procedimentos AOAC (1999), sendo que as amostras foram processadas em duplicado. Para a sua realização, cinco peixes inteiros de cada tanque, ainda semi-congelados, foram triturados e misturados, usando um picador de carne (Hobart, 2100T). A humidade foi determinada durante 24h a 105°C e, de seguida, as carcaças dos peixes foram liofilizadas, moídas e homogeneizadas.

As amostras foram analisadas quanto ao teor de cinzas, durante 6h a 550 °C, proteína bruta ($N \times 6.25$, em analisador Leco N, Modelo FP-528, Corporação Leco, St. Joseph, EUA), gordura bruta (extração com éter de petróleo, Soxtherm, Gerhardt, Alemanha) e energia bruta (bomba calorimétrica adiabática, Werke C2000, IKA, Alemanha).

A composição proximal das dietas foi obtida através de metodologia laboratorial idêntica.

2.4 Análise anatomopatológica

2.4.1 *Avaliação Anatomopatológica Macroscópica*

Para esta avaliação foram utilizados três peixes de cada tanque (nove peixes por tratamento). Em cada peixe observou-se o aspecto exterior e interior, tomando em atenção possíveis alterações ou colorações anormais dos vários órgãos, tendo sido dada maior atenção ao aspecto do fígado. Para o efeito, foi utilizada uma tabela para registo de parâmetros gerais e eventuais alterações (tabela 1). Após a análise, os fígados foram acondicionados individualmente, em tubos com formol a 10%, tal como referido anteriormente.

Tabela 1 – Tabela para auxílio na avaliação anatomopatológica macroscópica.

Tanque X	Exterior	Fígado + vesícula biliar	Tubo digestivo	Outros
Peixe 1				
Peixe 2				
Peixe 3				

2.4.2 *Análise histológica*

O material chegou ao laboratório de Anatomia Patológica da UTAD em tubos com formol tamponado a 10%, depois de pelo menos 24 horas nesta fase de fixação, e foram seleccionados dois fígados de cada dieta experimental para análise. Foi preenchida uma ficha para cada animal correspondente a cada fígado e atribuído um número. Depois realizou-se o corte macroscópico, onde todos os fígados foram retirados dos tubos, cortados nos mesmos dois locais e colocados em cassetes identificadas com o número do animal. As cassetes depois de fechadas foram colocadas num processador automático para inclusão em parafina, primeiro desidratadas passando por uma sucessão de álcoois de concentração crescente desde 70% até 100%, passando por xilol e terminando em parafina. Deste modo, foi feita a

desidratação das peças e a sua impregnação em parafina, cujo processamento durou, em média, 16 horas.

Após a obtenção dos blocos, estes foram sujeitos a cortes no micrótomo. Após o arrefecimento do bloco em placa de refrigeração, foram efectuados os cortes definitivos com uma espessura de $3/5\ \mu\text{m}$, formando ténias.

Os cortes foram posteriormente colocados numa tina com álcool a 30% para distensão e para selecção dos melhores que foram posteriormente colocados em banho-maria com água destilada para a sua completa distensão. Com uma lâmina limpa recolheram-se os cortes, sendo que a secagem das lâminas foi feita em estufa durante a noite.

No dia seguinte procedeu-se à coloração de rotina, com Hematoxilina-Eosina (H-E), num colorador automático em que as lâminas passam por vinte e dois passos (cerca de uma hora no total). As lâminas foram montadas no montador de lamelas, utilizando para o efeito uma gota de resina sintética (*Entellan*).

Após a preparação das lâminas, procedeu-se à sua observação em microscópio de luz (Nikon Eclipse E600) equipado com uma câmara (Nikon DXM 1200) e com a utilização do software 1.44o ImageJ. Foram anotadas as alterações e tiradas as respectivas fotografias.

2.5 Cálculos

Na avaliação dos parâmetros do crescimento e de eficiência alimentar foi utilizado o ganho de peso (GP), a taxa de crescimento específico (TCE), o índice de crescimento médio diário (ICMD), a taxa de conversão alimentar (TCA), a eficiência alimentar (EA), a ingestão voluntária de alimento (IVA), o índice hepatossomático (IHS) e a taxa de mortalidade (TM). Sendo PMI e PMF o peso médio do peixe inicial e o peso médio do peixe final respectivamente, aplicaram-se as seguintes fórmulas:

$GP (\% \text{ PMI} / \text{dia}) = \text{ganho de peso} * 100 / \text{PMI} * \text{n}^\circ \text{ dias}$

$TCE = 100 * (\text{LN}(\text{PMF}) - \text{LN}(\text{PMI})) / \text{n}^\circ \text{ dias};$

$\text{ICMD} = 100 * \text{PMF} (\text{g})^{1/3} - \text{PMI} (\text{g})^{1/3} / \text{n}^\circ \text{ dias};$

$\text{TCA} = \text{ingestão voluntária de alimento (g)} / \text{ganho de peso (g)};$

$\text{EA} = \text{ganho de peso (g)} / \text{ingestão voluntária de alimento (g)};$

$\text{IVA} = \text{ingestão voluntária de alimento} / ((\text{Peso de grupo inicial} + \text{Peso de grupo final}) / 2) \% / \text{n}^\circ \text{ dias};$

$\text{IHS} = \text{peso do fígado (g)} / \text{peso do peixe (g)}$

$\text{TM} = (\text{n}^\circ \text{ de animais mortos} / \text{n}^\circ \text{ inicial de animais}) * 100$

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi efectuada segundo a metodologia proposta por Zar (1999). Os dados foram testados em relação à sua normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e em relação à homogeneidade das variâncias (teste de Levene).

Para avaliar as diferenças entre os grupos alimentados com as diferentes dietas experimentais, os dados foram sujeitos a uma análise de variância simples (ANOVA). No caso da existência de diferenças significativas ($P \leq 0.05$), foi utilizado o teste de Tukey para avaliação das diferenças entre médias. Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS (versão 11) e o JMP 7. Também foi utilizado o teste do qui-quadrado para analisar o parâmetro da taxa de mortalidade.

3 RESULTADOS

3.1 *Dietas experimentais*

Na tabela 2 apresentam-se os vários ingredientes usados na formulação das quatro dietas experimentais e respectiva composição.

Tabela 2 –Composição em ingredientes das dietas experimentais (CTRL, FUM, MFIX e FUM+MFIX).

Ingredientes, %	CTRL	FUM	MFIX	FUM+MFIX
Farinha de peixe ¹	27,25	27,25	27,25	27,25
Concentrado de peixe (CPSP90)	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha de lula	5,00	5,00	5,00	5,00
Concentrado proteico de soja	7,00	7,00	7,00	7,00
Glúten de trigo	10,50	10,50	10,50	10,50
Trigo	3,00	3,00	3,00	3,00
Farinha de ervilha	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de peixe	17,00	17,00	17,00	17,00
Premix (Vitaminas e Minerais) ²	2,00	2,00	2,00	2,00
Vitamin C	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina E	0,05	0,05	0,05	0,05
Lecitina de soja	3,00	3,00	3,00	3,00
Ligante (goma guar)	3,00	3,00	3,00	3,00
Premix macroalgas	1,00	1,00	1,00	1,00
Antioxidante	0,40	0,40	0,40	0,40
Fosfato de calico	0,70	0,70	0,70	0,70
Glicerol	5,00	5,00	5,00	5,00
Fumonisina (mg kg ⁻¹)		0,05		0,05
Micofix (mg kg ⁻¹)			2,50	2,50

¹ Peruvian fishmeal –low temperature (LT), EXALMAR,

² Premix, Portugal: Vitamins (mg or IU kg⁻¹ diet): Vitamin A (retinyl acetate), 20.000 UI; vitamin D3 (DL-cholecalciferol), 2000 UI; vitamin E (Lutavit E50), 100 mg; vitamin K3 (menadione sodium bisulfite), 25 mg; vitamin B1 (thiamine hydrochloride), 30 mg; vitamin B2 (riboflavin), 30 mg; calcium pantothenate, 100 mg; nicotinic acid, 200 mg; vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride), 20 mg; vitamin B9 (folic acid), 15 mg; vitamin B12 (cyanocobalamin), 100 mg; vitamin H (biotin), 3000 mg; vitamin C (Lutavit C35), 1000 mg; inositol, 500 mg; colin chloride, 1000 mg; betaine (Betafin S1), 500 mg; Minerals (mg or % kg⁻¹ diet): Co (cobalt carbonate), 0.65 mg; Cu (cupric sulphate), 9 mg; Fe (iron sulphate), 6 mg; I (potassium iodide), 0.5 mg; Mn (manganese oxyde), 9.6 mg; Se (sodium selenite), 0.01 mg; Zn (zinc sulphate) 7.5 mg; Ca (calcium carbonate), 18.6%; KCl, 2.41%; NaCl, 4.0 %;

Como apresentado na tabela, as únicas diferenças em relação à formulação base (CTRL) das dietas foram a inclusão de fumonisina a 0,05 mg kg⁻¹ na dieta FUM) e a inclusão de um produto comercial (Micofix) da BIOMIN (dieta FUM+MFX), para avaliação do seu desempenho a uma taxa de inclusão de 2,50 mg kg⁻¹. O produto também foi utilizado de modo isolado (dieta MFX) para avaliação do seu possível efeito no crescimento dos peixes.

Tabela 3 –Composição das dietas experimentais (CTRL, FUM, MFX e FUM+MFX).

Composição proximal	CTRL	FUM	MFX	FUM+MFX
% MS	93,87	93,17	96,18	95,47
Cinzas (% MS)	9,14	9,16	9,14	9,14
Proteína bruta (% MS)	48,35	47,83	48,27	48,70
Gordura bruta (% MS)	22,53	23,17	21,89	22,56
Energia bruta (kJ/g % MS)	21,53	21,7	20,98	21,12

Os valores são médias de duas determinações (n=2).

A análise das dietas experimentais confirmaram os pressupostos da sua formulação, tendo sido obtidos níveis isoprotéicos, isolipídicos e isoenergéticos (Tabela 3). A inclusão dos compostos não teve qualquer influência ao nível da composição proximal das dietas.

3.2 Parâmetros do crescimento e da eficiência alimentar, índice hepatossomático e taxa de mortalidade

O desempenho do crescimento e a eficiência alimentar das dietas encontram-se resumidos na tabela 4 (gráficos 1 e 2). Em todos os parâmetros do crescimento e da eficiência do alimento avaliados não foram observadas diferenças significativas (P>0,05).

A taxa de mortalidade foi reduzida, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$; 0,146) para o número de mortes observado em cada tratamento (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros do crescimento, eficiência alimentar, índice hepatossomático e taxa de mortalidade dos juvenis de truta após 58 dias de alimentação com as dietas experimentais.

	CTRL	FUM	FUM+MFX	MFX
PMI (g)	19,04 ± 0,18	19,03 ± 0,09	19,02 ± 0,10	18,99 ± 0,15
PMF (g)	107,23 ± 5,44	108,75 ± 4,86	101,30 ± 5,91	102,16 ± 2,64
GP (% PMI/dia)	7,75 ± 0,36	7,69 ± 0,45	7,22 ± 0,10	7,69 ± 0,17
TCE (% dia)	4,00 ± 0,11	4,01 ± 0,13	3,84 ± 0,03	3,99 ± 0,05
ICMD	4,38 ± 0,13	4,36 ± 0,16	4,17 ± 0,04	4,36 ± 0,06
TCA	0,80 ± 0,01	0,83 ± 0,04	0,78 ± 0,11	0,80 ± 0,00
EA	1,26 ± 0,02	1,21 ± 0,05	1,30 ± 0,20	1,24 ± 0,01
IVA (%PCM/dia)	2,85 ± 0,01	2,92 ± 0,06	2,71 ± 0,37	2,87 ± 0,04
IHS	0,91 ^b ± 0,04	0,76 ^a ± 0,04	0,86 ^{ab} ± 0,04	0,92 ^b ± 0,04
TM (%)	1,33 ± 0,02	3,33 ± 0,04	2,67 ± 0,05	6,0 ± 0,06

Valores são médias + desvio padrão (n= 3). Em cada linha valores com expoente diferente correspondem a diferenças significativas ($P<0.05$).

PMI- Peso médio inicial;

PMF - Peso médio final (g);

GP- Ganho de peso (% PMI/dia);

TCE- Taxa de crescimento específico (% dia);

ICMD- Índice de crescimento diário;

TCA- Taxa de conversão alimentar;

EA- Eficiência alimentar;

IVA- Ingestão voluntária de alimento (%PCM/dia);

IHS- Índice hepatossomático;

TM- Taxa de mortalidade (%)

A análise dos valores dos índices hepatossômáticos (Tabela 4) permitiu a detecção de diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$; 0,018). Os peixes alimentados com a dieta FUM apresentaram os valores mais baixos (0,76) para este parâmetro, em relação aos tratamentos CTRL e MFIX que não continham fumonisina. Por sua vez, o tratamento FUM+MFIX apresentou valores intermédios (0,86), que não se revelaram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$) em relação a todos os restantes tratamentos.

Como foi referido, em relação ao peso corporal dos peixes, verificou-se um aumento semelhante do peso médio sem registo de diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) em todos os grupos alimentados com as dietas experimentais (gráfico 1). O peso médio individual inicial foi na ordem dos 19,02 g, sendo que os peixes terminaram com pesos médios de 104,86 g no final do ensaio. Todos os grupos de peixes quintuplicaram o seu peso corporal médio inicial após 58 dias.

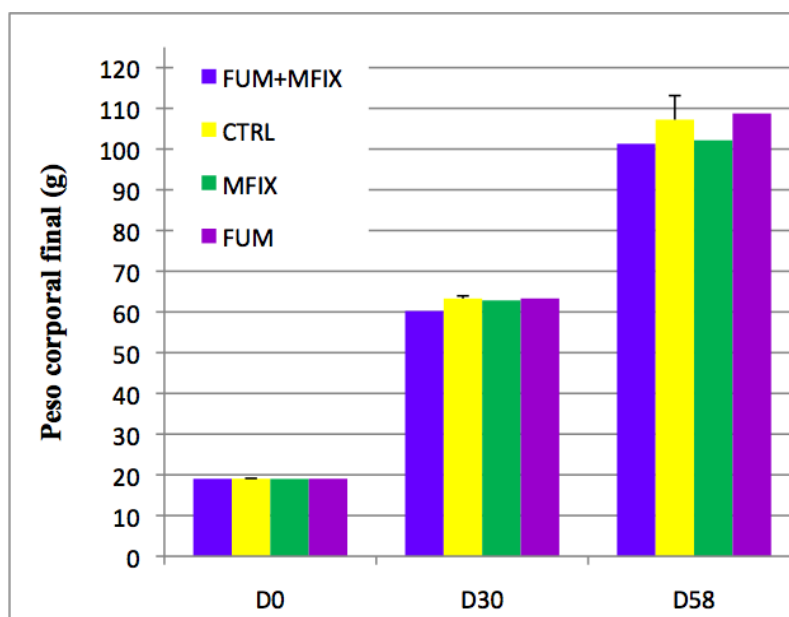


Gráfico 1 – Evolução do peso médio corporal dos juvenis de trutas arco-íris durante 58 dias de ensaio (D – dia).

A evolução da taxa de conversão do alimento está representada de seguida (gráfico 2). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) para este parâmetro da eficiência alimentar sendo que, durante todo o período do ensaio, os grupos de peixes

alimentados com as dietas experimentais apresentaram valores médios baixos (min. 0,7; máx. 0,8) e dentro de limites tidos como óptimos para a espécie em causa.

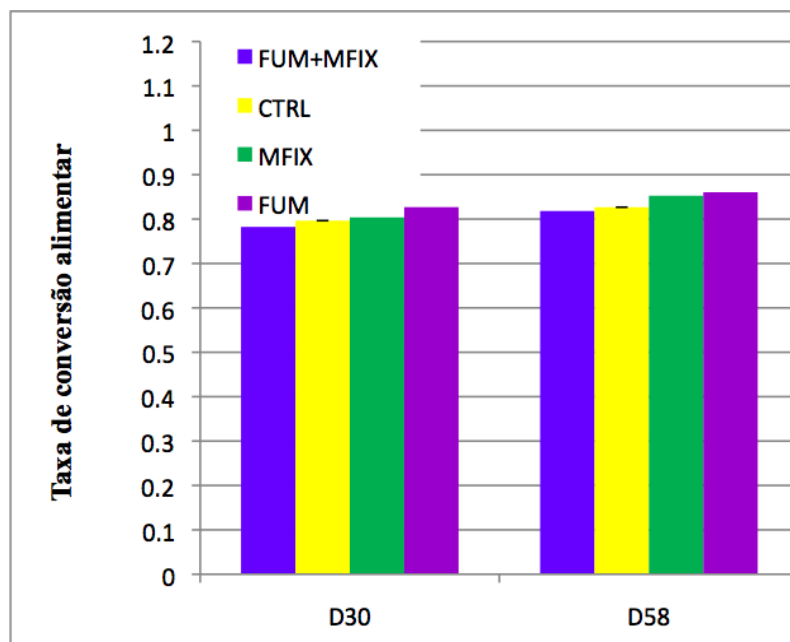


Gráfico 2 – Evolução da taxa de conversão do alimento durante 58 dias de alimentação (D - dia).

3.3 Análise da composição corporal

A análise da composição corporal dos peixes apresenta-se na tabela 5.

Tabela 5 –Composição corporal (inicial e final) dos juvenis de truta após 58 dias de alimentação.

	Humidade	Proteína	Gordura	Cinzas	Energia
Inicial	62,97	21,03	10,25	5,4	8,77
CTRL	63,86 ± 0,5	18,20 ± 0,3	11,16 ± 0,2	3,98 ± 0,1	8,89 ± 0,1
FUM	63,80 ± 2,1	18,24 ± 1,2	13,11 ± 0,7	3,69 ± 0,4	9,42 ± 0,6
FUM + MFI	64,45 ± 1,5	17,01 ± 0,8	12,39 ± 1,1	3,58 ± 0,2	9,05 ± 0,3
MFI	63,88 ± 0,2	18,47 ± 0,0	13,73 ± 0,3	3,41 ± 0,3	9,46 ± 0,1

Valores são médias + desvio padrão (n= 3). Em cada linha valores com expoente diferente correspondem a diferenças significativas (P<0.05).

Em relação aos valores obtidos verificou-se que a composição final das carcaças foi homogênea em todos os tratamentos experimentais, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) entre os vários tratamentos. Os teores em humidade das carcaças variaram entre 63,8 e 64,5 % enquanto a proteína, expressa em % da matéria seca oscilou entre 17,0-18,5%. Os teores em gordura da carcaça foram um pouco menos homogêneos com registo de valores entre 11,16 e 13,73 (%MS) sem contudo apresentarem diferenças estatisticamente significativas.

3.4 Análise anatomopatológica

3.4.1 Avaliação Anatomopatológica Macroscópica

Nesta avaliação, seguindo o protocolo exposto no capítulo da metodologia, foram analisados três peixes por tanque (nove por tratamento) que evidenciaram um aspecto normal exteriormente e internamente (Imagens 1, 2 e 3), apenas com excepção dos fígados de alguns animais.



Imagem 1 – Exemplar de truta arco-íris (foto: José Almeida).



Imagem 2– Procedimento de abertura de um peixe (foto: José Almeida).



Imagem 3– Exposição interna do peixe com visualização do fígado (foto: José Almeida).

Em relação aos grupos de peixes alimentados com as dietas CTRL e MFIX, não foram detectadas alterações ao nível do fígado, tal como podemos observar nas imagens 4 e 5. Todavia, nos grupos de peixes que foram alimentados com dietas que continham fumonisina (dietas FUM e FUM+MFIX) foram encontradas algumas alterações hepáticas. Como podemos ver na imagem 6 o fígado de um peixe da dieta FUM apresenta uma coloração mais pálida que ocupa cerca de 2/3 do fígado, tendo sido observado um outro fígado com uma coloração ligeiramente alterada - vermelho-escuro focal. Nos peixes da dieta FUM+MFIX também se identificaram alterações, estando estas representadas nas imagens 7 e 8.

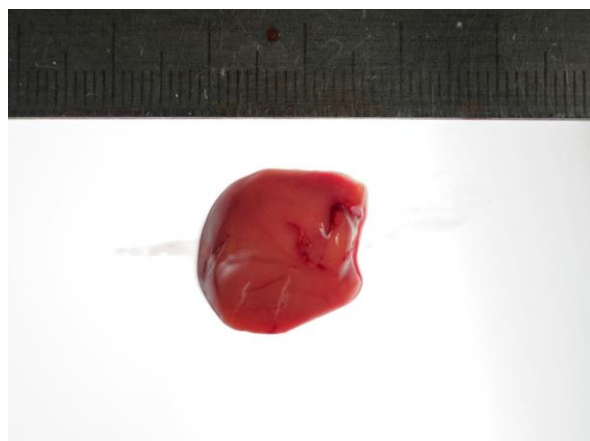


Imagem 4– Fígado com aspecto normal (dieta CTRL) (foto: José Almeida).



Imagem 5 – Fígado com aspecto normal (dieta MFIX) (foto: José Almeida).



Imagem 6–Fígado (dieta FUM), onde se observa uma área com coloração mais pálida (cerca de 2/3 do órgão) (foto: José Almeida).



Imagem 7 – Fígado (dieta FUM+MFX) com coloração heterogênea (zonas castanho-avermelhadas e zonas vermelhas-alaranjadas) (foto: José Almeida).

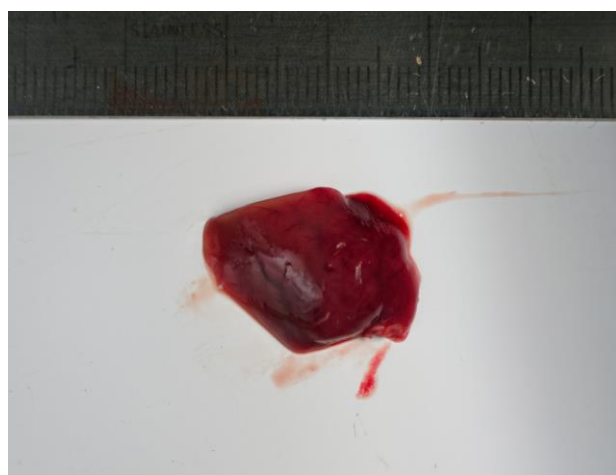


Imagem 8 – Fígado (dieta FUM+MFX) com coloração vermelho escuro difusa e presença de vários vasos evidentes (foto: José Almeida).

3.4.2 Análise Histológica

Em todos os peixes, alimentados com as diferentes dietas, observaram-se infiltrados de células linfoplasmocitárias multifocais aleatórios. Estes infiltrados podem ser analisados, com algum promenor, nas imagens 9, 10, 11 e 12 dos cortes histológicos realizados.

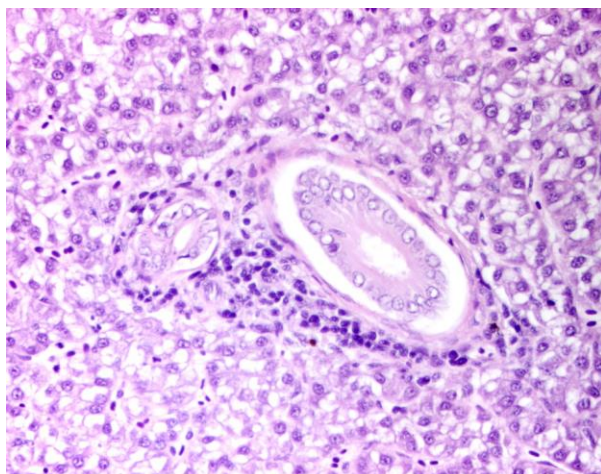


Imagem 9 – Corte histológico de fígado (dieta CTRL) com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).

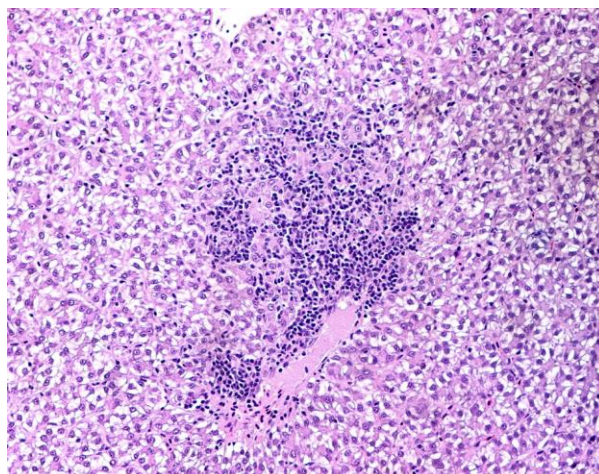


Imagem 10 – Corte histológico de fígado (dieta MFX), com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 20x) (foto: Anabela Alves).

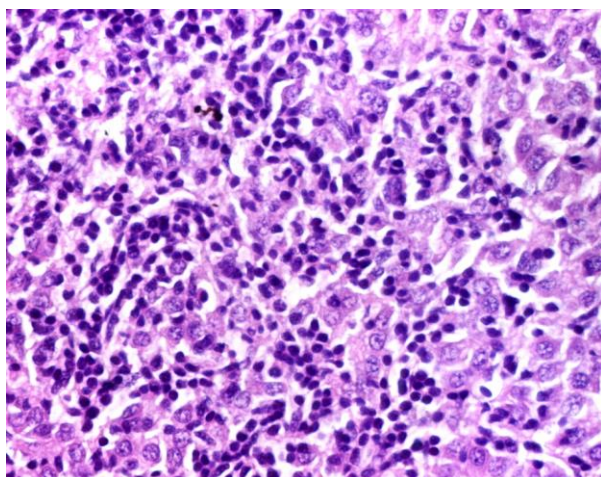


Imagem 11 – Corte histológico de fígado (dieta FUM+MFX) com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 60x) (foto: Anabela Alves).

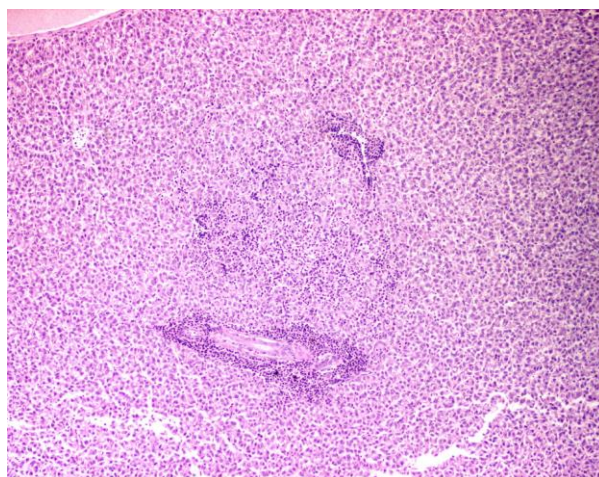


Imagem 12 – Corte histológico de fígado (dieta FUM), com infiltrado linfoplasmocitário (H-E; 10x) (foto: Anabela Alves).

Deve ser referido que nos peixes analisados das dietas CTRL e MFX não foram observadas outras alterações para além destes infiltrados, sendo que os fígados apresentavam uma arquitectura normal para trutas arco-íris (Imagens 13 e 14). Nos peixes alimentados com as dietas FUM e FUM+MFX foram observadas algumas alterações na arquitectura hepática, traduzidas num aspecto mais homogêneo, sinusóides mais visíveis, vacuolização ausente/diminuída e presença de hepatócitos diminuídos de tamanho (Imagens 15 e 16). Também se observaram células gigantes multinucleadas com formação de sincícios nos

ductos biliares (Imagens 17 e 18). Nos peixes da dieta FUM foi observada a presença de necrose focal de liquefacção numa das lâminas analisadas (Imagem 19).

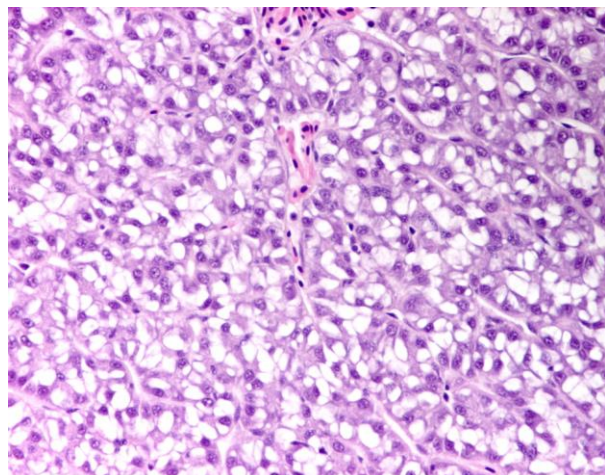


Imagem 13 – Corte histológico de fígado (dieta CTRL) com arquitetura normal (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).

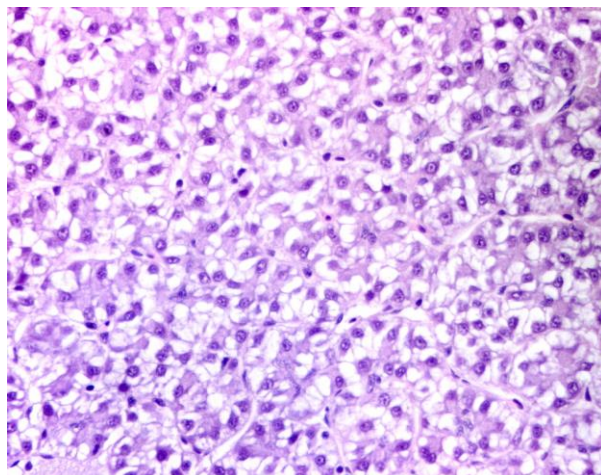


Imagem 14 – Corte histológico de fígado (dieta MFIX) com arquitetura normal (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).

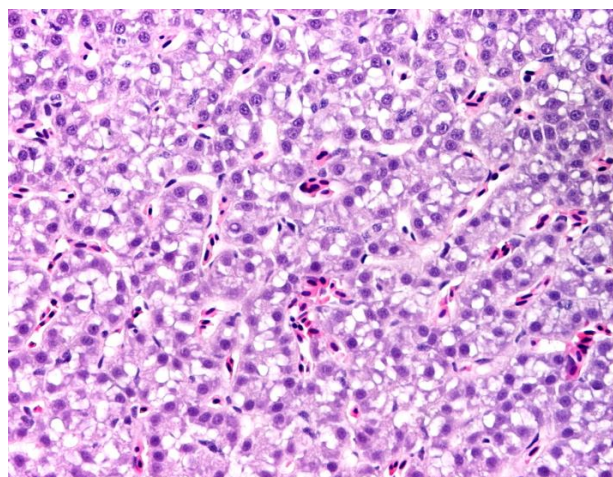


Imagem 15 – Corte histológico de fígado (dieta FUM) com arquitetura alterada (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).

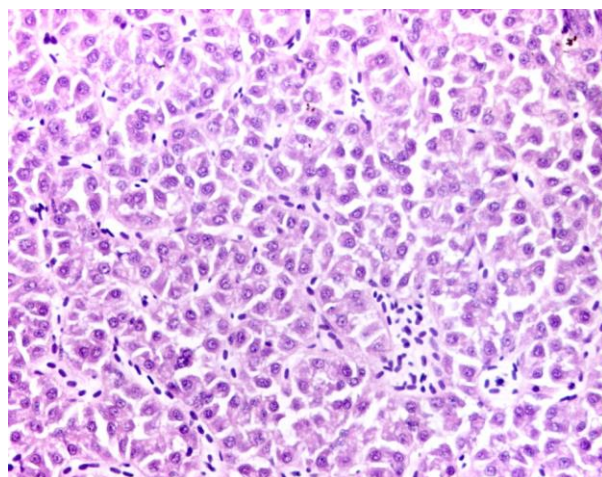


Imagem 16 – Corte histológico de fígado (dieta FUM+MFIX) com arquitetura alterada (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).

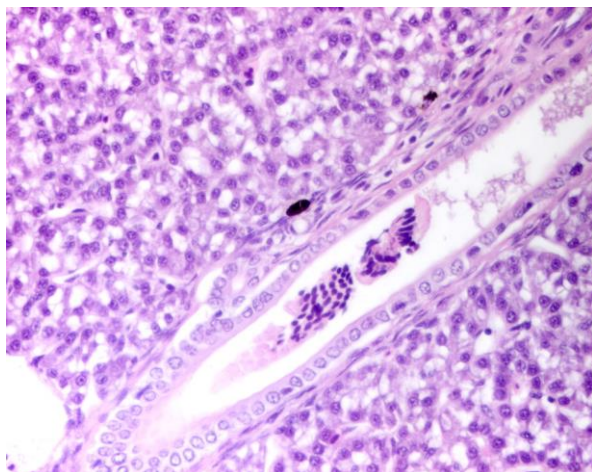


Imagem 17 – Corte histológico de fígado (dieta FUM) com formação de sincícios nos ductos biliares (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).

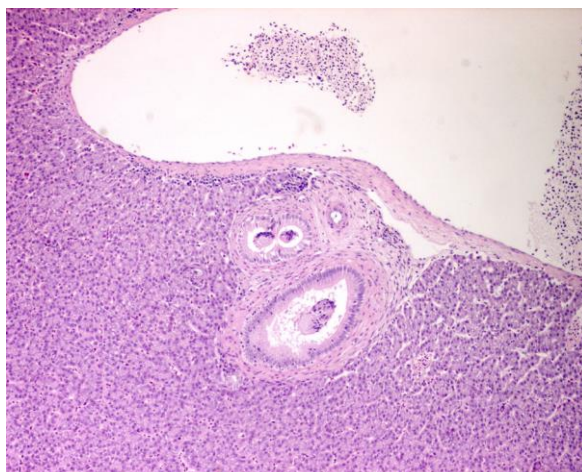


Imagem 18 – Corte histológico de fígado (dieta FUM+MFX) com formação de sincícios nos ductos biliares (H-E; 10x) (foto: Anabela Alves).

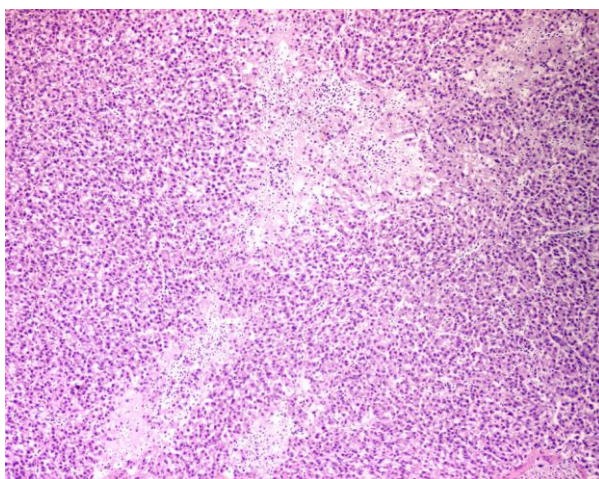


Imagem 19 – Corte histológico de fígado (dieta FUM) com uma zona focal de necrose de liquefacção (H-E; 40x) (foto: Anabela Alves).

4 DISCUSSÃO

Em termos dos parâmetros do desempenho do crescimento e da eficiência alimentar, como referido, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os vários parâmetros avaliados. Os peixes apresentaram crescimentos normais e dentro de valores tidos como ótimos para a espécie. Os peixes alimentados com as dietas experimentais quase sextuplicaram de peso em 58 dias de alimentação e apresentaram um índice de conversão médio na ordem dos 0,80. Os resultados obtidos em termos da influência das fumonisinas, quando comparados com outros estudos referidos na bibliografia, encontram-se enquadrados ao sugerirem que baixas concentrações de fumonisinas não exercem efeitos perniciosos no crescimento. Com efeito, alguns autores referem alterações no crescimento apenas a partir de concentrações de $5,0\text{mg kg}^{-1}$ (Gbore et al. 2010) ou de 40mg kg^{-1} (Li et al. 1994; Tuan et al. 2003) que, em termos comparativos com os níveis que utilizamos, foram muito mais elevadas.

Na análise da composição corporal não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as carcaças dos peixes que foram alimentados com as várias dietas experimentais, significando que a ingestão de fumonisinas a baixas concentrações não teve qualquer efeito na composição corporal final dos peixes. Esta metodologia não foi realizada na bibliografia no que diz respeito a esta micotoxina em peixes, não havendo portanto comparação possível.

Em termos hepáticos, e apesar do nível baixo de inclusão de micotoxinas, o estudo realizado demonstrou que concentrações de $0,05\text{ mg kg}^{-1}$ de fumonisinas na dieta podem induzir alterações ao nível hepatossomático e ao nível macroscópico e histológico em juvenis de trutas arco-íris, com um peso médio inicial de cerca de 19 gramas e após um período de alimentação de 58 dias.

Na bibliografia consultada, o índice hepatossomático não foi um dos parâmetros utilizados para avaliar as possíveis alterações hepáticas induzidas pelas fumonisinas, o que dificulta a comparação dos nossos resultados com os obtidos por outros autores. Estas evidências sugerem que a abordagem realizada terá sido a primeira quer em termos de espécie quer em termos de metodologia. Os resultados que obtivemos, utilizando o índice hepatossomático, originou alterações significativas neste parâmetro hepático ($P < 0,05$) devidas à ingestão das micotoxinas.

Em relação a alterações macroscópicas, apesar de uma amostragem não muito intensiva, (nove peixes por tratamento), foi possível detectar, nos grupos de peixes alimentados com dietas que continham fumonisinas, algumas diferenças face aos animais do grupo controlo. Segundo a bibliografia consultada, a concentração mais baixa estudada de fumonisinas foi de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo que até concentrações de 20 mg kg^{-1} não foram observadas tais alterações macroscópicas (Lumlertdacha et al. 1995). De acordo com o mesmo autor, o surgimento de alterações hepáticas é influenciado pela concentração de fumonisinas ao ter identificado alterações mais exuberantes com o aumento das concentrações destas micotoxinas.

No que diz respeito à histologia, Lumlertdacha et al. (1995) observaram alterações a partir de concentrações de 20 mg kg^{-1} , em peixes da espécie *Ictalurus punctatus* com peso médio inicial de 1,2 gramas (um mês) e peixes com peso de 31 gramas, enquanto que no estudo que realizamos encontramos alterações com concentrações de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ de fumonisinas em peixes com 19 gramas. No entanto, Brown et al. (1994) não identificaram lesões em nenhum órgão estudado, em peixes adultos (*Ictalurus punctatus*), mesmo a concentrações elevadas de 313 mg kg^{-1} . Além deste autor, Tuan et al. (2003) também não detectaram alterações a nível histológico até concentrações de 150 mg kg^{-1} , apesar de terem trabalhado com peixes de um mês de idade com 2,7 gramas de peso, mas da espécie *Oreochromis niloticus*. Com isto, podemos concluir que para além de existirem poucos estudos relacionados com este assunto, estes não se apresentam em concordância, deixando antever a necessidade de trabalhos complementares nesta área de modo a esclarecerem os possíveis efeitos da ingestão de fumonisinas para se poder estabelecer uma ligação entre as espécies, a sua idade e peso e o nível de alterações hepáticas que apresentam.

Apesar da evidente discrepância de resultados apresentada na bibliografia, de acordo com um ensaio recente realizado por nós (resultados ainda não publicados) com peixes de maior tamanho (88 gramas), maior duração (84 dias) e níveis de fumonisinas mais elevados (20 mg kg⁻¹ ; 400x), não foram observadas diferenças significativas no crescimento ($P>0,05$) nem no índice hepatossomático ($P>0,05$). Estes resultados sugerem que os peixes mais jovens são mais sensíveis face aos seus homólogos sub adultos ou adultos, ou seja, a idade/peso do peixe é um factor que, de facto, pode influenciar o grau e a severidade das alterações hepáticas. Os factores que poderão ter causado esta diferença em relação às alterações observadas com baixas concentrações, que não vão de encontro ao que se encontra descrito na bibliografia, podem estar relacionados com a espécie animal, o seu manejo alimentar, bem como possíveis parâmetros da água (pH, oxigénio dissolvido, amónia, temperatura, entre outros). A duração do ensaio não parece constituir um factor a considerar pois o ensaio apresentado durou 58 dias e obteve alterações a concentrações de 0.05 mg kg⁻¹, sendo que à concentração mais baixa na bibliografia (0.3mg kg⁻¹), o ensaio teve uma duração mais prolongada (10 semanas e 14 semanas), o que não implicou o surgimento de alterações (Lumlertdacha et al. 1995).

Em relação à taxa de mortalidade, não foram observadas evidências estatísticas que suportem que os vários tratamentos utilizados pudessem afectar a taxa de mortalidade, o que também foi evidenciado por outros autores (Li et al. 1994; Yildirim et al. 2000; Tuan et al. 2003). Contudo, Lumlertdacha et al. (1995) observaram uma mortalidade elevada com concentrações de 320 mg kg⁻¹ e superiores, devido à bactéria *Cytophaga columnaris*. Gbore et al. (2010) não registaram mortalidade significativa no estudo que efectuaram. Esta mortalidade poderá ter estado associada ao número de peixes por tanque, a alterações no fluxo de água e/ou alterações ao nível dos parâmetros físico-químicos da água.

Neste ensaio foram formuladas dietas isoproteicas e isoenergéticas de acordo com as exigências nutricionais das trutas arco-íris em que, para além da incorporação das fumonisinas, foi também utilizado um produto comercial MFIX (BIOMIN). O uso deste produto pretendeu fazer uma avaliação preliminar da sua eficiência em termos de anulação dos efeitos destas micotoxinas.

Face aos resultados obtidos, podemos referir que o produto MFIX terá tido um efeito positivo no combate aos possíveis efeitos das micotoxinas em termos hepáticos. Isto pois a análise

estatística revelou que a dieta (FUM+MFX), em termos dos índices hepatosomáticos, apesar de não ter diferido significativamente das restantes dietas (CTRL, FUM e MFX) se distanciou, em termos numéricos, do tratamento que continha apenas fumonisinas, a dieta FUM (IHS; 0,75), e com consequente aproximação (IHS: 0,85) para as dietas CTRL e MFX (IHS: 0,91 e 0,92, respectivamente).

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que o fornecimento de uma dieta com baixa concentração (0,05 mg kg⁻¹) de fumonisinas a juvenis de trutas arco-íris (19 gramas) não interfere nos parâmetros do crescimento podendo, no entanto, induzir alterações hepáticas após 58 dias de alimentação. Esta afirmação é suportada pelo facto de terem sido observadas alterações ao nível do índice hepatossomático, da análise macroscópica dos fígados e correspondente análise histológica.

A bibliografia consultada sugere que a concentração (nível) de fumonisinas utilizada interfere de modo significativo com alterações do fígado a nível macroscópico e histológico apenas a partir de concentrações de 80 mg kg⁻¹ e de 20 mg kg⁻¹ respectivamente em peixe gato (Lumlertdacha et al. 1995). Este estudo, aliado ao estudo recente realizado por nós, sugere que a espécie utilizada e a sua idade (peso) são factores que podem influenciar a acção das fumonisinas em termos hepáticos.

Outros aspectos relacionados com o manejo e certos parâmetros da água (pH, oxigénio dissolvido, amónia, temperatura, entre outros) também deverão ser considerados.

Este ensaio preliminar deixa antever que o produto utilizado (MFI-X-BIOMIN) para minorar os efeitos das micotoxinas em dietas para trutas arco-íris, se apresenta como uma alternativa interessante sendo que, para atingir o efeito máximo da sua eficácia, devem ser efectuados mais estudos complementares.

Este estudo preliminar pode constituir um contributo na área ao adicionar informação nova com resultados que envolvem a utilização de uma espécie ainda não abordada, neste tipo de ensaios, na bibliografia. No entanto, são necessários mais estudos nesta área para percebermos o porquê das diferenças observadas em relação a outros estudos científicos.

Seria também interessante a realização de estudos complementares associados aos parâmetros da água, em especial a temperatura, para tentar perceber de que modo esta poderá influenciar as alterações causadas pelas fumonisinas nos peixes de água fria. Em comparação com os animais terrestres, o meio envolvente em que os animais aquáticos vivem tem uma influência mais acentuada em termos da actuação de fármacos e microrganismos, sendo por isso um estudo pertinente.

6 BIBLIOGRAFIA

- Altug, G., & Beklevik, G. (2003). Level of aflatoxin in some fish feeds from fish farming processes, feed factories and imported feeds. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27(6), 1247–1252.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 1999. Official methods of analysis. 16th ed. Washington, USA .
- Baglieri, A., Reyneri, A., Gennari, M., & Nègre, M. (2013). Organically modified clays as binders of fumonisins in feedstocks. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(9), 776–783. <http://doi.org/10.1080/03601234.2013.780941>
- Barbosa, T. S., Pereyra, C. M., Soleiro, C. A., Dias, E. O., Oliveira, A. A., Keller, K. M., Silva, P. P., Cavaglieri, L. R., & Rosa, C. A. (2013). Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. *International Aquatic Research*, 5(1), 3. <http://doi.org/10.1186/2008-6970-5-3>
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <http://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Béraud, P. (2013). Des aliments à base de végétaux pour les poissons d'élevage. Retrieved January 11, 2015, from <http://www6.inra.fr/productions-animales/2013-Volume-26/Numero-4-2013-pp.-301-384/Des-aliments-a-base-de-vegetaux-pour-les-poissons-d-elevage>
- Brown, D. W., McCoy, C. P., & Rottinghaus, G. E. (1994). Experimental Feeding of Fusarium Moniliforme Culture Material Containing Fumonisin B1 to Channel Catfish, *Ictalurus Punctatus*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(1), 123–124. <http://doi.org/10.1177/104063879400600128>
- Carlson, D. B., Williams, D. E., Spitsbergen, J. M., Ross, P. F., Bacon, C. W., Meredith, F. I., & Riley, R. T. (2001). Fumonisin B1 Promotes Aflatoxin B1 and N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine-Initiated Liver Tumors in Rainbow Trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172(1), 29–36. <http://doi.org/10.1006/taap.2001.9129>
- Chern, W. S., & Rickertsen, K. (2003). *Health, Nutrition and Food Demand*. CABI.
- Du, Z.-Y., Zhang, J., Wang, C., Li, L., Man, Q., Lundebye, A.-K., & Frøyland, L. (2012). Risk–benefit evaluation of fish from Chinese markets: Nutrients and contaminants in 24 fish species from five big cities and related assessment for human health. *Science of The Total Environment*, 416, 187–199. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.020>
- Elhadi, N. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. *Asian Pacific*

- Journal of Tropical Biomedicine*, 4(3), 234–8. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60237-9](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60237-9)
- Fallah, A. A., Pirali-Kheirabadi, E., Rahnama, M., Saei-Dehkordi, S. S., & Pirali-Kheirabadi, K. (2014). Mycoflora, aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in fish feed. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 6(4), 419–424. <http://doi.org/10.3920/QAS2012.0186>
- FAO (2007). The state of the world fisheries and aquaculture, 2006. FAO. Rome, Italy.
- FAO (2009). How to Feed the World in 2050. FAO. Rome, Italy.
- FAO (2011). Aquaculture development. 5. Use of wild fish as feed in aquaculture. *FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries*. No. 5, Suppl. 5. Rome, FAO. 2011. 79p.
- FAO (2012). The state of World Fisheries and Aquaculture, 2012. FAO. Rome, Italy.
- FAO, IFAD & WFP. (2014a). The State of Food Insecurity in the World 2014. *Strengthening the enabling environment for food security and nutrition*. FAO. Rome, Italy.
- FAO, (2014b). The state of world fisheries and aquaculture, 2014. Opportunities and challenges. FAO. Rome, Italy.
- FAO (2002). Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds: further thoughts on the fishmeal trap, by M.B. New & U.N. Wijkström. FAO Fisheries Circular No. 975. Rome. 61 pp.
- Ferrando, R. (1981). *Traditional and Non-traditional Foods*. Food & Agriculture Org.
- Francis, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3–4), 197–227. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Fuertes, J. B., Celada, J. D., Carral, J. M., Sáez-Royuela, M., & González-Rodríguez, Á. (2013). Replacement of fish meal by pea protein concentrate in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture*, 388–391, 159–164. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.028>
- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Bognanno, M., Chies, L., DeAngelis, A., & Galvano, M. (1997). Activated carbons: In vitro affinity for fumonisin B-1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *Journal of Food Protection*, 60(8), 985–991.
- Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E., Stone, D., Wilsom, R. & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38(6), 551–579. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Gbore, F. A., Adewole, A. M., Oginni, O., Oguntolu, M. F., Bada, A. M., & Akele, O. (2010). Growth performance, haematology and serum biochemistry of African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings fed graded levels of dietary fumonisin B1. *Mycotoxin Research*, 26(4), 221–227. <http://doi.org/10.1007/s12550-010-0059-2>
- Godfray, H. C. J., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Nisbett, N., Pretty, J., Robinson, C. T., Toulmin, C. & Whiteley, R. (2010a). The future of the global food

- system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2769–2777. <http://doi.org/10.1098/rstb.2010.0180>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010b). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818. <http://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Caldach-Giner, J. A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., Kaushik, S. J. & Pérez-Sánchez, J. (2003). Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotrophic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 220(1–4), 749–767. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00654-3](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00654-3)
- Gregori, R., Meriggi, P., Pietri, A., Formenti, S., Baccarini, G., & Battilani, P. (2013). Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. *Food Control*, 30(1), 280–287. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.033>
- Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41(5), 770–776. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>
- Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., & Wallig, M. A. (2001). *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press.
- He, K. (2009). Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease—Eat Fish or Take Fish Oil Supplement? *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52(2), 95–114. <http://doi.org/10.1016/j.pcad.2009.06.003>
- Huwig, A. S. F. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122(2), 179–88. [http://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00360-5](http://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00360-5)
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., & Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants. Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28(11), 1590–1609. <http://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>
- Jouany, J. P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4), 342–362. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.009>
- Khalil, A. A., Abou-Gabal, A. E., Elfaramawy, A. M., Khaled, A. E., & Abdellatef, A. A. (2013). Lactic Acid Bacteria as Antimycotic and Antimycotoxins Agents against Toxigenic *Fusarium* species Associated to Maize Grains Stored in Egyptian Markets. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7, 93–105.
- Kleeman, G. K., Dal Pai, M., Pezzato, L. E., Teixeira, C. P., Padovani, C. R., & Barros, M. M. (2011). Farelo de algodão como sucedâneo do farelo de soja em rações para tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Saúde E Produção Animal*, 12(3). Retrieved from <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewArticle/2132>
- Kroghdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3), 333–344. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>

- Kumar, V. D. B. (2012). Anti-nutritional Factors in Plant Feedstuffs Used in Aquafeeds.
- Lemke, S. L. S. E. O. (2001). Deamination of fumonisin B(1) and biological assessment of reaction product toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14(1), 11–5. <http://doi.org/10.1021/tx000166d>
- Li, M. H., Raverty, S. A., & Robinson, E. H. (1994). Effects of Dietary Mycotoxins Produced by the Mold *Fusarium moniliforme* on Channel Catfish *Ictalurus punctatus*1. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(4), 512–516. <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00820.x>
- Liao, Y.-J., Yang, J.-R., Chen, S.-E., Wu, S.-J., Huang, S.-Y., Lin, J.-J., Chen, L.-R. & Tang, P.-C. (2014). Inhibition of Fumonisin B1 Cytotoxicity by Nanosilicate Platelets during Mouse Embryo Development. *PloS One*, 9(11), e112290. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0112290>
- Liener, I. (2012). *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Elsevier.
- Lovell, T. (1998). *Nutrition and Feeding of Fish*. Springer Science & Business Media.
- Lumlertdacha, S., Lovell, R. T., Shelby, R. A., Lenz, S. D., & Kemppainen, B. W. (1995). Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. *Aquaculture*, 130(2–3), 201–218. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00219-E](http://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00219-E)
- Magan, N., & Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 131–139. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034>
- Manning, B. B., Ulloa, R. M., Li, M. H., Robinson, E. H., & Rottinghaus, G. E. (2003). Ochratoxin A fed to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) causes reduced growth and lesions of hepatopancreatic tissue. *Aquaculture*, 219(1–4), 739–750. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00033-4](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00033-4)
- Matejova, I., Modra, H., Blahova, J., Franc, A., Fictum, P., Sevcikova, M., & Svobodova, Z. (2014). The Effect of Mycotoxin Deoxynivalenol on Haematological and Biochemical Indicators and Histopathological Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biomed Research International*, 310680. <http://doi.org/10.1155/2014/310680>
- Mazen, M. B., El-Kady, I. A., & Saber, S. M. (1990). Survey of the mycoflora and mycotoxins of cotton seeds and cotton seed products in Egypt. *Mycopathologia*, 110(3), 133–138. <http://doi.org/10.1007/BF00437536>
- Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Cárdenas-Chávez, D. L., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2013). Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B1 and B2 production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(85), 20130320. <http://doi.org/10.1098/rsif.2013.0320>
- Meredith, F. I., Riley, R. T., Bacon, C. W., Williams, D. E., & Carlson, D. B. (1998). Extraction, Quantification, and Biological Availability of Fumonisin B1 Incorporated into the Oregon Test Diet and Fed to Rainbow Trout. *Journal of Food Protection*, 61(8), 1034–1038.

- Merino, G., Barange, M., Blanchard, J. L., Harle, J., Holmes, R., Allen, I., Allison, E. H., Badjeck, M. C., Dulvy, N. K., Holt, J., Jennings, S., Mullon, C. & Rodwell, L. D. (2012). Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate? *Global Environmental Change*, 22(4), 795–806. <http://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2012.03.003>
- Milani, J. M. (2013). Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Vet Med*, 58, 405–411.
- Milani, J., & Maleki, G. (2014). Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2372–2375. <http://doi.org/10.1002/jsfa.6600>
- Myers, N. (1992). *Tropical Forests and Climate*. Springer Science & Business Media.
- Nácher-Mestre, J., Ibáñez, M., Serrano, R., Pérez-Sánchez, J., & Hernández, F. (2013). Qualitative Screening of Undesirable Compounds from Feeds to Fish by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(9), 2077–2087. <http://doi.org/10.1021/jf304478n>
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldburg, R. J., Hua, K. & Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15103–15110. <http://doi.org/10.1073/pnas.0905235106>
- Nizza, A., & Piccolo, G. (2009). Chemical-nutritional characteristics of diets in aquaculture. *Veterinary Research Communications*, 33(1), 25–30. <http://doi.org/10.1007/s11259-009-9240-5>
- Oliveira, A. M. B. de M., Cyrino, J. E. P. (2004). Attractants in plant protein-based diets for the carnivorous largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Scientia Agricola*, 61(3), 326–331.
- Parker, R. O. (2000). *Aquaculture Science*. Cengage Learning.
- Pereira, T. G., & Oliva-Teles, A. (2002). Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture Research*, 33(14), 1183–1189. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00782.x>
- Pietsch, C., Kersten, S., Burkhardt-Holm, P., Valenta, H., & Daenicke, S. (2013). Occurrence of Deoxynivalenol and Zearalenone in Commercial Fish Feed: An Initial Study. *Toxins*, 5(1), 184–192. <http://doi.org/10.3390/toxins5010184>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science & Business Media.
- Piva, A., Casadei, G., Pagliuca, G., Cabassi, E., Galvano, F., Solfrizzo, M., Riley, R. T. & Diaz, D. E. (2005). Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B1 when fed to weanling piglets. *Journal of Animal Science*, 83(8), 1939–1947.
- Prudente Jr, A. D. (2008). *Evaluation of aflatoxin-related products from ozonated corn*. Louisiana State University. Retrieved from <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-07102008-105943/>
- Rana, K. J., Siriwardena, S., Hasan, M. R., & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). *Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and*

- aquaculture production*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Reinertsen, H., & Haaland, H. (1995). *Sustainable Fish Farming*. CRC Press.
- Reis, B., Cabral, E. M., Fernandes, T. J. R., Castro-Cunha, M., Oliveira, M. B. P. P., Cunha, L. M., & Valente, L. M. P. (2014). Long-term feeding of vegetable oils to Senegalese sole until market size: Effects on growth and flesh quality. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet. *Aquaculture*, 434, 425–433. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.002>
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., & Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101–2105.
- Schwartz, P., Bucheli, T. D., Wettstein, F. E., & Burkhardt-Holm, P. (2013). Life-cycle exposure to the estrogenic mycotoxin zearalenone affects zebrafish (*Danio rerio*) development and reproduction. *Environmental Toxicology*, 28(5), 276–289. <http://doi.org/10.1002/tox.20718>
- Schwartz, P., Thorpe, K. L., Bucheli, T. D., Wettstein, F. E., & Burkhardt-Holm, P. (2010). Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. *The Science of the Total Environment*, 409(2), 326–333. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.017>
- Smith, D., & Henderson, R. (1991). *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press.
- Solfrizzo, M., Avantaggiato, G., & Visconti, A. (1997). Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 692(1), 87–93.
- Solfrizzo, M., Carratu, M. R., Avantaggiato, G., Galvano, F., Pietri, A., & Visconti, A. (2001a). Ineffectiveness of activated carbon in reducing the alteration of sphingolipid metabolism in rats exposed to fumonisin-contaminated diets. *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 507–511. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00160-5](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00160-5)
- Solfrizzo, M., Visconti, A., Avantaggiato, G., Torres, A., & Chulze, S. (2001b). In vitro and in vivo studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia*, 151(3), 147–153. <http://doi.org/10.1023/A:1017999013702>
- Steffens, W. (1997). Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151(1–4), 97–119. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01493-7](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01493-7)
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1–4), 146–158. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R., & Metian, M. (2011). *Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Tolleson, W. H., Couch, L. H., Melchior, W. B., Jenkins, G. R., Muskhelishvili, M., Muskhelishvili, L., McGarrity, L. J., Domon, O., Morris, S. M. & Howard, P. C. (1999). Fumonisin B1 induces apoptosis in cultured human keratinocytes through

- sphinganine accumulation and ceramide depletion. *International Journal of Oncology*, 14(5), 833–843.
- Torstensen, B. E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., Waagbø, R., Hemre, G.-I., Fontanillas, R., Nordgarden, U., Hevrøy, E. M., Olsvik, P. & Berntssen, M. H. G. (2008). Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture*, 285(1–4), 193–200. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.025>
- Tuan, N. A., Manning, B. B., Lovell, R. T., & Rottinghaus, G. E. (2003). Responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different concentrations of moniliformin or fumonisin B1. *Aquaculture*, 217(1–4), 515–528. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00268-5](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00268-5)
- Voss, K. A., Smith, G. W., & Haschek, W. M. (2007). Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4), 299–325. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.007>
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., & Merrill, A. H. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14486–14490.
- Welch, A. R. H. (2010). From Fishing to the Sustainable Farming of Carnivorous Marine Finfish. *Reviews in Fisheries Science*, 18, 235–247. <http://doi.org/10.1080/10641262.2010.504865>
- Wood, G. E. (1992). Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *Journal of Animal Science*, 70(12), 3941–3949.
- Wozny, M., Obremski, K., Jakimiuk, E., Gusiatin, M., & Brzuzan, P. (2013). Zearalenone contamination in rainbow trout farms in north-eastern Poland. *Aquaculture*, 416, 209–211. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.030>
- Yildirim, M., Manning, B. B., Lovell, R. T., Grizzle, J. M., & Rottinghaus, G. E. (2000). Toxicity of Moniliformin and Fumonisin B1 Fed Singly and in Combination in Diets for Young Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(4), 599–608. <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2000.tb00909.x>
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129–144. <http://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>