



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FABIANA AKEMI HIRATA BAE

**METODOLOGIA ANALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS
E MICROCISTINA EM PISCICULTURA**

Londrina

2022

FABIANA AKEMI HIRATA BAE

**METODOLOGIA ANALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS
E MICROCISTINA EM PISCICULTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elisa Yoko Hirooka

Londrina

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bae, Fabiana Akemi Hirata.

Metodologia analítica na determinação de micotoxinas e microcistina em piscicultura / Fabiana Akemi Hirata Bae. - Londrina, 2022.
52 f.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Cromatografia - Tese. 2. Micotoxinas - Tese. 3. Microcistina - Tese. 4. Piscicultura - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.1

FABIANA AKEMI HIRATA BAE

**METODOLOGIA ANALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS
E MICROCISTINA EM PISCICULTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Ismael Rodrigues Amador
Grupo Abelf - Divisão de Farmacêuticos, Jaguapitã-
PR

Dr. Lycio Shinji Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Dr^a. Cássia Takabayashi Yamashita
Universidade Federal do Paraná – Jandaia do Sul

Dr^a. Daiane Dias Lopes
USDA-ARS - Departamento de Agricultura dos
Estados Unidos

Londrina, 20 de setembro de 2022

À minha família dedico, com amor.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, incentivo, paciência, compreensão e oportunidades concedidas durante a orientação.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelos conhecimentos, oportunidade e infraestrutura concedidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pelo suporte e conhecimentos repassados.

A prof^a Dr^a. Marta Toledo Benassi e Dr. Ismael Rodrigues Amador por todo conhecimento e contribuição concedidos na qualificação.

Aos proprietários dos pesqueiros que concederam as amostras para a realização da pesquisa.

A Dra. Daiane Dias Lopes pelos conhecimentos e amizade compartilhados durante o mestrado.

Ao prof. Dr. José Carlos pelas amostras concedidas para pesquisa.

A Dra. Renata Sobottka por compartilhar os ensinamentos perante extração e operação do UPLC MS/MS.

Ao Dr. Ismael Rodrigues Amador e Dr. Lycio Shinji Watanabe pelo suporte na manutenção dos equipamentos.

Aos colegas de laboratório: Daiane Dias Lopes, Fernando de Godoi Silva, Tuany Marin, Giovana Marcolino e Maikon de Nascimento pela amizade, troca de experiência e momentos de descontração.

À minha família, em especial a minha mãe Sachie pelo incentivo, apoio e força. Ao meu namorado e meus amigos pelo carinho e incentivo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A piscicultura nacional vem se fortalecendo com o incentivo e aumento do consumo de peixe, sendo a qualidade da carne dependente da alimentação dos animais. O cereal predomina na formulação de ração, cuja susceptibilidade à contaminação por fungos micotoxigênicos implica na ingestão indireta de micotoxinas através do peixe, sendo este consumido como produto de origem animal. Além das toxinas apresentarem efeito agudo afetando a função hepática e renal ao consumidor, o consumo em baixas doses poderia causar efeito crônico indesejável à saúde humana, neste sentido a importância do monitoramento de ração. O aumento do teor de nitrogênio e fósforo advindas da ração na água dos tanques, pode desencadear eutrofização e consequente fenômeno de floração de cianobactérias, responsável por sabor desagradável ao pescado, e produção de microcistina hepatotóxica. Visando contribuir na análise de toxinas naturais presentes em níveis residuais, este trabalho teve como objetivo principal a aplicação de métodos cromatográficos com ênfase à aplicação de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas - UHPLC-MS/MS para micotoxinas em ração (aflatoxinas, fumonisinas e deoxinivalenol), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fotodiodos - HPLC-PDA para microcistina LR em água e também o método de imunoensaio para análise de microcistina LR em água, sendo as amostras oriundas de piscicultura da região do município de Londrina, Norte do Paraná e município de Araguaína, Norte de Tocantins. As extrações empregadas no trabalho foram pré concentração em cartucho C18 (SPE) para as amostras de água, e extração *QuEChERS* para amostras de ração. Das 36 amostras de água apenas três foram quantificadas para microcistina LR. Já as amostras de ração 84 % foram positivas para fumonisina B₁, 100 % para fumonisina B₂, e 80 % para Deoxinivalenol. Os resultados indicaram que as pisciculturas estão ausentes de contaminação por microcistina LR, diferentemente dos valores de micotoxinas encontradas em amostras de ração, que apesar de estarem contaminadas apresentaram valores dentro do limite aceitável pela legislação.

Palavras-chave: cromatografia, micotoxina, microcistina, ração, água, peixe

ABSTRACT

The national fish-farming has been strengthened with the encouragement and increase of fish consumption, with the quality of meat being dependent on animal feed. Cereal is predominates in feed formulation, whose susceptibility to contamination by mycotoxigenic fungi implies the indirect ingestion of mycotoxins through fish, which is consumed as a product of animal origin. In addition to the toxins having an acute effect affecting the hepatic and renal function of consumer, consumption in low doses could cause an undesirable chronic effect on human health, in this sense, it is important to monitor de feed. The increase in the nitrogen and phosphorus content from the ration in the water of the tanks can trigger eutrophication and consequent cyanobacterial flowering phenomenon, responsible for unpleasant taste to fish, and production of hepatotoxic microcystin. Aiming to contribute to the analysis of natural toxins present in residual levels, this work had as main objective the application of chromatographic methods with emphasis on the application of ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry – UHPLC-MS/MS for mycotoxins in feed (aflatoxins, fumonisins and deoxynivalenol), high performance liquid chromatography coupled to the photodiode detector – HPLC-PDA for microcystin LR in water, and also the immunoassay method for the analysis of microcystin LR in water, with the samples coming from fish farming in the region of the municipality of Londrina, North of Paraná state and municipality of Araguaína, North of Tocantins state. The extractions used in the work were pre concentration in C18 cartridge (SPE) for water samples, and QuEChERS extraction for feed samples. Of the 36 water samples, only three were quantified for microcystin LR. As for the feed samples, 84 % were positive for fumonisin B₁, 100 % for fumonisin B₂ and 80 % for Deoxynivalenol. The results indicated that fish farms are free from contamination by microcystin LR, unlike the values of mycotoxins found in feed samples, which, despite being contaminated, presented values within the acceptable limit by legislation.

Keywords: Chromatography, mycotoxins, microcystin, feed, water, fish

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Gráfico do aumento da produção na piscicultura	13
Figura 2. Estrutura básica da microcistina onde X, Z são aminoácidos	15
Figura 3. Estrutura química das Aflatoxinas de maior ocorrência.....	18
Figura 4. Estrutura química das fumonisinas.....	19
Figura 5. Estrutura química de principais tricotecenos.	20
Figura 6. Esquema ilustrativo do método de ELISA competitivo indireto	22
Figura 7. Fluxograma geral do trabalho.....	26
Figura 8. Localização aproximada das pisciculturas	27
Figura 9. Esquema de cultivo de cianobactéria para produção de extrato de microcistina	28
Figura 10. Cultivo de cianobactérias <i>Microcystis aeruginosa</i>	29
Figura 11. Fluxograma das etapas simplificadas que serão empregados para ração e água.	33
Figura 12. Curva analítica de MC-LR utilizando método ic-ELISA.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente fase móvel UHPLC-MS/MS	32
Tabela 2. Condições de detecção UHPLC-MS/MS para cada micotoxina.....	32
Tabela 3. Resultado de recuperação de Microcistina-LR	34
Tabela 4. Resultado amostra de proficiência inter laboratorial da empresa Romer Labs – Aflatoxins / Fumonisin in Corn (CSSMY015 – M18411AF) October/December 2018	38
Tabela 5. Curva analítica e coeficiente de determinação	38
Tabela 6. Média de contaminação por micotoxinas das rações dos pesqueiros	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcM – Anticorpo monoclonal

AFB₁ – Aflatoxina B₁

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA – Albumina de Soro Bovino

DON – Deoxinivalenol

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FB₁ – Fumonisina B₁

FB₂ – Fumonisina B₂

FDA – *Food and Drug Administration* (Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços humanos dos Estados Unidos)

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e Seguro)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MC_LR – Microcistina LR

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PBST – Tampão fosfato salino + 0,05% Tween 20

PDA – *Photo Diodo Array* (Arranjos de fotodiodo)

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

rpm: rotação por minuto

SPE – *Solid Phase Extraction* (Extração em fase sólida)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Piscicultura	12
2.2 Cianobactéria e Microcistina	14
2.3 Ração	16
2.4 Micotoxinas	17
2.5 Métodos cromatográficos	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivo Específico	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Material	24
4.2 Amostras	25
4.3 Métodos	28
4.3.1 Produção do extrato de Microcistina-LR	28
4.3.2 Imunoensaio (Ic Elisa): Detecção de Microcistina em água	29
4.3.3 Extração em fase sólida (SPE) e análises cromatográficas de Microcistina em água	30
4.3.4 Método de Extração <i>QUECHERS</i> com modificações aplicado para amostras de ração	31
4.3.5 Método cromatográfico UHPLC-MS/MS	31
4.4 Avaliação do desempenho metodológico	33
4.5 Esquema dos métodos empregados	33
4.6 Análise estatística	34
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	34
5.1 Produção de extrato de microcistina-LR	34
5.2 Avaliação do desempenho metodológico de microcistina-LR em água	34
5.2.1 Extração em fase sólida (SPE) e análise cromatográfica de microcistina-LR em água	35
5.2.2 Imunoensaio (IC ELISA): determinação de microcistina-LR em água	36
5.3 Avaliação do desempenho metodológico de micotoxinas em ração ..	38

5.3.1 Extração QuEChERS e análise cromatográfica de micotoxinas em ração

38

6. CONCLUSÃO 43

REFERÊNCIAS..... 44

APÊNDICE A – Tabela de resultados de MC-LR em amostras de água 49

APÊNDICE B – Tabela de resultados de Micotoxinas em amostras de ração

50

APÊNDICE C – Cromatograma de análise de microcistina LR em água ... 51

APÊNDICE D – Cromatogramas de análises de micotoxinas em ração 52

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é a técnica de criação de organismos aquáticos, com a produção brasileira da atividade crescente a cada ano, a produção cresce em média 4,74 % ao ano, em 2014 a produção era de 578,800 t e em 2021 atingiu 841,005 t, um aumento de 45 % (Associação de piscicultura do Brasil, 2022). A piscicultura vem sendo intensificada no Estado do Paraná principalmente devido ao aumento do consumo de peixe pela comunidade em vista de incentivo direcionado ao alimento saudável, melhorias em tecnologia de produção, apoio técnico do Governo do Paraná - Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (Emater) e desenvolvimento de cooperativas (Paraná Cooperativo, 2019).

Oreochromis niloticus, a tilápia, é um onívoro capaz de aceitar alimentos artificiais em todas as fases de crescimento, considerado como peixe de fácil adaptação à piscicultura (HAYASHI, 1999). Apesar disso, determinados cuidados são necessários, em especial perante qualidade da água e ração utilizada na alimentação.

A qualidade da água é fundamental para a sobrevivência dos peixes, como a piscicultura é realizada em taques abertos, expostos aos fatores ambientais, e a presença de outros microorganismos como os fitoplânctons, o monitoramento da água é de suma importância.

Fitoplânctons são microrganismos aquáticos, cuja presença se associa a concentrações de fósforo e nitrogênio; o aumento pode estimular a elevação da sua população, desencadeando a floração (HURTADO, 2014). Dentre cianobactérias fitoplantônicas, determinadas espécies são capazes de produzir cianotoxinas: hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (KAMOGAE et al., 2007; PASOSSO et al., 2007). A microcistina, um metabólito secundário da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, destaca-se entre as hepatotoxinas (GIORDANO, 2007). Estudos identificaram a bioacumulação de microcistina em animais aquáticos, tornando-os impróprio para o consumo (COSTA et al., 2017; KAMOGAE, 2007; PANOSSO et al., 2007).

Os subprodutos vegetais compõem 90 % da dieta de peixe onívoro, com ênfase ao farelo de soja e milho (HAYASHI, 1999; COLEÇÃO SENAR, 2019). Considerando que os produtos de origem vegetal são susceptíveis à contaminação por fungos, como destaque a *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., a qualidade e

segurança da ração depende de controle de ingredientes, principalmente oriundos de cereais (HASHIMOTO et al., 2003; BARBOSA et al., 2013). A contaminação da ração e a bioacumulação de toxina no tecido de peixe pode trazer consequências indesejáveis à saúde pública, assim como repercutir negativamente ao setor econômico (GODOY, 2018; PINHEIRO et al., 2015).

O monitoramento das aflatoxinas manifesta alto interesse para o setor produtivo alimentício. Métodos analíticos como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e imunoenensaio (ELISA) são empregados para garantir os limites permitidos pela legislação. Para detecção de multomicotoxinas em nível de traços, a técnica mais avançada é a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Apesar da expansão da atividade da piscicultura brasileira são poucos os estudos relacionados a contaminação por toxinas naturais nesta atividade. Devido à falta de regulamentação e fiscalização, são poucos os estudos relacionados a contaminação por toxinas naturais na atividade de piscicultura, com a expansão desta atividade e crescente exportação destes alimentos, é necessário o monitoramento e controle, a fim de garantir a segurança desses produtos alimentícios.

O trabalho teve como objetivo aplicar métodos analíticos e imunológicos para avaliar o nível de contaminação das águas das pisciculturas das regiões de Londrina-PR e Araguaína-TO. Pretende-se contribuir avaliando a ração destinada aos peixes e a água em que vivem com o intuito de verificar a co-ocorrência de toxinas naturais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

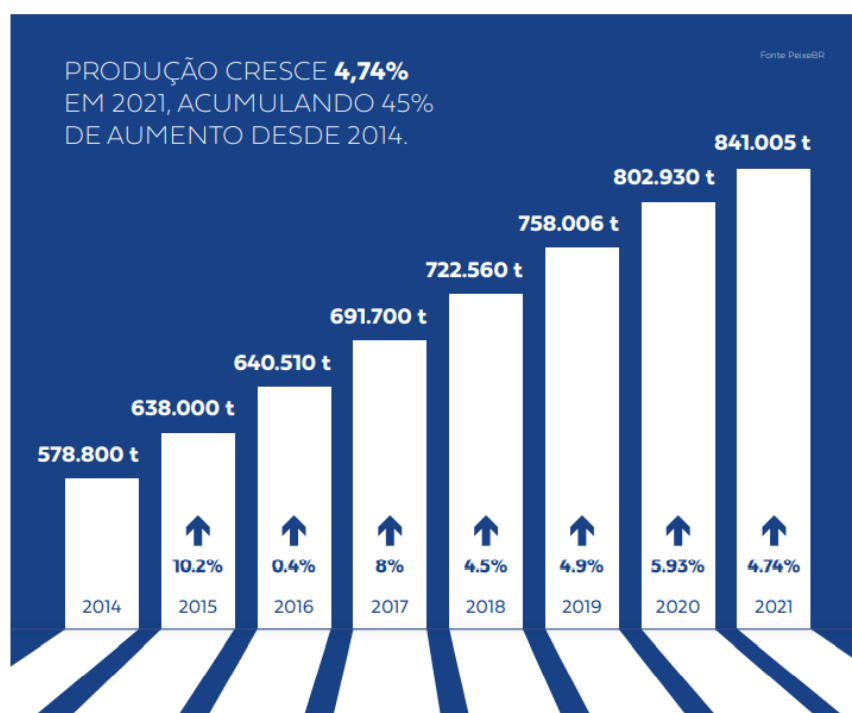
2.1 Piscicultura

A aquicultura é a técnica empregada para a criação de organismos aquáticos, seja peixe (piscicultura), crustáceos (carcinicultura), entre outros. A piscicultura emprega tanque-rede na criação de peixe em gaiola mantida na água de rio, lago ou mar; tanque escavado trata-se de um reservatório artificial escavado no solo e mantida por água de rio ou lago (EMBRAPA, 2020).

A produção brasileira da atividade de aquicultura no ano de 2018 atingiu 722.560 t, no ano seguinte a produção teve um aumento de 4,9 % chegando a 758.006 t, com aumentos sucessivos em 2020 a produção chegou a atingir 802.930 t e no ano

de 2021 houve um crescimento de 4,7 % com produção de 841.005 t que movimentou 8 bilhões de reais, conforme Figura 1. Em 2021 a produção de tilápia representou 534 mil t, crescimento de 9,8 % comparado ao ano anterior; o Paraná é o maior produtor de tilápia do Brasil com 182 mil t, esta espécie é a mais exportada, sendo os Estados Unidos o líder de importação com 64 % em 2021 (Associação de piscicultura do Brasil, 2022). O Departamento de Economia Rural (Deral) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Estado do Paraná estimou o aumento da produção de pescado, devido ao aumento do consumo de peixe, melhoria na tecnologia de produção, apoio técnico do Governo paranaense – Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (Emater) e, inserção de cooperativas, a exemplo de Copacol e C. vale. A região Oeste do Paraná se destaca com 66 % da produção, principalmente na região de Toledo e Cascavel com tilápia representando 95 % (Paraná Cooperativo, 2019).

Figura 1. Gráfico do aumento da produção na piscicultura



Fonte: Associação de piscicultura do Brasil, 2022

A região norte do Estado de Tocantins vem se destacando na atividade de piscicultura por intermédio do convênio de Assistência Técnica e Extensão Rural (Ater) desenvolvida pelo Governo de Tocantins, e parceria com o MAPA que fornece acompanhamento técnico nas propriedades. É um Estado com boa logística de distribuição, possibilita acesso aos portos de Itaqui (MA) e de Santos (SP), além de

possuir uma vasta disponibilidade hídrica, conta com o plano de desenvolvimento sustentável focadas no licenciamento ambiental e sanidade; incentivos fiscais; financiamento; pesquisas entre outros (MACHADO, 2021). Em 2021, o Estado ocupou a 18ª posição no ranking nacional com produção de 16.250 t, sendo 250 t da espécie tilápia e 16.000 t de peixes nativos (Associação de piscicultura do Brasil, 2022)

A rápida expansão do cultivo de tilápia do Nilo, pertencente a espécie *Oreochromis niloticus*, originária da África, Israel e Jordânia, se deve ao elevado potencial na adaptação em piscicultura. Introduzida no Brasil na década de 70, a espécie onívora aceita alimentos artificiais (HAYASHI et al., 1999).

A qualidade da água é fundamental na aquicultura, devendo-se monitorar os principais fatores: oxigênio dissolvido com valores de referência entre 5-6 mg/L, temperatura de 26 a 32 °C, pH 6,5 - 8, transparência de 80 a 200 cm e teor de amônia e nitrito < 0,5 mg/L. Os compostos amoniacais derivam de componentes proteicos de ração, oxidadas/metabolizadas por bactérias em nitrato, seguida de uso pelo fitoplâncton (EMPRAPA, 2020).

2.2 Cianobactéria e Microcistina

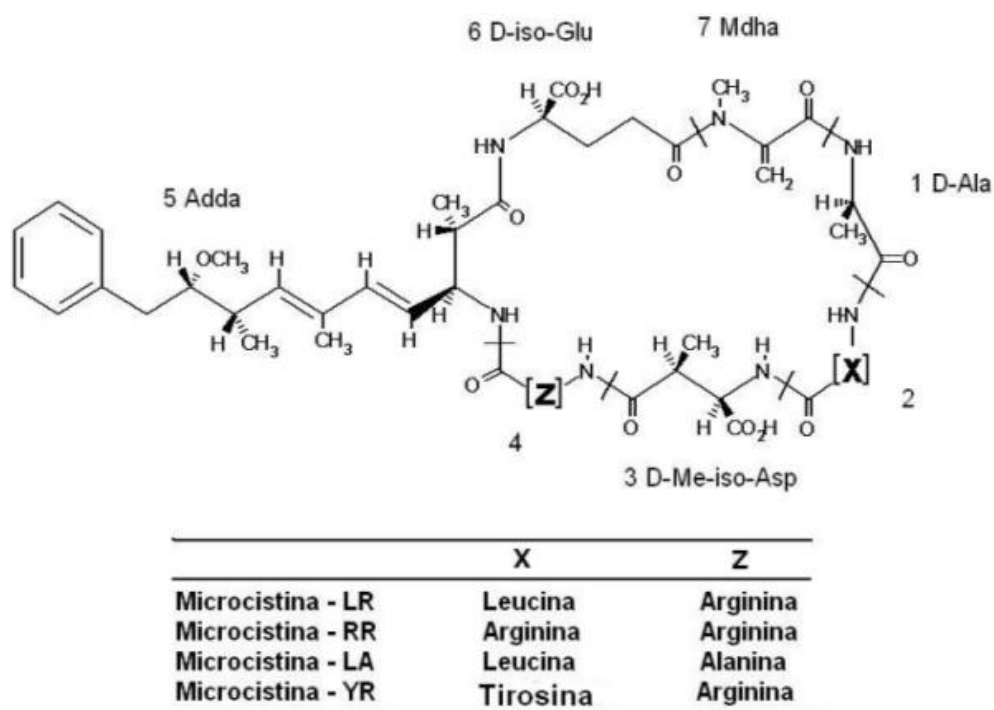
Fitoplânctons fotossintetizantes ocorrem em ambientes aquáticos e terrestres, sendo os principais grupos de água doce: *Cyanophyta*, *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Chrysophyta* e *Pyrrophyta*. A predominância de organismos aquáticos se associa principalmente ao nível de fósforo e nitrogênio (eutrofização) em água, capazes de desencadear a floração, ou seja, a elevação da população de fitoplâncton (HURTADO, 2014). Na piscicultura o aumento do fenômeno de floração reduz o nível de oxigênio na água, ocasionando a mortalidade de peixe, promove metabolismo secundário em fitoplâncton e, causa sabor desagradável ao pescado (MACEDO; SIPAÚBA-TAVARES, 2010). A resolução CONAMA 357/2005 permite densidade máxima de 50.000 cél/mL de cianobactéria para aquicultura e atividade de pesca (CONAMA 357/2005).

As cianobactérias são fitoplânctons com determinadas espécies produtoras de cianotoxinas, classificadas em neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas. A contaminação em água representa sério perigo à saúde pública, seja ao nível ambiental, como na produção de alimentos de origem aquática. Intoxicação grave

relacionado a cianotoxina como ocorreu em Caruaru, Pernambuco-Brasil envolvendo hemodiálise em renal crônico, causando hepatotoxicose devido a intoxicação por microcistina e pacientes fatais pela falência hepática (AZEVEDO et al., 2002; KAMOGAE et al., 2007; PANOSSO et al., 2007).

A microcistina se destaca entre as hepatotoxinas, metabólito secundário de cianobactéria, em destaque a *Microcystis aeruginosa*, ela é formada por sete peptídeos cíclicos predominantemente solúveis em água. Os análogos destas toxinas são caracterizados pela diferença do arranjo dos aminoácidos na sua estrutura molecular, por exemplo, microcistina LR é formada pelos aminoácidos leucina e arginina, conforme Figura 2 (MARTINS, 2010; CHORUS, BARTRAM, 1999).

Figura 2. Estrutura básica da microcistina onde X, Z são aminoácidos



Fonte: Martins, 2010.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a Tolerância Diária Ingerida é de 0,04 µg de microcistinas/kg/dia e no Brasil pela portaria No 1.469 a concentração máxima permitida para ingestão de água de consumo é de 1 µg/L/dia (GIORDANO, 2007; FUNASA, 2001).

Alguns estudos demonstraram a utilização de peixes onívoros, carpas e tilápias filtradoras para o controle de floração das cianobactérias (GIORDANO, 2007; PANOSSO et al., 2007). Porém, é comum a bioacumulação de microcistinas nos

animais aquáticos vertebrados e invertebrados, o consumo de animais expostos as toxinas podem trazer riscos à saúde humana (KAMOGAE, 2007). Panosso et al. (2007), também relatou a ocorrência da bioacumulação das toxinas no tecido muscular tornando os peixes impróprios para o consumo. Estudos realizados no município do Rio de Janeiro determinou a presença de cianotoxinas em carne de peixe em quantidades superiores aos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (COSTA et al., 2017).

2.3 Ração

O Brasil é um país com grande disponibilidade de água e matéria-prima para alimentação. Além disso, possui extensa costa marítima sendo favorável a piscicultura (GODOY, 2018). As tilápias são consideradas uma espécie de interesse para esta atividade, aceitam alimentos artificiais em todas as fases da vida (HAYASHI, 1999).

A ração comercializada na alimentação de peixe deve atender requisitos nutricionais, a inadequação leva a altas taxas de deformidade anatômica, deficiências de vitaminas e minerais, e incidências de morbimortalidade prejudicando a cadeia produtiva (HASHIMOTO et al., 2003; COLEÇÃO SENAR, 2019).

Além da quantidade de proteína e gordura a qualidade da ração depende do controle dos cereais e grãos; milho, soja, arroz e trigo são susceptíveis a contaminação por fungos produtores de micotoxinas, frequentemente por *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (HASHIMOTO et al., 2003; BARBOSA et al., 2013). A contaminação por fungos depende dos fatores ambientais, condições de temperatura e umidade no local de cultivo, colheita e armazenamento (BEDOYA SERNA, 2018). Animais alimentados por rações contaminadas por estes fungos podem conter micotoxinas em seus produtos e subprodutos: carne, leite e queijo (PINHEIRO et al., 2015) e quando consumida são prejudiciais à saúde (FERNANDES, 2017).

Em espécies aquáticas a contaminação de micotoxinas é através da alimentação por rações contaminadas, fato crescente com o uso de cereais na ração (PINHEIRO et al., 2015). Para peixes onívoros em fase adulta, a dieta compõe 90 % de subprodutos vegetais, farelo de soja e milho (HAYASHI, 1999; COLEÇÃO SENAR, 2019).

No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988 estabelece limite máximo total de 50 µg/kg de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) e de 10000 µg/kg para fumonisinas (B₁ e B₂) para matéria prima e ração (MAPA, 1988). Já a Food and Drug Administration (FDA) recomenda limite máximo para aflatoxinas totais de 10 µg/kg para alimentos de consumo animal e para fumonisinas totais em ração para bagre de 10000 µg/kg (FDA Guidance, 2001).

A ANVISA através da instrução normativa 88, de 26 de março de 2021 estabelece para matéria-prima e alimentos prontos para consumo humano o limite total de aflatoxinas variando de 1 a 20 µg/kg e para fumonisinas totais de 200 a 5000 µg/kg (ANVISA, 2021). Por outro lado, a FDA recomenda o limite máximo para aflatoxinas totais de 20 µg/kg (FDA Guidance, 2000), e para fumonisinas totais de 2000 a 4000 µg/kg (FDA Guidance, 2001).

Para o conhecimento da situação perante a contaminação fúngica e das toxinas na ração, alguns estudos foram realizados, a exemplo do estudo no norte do Brasil que detectou a contaminação fúngica de 56 % e 11 % em ração para peixes jovens e em fase de crescimento, respectivamente. Algumas pesquisas demonstram predominância de contaminação em ração pelo fungo do gênero *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (BARBOSA et al., 2013). Na pesquisa de Hashimoto et al. (2003), em um pesqueiro da região de Londrina/PR foram detectadas aflatoxina em 61,9 % de amostras, e 76,20 % de amostras foram positivas para fumonisinas.

No trabalho de Barbosa et al. (2013), colônias de *Fusarium* spp. não foram isoladas de ração, porém 98 % estavam contaminadas com fumonisina, o fungo não apresenta capacidade de crescer em ração seca, provavelmente a toxina tenha sido produzida no campo e contaminado a ração através da matéria-prima. Por outro lado, uma pesquisa demonstrou a presença de fungos *Aspergillus flavus*, porém, as cepas não eram produtoras de aflatoxinas, sendo assim não foram detectadas toxinas nas amostras de ração (CARDOSO FILHO et al., 2013).

2.4 Micotoxinas

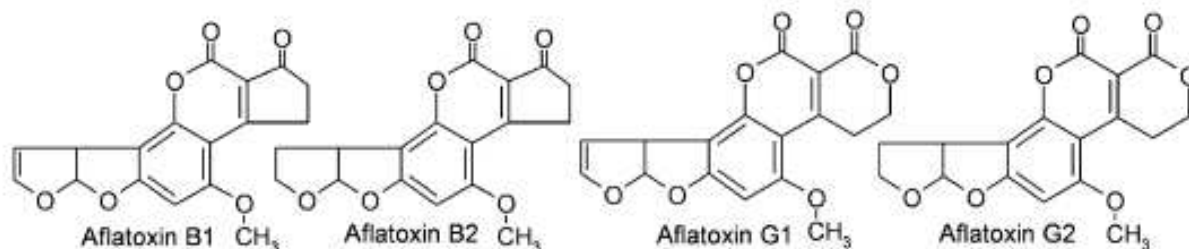
Micotoxinas são metabólitos secundários de espécies fúngicas capazes de apresentar toxicidade aguda, crônica, mutagênica e teratogênica, comumente afetam

as funções do fígado e rim. O efeito ao longo prazo da ingestão de pequenas quantidades resulta em carcinogenicidade, especialmente hepática. Os principais fungos produtores de micotoxina no cultivo de cereais, secagem e armazenamento, são: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. (PITT, 2000).

As toxinas frequentemente encontradas em alimentos: aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, ocratoxinas, tricotecenos: deoxinivalenol, toxina T-2 e patulina (MASSOCCO, 2016; LINO M.; SILVA G.; PENA S., 2004) são quimicamente estáveis, e apesar da remoção do fungo por processos industriais como aquecimento e resfriamento as toxinas ainda permanecem no alimento (FERNANDEZ, 2017). A contaminação pelas toxinas pode ocorrer durante o cultivo, a colheita e armazenamento (BARBOSA et al., 2013; BEYENE et al., 2019).

O fungo do gênero *Aspergillus* spp. produz a micotoxina denominada aflatoxina, conforme Figura 3 classificada em tipo B₁, B₂, G₁ e G₂ são consideradas agentes carcinogênicos, em especial a aflatoxina B₁ (MASSOCCO, 2016). Quando o fungo está presente na ração, o manipulador pode desencadear aspergilose, reações alérgicas e problemas respiratórios (CARDOSO FILHO et al., 2013).

Figura 3. Estrutura química das Aflatoxinas de maior ocorrência



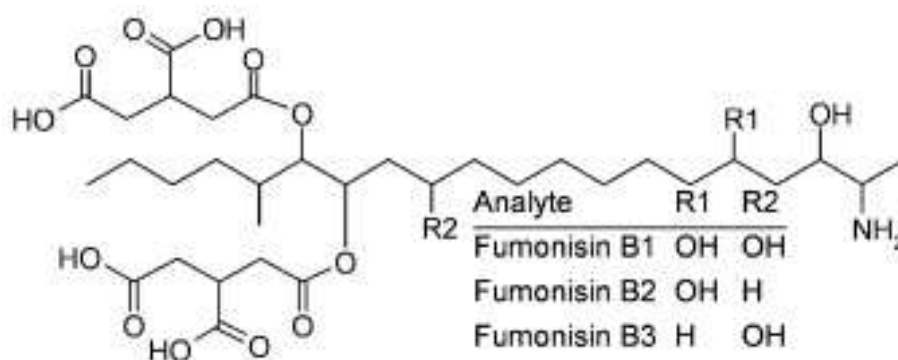
Fonte: SULYOK et al., 2007

As aflatoxinas são lipossolúveis, quando consumida são facilmente absorvidas pelo trato gastrointestinal. A intoxicação aguda apresenta sintomas de dor abdominal, vômito, esteatose hepática entre outras, na aflatoxicose crônica os principais efeitos são indução de carcinoma hepatocelular, carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade (FERNANDEZ, 2017). Quando as aflatoxinas B₁ e B₂ são ingeridas estas sofrem biotransformação resultando em aflatoxina M₁ e M₂, que por sua vez é um agente menos tóxico, porém, se tratando de alimento infantil destaca alta toxicidade (PITT, 2000). Um estudo relatou a ocorrência de aflatoxinas M₁ e M₂ em

leite e urina de animais, em consequência ao uso de alimento contaminado na fabricação de ração (FERREIRA et al., 2006).

Fumonisinias podem ser produzidas pelo fungo do gênero *Fusarium* spp. classificadas como fumonisinias B₁ e B₂. O consumo de alimentos contaminados por estes fungos tem sido associado a doenças como toxicoses, efeitos anti-nutricionais, alterações fisiopatológicas e carcinogênicas. A FB₁ é predominantemente encontrada no milho. Fumonisinias são moléculas polares, solúveis em água e acetronitrila (LINO M.; SILVA G.; PENA S., 2004). Na Figura 4 estão apresentadas as estruturas químicas das fumonisinias.

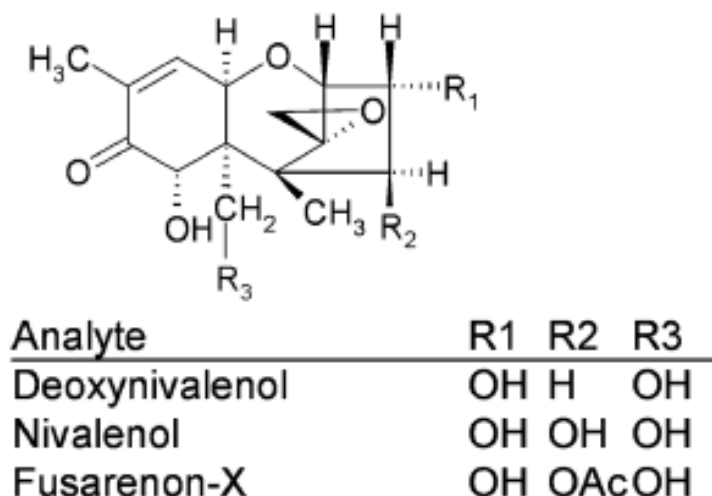
Figura 4. Estrutura química das fumonisinias



Fonte: SULLYOK et al., 2007

Os tricotecenos são metabólitos secundários que podem ser produzidos pelo fungo do gênero *Fusarium* spp., dentre os tricotecenos, deoxynivalenol é a toxina mais estudada em vários países. Estas toxinas são comumente encontradas no trigo, milho, cevada, aveia e centeio. Causam toxicidade aguda e crônica, problemas gastrointestinais, hepática e neurológicas. Na Figura 5 encontra-se a estrutura química dos principais tricotecenos (YAN et al., 2020).

Figura 5. Estrutura química de principais tricotecenos.



Fonte: SULYOK et al., 2007

Godoy (2018), avaliou amostras de ração utilizada em pisciculturas de tilápia do Brasil, em condições normais de criação, foram detectadas aflatoxina B₁ e G₁, os níveis encontraram-se dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira. Neste estudo também foram avaliados a distribuição de toxinas no fígado e músculo de peixe, a quantificação de aflatoxina G₁ no fígado apresentou um nível de 0,152 µg/kg, enquanto a aflatoxina B₁ variou de 0,150 a 0,866 µg/kg. No entanto, no músculo de tilápia não foi detectada aflatoxina G₁, apenas quantificaram a aflatoxina B₁ em 16,67 % das amostras e os níveis variaram de 0,150 a 0,372 µg/kg. Apesar de serem detectados em níveis abaixo do permitido, os peixes são suscetíveis a deposição residual da toxina nos tecidos. Massocco (2016), também investigou a ocorrência de aflatoxinas em ração e tecido de Lambari, Matrinxã e Pacu, em condições naturais das pisciculturas do estado de São Paulo; nas amostras de ração avaliadas somente uma continha aflatoxina B₁ com nível de 1,4 µg/kg, no músculo de peixe os resultados indicaram níveis abaixo do limite de detecção de aflatoxina, apenas em uma propriedade foi quantificada aflatoxina M₁ 5,4 µg/kg na espécie matrinxã.

Bedoya Serna (2018), realizou um estudo para avaliar a transferência da aflatoxina incorporada na ração para os tecidos de peixe da espécie matrinxã (*Brycon cephalus*), foram utilizados quatro tratamentos: controle, concentrações de 10 µg/kg, 20 µg/kg e 50 µg/kg de aflatoxina B₁, tempo de tratamento de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Como resultado, não foram detectados acúmulo de aflatoxina B₁ no tecido muscular desta espécie, algumas amostras apresentaram traços inferiores ao limite

de quantificação. As espécies aquáticas apresentam diferenças nas reações dos efeitos tóxicos da aflatoxina, a variação para metabolização das toxinas depende dos fatores como espécie, idade, alimentação, sexo e saúde do animal. Fernandez (2017), também relata resistência ao acúmulo de aflatoxinas em peixes matrinxã e pacu, e esta resistência se deve a diferença de metabolismo das espécies.

2.5 Métodos cromatográficos

A cromatografia líquida é uma técnica analítica de separação de compostos pela diferença de solubilidade entre fase móvel e estacionária, a interação permite a separação dos analito, o uso de detectores associados a *softwares* específicos permite a quantificação dos componentes de uma mistura (LANÇAS, 2009; NUNES, 2019). Comumente esta técnica é associada a detecção por arranjos de fotodiodo (PDA), que utiliza a absorvância ultravioleta-visível para quantificação de analitos de interesse, o diferencial deste detector é o registro de todo o intervalo de espectro selecionado (LANÇAS, 2009). Em outros casos mais específicos, está associada a detecção por fluorescência, por apresentar maior sensibilidade comparada ao detector de arranjos de fotodiodo, simplificada por comprimento de onda de excitação selecionado ao passar pelo filtro primário, e emissão após passar pela amostra selecionado pelo filtro secundário (COLLINS et al., 1997). Além destas duas últimas, a espectrometria de massa permite que a identificação seja realizada pelas massas individuais de cada composto analisado, possibilitando isolar, identificar e quantificar qualquer molécula ionizável conforme sua razão massa/carga, tornando a técnica analítica mais versátil e sensível em baixas concentrações (DA SILVA, 2011). A técnica mais avançada para detecção de multimicotoxinas é a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (RIGHI, 2013).

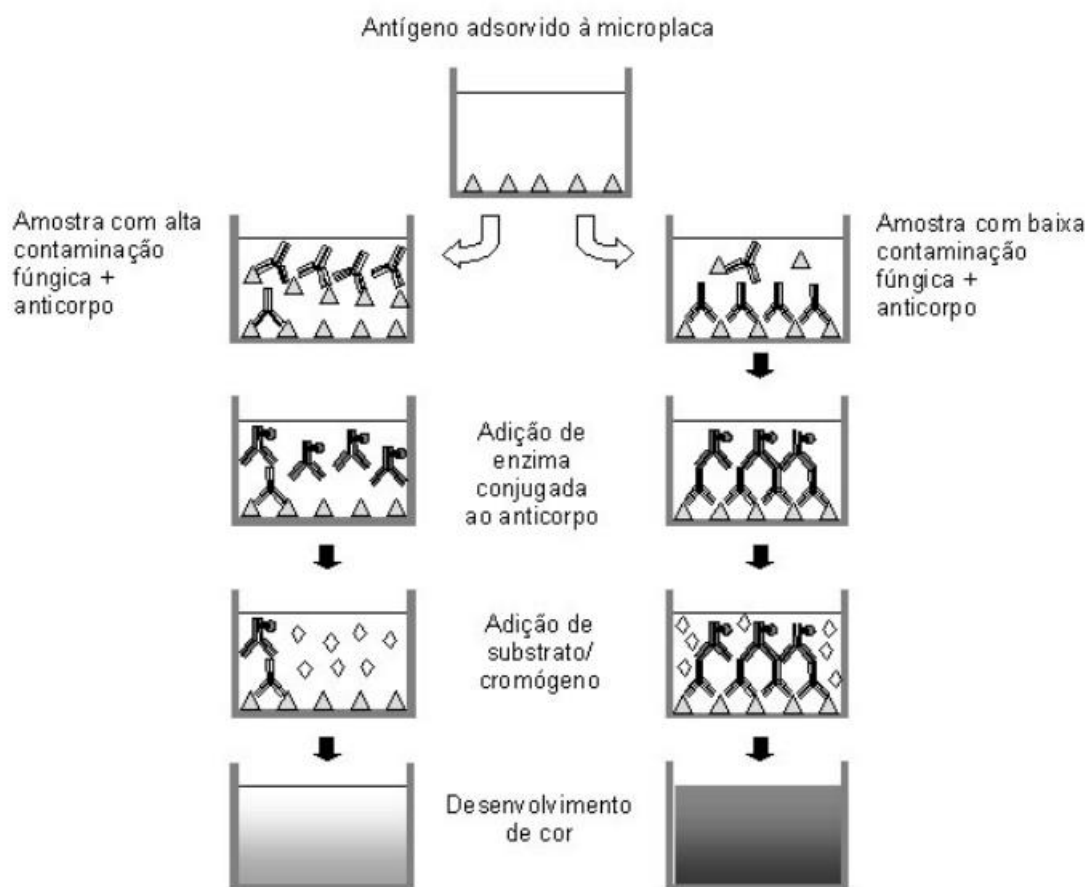
2.6 Imunoensaio (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ELISA)

Imunoensaio é uma técnica analítica aplicável em análises de micotoxina em alimentos, é um método de detecção do antígeno ou anticorpo específico baseado nas reações antígeno-anticorpo, as principais vantagens são alta sensibilidade, capacidade de detecção em quantidades baixas ng/mL de toxina em alimentos, seja

também em alimentos que sofreram processos industriais, fácil execução, simplicidade, baixo custo. Dentre os ELISA conhecidos, os mais utilizados para detecção de micotoxinas em alimentos são: competitivo direto, competitivo indireto e o sanduíche (MEIRELLES et al., 2006).

Como as micotoxinas apresentam baixa massa molecular e imunogenicidade, o ensaio competitivo indireto é o mais indicado. Conforme Figura 6, ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) requer um anticorpo específico (primário), o princípio é a competição entre a toxina presente na amostra e a toxina imobilizada na microplaca pelo sítio do anticorpo específico (FUJI, S.; GARCIA, L.B.; HIROOKA, E.Y, 2004; MEIRELLES et al., 2006).

Figura 6. Esquema ilustrativo do método de ELISA competitivo indireto



Fonte: MEIRELLES et al., 2006

2.7 Métodos de extração

A determinação de toxinas consiste nos procedimentos de amostragem, preparo da amostra, extração, purificação e análise (RIGHI, 2013). Os métodos de extração comumente empregados na cromatografia são *QuEChERS* e extração em fase sólida.

O método *QuEChERS* é aplicado na extração de micotoxinas de diversas amostras, a técnica envolve etapas para simplificar o preparo, baixo consumo de solvente e simplicidade; o método original inicia com extração por acetonitrila, em seguida uma etapa de partição líquido-líquido através da adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio ($MgSO_4$ e $NaCl$) para facilitar a remoção de componentes polares, e no fim a purificação (RIGHI, 2013). O método é constantemente otimizado e aplicado em diversos estudos para extração de micotoxinas em diferentes matrizes (NUNES, 2019).

Extração por fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido sólido que tem como objetivo a extração e concentração do analito de interesse e limpeza de interferentes das amostras. A técnica permite a análise de compostos em concentrações muito baixas, sendo muito utilizada em cromatografia líquida (JARDIM, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a contaminação por toxinas naturais em piscicultura (ração e água), focando principalmente na aplicabilidade do método na análise de micotoxinas em ração e microcistina em água, testando viabilidade de análise em controle de qualidade em amostras da Região Londrina, Norte do Paraná e Araguaína, Norte de Tocantins.

3.2 Objetivo Específico

Avaliar a contaminação de micotoxinas (Aflatoxina B1, Fumonisina B1 e B2, Deoxynivalenol) em ração destinada a alimentação de peixe por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (U-HPLC-MS/MS);

Avaliar a contaminação por microcistina em água de piscicultura por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de fotodiodo (HPLC-PDA);

Aplicar imunoenensaio ic-ELISA empregando AcM produzido no Laboratório para determinação de microcistina em água de piscicultura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os reagentes utilizados neste trabalho foram acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha), acetonitrila grau MS (Merck, Alemanha), Metanol grau HPLC (Riedel-Honeywell, USA), ácido acético glacial (Macron, USA), ácido fórmico (J. T. Baker, México), acetato de amônio grau HPLC ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) (J.T. Baker, USA) e água ultrapura com resistividade a $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ (Elga, Reino Unido). Para as extrações, sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) (J. T. Baker, México), cloreto de sódio (NaCl) (Alphatec, Brasil). Os reagentes utilizadas para imunoenensaio, Anti-IgG – HRP (horseradish peroxidase - anticorpo conjugado a enzima peroxidase (ThermoFisher Scientific, EUA), Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Synth, Brasil), gelatina (Wako, Japão), acetato de sódio (NaO_2CCH_3) (Anidrol, Brasil), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBZ) ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$) (Sigma Aldrich, USA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Merck, Alemanha), para preparo de PBS e PBST: cloreto de sódio (NaCl) (Alphatec, Brasil), cloreto de potássio (KCl) (Synth, Brasil), Tween 20 (Synth, Brasil), fosfato dissódico (Na_2HPO_4) (Química Moderna, Brasil) e fosfato monopotássico (KH_2PO_4) (Fmaia, Brasil),

Os materiais e equipamentos empregados: microplacas com 96 poços (Costar, USA), microtubos plásticos 1,5 e 2,0 mL (Eppendorf, Alemanha), tubo tipo falcon 50 mL (Firstlab, Brasil), filtro de fibra de vidro $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius, Alemanha) membrana filtrante de PVDF $0,22 \mu\text{m}$ com diâmetro 13 mm (Millex, Alemanha), cartuchos de fase sólida (SPE) - ODS-5 Whatman 500 mg (Cytiva, EUA), os agitadores orbital shaker (Quimis, Brasil), vórtex modelo 774 (Fisatom, Brasil), banho ultrassônico Modelo Ultrasonic Clear (Unique, Brasil), banho maria (Marconi, Brasil), centrífuga de microtubos Modelo 5810R (Eppendorf, Alemanha), sistema de secagem

com nitrogênio gasoso, moedor de bancada Modelo A11 basic (IKA, Alemanha), peneira 32 *mesh* ou 500 mm (Bertel, Brasil), Manifold (Sulpeco, EUA).

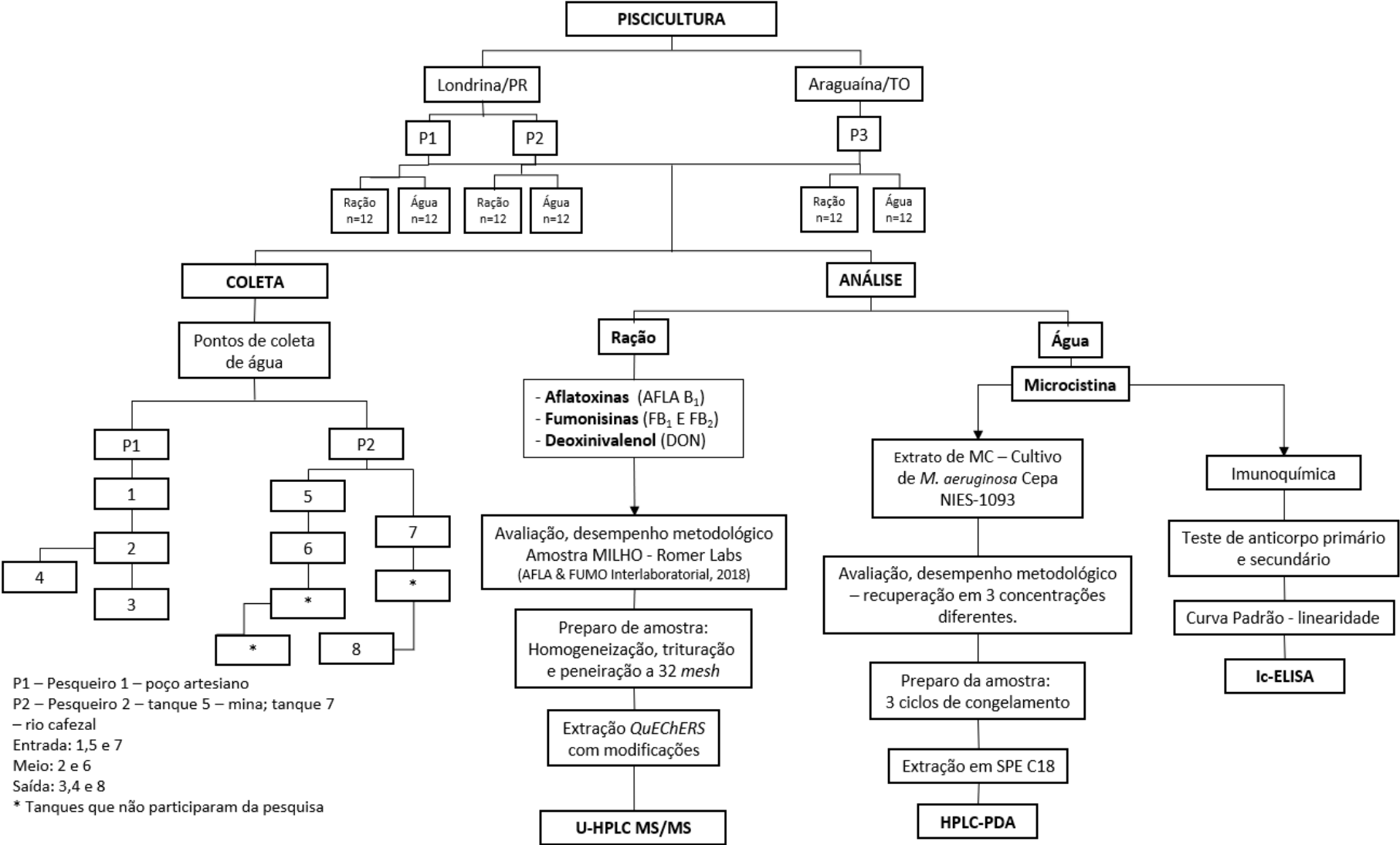
Os cromatógrafos líquidos utilizados foram HPLC Shimadzu Modelo 20 (Shimadzu corp., Kyoto, Japão) com detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A e um ultra cromatógrafo UPLC Waters (Waters, USA) acoplado a um espectrômetro de massas tipo tandem quadruplo (TQD). Para ELISA foram utilizados leitora de microplaca Modelo Zenyth 200 RT (Biochrom, Inglaterra), lavadora de placa Modelo BS II (Brasserum, Brasil), Câmara de germinação Modelo TE-402 (Tecnal, Brasil).

Os padrões utilizados para quantificação foram Microcistina-LR (Wako, Japão), Aflatoxina B1 (Sigma Aldrich, USA), Fumonisina B1 e B2 (Wako, Japão), Mix Tricotecenos (Wako, Japão).

4.2 Amostras

A Figura 7 representa o fluxograma geral do trabalho, referente as amostras de ração e água coletadas em três pisciculturas: duas localizadas no estado do Paraná, Londrina, e outra localizada no estado de Tocantins, Araguaína. Este trabalho conta com a colaboração do professor Doutor José Carlos Ribeiro Júnior, da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins – Campus Araguaína.

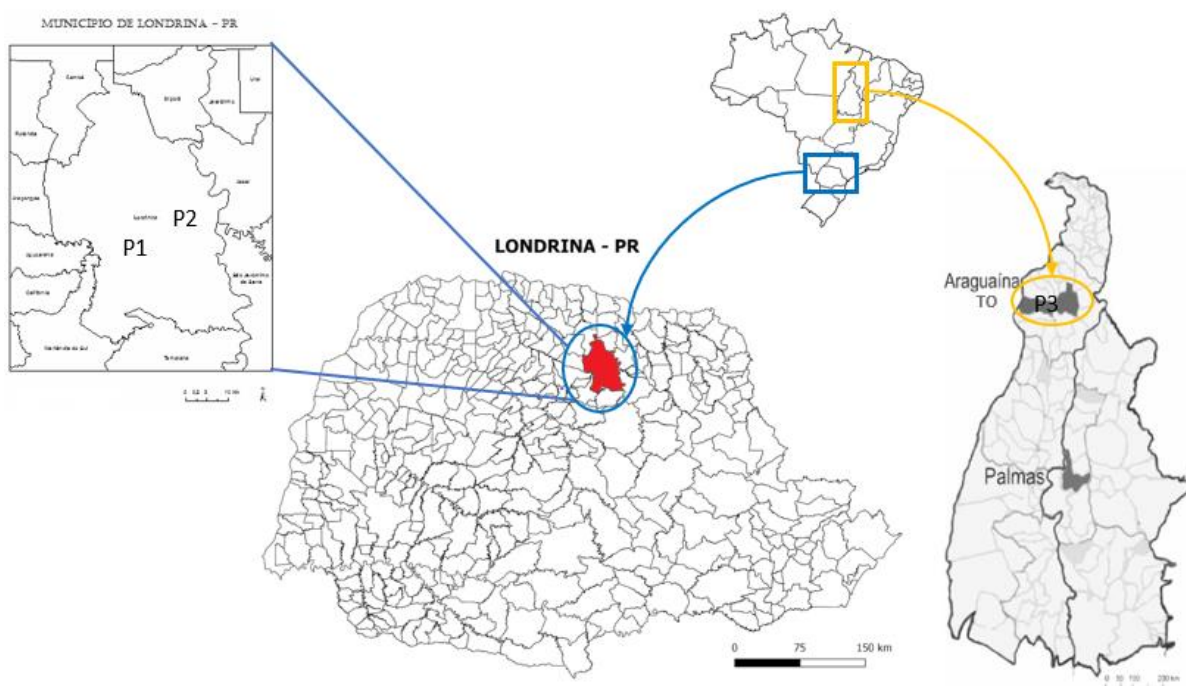
Figura 7. Fluxograma geral do trabalho



Fonte: Autoria própria

As amostras foram coletadas no período de janeiro a maio de 2021 em 2 pesqueiros da região de Londrina/PR denominadas P1, P2. E P3 as que foram enviadas pelo prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior, as amostras coletadas em Tocantins foram enviadas congeladas para o departamento, todas as amostras foram armazenadas a -20°C até a análise. A Figura 8 indica aproximadamente as localizações das pisciculturas da região de Londrina/PR, exceto a região de Araguaína/TO onde as coletas foram coletas aleatoriamente.

Figura 8. Localização aproximada das pisciculturas



Fonte: Autoria própria

As águas foram coletas em quatro pontos distintos nos tanques que representaram a entrada, meio e saída de água, conforme Figura 7. No P1 utilizou-se água de poço artesiano. No P2 água de mina no tanque 5; e a água vinda do rio Cafezal no tanque 7. Com o intuito de tentar representar o tanque por inteiro foram selecionados quatro pontos de cada tanque um oposto ao outro, onde foram coletadas uma porção superficial de cada ponto e homogeneizadas em um recipiente, depois coletadas em uma garrafa pet em torno de 1,0 L para cada amostra. Logo após a coleta, as amostras foram congeladas. E posteriormente passaram por 3 ciclos de congelamento e descongelamento com o objetivo de romper a parede celular das

cianobactérias para liberação da toxina, e após os ciclos foram mantidas congeladas até o momento da análise.

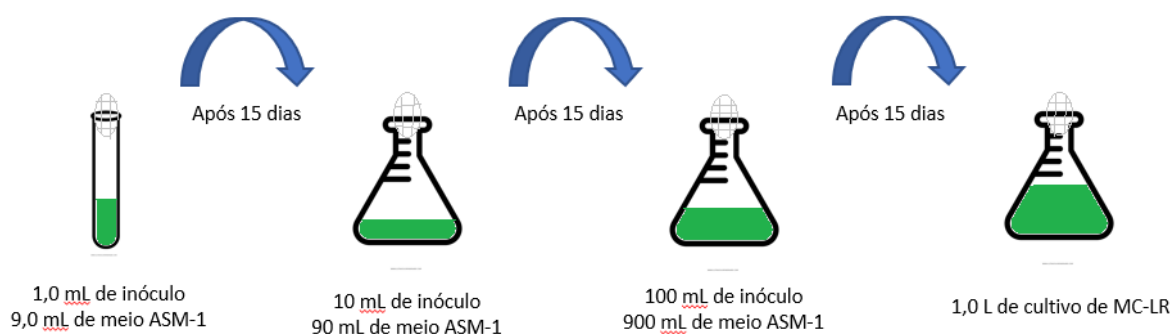
As amostras de ração foram coletas dos sacos que estavam em uso no dia da coleta, homogeneizadas e trituradas por moinho de bancada, peneiradas em peneiras de 32 *mesh* e mantidas refrigeradas até o momento da análise.

4.3 Métodos

4.3.1 Produção do extrato de Microcistina-LR

Para produção de extrato de microcistina foi utilizado inóculo de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann Cepa NIES-1093 adquiridas na National Institute for Environmental Studies, Tsukuba – Japão.

Figura 9. Esquema de cultivo de cianobactéria para produção de extrato de microcistina



Fonte: Autoria própria

As cianobactérias *Microcystis aeruginosa* cepa NIES-1093 foram cultivadas em meio ASM-1 pH 8,0, no tubo de ensaio foram adicionados 1,0 mL de inóculo para 9,0 mL de meio ASM-1 e armazenadas em câmara de germinação com temperatura de 24 °C, programada com 1500 lux 10 horas na luz e 14 horas no escuro, os tubos passaram por uma agitação diariamente. A cada 15 dias ocorreram repicagens na mesma proporção 1:9 destas células para aumentar a produção das cianobactérias, até atingir 1,0 L de cultura, conforme Figura 8 e 9 (ZHANG et al., 2004; SILVA-STENICO, 2009; MIGUEL, 2014).

Figura 10. Cultivo de cianobactérias *Microcystis aeruginosa*



Fonte: Arquivo pessoal

Para o preparo do extrato de microcistina, as cianobactérias foram divididas em 6 tubos centrífugas de 50,0 mL e centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos a 4,0 °C, após o descarte do sobrenadante a massa celular foi recolhida em um tubo de centrifuga de 50,0 mL, e congeladas a -20,0 °C. Nos dias seguintes passaram por 3 ciclo de congelamento e descongelamento, ultrassonicadas por 10,0 min em ultrassom com o objetivo de promover o rompimento celular, posteriormente filtrado em filtro de vidro 0,45 µm, e membrana filtrante PVDF 0,22 µm (MIGUEL, 2014).

4.3.2 Imunoensaio (Ic Elisa): Detecção de Microcistina em água

O método ic-ELISA implementado no Laboratório de imunoreagentes e Molecular (LIM) empregam microplacas de 96 poços, na etapa de sensibilização foram utilizadas 50 µL do conjugado de MC-LR e albumina de soro bovino (MC-LR-BSA) diluídos em tampão fosfato salino (PBS 0,015 M a pH 7,3), incubadas em 4,0 °C por 24 horas, e três lavagens com tampão PBST, os poços bloqueados com 150 µL de 0,5 % solução gelatina em PBS e incubadas a 25 °C por 30 min, em seguida foram realizadas três lavagens com o mesmo tampão, na etapa de competição empregaram-se 50 µL do padrão ou amostra, seguida de 50 µL de anticorpo monoclonal (AcM) anti-MC hibridomas da linhagem 5-3 diluídas na proporção 1/1000 em PBS com azida

sódica 0,1%, novamente incubadas a 25 °C por 1 hora, e três lavagens com PBST, na próxima etapa 100 µL de anti-IgG – HRP (anticorpo conjugado a enzima peroxidase) 1/4000 diluídos em PBS - 0,05 % Tween 20 foram inseridas nos poços e incubados a 25 °C por 1 hora, novamente foram realizadas seis lavagens com PBST, por fim 100 µL de substrato cromógeno (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5 com 0,05 % de peróxido de hidrogênio foram adicionados e incubadas por 20 min a 25 °C. A reação enzimática foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹. A leitura da absorção foi realizada em 450 nm (YAMASHITA et al., 2017).

A porcentagem de ligação foi calculada através da média da absorbância da amostra a partir da equação:

$$\% \text{ de ligação} = (A+/A-) \times 100$$

Onde:

A+: absorbância média lida na presença de amostra ou do padrão de MC-LR

A-: absorbância na ausência de MC-LR

4.3.3 Extração em fase sólida (SPE) e análises cromatográficas de Microcistina em água

Para análise de microcistina, as amostras foram filtradas em filtro de vidro 0,45 µm, posteriormente submetidas a extração e concentração em cartuchos de fase sólida (SPE) (ODS-5 Whatman 500 mg). O cartucho passou por um processo de pré-condicionamento com 5,0 mL de metanol e condicionamento com 5,0 mL de água ultrapura, seguida de 80,0 mL de amostra e 5,0 mL de água ultrapura para limpeza, as microcistinas foram eluídas com 5,0 mL de metanol, secas em banho-maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspendido em metanol, por último filtradas em filtro PVDF 0,22 µm (YAMASHITA et al., 2017).

Para detecção e quantificação de microcistina utilizou-se cromatografia de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu (Japão) constituído de um sistema de bomba LC-20AD, forno de coluna CTO-20A, gerenciado por interface CDM-20A, acoplado ao detector de arranjos de fotodiodos (PDA) SPD-M20A. A obtenção de dados e controle do instrumento foi realizado através do *software LC Solutions*. As condições

cromatográficas foram de acordo com KURODA et al., (2007). Eluição de forma isocrática com fase móvel de acetonitrila: acetato de amônio 20,0 mM (30:70 v/v), pH 5,0. Coluna C18 (Phenomenex Luna 250 x 4,6mm x 5 µm 100 Å) mantida a 40 °C, comprimento de onda fixado em 238 nm, vazão de 1,0 mL/min, tempo de corrida 10,0 minutos.

4.3.4 Método de Extração *QUECHERS* com modificações aplicado para amostras de ração

O método de extração baseou-se no método *QuEChERS* com adaptações, em que 5,0 g da amostra de ração foi adicionado 10,0 mL de água, seguida de 10,0 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético a 0,5 % (v/v). A mistura foi agitada manualmente por 20 s e depois colocado no *orbital shaker* por 10,0 min a 300 rpm. Posteriormente, 4,0 g de Sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e 1,0 g Cloreto de sódio (NaCl) foram adicionadas na mistura e agitada vigorosamente por 20 s e em seguida, a amostra foi centrifugada por 15 min em 5000 rpm. 1,0 mL do sobrenadante foi evaporado em banho-maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso. O extrato seco foi submetido a 3 etapas de *clean-up* (limpeza) da amostra: na 1ª etapa, foi adicionado 100,0 µL de acetonitrila e submetido a cavitação ultrassônica por 5 min; na 2ª etapa foi adicionado mais 100,0 µL de água ultrapura e ultrassonicado por mais 5 min. Por último, a mistura foi transferida para microtubos de 1,5 mL e centrifugada a 14000 rpm por 15 min. Alíquotas de 120,0 µL do sobrenadante foram diluídas em 280,0 µL de água ultrapura e centrifugada por 14000 rpm - 15 min e filtrada em membranas filtrantes de PVDF 0,22 µm (13 mm) e armazenadas em geladeira a 4,0 °C até o momento das análises cromatográfica (SOBOTKA, 2020; ZANIN, 2021).

4.3.5 Método cromatográfico UHPLC-MS/MS

A análise simultânea de multimicotoxina foi realizada em UPLC Acquity Waters (USA) constituída por bomba binária, amostrador automático, forno de coluna de UHPLC e HPLC, acoplada a um espectrômetro de massas do tipo tandem quadrupolo (TQD) com fonte de ionização *electrospray* (ESI). A coluna utilizada foi uma coluna HSS C18 (Waters, Acquity UPLC HSS C18 1,8 µm, 2,1x100 mm) mantida em

forno a 35 °C. O método cromatográfico empregado no modo gradiente, em que a fase móvel A foi composta por água ultrapura acidificada com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico e a fase móvel B, acetonitrila acidificada com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico, resumida na Tabela 1. O modo de injeção da amostra foi deixado como *parcial loop*, onde 10,0 µL da amostra são intercalados entre duas porções da fase móvel inicial. O tempo de corrida foi de 15 min com vazão de 0,40 mL/min. A obtenção de dados e controle do instrumento foi realizado no *software Mass Lynx* (Waters, versão 4.2) (SOBOTTKA, 2020; ZANIN, 2021).

Tabela 1. Gradiente fase móvel UHPLC-MS/MS

Tempo (min.)	A%*	B%**
Início	90	10
3,0	90	10
10,0	30	70
10,1	10	90
12,0	10	90
12,1	10	90
15,0	90	10

Fonte: SOBOTTKA, 2020; ZANIN, 2021

* A %: água ultrapura acidificada com ácido fórmico a 0,1 % (v/v).

** B %: acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1 % (v/v)

As condições de espectrômetro de massa (TQD) empregado para a análise constituiu-se no modo íon positivo (ESI +), voltagem capilar de 1 kV, temperatura de dessolvatação a 400 °C, source temperatura da fonte de ionização de 150 °C, fluxo do gás nitrogênio para dessolvatação a 800 L min⁻¹, gás argônio para fragmentação das moléculas. Na Tabela 2 apresenta-se as micotoxinas com suas respectivas condições de detecção.

Tabela 2. Condições de detecção UHPLC-MS/MS para cada micotoxina

Micotoxina	Ion Precursor (m/z)	Ion Fragmentado	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (V)	Tempo de retenção (min)
Deoxynivalenol	297,1	249,1 *	24	12	1,9
		203,1 **	24	14	
Aflatoxina B ₁	313,03	285,2 *	48	22	7
		269,1 **	48	28	
Fumonisina B ₁	722,4	334,2 *	58	38	6,65
		352,2 **	58	38	

Fumonisina B ₂	706,4	336,2 *	56	42	7,4
		318,2 **	56	40	

Fonte: SOBOTTKA, 2020; ZANIN, 2021

*Íon de identificação

** Íon de confirmação

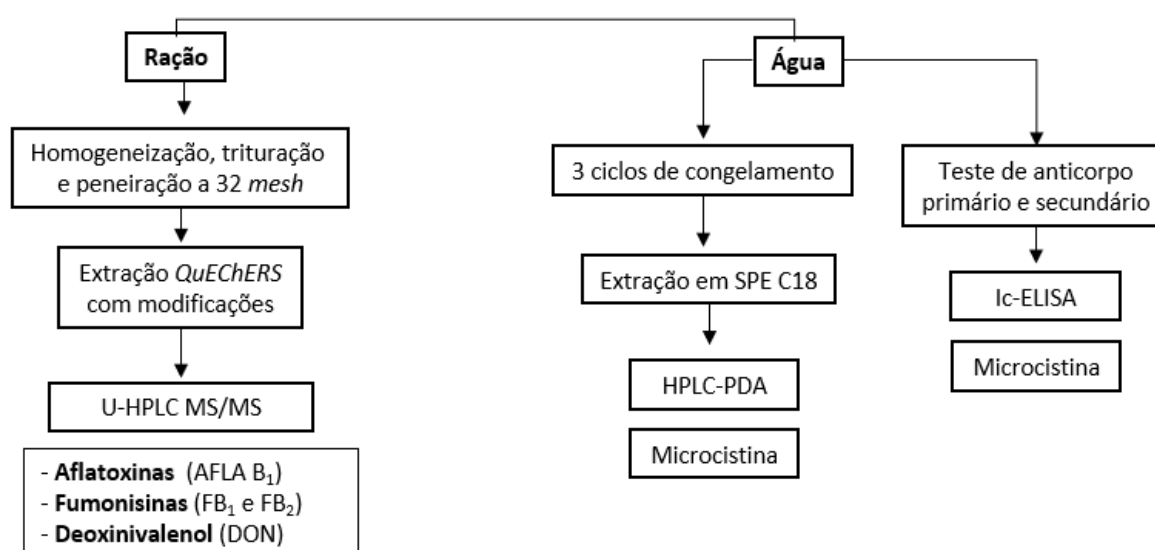
4.4 Avaliação do desempenho metodológico

Para avaliar a eficiência do método analítico de microcistina foram realizados ensaios de recuperação em amostras fortificadas, utilizando padrão de MC-LR em três concentrações diferentes: 1,25, 3,10 e 6,25 µg/L. E para o método analítico de micotoxinas foi extraído uma amostra de proficiência interlaboratorial da empresa Romer Labs – Aflatoxins / Fumonisins in Corn (CSSMY015 – M18411AF) October/December 2018.

4.5 Esquema dos métodos empregados

Como neste trabalho foram empregados dois preparos de amostra e três métodos de análises para as toxinas. As etapas de cada tratamento e análise foram simplificadas e melhor representados na Figura 10 para ambas as matrizes estudadas (ração e água) na piscicultura.

Figura 11. Fluxograma das etapas simplificadas que serão empregados para ração e água.



Fonte: Autoria própria

4.6 Análise estatística

A comparação de médias entre os pesqueiros foi realizada por meio da ANOVA e teste de *Tukey* com intervalo de confiança de 95 % com auxílio do Programa Statistica versão 7.0 (Tulsa, EUA).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Produção de extrato de microcistina-LR

O cultivo de cianobactéria foi de grande valia na pesquisa pois o extrato de MC-LR resultante do cultivo foi utilizado para definir a metodologia de extração e detecção de MC-LR. E as células podem novamente ser congeladas em nitrogênio líquido mantendo sua cepa preservada para pesquisas posteriores.

O extrato de microcistina obtida do cultivo de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* apresentou concentração de 14 µg/mL. E inicialmente foi usada para o teste de extração. Foram testados alguns métodos de extração, porém, o método descrito por Yamashita et al. (2017), foi o mais viável sendo assim utilizado para avaliação de desempenho metodológico com recuperação em três concentrações diferentes utilizando padrão de MC-LR.

5.2 Avaliação do desempenho metodológico de microcistina-LR em água

A recuperação foi realizada pré concentrando a toxina em 80 vezes.

Conforme Tabela 3, as recuperações atingiram o critério de aceitação da ANVISA RDC N°166, 2017 que considera de 80-120 %, portanto, o método empregado na extração de microcistina foi satisfatório.

Tabela 3. Resultado de recuperação de Microcistina-LR

MC-LR adicionada (µg/L)	Média MC-LR (µg/L) + DP	Recuperação (%)
1,25	1,06 ± 0,03	85,08
3,10	3,09 ± 0,07	101,1
6,25	6,64 ± 0,03	106,39

Fonte: Autoria própria

*MC-LR – Microcistina Leucina e Arginina; DP-Desvio Padrão

5.2.1 Extração em fase sólida (SPE) e análise cromatográfica de microcistina-LR em água

As amostras passaram por 3 ciclos de congelamento e descongelamento com o objetivo de romper a parede celular, conforme estudo de Silva-Stenico et al. (2009), a extração eficaz da microcistina de cianobactérias requer a ruptura celular para liberação da toxina. E foram concentradas 80 vezes para serem quantificadas.

A curva com adição de padrão de MC-LR foi estabelecida entre 0,3-12 µg/L, coeficiente de determinação $R^2= 0,996$ curva analítica $y=10,395x - 1,5263$. Limite de detecção e quantificação com valores respectivamente de LD=0,09 µg/L e LQ=0,3 µg/L.

As 36 amostras foram analisadas pelo método cromatográfico, 3 amostras foram detectadas e estimadas valores para microcistina nas concentrações de 0,48; 0,6 e 0,77 µg/L, e mais 3 amostras abaixo do LQ. Segundo teste de Tukey as médias entre os pesqueiros não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância, o teste F calculado apresentou valor menor que o F tabelado, portanto a variância dos dados foi semelhante. Os resultados se assemelham a um estudo de Miguel et al. (2018), que utilizou método imunoquímico e detectou a média de 0,07 µg/L de microcistina; onde 40 % de suas amostras positivas foram das bacias hidrográficas do Tibagi, na região de Londrina/PR, em contrapartida os pesqueiros desta região apresentaram resultados não detectados para microcistinas.

Entretanto, Pádua (2004), obteve resultados positivos para 95% das amostras analisadas, variando de não detectável a 3,13 µg/L em pesqueiros da região de Londrina/PR. Um monitoramento realizado pelos autores de Kamogae et al. (2006), em que analisaram amostras oriundas de três pisciculturas da região de Londrina/PR durante 1 ano (outubro de 2002 – outubro de 2003) 95% das amostras foram positivas para microcistina, porém, em baixas concentrações em média 0,275 µg/L, apenas em uma das piscicultura foi encontrado microcistina acima do limite recomendado pela Organização Mundial da Saúde de 1 µg/L que ocorreu apenas no período de dezembro de 2002 a janeiro de 2003.

Os pesqueiros da região de Londrina/PR usavam águas oriundas de poço artesiano, minas e do rio cafezal, nos dias de coleta da amostra não foi identificado eutrofização nos tanques, exceto em uma das coletas onde foi detectado a eutrofização em apenas um dos tanques; e apesar disto não foi detectado MC-LR. Um estudo realizado por Roseni et al. (2013), foram identificados 23 táxons da comunidade fitoplanctônica na região metropolitana de São Paulo. E Pádua (2004), não observou correlação direta com a contagem de colônia cianofíceas e a liberação de toxinas.

5.2.2 Imunoensaio (IC ELISA): determinação de microcistina-LR em água

Primeiramente para se testar o anticorpo monoclonal (AcM) anti-MC, hibridomas da linhagem 5-3 foi realizado i-ELISA com o objetivo de definir as concentrações do antígeno e diluição dos anticorpos, sendo assim a placa foi sensibilizada com 50,0 μ L de MC-LR em BSA na concentração de 100 ng, e bloqueadas com 125,0 μ L de 0,5 % gelatina em PBS, na etapa de competição 100,0 μ L do anticorpo primário na diluição de 1/1000 em PBS e na etapa do anticorpo secundário foi utilizado diluição de 1/4000 em PBST, o procedimento seguiu conforme descrito na metodologia. A princípio estas proporções apresentaram um resultado satisfatório, com absorvância de 1. As condições do método foram avaliadas conforme a Lei de Beer em que a absorvância entre 0,2 e 0,8 é uma faixa considerada de maior linearidade (SKOOG et al., 2006; SILVA, 2019) na próxima etapa foi realizada a ic-ELISA para curva com padrão de MC-LR, porém, a absorvância de 1 caiu para 0,3. Novamente, foi testado i-ELISA com diferentes diluições do anticorpo primário de 1/1000, 1/100 e 1/10 como resultado a leitura da absorvância média foi de 0,26. A fim de tentar entender a queda na leitura foram conferidos e testados o funcionamento da lavadora de placa, pH dos PBS e PBST, para o bloqueio foi testado 0,5 % de ovoalbumina e na sensibilização foi utilizado tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6 conforme Yamashita (2017), ao pensar em desnaturação do anticorpo primário foi descongelado uma outra fração do anticorpo, definida as condições e concentrações como mencionadas na metodologia.

A Figura 11 foi um teste realizado de ic-ELISA para MC-LR sendo o eixo X a concentração do padrão utilizado em μ g/L e Y a porcentagem de ligação.

A porcentagem de ligação foi o valor médio da absorbância da amostra e calculada a partir da equação:

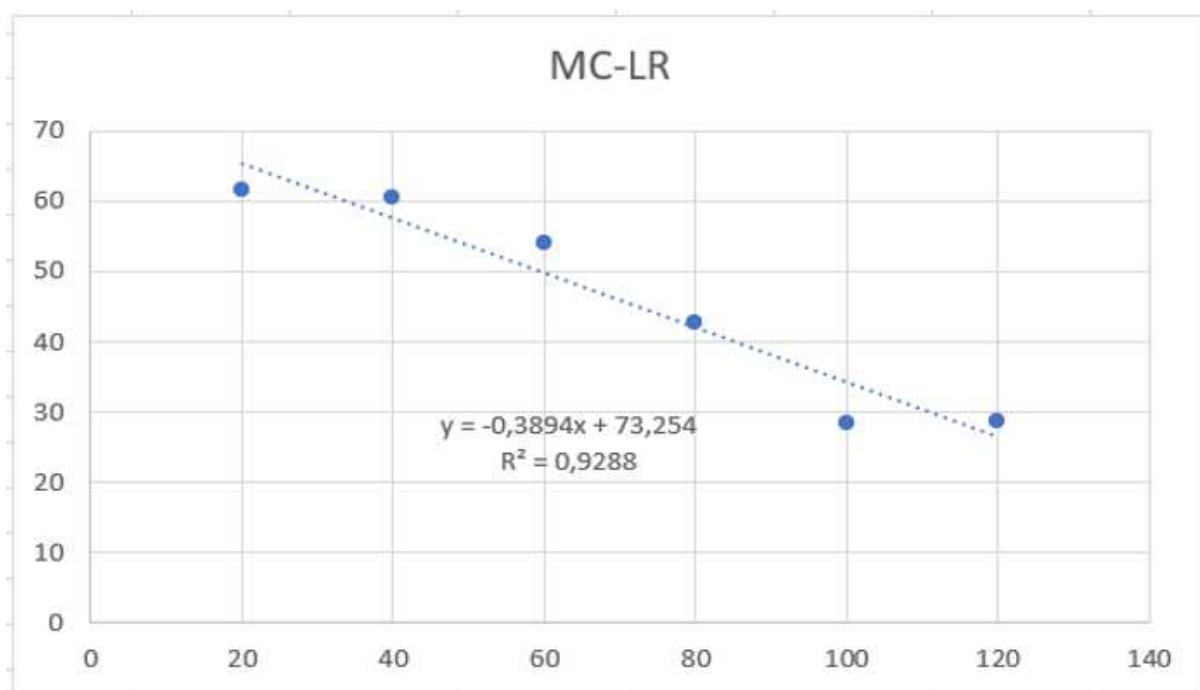
$$\% \text{ de ligação} = (A+/A-) \times 100$$

Onde:

A+: absorbância média lida na presença de amostra ou do padrão de MC-LR

A-: absorbância na ausência de MC-LR

Figura 12. Curva analítica de MC-LR utilizando método ic-ELISA.



Fonte: Autoria própria

Eixo Y= % de ligação e eixo X= concentração em µg/L.

Tentativas posteriores para melhorar o coeficiente de determinação e realizar a análise das amostras, a leitura do anticorpo diminuiu a cada tentativa, a causa principal da desnaturação do anticorpo pode estar relacionada com a presença de azida sódica na solução. Segundo a ABCAM (2022), empresa produtora de anticorpos e afins, a azida sódica interfere na conjugação de anticorpos, inibe a peroxidase e pode ser tóxica para as células, segundo o site da empresa, a ABCAM reformulou vários anticorpos livres de azida.

Por conta da baixa leitura de ligação dos anticorpos, não foi possível dar continuidade a análise por imunoenensaio.

5.3 Avaliação do desempenho metodológico de micotoxinas em ração

Para avaliar o método de extração e as condições cromatográficas foi extraída uma amostra de referência, com concentrações conhecidas para algumas micotoxinas. Conforme Tabela 4 a exatidão do método mostrou-se satisfatório.

Tabela 4. Resultado amostra de proficiência inter laboratorial da empresa Romer Labs – Aflatoxins / Fumonisin in Corn (CSSMY015 – M18411AF) October/December 2018

Micotoxinas	Resultado Romer (µg/Kg)	Resultado extração (µg/Kg)	Recuperação (%)
Aflatoxina B ₁	8,1	9,56	118,02
Fumonisina B ₁	3518,82	3338,41	94,87
Fumonisina B ₂	984,03	778,81	79,14

Fonte: Autoria própria

5.3.1 Extração QuEChERS e análise cromatográfica de micotoxinas em ração

As amostras foram extraídas pelo método *QuEChERS* com adaptações conforme descrito no método de extração.

As curvas analíticas dos padrões de micotoxinas (aflatoxina B₁, fumonisina B₁, fumonisina B₂ e deoxinivalenol) foram indicadas conforme Tabela 5.

Tabela 5. Curva analítica e coeficiente de determinação

Micotoxinas	Faixa de trabalho (µg/kg)	Curva analítica	Coeficiente de determinação (R ²)	LQ (µg/kg)	LD (µg/kg)
Aflatoxina B ₁	2 - 60	Y=166,008*x+(-291,471)	0,995	2	0,60
Fumonisina B ₁	40 - 1200	Y=93,4101*x+875,642	0,992	40	12,01
Fumonisina B ₂	40 - 1200	Y=134,711*x+(-510,279)	0,996	40	12,01
Deoxinivalenol	33 - 996	Y=8,05841*x+1956,28	0,989	33	9,91

Fonte: Autoria própria

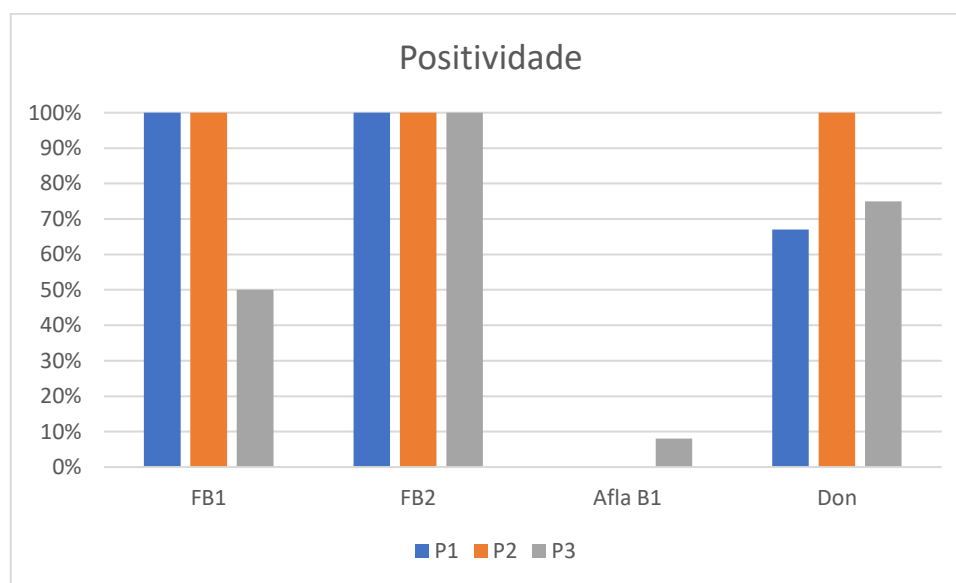
LQ: Limite de quantificação

LD: Limite de detecção

Conforme apresentada no Gráfico 1, das 36 amostras 83,33 % foram positivas para fumonisina B₁, 100% para fumonisina B₂, 80% para deoxinivalenol e apenas uma

amostra resultou em aflatoxina B₁ com 5,23 µg/kg. Das amostras positivas para deoxinivalenol todas foram abaixo do LQ.

Gráfico 1. Amostras de ração positivas para micotoxinas



Fonte: Autoria própria

Houve diferença significativa das médias de fumonisina B₁ e B₂ entre os pesqueiros, conforme Tabela 6. A média de toxina FB₁ determinadas nos P1, P2 e P3 foi de 610,00 µg/Kg, 119 µg/Kg e 7 µg/Kg, respectivamente. Já a média da toxina FB₂ presente nas rações foi de 200 µg/Kg, 50 µg/Kg e 10 µg/Kg para os P1, P2 e P3, respectivamente. Observa-se que P1 apresentou maior contaminação por micotoxinas, e apesar da positividade para micotoxinas, todas as amostras estavam de acordo com os valores permitidos pela portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) de 10000 µg/kg de fumonisinas (B₁ e B₂) para matéria-prima e ração.

Tabela 6. Média de contaminação por micotoxinas das rações dos pesqueiros

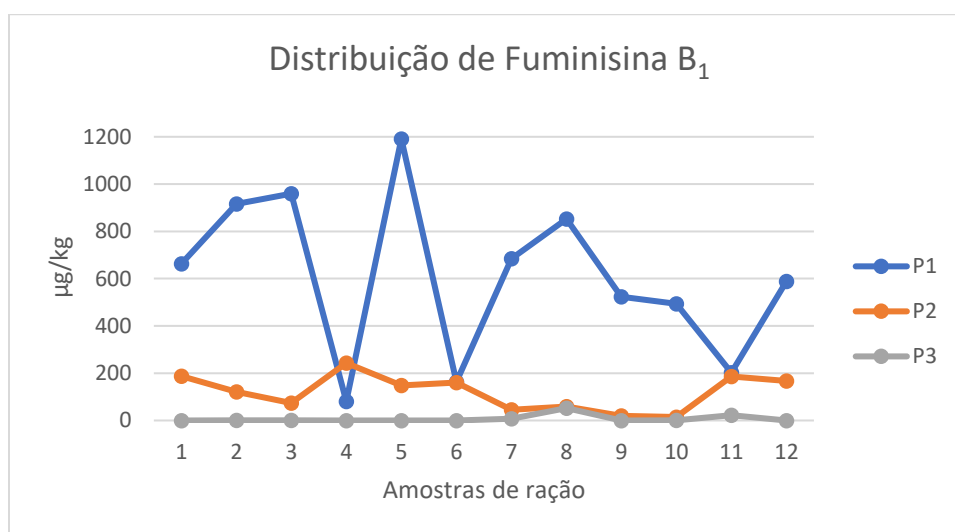
Pesqueiro (P)	Média Aflatoxina B ₁ (µg/Kg)	Média Fumonisina B ₁ (µg/Kg)	Média Fumonisina B ₂ (µg/Kg)
1	0 ^a	610,0 ^b	200,0 ^b
2	0 ^a	119,0 ^a	50,0 ^a
3	0,44 ^a	7,0 ^a	10,0 ^a

Fonte: Autoria própria

Pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de significância, letras iguais na coluna não há diferença significativa e letras diferentes há diferença significativa.

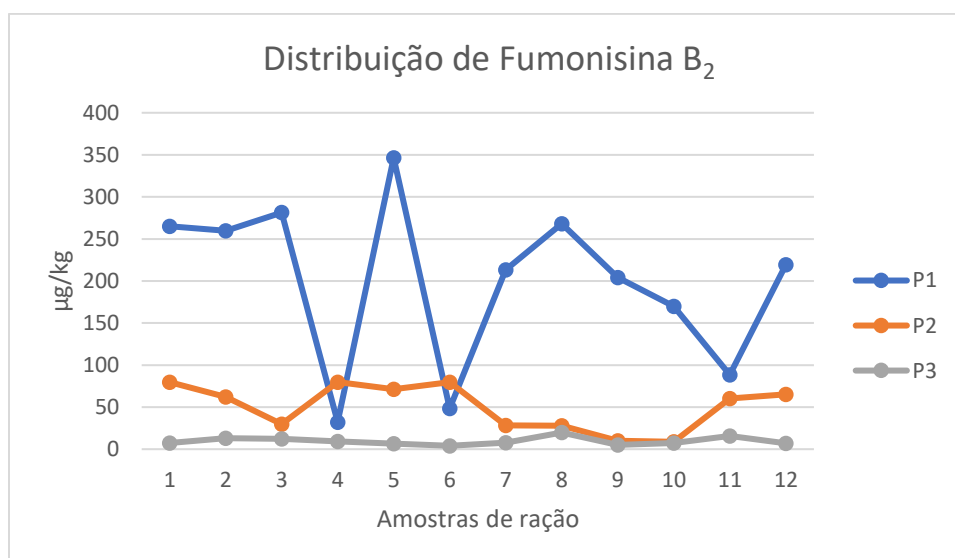
Dentre as micotoxinas detectadas, a fumonisina foi o que se destaca pela positividade das amostras. No Gráfico 2 observa-se a distribuição de fumonisina B₁ nos pesqueiros, e no Gráfico 3 a distribuição da fumonisina B₂, em ambas a variação da contaminação do pesqueiro 1 foi maior entre as amostras, tendo as rações com maior concentração de micotoxinas.

Gráfico 2. Distribuição de fumonisina B₁ nos pesqueiros P1, P2 e P3



Fonte: Autoria própria

Gráfico 3. Distribuição de Fumonissina B₂ nos pesqueiros P1, P2 e P3



Fonte: Autoria própria

A contaminação por fumonisinas era presumido considerando a composição das rações, pois nas duas marcas observou-se maior predominância de milho na

composição, segundo Lino (2004), a incidência mundial de fumonisinas em alimentos para consumo humano ou animal é predominantemente encontrado no milho contaminado, sendo assim a qualidade da ração depende da condição da matéria-prima. A seguir estão escritas a composição de duas marcas encontradas nas pisciculturas da região de Londrina/PR.

Composição da marca A: Farelo de trigo, milho integral moído, farelo de gérmen de milho desengordurado, farelo de glúten de milho 21% (Refinazil), farelo de soja, farinha de carne e ossos bovino, farinha de sangue, farinha de vísceras de frango, minerais e vitaminas.

Composição da marca B: Farelo de milho desengordurado, milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, calcário calcítico, cloreto de sódio, antifúngico, premix vitamínico e mineral.

As composições das rações encaminhadas de Tocantins não foram divulgadas, foram as amostras que apresentaram uma variação de tamanho e formatos comparada com as rações coletadas em Londrina/PR. Pela baixa contaminação de micotoxinas e pela criação de peixes nativos da região Norte do país, espécies do tipo pirarucu e caranha são espécies carnívoras, sendo assim pode-se deduzir que as rações apresentaram baixa concentração de ingredientes de origem vegetal. Conforme, SENAR (2019), peixes onívoros como tilápia, tambaqui, pacu, aceitam e digerem bem ingredientes de origem vegetal, porém, peixes carnívoros como pirarucu, pintado, surubim necessitam de alimentos com alta concentração de proteína, acima dos 40 %.

Em comparação aos outros estudos realizados pelo grupo, Zanin (2021), analisou rações para aves em postura e detectou deoxinivalenol em 100 % de suas amostras com concentração média de 184,0 µg/Kg, e para fumonisina B₁ 89 % e B₂ 98% com contaminação média de 614,00 µg/Kg e 249,6 µg/Kg, respectivamente. Outro estudo, Godoi (2019), obteve 87,5 % de amostras positivas para Aflatoxina B₁ em ração para aves em postura. Hashimoto (2013), avaliou amostras de ração para peixes da região de Londrina/PR e detectou aflatoxinas em 61,9 % das amostras em níveis abaixo de 4,0 µg/kg, e 38,10 % com nível entre 4,0 µg/kg a 15,6 µg/kg. E para Fumonisina foram encontradas 76,20 % de amostras contaminadas com níveis abaixo de 4,0 µg/kg.

Em um outro estudo foram encontradas em amostras de ração 16,28 % e 86,05 % de aflatoxina G₁ e B₁, respectivamente. Porém, os níveis encontrados foram abaixo de 1,0 µg/kg de Aflatoxinas. Os níveis variaram de 0,09 a 0,540 µg/kg para Aflatoxinas G₁ e 0,09 a 0,736 µg/kg para Aflatoxina B₁ (GODOY et al., 2018).

O crescimento de fungos e produção de micotoxinas dependem dos fatores que favorecem a sua produção tais como a atividade de água, temperatura de processamento, temperatura de armazenamento acima de 27 °C, disposição nutricional, grau de oxigenação e umidade ambiente acima de 62 % (PEREIRA, 2012; FEDDERN et al., 2013; HÉRLON et al., 2014). Sendo assim, a presença de fungo não implica na produção de toxinas, assim como a presença de toxina no alimento pode estar com a ausência de fungo. Deste modo, pode-se compreender que a ocorrência da contaminação possa vir da matéria-prima que compõem a ração. Cardoso (2013), verificou uma alta incidência de fungos em rações para peixes com quantidade significativa, onde 60 % das cepas foram do *Aspergillus flavus*, no estudo, analisaram a capacidade das cepas de produzirem aflatoxinas, porém, não foram detectadas aflatoxinas nas amostras analisadas. Outro estudo Massocco (2016), detectou fungos toxigênicos nas amostras de ração e encontrou apenas uma amostra com 1,4 µg/kg de aflatoxina B₁ em rações para peixes de pisciculturas localizadas no centro-leste do estado de São Paulo. Considerando os estudos citados, pressupõem-se que a contaminação por micotoxinas ocorreu na matéria-prima, pois as amostras coletadas na região de Londrina/PR estavam armazenadas em temperaturas superiores a 27 °C, porém, por conta do alto consumo as rações eram adquiridas mensalmente.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram detectados Microcistina-LR em seis amostras de água analisadas por cromatografia líquida, e apenas três destas amostras foram quantificadas. Não foi possível realizar a análise das amostras por imunoenensaio devido a desnaturação do anticorpo monoclonal. A produção do extrato de microcistina demonstrou-se satisfatório, sendo conveniente a sua utilização para pesquisas futuras que exigem uma maior quantidade desta toxina.

Quanto as micotoxinas analisadas nas amostras de rações a maioria apresentaram contaminação por fumonisina B₁ e B₂. Como perspectiva de estudo futuro poderia ser realizado análise de proteína das rações com composição desconhecida para melhor explicar o resultado obtido.

Pode-se concluir que há ocorrência de micotoxinas em rações para peixes, e apesar de estarem todos dentro do limite da legislação, deve-se manter um contínuo monitoramento de micotoxinas e microcistina em pisciculturas para diminuir a exposição dos animais a essas toxinas. E assim garantir a segurança de alimentos.

REFERÊNCIAS

- **ABCAM**. Disponível em:
<<https://www.analiticaweb.com.br/inovando/edicoes/14.html>>. Acesso em: 01 maio, 2022.
- **Associação Brasileira da Psicicultura**. Disponível em:
<<https://www.peixebr.com.br/>>. Acesso em: 20 maio, 2022.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K., Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru. Brazil. *Toxicol.* 181 – 182, p. 441-446, 2022.
- BARBOSA et al. Mycobiota and mycotoxins presente in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Internacional Aquatic Research**, v.5, n.3, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução normativa – IN nº 88, de 26 de março, 2021. Publicada no Diário Oficial da União nº 61, de 31 de março de 2021.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº166, de julho de 2017. Publicada no Diário Oficial da União edição 141, de 25 de julho de 2017.
- BEDOYA SERNA, Carolina Maria. **Efeito de aflatoxinas na ração sobre Matrinxã (Brycon cephalus): acúmulo em tecidos e desempenho produtivo**. 2018. 101f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.
- BEYENE et al. High-performance liquid chromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay techniques for detection and quantification of aflatoxin B1 in feed samples: a comparative study. **BMC Reserach Notes**, v.12, n.492, 2019.
- CARDOSO FILHO, F. C. et al. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciênc. Anim. Bras.**, Goiânia, v.14, n.3, p.305-311, jul./set. 2013.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon. p.369-405. Ed. 1999.
- COLEÇÃO SENAR – Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 263. Piscicultura: alimentação. Senar, Brasília, 2019.
- COLLINS, CH et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Unicamp Campinas – SP, 1997.
- COSTA, Regiane. L. et al. Floração de cianobactérias potencialmente tóxicas em tanques de pisciculturas da região centro sul do estado de Mato Grosso. **Biodiversidade**, v.16, n.1, p.33, 2017.

- DA SILVA, Rosselei Caiél. **Métodos individual e multirresidual para determinação de pesticidas em grãos e derivados por GC-PFPD, GC-ITD-MS e LC-MS/MS**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Marina, 2011.
- **Embrapa Pesca e Aquicultura**. Disponível em: https://www.embrapa.br/contando-ciencia/pesca-e-aquicultura/-/asset_publisher/pzk4tXFfiHGh/content/o-que-e-aquicultura-1355746?inheritRedirect=false >. Acesso em: 29 jan. 2020.
- FDA – Food and Drug Administration – Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. August, 2000.
- FDA – Food and Drug Administration – Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds. November, 2001.
- FEDDERN, V. et al. Aflatoxins importance on animal nutrition. **In: Aflatoxins – recente advances and future prospects**, cap.8, p.171-195, 2013. Disponível em <https://www.intechopen.com/chapters/42067>> doi: 10.5772/51952. Acesso em: 12 jun. 2022.
- FERNANDES, Andrezza Maria. **Aflatoxinas em peixes: resíduos em tecidos, efeitos sobre o desempenho e aspectos fisiológicos**. 2017. 103f. Tese (Livre Docência – Micotoxinas na produção animal e na segurança de alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- FERREIRA, H. et al. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência**, Guarapuava, v.2, p.113 – 127, 2006.
- FUNASA – **Fundação Nacional de Saúde**. Portaria No 1.469, out. 2001.
- FUJI, S.; GARCIA, L.B.; HIROOKA, E.Y. Metodologia analítica imuniquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.15, n.3, p.273-284, 2004.
- GIORDANO, Sheila B. **Estudos sobre a incorporação de Microcistinas de cianobactérias em carpa prateada – *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844)**. 2007. 56f. Dissertação de mestrado – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.
- GODOY, Sílvia H. S. **Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Brasil**. 2018. 70f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.
- HASHIMOTO, E. H. et al. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.1, p.123-132, jan./jun.2003.
- HAYASHI, Carmino. et al. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum**, v.21, n.3, p.733-737, 1999.

- HÉRLON et al. Fungos toxigênicos e micotoxinas na alimentação de peixes: uma revisão. **Scientia Amazonia**, v.3, n.3, 59-71, 2014.
- HURTADO, F. B. et al. Diversidade fitoplanctônica da piscicultura Santa Helena, Alvorada D'Oeste, RO: ocorrência de floração de cianobactérias. **IX jornada científica CEDSA**, Porto Velho/RO, 27 a 29 de nov. 2014.
- JARDIM, I.C.S.F. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v.2, n.1, p.13-25, 2010.
- KAMOAGE et al. Monitoring microcystin and physicochemical parameters: Role of agricultural-aquaculture activity in the water quality. In: **Proceeding of the XI th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, Bethesda, Maryland, USA. May 17-21, 2004. p. 321 – 331.
- KURODA, E.K. et al. Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.12, n.1, p.24-31, jan./mar. 2007.
- LANÇAS, F.M. A cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2, 2009.
- LINO, M. Celeste; SILVA, J.G. Liliana; PENA, S. Angelina. Fumonisinias: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias*, 99 (552), 181-192, 2004.
- MACHADO, Bianca Kesselring Vieira. Entenda porque a piscicultura vem ganhando forças no estado de Tocantins. *Aquaculturebrasil.com*, 2021. Disponível em: < <https://www.aquaculturebrasil.com/noticia/209/entenda-porque-a-piscicultura-vem-ganhando-forca-no-estado-de-tocantins> >. Acesso em: 18 jun. 2022.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09 de novembro de 1988. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 9 de nov. 1988. Seção 1, p.21.968.
- MACEDO, Carla F.; SIPAÚBA-TAVARES, Lúcia H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.36, n.2, p.149 – 163, 2010.
- MEIRELLES et al. Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v.27, n.4, p.617-628, out./dez.2006.
- MIGUEL et al. Prospecção de microcistina no Paraná – Cotaminação, qualidade da água e degradação do meio ambiente. **Biosaúde**, Londrina, v. 20, n. 2, 2018.
- MIGUEL, Tatiana de Ávila. **Microcistina: Prospecção de contaminação, leveduras bioativas e genes de biodegradação em *Sphingosinicella microcystinivorans* B9**. 2014. 116f. Tese apresentada (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.
- MOSSOCCO, Marina Martinêz. **Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em pisciculturas do Estado de São Paulo: rações e espécies comerciais de pescado de cultivo**. 2016. 72f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-

Graduação em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

- NUNES Marina da Graça Pereira. **Determinação de micotoxinas por UPLC-MS/MS em grãos armazenados sob condições de temperatura e atmosfera controlada.** 2019. 174f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Marina, 2019.
- PÁDUA, Camilla Guiotti. **Qualidade físico-química e monitoramento de microcistinas em águas de piscicultura no município de Londrina/PR.** 2004. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- PANASSO, Renata et al. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Oecol. Bras.**, v.11, n.3, p.433 – 449, 2007.
- PEREIRA, M.M.G; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *aspergillus flavus* e *aspergillus parasiticus*. **Boletim CEPPA**, v.20, v.1, p. 141-156, 2002.
- PINHEIRO et al. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em pisciculturas. **Nutritime Revista Eletrônica**, on-line, Viçosa, v.12, n.5, p.4268-4279, set-out, 2015.
- **PISCICULTURA: Líder na produção de pescados, Paraná prevê crescimento de 20%.** Disponível em: <http://www.paranacooperativo.coop.br/ppc/index.php/sistema-ocepar/comunicacao/2011-12-07-11-06-29/ultimas-noticias/121794-piscicultura-lider-na-producao-de-pescados-parana-preve-crescimento-de-20> Acesso em: 29 jan. 2020.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p.184 – 192, 2000.
- RIGHI, Laís Weber. **Método multirresíduo para determinação de micotoxinas em vinho por UPLC- MS/MS.** 2013. 142f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Marina, 2013.
- ROSINI, E.F.; SANT'ANNA, C.L.; TUCCI, A. Cyanobacteria de pescueiros da região metropolitana de São Paulo, Brasil. *Rodriguésia* 64 (2): 399-417, 2013.
- SILVA, Fernando de Godoi. **Aflatoxina B1 na avicultura de postura – ovo, ração e milho – na região norte do Paraná, Brasil.** 2019. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.
- SILVA-STENICO et al. Hepatotoxin Microcystin-LR Extraction Optimization. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.20, n.3, p.535-545, 2009.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. São Paulo: Thomson Learning, 2006.
- SOBOTTKA, Renata Pinheiro. **Analítica avançada aplicada ao setor agroindustrial: multi-micotoxinas e bioativos visando qualidade e segurança**

em aveia e trigo. 2020. 109 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

- SULYOK, Michael; KRSKA, Rudolf; SCHUHMACHER, Rainer. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Anal Bioanal Chem**, 389:1505-1523, 2007. Doi: 10.1007/s00216-007-1542-2.

- YAMASHITA, Cássia R.T. et al. Comparação de métodos para análise de microcistinas: imunoensaio elisa competitivo indireto implementado em laboratório vs cromatografia líquida de ultra eficiência. **Congresso ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.** IV–203, 2017.

- YAN, Pianpian. et al. Natural Occurrence of Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives in Chinese Maize and Wheat Collected in 2017. **Toxins.** 12, 200, 2020. Doi:10.3390/toxins12030200.

- ZANIN, Livia Montanheiro Médici. **Avanço em multi-micotoxinas aplicado à cadeia de aves com ênfase a ração: monitoramento e prevenção.** 2021. 21 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

- ZHANG, Ming-ming et al. A method to extract algae toxin of microcystin-LR. **Journal of Environmental Science.** Vol. 16, No.4, 694-696, 2004.

APÊNDICE A – Tabela de resultados de MC-LR em amostras de água

Resultados de Microcistina LR em água					
Pesqueiro 1		Pesqueiro 2		Pesqueiro 3	
Amostra	MC-LR (µg/L)	Amostra	MC-LR (µg/L)	Amostra	MC-LR (µg/L)
1	ND	1	ND	1	<LQ
2	0,47	2	ND	2	ND
3	ND	3	ND	3	ND
4	ND	4	ND	4	<LQ
5	ND	5	ND	5	ND
6	ND	6	ND	6	ND
7	0,77	7	ND	7	ND
8	0,60	8	ND	8	ND
9	ND	9	ND	9	ND
10	ND	10	ND	10	ND
11	ND	11	ND	11	ND
12	ND	12	<LQ	12	ND

Fonte: Autoria própria

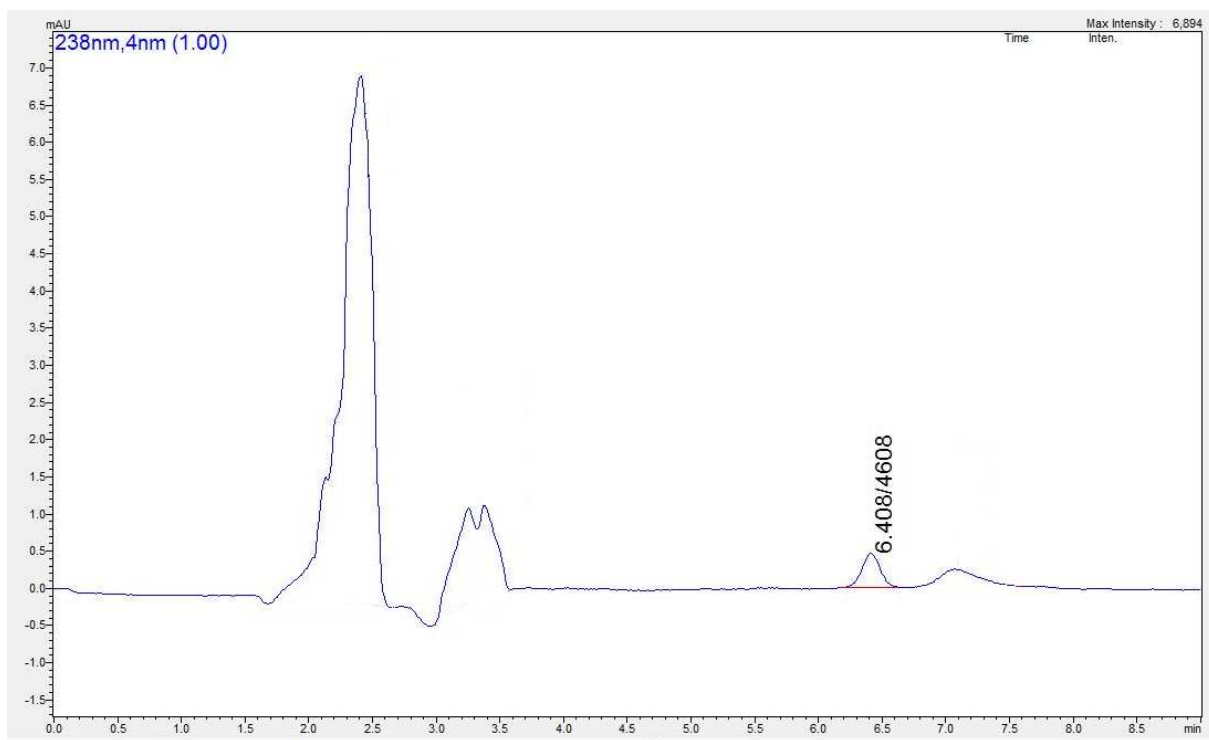
APÊNDICE B – Tabela de resultados de Micotoxinas em amostras de ração

Resultados de micotoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) em ração

Pesqueiro 1					Pesqueiro 2					Pesqueiro 3				
Amostra	FB1	FB2	DON	AFB1	Amostra	FB1	FB2	DON	AFB1	Amostra	FB1	FB2	DON	AFB1
1	662,86	264,87	<LQ	ND	1	187,69	79,74	<LQ	ND	1	<LQ	7,44	<LD	ND
2	915,49	259,62	<LQ	ND	2	121,19	62,15	<LQ	ND	2	1,05	13,25	<LD	ND
3	958,92	281,30	ND	ND	3	73,15	29,82	<LQ	ND	3	0,39	12,46	<LD	ND
4	80,75	32,29	<LQ	ND	4	243,13	79,81	<LQ	ND	4	<LQ	9,31	<LD	ND
5	1191,01	346,44	<LQ	ND	5	148,43	71,30	<LQ	ND	5	<LQ	6,46	<LD	ND
6	163,18	48,48	<LQ	ND	6	159,93	79,56	<LQ	ND	6	<LQ	4,06	<LD	ND
7	685,02	213,17	ND	ND	7	45,05	28,17	<LQ	ND	7	7,74	7,74	ND	ND
8	852,23	267,98	<LQ	ND	8	58,46	27,83	<LQ	ND	8	52,32	19,76	<LQ	ND
9	523,27	203,98	ND	ND	9	19,89	10,02	<LQ	ND	9	<LQ	5,02	<LQ	5,23
10	493,81	169,89	<LQ	ND	10	14,82	8,80	<LQ	ND	10	0,52	7,43	ND	ND
11	202,01	88,28	<LQ	ND	11	185,67	60,27	<LQ	ND	11	23,03	15,66	<LQ	ND
12	587,88	219,20	ND	ND	12	167,40	65,41	<LQ	ND	12	<LQ	7,07	ND	ND

Fonte: Autoria própria

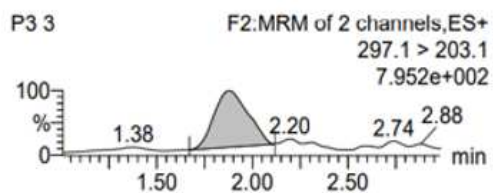
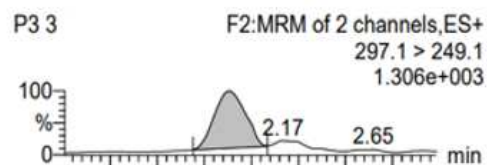
APÊNCIDE C – Cromatograma de análise de microcistina LR em água



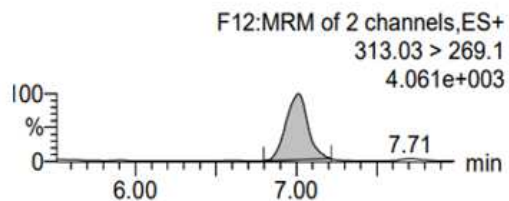
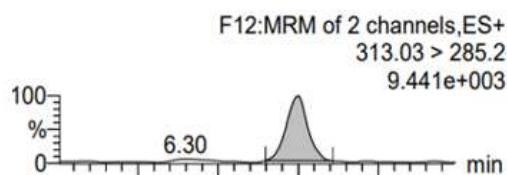
Fonte: Arquivo pessoal

APÊNCIDE D – Cromatogramas de análises de micotoxinas em ração

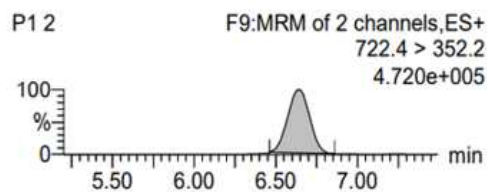
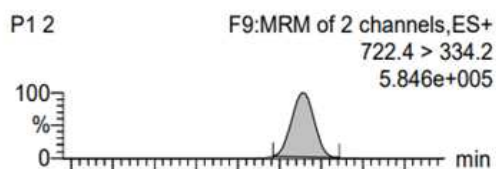
Deoxinivalenol



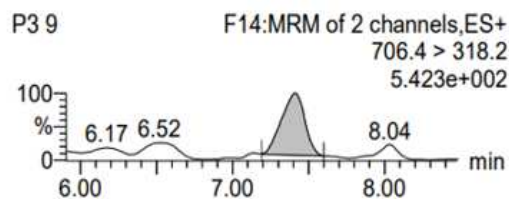
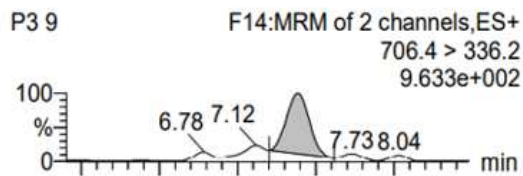
Aflatoxina B1



Fumonisin B1



Fumonisin B2



Fonte: Arquivo pessoal