



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Milena Dutra Pierezan

Palitoxinas como potenciais agentes etiológicos da doença de Haff: otimização e validação de um método analítico empregando LC-ESI-MS/MS para a investigação de amostras de pescado diretamente associadas à doença no Brasil

Florianópolis

2024

Milena Dutra Pierezan

Palitoxinas como potenciais agentes etiológicos da doença de Haff: otimização e validação de um método analítico empregando LC-ESI-MS/MS para a investigação de amostras de pescado diretamente associadas à doença no Brasil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Silvani Verruck
Coorientador: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff

Florianópolis

2024

Pierezan, Milena Dutra

Palitoxinas como potenciais agentes etiológicos da doença de Haff : otimização e validação de um método analítico empregando LC-ESI-MS/MS para a investigação de amostras de pescado diretamente associadas à doença no Brasil / Milena Dutra Pierezan ; orientadora, Silvani Verruck, coorientador, Rodrigo Barcellos Hoff, 2024.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Palitoxinas. 3. Otimização. 4. Validação. 5. Propriedades Físico-Químicas. I. Verruck, Silvani. II. Hoff, Rodrigo Barcellos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Milena Dutra Pierezan

Palitoxinas como potenciais agentes etiológicos da doença de Haff: otimização e validação de um método analítico empregando LC-ESI-MS/MS para a investigação de amostras de pescado diretamente associadas à doença no Brasil

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 01 de março de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Fabiano Barreto
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/RS)

Prof. Dr. Mathias Alberto Schramm
Instituto Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Ciência dos Alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Silvani Verruck
Orientadora

Dr. Rodrigo Barcellos Hoff
Coorientador

Florianópolis, 2024.

Este trabalho é dedicado a Deus e ao meu amado marido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, primeiramente, pela oportunidade de participar de um projeto tão relevante como este. Agradeço aos **meus pais**, por todos os valores inculcados ao longo do meu crescimento, e por me levarem a enxergar a necessidade de honrar àqueles que nos ensinam e o compromisso de com o conhecimento que adquiri, ser útil à sociedade. Agradeço ao **meu marido**, por todo o incentivo, companheirismo e estabilidade.

Agradeço a **Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)**, em especial aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo ensino de excelência e por despertarem em mim o amor pela ciência. Agradeço imensamente aos laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), em especial a **Seção Laboratorial Avançada em Santa Catarina (SLAV/SC)**, por viabilizar a formação de parcerias como a deste projeto. Agradeço pela infraestrutura concedida e pela *expertise* da equipe envolvida. Colaborações como estas não apenas enriquecem a jornada do pesquisador, mas também desempenham um papel fundamental no atendimento das demandas mais atuais da sociedade.

Agradeço também a todos os analistas que me auxiliaram ao longo do projeto, em especial ao **Cristian Rafael Kleeman**, por sanar minhas infinitas dúvidas e me acompanhar ao longo dos ensaios analíticos, e a Carolina Turnes Pasini Deolindo, por me auxiliar no delineamento experimental da otimização do método analítico. Agradeço ao **Dr. Rodrigo Barcellos Hoff**, chefe de laboratório e meu co-orientador, por encabeçar muitas das pesquisas relacionadas a doença de Haff e por me incluir em uma delas. Agradeço, a minha orientadora **Dra. Silvani Verruck**, por todo o apoio e paciência. Por gerenciar as atividades de maneira tão eficiente e me permitir crescer como aluna e pesquisadora. Agradeço, finalmente, aos **membros da banca**, pela disponibilidade de participação e pelas contribuições com este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Eu não falhei.
Apenas descobri 10 mil soluções que não funcionam.”
Thomas Edison*

RESUMO

A doença de Haff, também conhecida como doença da urina preta, é tipicamente desenvolvida após a ingestão de pescado contaminado e tem como principais achados clínicos a rabdomiólise e a mioglobínúria. No Brasil, casos confirmados da doença foram descritos apenas a partir de 2008 nas regiões Norte e Nordeste e, desde então, sua incidência e distribuição tem aumentado. Além da preocupação relacionada à segurança de alimentos, o receio da população quanto ao consumo de pescado nas regiões mais afetadas ainda têm proporcionado elevados prejuízos à cadeia produtiva local. Ademais, a etiologia da doença ainda é desconhecida, mas estudos recentes tem sugerido sua possível relação com as palitoxinas. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar um método analítico previamente desenvolvido para detecção de produtos de oxidação de palitoxinas, empregando LC-ESI-MS/MS, a fim de investigar a sua presença em amostras de pescado diretamente associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil. A otimização do método foi realizada por meio de um delineamento composto central rotacional utilizando amostras de peixe de água doce (tambaqui) fortificadas com padrão analítico de palitoxina. Em seguida, o método otimizado foi submetido a um processo de validação intralaboratorial de acordo com o Regulamento de Execução 2021/808/EC, com algumas adaptações, em virtude da complexidade e das limitações ainda enfrentadas na análise de palitoxinas. O preparo de amostras envolveu uma extração sólido-líquido seguida de uma extração em fase sólida que inclui a reação das palitoxinas com ácido periódico. A detecção dos principais fragmentos oxidados obtidos por esta reação (fragmentos amida e amina) foi realizada por LC-ESI-MS/MS no modo positivo, utilizando coluna C18, e contendo acetonitrila e água como fases móveis, ambas acidificadas com 0,1% de fórmico ácido. Após a otimização e validação do método, a investigação etiológica foi executada com a análise de 16 amostras de pescado (pescado *in natura* e sobra de refeições à base de pescado) associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil, coletadas a partir dos episódios ocorridos em 2022. Ao final, foi possível observar que o resultado obtido na otimização do método foi satisfatório e resultou em um aumento de sinal de aproximadamente 20% para os analitos. Ademais, mesmo com as limitações ainda existentes na validação de métodos envolvendo a análise de palitoxinas, o processo de validação executado no presente projeto é um dos mais completos já publicados. O método demonstrou ser apropriado para análises quantitativas em amostras de pescado (peixes de água doce e salgada, crustáceos e moluscos bivalves) e apresentou elevada sensibilidade (LQ de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$), sendo capaz de trabalhar em uma faixa que inclui o limite provisório de ingestão de palitoxinas ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$). Se tratando da investigação

etiológica, com os resultados obtidos, ainda não é possível assumir que há uma relação entre as palitoxinas e o desencadeamento da doença de Haff no Brasil. Para futuros estudos, recomenda-se a realização de uma análise confirmatória empregando espectrometria de massas de alta resolução.

Palavras-chave: doença transmitida por alimentos; biotoxinas emergentes; ostreocinas; mascarenotoxinas; ovatoxinas; SPE; propriedades físico-químicas; solubilidade; predição *in silico*.

ABSTRACT

Haff disease, also known as black urine disease, is typically developed after ingestion of contaminated marine and seawater species and its main clinical findings are rhabdomyolysis and myoglobinuria. In Brazil, confirmed cases have been described only since 2008 in North and Northeast regions and, since then, its incidence and distribution has increased. In addition to the concern related to food safety, the populations' fear regarding the consumption of fish in the most affected regions has caused high losses to the local production chain. Moreover, the causative agent of the disease is still unknown, but recent studies have suggested its possible correlation with palytoxins. Therefore, the objective of the present work was to optimize and validate an analytical method previously developed for the detection of palytoxin oxidation products, using LC-ESI-MS/MS, to investigate the presence of these biotoxins in food samples directly associated with Haff disease in Brazil. The optimization of the method was carried out through a rotatable central composite design using samples of freshwater fish (*tambaqui*) fortified with a palytoxin analytical standard. Then, the optimized method was subjected to an intralaboratory validation process in accordance with the European guideline 2021/808/EC, with some adaptations, due to the complexity and limitations still faced with palytoxins analysis. Sample preparation involved a solid-liquid extraction followed by a solid phase extraction that includes the reaction of palytoxins with periodic acid. The detection of the main oxidized fragments obtained by this reaction (amide and amine fragments) was carried out by LC-ESI-MS/MS in positive mode, using a C18 column, and containing acetonitrile and water as mobile phases, both acidified with 0.1% of formic acid. After the method optimization and validation, the etiological investigation was carried out with the analysis of 16 marine and freshwater food samples (*in natura* and leftover meals) associated with Haff disease in Brazil, collected from the episodes that occurred in 2022. Finally, it was possible to observe that the result obtained in the method optimization was satisfactory and resulted in a signal increase of approximately 20% for the analytes. Furthermore, even with the limitations that still exist for method validations involving palytoxins analysis, the validation process carried out in the present project is one of the most complete published so far. The method demonstrated to be appropriate for quantitative analyzes of marine and freshwater samples (marine and freshwater fish, crustaceans and

bivalve mollusks) and presented high sensitivity (LQ of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$), being able to work in a range that includes the provisional palytoxin intake limit ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$). Regarding the etiological investigation, with the results obtained, it is still not possible to assume that there is a relationship between palytoxins and the Haff disease triggering in Brazil. For future studies, a confirmatory analysis using high-resolution mass spectrometry is recommended.

Keywords: foodborne disease; emergent biotoxins; emergent biotoxins; ostreocins; mascarenotoxins; ovatoxins; SPE; physicochemical properties; solubility; *in silico* prediction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização dos fragmentos A e B e dos cromóforos das palitoxinas, utilizando a estrutura química planar da palitoxina como exemplo.....	31
Figura 2 - Estrutura química planar da palitoxina indicando as clivagens resultantes da reação com ácido periódico e os principais produtos de oxidação obtidos para a palitoxina e seus análogos segundo suas variações estruturais.....	43
Figura 3 - Superfícies de resposta geradas pelas variáveis de extração testadas para a) PITX-amida e b) PITX-amina.....	52
Figura 4 - <i>Extracted ion chromatogram</i> obtido para a) PITX-amida e b) PITX-amina na avaliação da seletividade do método empregando amostra branca de peixe tambatinga, indicando a janela de tempo de retenção dos fragmentos.....	55
Figura 5 - Cromatogramas e respectivos espectros de massa obtidos por <i>enhanced product ion scan</i> para a) PITX-amida e b) PITX-amina empregando amostra branca de peixe tambatinga fortificada com 45 µg PITX kg ⁻¹ . Os íons monitorados estão destacados em azul.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hipóteses estruturais das ovatoxinas ainda não completamente elucidadas em comparação com a estrutura química planar da palitoxina.....	34
Tabela 2 - Desenho experimental elaborado para a otimização da extração de palitoxinas empregando amostras de peixe de água doce (tambaqui).....	46
Tabela 3 – Resumo das amostras utilizadas na avaliação da seletividade do método otimizado para extração de palitoxinas.....	48
Tabela 4 - Parâmetros de LC-ESI-MS/MS otimizados para a análise de palitoxinas em amostras alimentícias (peixes de água doce e salgada, crustáceos e moluscos bivalves).....	50
Tabela 5 - Performance do método otimizado para a análise de palitoxinas avaliada com amostras brancas de peixe tambatinga.....	54
Tabela 6 - Resumo das amostras de pescado associadas à doença de Haff analisadas através do método otimizado e validado.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
Ag	Prata
Al	Alumínio
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
ARfD	Dose oral aguda de referência
As	Arsênio
ASP	<i>Amnesic shellfish poisoning</i>
AZA	Azaspirácido
Ba	Bário
Be	Berílio
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAD	Gás de colisão
CC α	Limite de decisão para confirmação
Cd	Cádmio
CE	<i>Collision energy</i>
Co	Cobalto
Cr	Cromo
CTX	Ciguatoxina
Cu	Cobre
CUR	<i>Curtain gas</i>
CV	Coefficiente de variação
CXP	<i>Collision cell exit potential</i>
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DP	<i>Declustering potential</i>
DPR	Desvio padrão relativo
DSP	<i>Diarrhetic shellfish poisoning</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EP	<i>Entrance potential</i>
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
Fe	Ferro
Fe ²⁺	Íon ferroso

FIA	<i>Flow injection analysis</i>
GS1	<i>Ion source gas 1</i>
GS2	<i>Ion source gas 2</i>
H	Hidrogênio
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Água
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IFSC	Instituto Federal de Santa Catarina
IS	<i>Ion spray voltage</i>
iso-PITX	Palitoxina isobárica
K	Potássio
K ⁺	Íon potássio
LC	Cromatografia líquida
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em <i>tandem</i> com ionização por eletrospray
LC-FLD	Cromatografia líquida com detector de fluorescência
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LC-UV	Cromatografia líquida com detector ultravioleta
LC-qTOF-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisadores em <i>tandem</i> e <i>time-of-flight</i>
LD ₅₀	Dose letal mediana
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MCTs	Microcistinas
MsTX	Mascarenotoxinas
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
Na	Sódio
Na ⁺	Íon sódio
NH ⁴⁺	Íon amônio
NSP	<i>Neurotoxic shellfish poisoning</i>
OsTC	Ostreocina

OsTX	Ostreotoxina
OvTX	Ovatoxina
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MoluBiS	Programa Nacional de Moluscos Bivalves Seguros
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas com analisador em <i>tandem</i>
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
PITX	Palitoxina
pPITX	Palitoxina putativa
PSP	<i>Paralytic shellfish poisoning</i>
Q1	Primeiro analisador quadrupolo
q2	Célula de colisão
Q3	Segundo analisador quadrupolo
SLAV/SC	Seção Laboratorial Avançada de Santa Catarina
Sb	Antimônio
Se	Selênio
Sn	Estanho
SPE	Extração em fase sólida
TEM	Temperatura
Th	Tório
Tl	Tálio
TOF	Analisador de massas do tipo <i>time-of-flight</i>
TS	<i>Tissue standard</i>
TTX	Tetrodotoxina
U	Urânio
V	Vanádio
Zn	Zinco

UNIDADES DE MEDIDA

°C	Graus Celsius
Da	Daltons

Kg	Quilogramas
L	Litros
mg	Miligramas
<i>m/z</i>	Razão massa carga
nm	Nanômetros
psi	Libra-força por polegada quadrada
rpm	Rotações por minuto
μg	Microgramas
μm	Micrômetro
V	Volts
v	Volume

DIAGRAMA CONCEITUAL

O QUE?

-Otimizar e validar um método analítico previamente desenvolvido, empregando LC-ESI-MS/MS, para a investigação da presença de palitoxinas em amostras de pescado diretamente associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil.

POR QUÊ?

-A enfermidade é enquadrada como uma doença emergente, ainda com etiologia desconhecida;
-Desde o primeiro relato da ocorrência da doença de Haff no Brasil, em 2008, sua incidência e distribuição vem aumentando, o que representa um cenário preocupante do ponto de vista da segurança de alimentos e da saúde pública;
-A doença vem causando receio aos consumidores de pescado das regiões mais afetadas pelos surtos (Norte e Nordeste) e, conseqüentemente, elevados prejuízos à cadeia produtiva e a queda na renda de milhares de pescadores locais;
-Estudos recentes têm sugerido uma possível relação da doença de Haff com as palitoxinas. Contudo, poucos autores analisaram amostras de pescado diretamente associadas à doença e de uma maneira mais direcionada à detecção de palitoxinas, com o intuito de prosseguir com tal investigação etiológica.

O QUE JÁ EXISTE?

-Um estudo brasileiro que executou uma análise exploratória em amostras de peixe cozido associadas ao surto da doença de Haff ocorrido entre 2020 e 2021, empregando LC-ESI-MS/MS. Foram identificados íons de transição característicos de biotoxinas pertencentes ao grupo das palitoxinas, tais como palitoxina-isobárica e ovatoxinas (-a, -b, -e);
-Alguns métodos envolvendo a análise de palitoxinas intactas por LC-ESI-MS/MS. Contudo, os mesmos resultam em baixa sensibilidade, um extrato final instável e/ou ambigüidades na identificação dos análogos em virtude das diferentes espécies iônicas formadas durante a análise instrumental;
-Um método envolvendo a análise de produtos de oxidação de palitoxinas por LC-ESI-MS/MS. Os produtos são obtidos após reação com ácido periódico durante o preparo de amostras. O método apresenta elevada sensibilidade, um extrato final mais estável, assim como uma identificação mais simples dos íons formados durante a análise instrumental.

HIPÓTESES?

-Há presença de palitoxinas em amostras de pescado diretamente associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil;
-Não há presença de palitoxinas em amostras de pescado diretamente associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil.

CONTRIBUIÇÕES DESTA ESTUDO PARA O ESTADO DA ARTE

-Foram definidas as condições instrumentais e analíticas ótimas para a identificação e a quantificação de produtos de oxidação de palitoxinas em amostras de pescado, empregando LC-ESI-MS/MS;
-Foi obtido um forte indício da presença de palitoxinas nas amostras de pescado associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil, o que contribui com a investigação etiológica da doença. Os resultados obtidos ainda servirão de subsídio para futuros estudos primários, tais como os que envolvem a realização de uma análise confirmatória;
-O método desenvolvido e validado pretende ser implementado em um dos laboratórios oficiais vinculados ao governo (SLAV/SC), de modo que este se torna um laboratório pioneiro em se tratando da análise de palitoxinas em pescado no país. Esta implementação contribui tanto com o avanço no monitoramento de biotoxinas na costa brasileira quanto com a manutenção da segurança de alimentos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	OBJETIVOS.....	24
1.1.1	Objetivo geral.....	24
1.1.2	Objetivos específicos.....	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	DOENÇA DE HAFF.....	24
2.1.1	Hipóteses etiológicas.....	26
2.2	BIOTOXINAS AQUÁTICAS.....	27
2.2.1	Palitoxina e organismos produtores.....	28
2.2.2	Análogos de palitoxina e organismos produtores.....	30
2.3	ANÁLISE DE PALITOXINAS.....	35
2.3.1	Técnicas analíticas.....	36
2.3.1.1	<i>Cromatografia líquida.....</i>	<i>37</i>
2.3.1.2	<i>Espectrometria de massas.....</i>	<i>37</i>
2.3.1.2.1	Fonte de ionização.....	39
2.3.1.2.2	Parâmetros otimizáveis.....	40
2.3.2	Preparo de amostras.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	SOLVENTES, REAGENTES E PADRÃO ANALÍTICO.....	43
3.2	PREPARO DE AMOSTRAS.....	44
3.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	44
3.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	46
3.5	INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA EMPREGADA.....	49
3.6	AMOSTRAS DE PESCADO ASSOCIADAS À DOENÇA DE HAFF.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	51
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	53
4.3	AMOSTRAS DE PESCADO ASSOCIADAS À DOENÇA DE HAFF.....	58
5	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

APÊNDICE A – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FRAGMENTO AMIDA DE PALITOXINA OBTIDAS POR PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>.....	68
APÊNDICE B – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FRAGMENTO AMINA DE PALITOXINA OBTIDAS POR PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>.....	70

1 INTRODUÇÃO

A doença de Haff, também conhecida como doença da urina preta, é tipicamente desenvolvida nas 24 horas posteriores à ingestão de pescado contaminado e tem como principais achados clínicos a rabdomiólise e a mioglobínúria (Bandeira *et al.*, 2017). O primeiro relato da doença de Haff ocorreu em 1924, em uma região litorânea atualmente pertencente à Rússia (Lawetzky, 1924; Meyer, 1924). Já no Brasil, casos compatíveis com a doença foram descritos apenas a partir de 2008 nas regiões Norte e Nordeste e, desde então, sua incidência e distribuição tem aumentado (Cardoso *et al.*, 2022). Além da preocupação relacionada à segurança de alimentos, o receio da população quanto ao consumo de pescado nas regiões mais afetadas pelos surtos, em especial de peixes, sejam eles de água doce ou salgada, têm proporcionado elevados prejuízos à cadeia produtiva e, conseqüentemente, a queda na renda de milhares de pescadores (Rocha *et al.*, 2021). Ademais, o agente causador da doença permanece desconhecido, de modo que a enfermidade atualmente se enquadra como uma doença emergente e um evento de saúde pública, sendo a investigação de sua etiologia e do potencial mecanismo que induz sua ocorrência uma prioridade (Carvalho *et al.*, 2021).

Até o momento, amostras de água e solo das regiões mais afetadas, assim como amostras alimentícias (pescado *in natura* e sobra de refeições à base de pescado) e clínicas (urina, fezes e soro humano) associadas aos pacientes diagnosticados já foram analisadas, a fim de identificar a presença de agentes químicos ou biológicos que possam ser responsáveis pelo desencadeamento da doença. Não foram detectadas concentrações significativas de elementos potencialmente tóxicos ou de biotoxinas aquáticas de maior ocorrência, assim como já parece ter sido descartada a possibilidade de a causa ser um agente biológico (Cardoso *et al.*, 2022; Pei *et al.*, 2019). Contudo, após o surto da doença de Haff relatado no Brasil entre 2020 e 2021, Cardoso *et al.* (2022) executaram uma análise exploratória em amostras de peixe cozido envolvidas nos episódios, empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS), e identificaram íons de transição característicos de biotoxinas pertencentes ao grupo das palitoxinas (PITXs). Ademais, alguns dos sintomas conhecidos por serem desencadeados pela intoxicação por PITXs, dentre os quais se inclui a rabdomiólise e a mioglobínúria, se enquadram aos da doença de Haff (Bandeira *et al.*, 2017). Sendo assim, atualmente, as PITXs constituem uma das principais hipóteses etiológicas sustentadas pela literatura (Campos *et al.*, 2021).

A PITX pertence a um grupo de biotoxinas emergentes de alto peso molecular (~2600 Da) e é considerada uma das mais complexas e tóxicas substâncias aquáticas não proteicas (Poli *et al.*, 2018). Além da própria PITX, diversos análogos já foram relatados, tais como homo-, bishomo-, neo- e deoxi-PITX, 42-OH-PITX, ostreocinas (OsTCs), mascarenotoxinas (MsTX) e ovatoxinas (OvTXs), cada qual sendo produzido por diferentes espécies de corais (*Palythoa* spp.), microalgas (*Ostreopsis* spp. e *Prorocentrum borbonicum*) e possivelmente cianobactérias (*Trichodesmium* spp.) (Arteaga-Sogamoso *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2012; Tibiriçá *et al.*, 2019). Limites regulatórios ainda não foram estabelecidos para PITXs em amostras de pescado. No entanto, o *European Food Safety Authority* (EFSA) sugeriu um limite de ingestão provisório de 30 µg PITXs kg⁻¹ com base na dose oral aguda de referência (ARfD) disponível (EFSA, 2009). Neste contexto, espera-se que os métodos analíticos envolvidos na análise de PITXs garantam a sensibilidade necessária para trabalhar em uma faixa que inclua este nível de interesse.

A análise de PITXs em amostras alimentícias ainda é uma tarefa desafiadora. Um dos principais desafios se encontra na limitação de padrão analítico, uma vez que apenas o padrão de PITX está disponível comercialmente. Por esta razão, as determinações qualitativas e quantitativas de seus análogos são usualmente realizadas assumindo que os mesmos se comportam de maneira similar à PITX durante o processo de extração e análise instrumental, devido à suas semelhanças estruturais. Ademais, a análise de PITXs intactas por LC-ESI-MS/MS usualmente apresenta baixa sensibilidade e resulta em ambiguidades na identificação dos analitos devido à complexa mistura de espécies formadas, que incluem estados de diferentes cargas (+1, +2 e +3) de diferentes espécies iônicas (H⁺, NH⁴⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Fe²⁺) e perdas sucessivas de moléculas de água (Ciminiello *et al.*, 2011). Neste contexto, o método analítico descrito por Selwood *et al.* (2012), que propõe a análise de produtos de oxidação específicos da PITX após uma reação com ácido periódico, tem surgido como uma alternativa promissora. A oxidação de dióis vicinais resulta na clivagem das ligações carbono-carbono que, no caso das PITXs, origina dois principais aldeídos nitrogenados que correspondem às extremidades inicial e terminal da molécula (fragmentos amida e amina, respectivamente). Estes produtos fornecem um sinal consideravelmente mais alto em LC-ESI-MS/MS quando comparados às PITXs intactas, assim como o extrato é mais estável. O limite de quantificação (LQ) também é um dos mais baixos já descritos para aplicação em matrizes alimentícias como o pescado (10 µg PITX L⁻¹), sendo o método um dos únicos que permitem trabalhar na faixa de concentração que inclui o limite provisório estabelecido pelo EFSA (Ciminiello *et al.*, 2011, 2015).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar um método analítico previamente desenvolvido para detecção de produtos de oxidação de PITXs, empregando LC- ESI-MS/MS, a fim de investigar a presença destas biotoxinas em amostras de pescado diretamente associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Otimizar e validar um método analítico previamente desenvolvido empregando LC-ESI-MS/MS para a investigação da presença de palitoxinas em amostras de pescado diretamente associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar um método analítico previamente desenvolvido para a detecção de produtos de oxidação de palitoxinas em amostras de pescado, empregando a técnica de LC-ESI-MS/MS;
- b) Validar o método analítico otimizado;
- c) Analisar amostras de pescado diretamente associadas ao desencadeamento da doença de Haff no Brasil, empregando o método analítico otimizado e validado;
- d) Investigar a relação entre as palitoxinas e o desencadeamento da doença de Haff através dos resultados obtidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA DE HAFF

A doença de Haff, também conhecida como doença da urina preta, é uma doença transmitida por alimentos e tipicamente desenvolvida nas 24 horas posteriores à ingestão de pescado, em especial peixes. As principais condições clínicas consideradas para seu diagnóstico são a mialgia intensa e súbita, a parestesia e a astenia, sem relação com a prática de atividades físicas. Tais sintomas costumam evoluir para a rabdomiólise, uma síndrome causada pela lesão no músculo esquelético. Como resultado, o paciente evidencia marcadores de necrose muscular, em especial a creatina quinase, cujo nível sérico se apresenta no mínimo cinco vezes superior ao limite máximo de referência (Bandeira *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2021). A urina do paciente ainda pode apresentar uma coloração que varia do avermelhado ao marrom, tendo em vista a eliminação de metabólitos musculares, principalmente a mioglobina, através do sistema renal (mioglobinúria) (Carvalho *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*,

2022). As principais complicações causadas pela doença de Haff são a hipercalemia, hipo ou hipercalcemia, hiperfosfatemia e hiperuricemia, associada à insuficiência renal aguda, a qual pode ser fatal (Campos *et al.*, 2021).

O primeiro relato da doença de Haff ocorreu em 1924, na região litorânea de Königsberg, território que no dado período pertencia à Alemanha, mas atualmente pertence à Rússia, sendo conhecido como Kaliningrado (Lawetzky, 1924; Meyer, 1924). Após este relato, mais de 1000 casos foram reportados no continente europeu, além de, ao longo dos anos, a doença também ter sido relatada em países de outros continentes, tais como Estados Unidos (1984) e China (2000). No Brasil, casos compatíveis com a doença foram descritos apenas recentemente (Cardoso *et al.*, 2022). O primeiro relato surgiu em 2008. Neste ano, pelo menos 27 casos ocorreram no estado do Amazonas (Norte) após o consumo de peixes de espécies locais de água doce, como Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Mylossoma spp.*) e Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (Campos *et al.*, 2021), além de casos adicionais, no mesmo estado, em 2013. Não foram encontrados relatos de óbitos devido à doença de Haff até este período. Já entre 2016 e 2017, o Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde, localizado na Bahia (Nordeste), registrou mais de 100 casos da doença após o consumo das espécies de peixe de água salgada Olho-de-boi (*Seriola spp.*) e Badejo (*Mycteroperca spp.*), havendo pelo menos dois óbitos (Bandeira *et al.*, 2017), além de casos adicionais em 2018 e o início de um novo surto a partir de 2020. Cabe destacar que as informações da doença publicadas até o ano de 2020 não estão centralizadas, o que dificulta uma quantificação mais precisa dos casos ocorridos até este período. Ademais, é extremamente comum a ocorrência de subnotificação, em especial se tratando de doenças transmitidas por alimentos. Sendo assim, os dados apresentados podem não ter representado na íntegra o número de casos de doença de Haff que de fato ocorreram até este período.

Por fim, em 2021, tornou-se compulsória a notificação e a investigação integrada de casos compatíveis com a doença de Haff no país. Sendo assim, atualmente, todos os casos vêm sendo acompanhados pelas equipes de epidemiologia do Ministério da Saúde, em cooperação com os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e o Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), com o auxílio do protocolo para investigação epidemiológica e laboratorial de casos suspeitos (MAPA, 2021, 2022). A partir destas notificações, foi possível emitir em 2022 o primeiro boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de doença de Haff (MS, 2021a). Foram registradas 391 notificações compatíveis com a doença no período de janeiro de 2021 a dezembro de 2022, tendo sido observado um aumento de aproximadamente 57% no número de casos entre estes dois anos,

com destaque para o mês de setembro. Durante este período, apenas na região Sul não houve notificações. Em boa parte dos poucos casos relatados nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, o pescado consumido era proveniente da região Norte. Sendo assim, as regiões Norte e Nordeste seguiram apresentando maior frequência de notificação (83 e 15%, respectivamente), com as maiores ocorrências sendo nos estados do Amazonas (47%) e Pará (30%). As principais espécies de peixe implicadas nos episódios durante este período foram Pacu, Tambaqui, Olho-de-boi e Badejo, que em alguns casos foram consumidos em conjunto com outros tipos de pescado, tais como crustáceos e moluscos bivalves.

Para além da preocupação relacionada à segurança de alimentos, a doença ainda tem provocado um impacto considerável sobre a cadeia produtiva do pescado nas regiões Norte e Nordeste. No decorrer dos últimos anos, autoridades municipais das localidades mais afetadas pela doença adotaram como estratégia emergencial o veto temporário da comercialização de espécies de peixe de água doce e salgada mais associadas aos casos. Contudo, mesmo após a liberação, foi observado um forte receio da população local quanto ao consumo de peixes, o que proporcionou a queda na renda de milhares de pescadores (Pierezan *et al.*, 2023). Em 2021, foi relatada uma queda de até 80% nas vendas em peixarias das comunidades ribeirinhas, de maneira que programas de apoio aos quase 60% de moradores dependentes desta fonte de renda nas localidades mais atingidas precisaram ser elaborados (Rocha *et al.*, 2021). Os tipos de pescado citados nos relatos clínicos ainda são frequentemente ingeridos em todos os locais em que os surtos já foram descritos, sem que necessariamente ocorra o desenvolvimento da patologia, assim como o agente causador da doença permanece desconhecido, o que dificulta a elaboração de políticas de prevenção e controle mais eficazes. Sendo assim, a enfermidade atualmente se enquadra como uma doença emergente e um evento de saúde pública, sendo a investigação de etiologia e do potencial mecanismo que induz sua ocorrência uma prioridade (Carvalho *et al.*, 2021).

2.1.1 Hipóteses etiológicas

Até o momento, já foram propostas diversas etiologias para a doença de Haff, não havendo, contudo, nenhuma conclusão definitiva a respeito (Carvalho *et al.*, 2021). Amostras de água e solo das regiões mais afetadas, assim como amostras alimentícias (pescado *in natura* e sobra de refeições à base de pescado) e clínicas (urina, fezes e soro humano) associadas aos pacientes diagnosticados já foram analisadas quanto à presença de elementos potencialmente tóxicos (Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni,

Sb, Se, Pb, Sn, Tl, Th U, V e/ou Zn). No entanto, os mesmos não foram detectados, ou se apresentaram em concentrações não preocupantes (Bandeira *et al.*, 2017; Pei *et al.*, 2019). Ademais, a ausência de febre ou sintomas de ordem gastrointestinal na maioria dos pacientes, bem como os resultados negativos de diversas análises realizadas para detecção de vírus e bactérias em amostras alimentícias e clínicas parecem descartar a possibilidade de a causa ser um agente biológico. A ocorrência de sintomas quase que exclusivamente após o consumo de pescado já submetido à elevadas temperaturas (cocção, fritura, dentre outros), que deveria eliminar boa parte dos agentes infecciosos, também aponta que essa não é a etiologia da doença (Cardoso *et al.*, 2022). Sendo assim, foi levantada a hipótese de que biotoxinas aquáticas poderiam estar associadas à ocorrência da doença de Haff, tendo em vista a sua termoestabilidade (Almeida *et al.*, 2019).

2.2 BIOTOXINAS AQUÁTICAS

As biotoxinas aquáticas contituem uma das maiores preocupações quando se trata da contaminação do pescado, uma vez que podem ser bioacumuladas no tecido animal e, em alguns casos, sofrer biomagnificação ao longo da cadeia trófica. A classificação das biotoxinas aquáticas é relativamente dinâmica. Diferentes classificações já foram estabelecidas em prol de agrupá-las por similaridade de estruturas químicas, propriedades físicas e mecanismos de ação. Atualmente, as principais biotoxinas hidrofílicas são classificadas em amnésicas (*amnesic shellfish poisoning* - ASP), paralisantes (*paralytic shellfish poisoning*- PSP), tetrodotoxinas (TTXs) e microcistinas (MCTs). Já as lipofílicas envolvem as diarreicas (*diarrheic shellfish poisoning*- DSP), neurotóxicas (*neurotoxic shellfish poisoning*- NSP), os azaspirácidos (AZAs), as ciguatoxinas (CTXs) e as aminas cíclicas, enquanto as PITXs são consideradas biotoxinas anfifílicas (Estevez *et al.*, 2019; Futigami; Dutra; Verruck, 2021). Destas, as MCTs e as saxitoxinas (biotoxinas do grupo das PSPs) são monitoradas nacionalmente em amostras de água para o consumo humano, visando garantir sua potabilidade (MS, 2021b), enquanto biotoxinas dos grupos ASP, PSP, DSP e AZP são monitorados através do Programa Nacional de Moluscos Bivalves Seguros (MoluBiS) para fins de controle higiênico-sanitário, tendo em vista os frequentes episódios de contaminação de moluscos bivalves por estes grupos de biotoxinas na costa brasileira (Brasil, 2023).

De maneira geral, as cianobactérias são os principais organismos produtores de biotoxinas em ambientes de água doce, enquanto que em água salgada os corais e as

microalgas têm maior predominância. Dentre estes organismos, as cianobactérias e as microalgas (em especial dinoflagelados) estão usualmente associadas à ocorrência de florações, as quais podem aumentar subitamente a concentração de biotoxinas nas regiões circunvizinhas (Roué; Darius; Chinain, 2018). O fenômeno ocorre em todas as latitudes e, nas últimas décadas, parece estar ocorrendo com maior frequência, duração e distribuição ao longo do globo, de modo que atualmente há uma preocupação mundial relacionada à disseminação de biotoxinas características de certas regiões em locais onde antes não era registrada sua ocorrência (Estevez *et al.*, 2019). Neste contexto, após o surto de doença de Haff relatado no Brasil entre 2016 e 2017, amostras de peixe *in natura* relacionadas foram investigadas tanto pela presença de biotoxinas já regulamentadas no Brasil (saxitoxinas, pertencentes ao grupo PSP), quanto pela presença de biotoxinas de baixa ocorrência ou com ausência de relatos na costa brasileira (brevetoxinas pertencentes ao grupo NSP, CTXs, TTXs e PITXs). Os resultados se apresentaram negativos em todos os casos (Almeida *et al.*, 2019; Bandeira *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2021). Contudo, após a nova ocorrência da doença entre os anos de 2020 e 2021, Cardoso *et al.* (2022) analisaram amostras de peixe Olho-de-boi na forma *in natura* e na forma de sobras de refeição à base de peixe cozido, empregando LC-ESI-MS/MS. Enquanto os resultados se apresentaram negativos nas amostras de peixe *in natura*, íons de transição característicos de um isômero da PITX, a PITX isobárica (iso-PITX), e alguns de seus análogos, tais como OvTX-a, -b e -d, foram detectados nas amostras de refeições à base de peixe cozido (Cardoso *et al.*, 2022). Uma vez que alguns dos sintomas característicos da intoxicação por PITXs ainda são comparáveis aos da doença de Haff, atualmente, este grupo de biotoxinas representa uma importante hipótese etiológica a ser investigada (Campos *et al.*, 2021).

2.2.1 Palitoxina e organismos produtores

A PITX foi primeiramente descrita em 1971, após sua identificação em corais de *Palythoa toxica*, nas ilhas do Havaí, Estados Unidos (Moore; Scheuer, 1971). Atualmente, sabe-se que sua produção também ocorre em outras espécies deste gênero, como *Palythoa helodiscus*, além da suspeita de produção, em menor concentração, por cianobactérias tais como *Trichodesmium* spp. e microalgas (*Ostreopsis siamensis* e *Ostreopsis* cf. *ovata*). (Nascimento *et al.*, 2020; Tibiriçá *et al.*, 2019). A toxina pertence a um grupo de moléculas de alto peso molecular (~2600 Da), e é considerada uma das mais complexas e tóxicas substâncias aquáticas não proteicas (Poli *et al.*, 2018). Estudos envolvendo a tentativa de elucidção de sua estrutura química foram sendo publicados desde então, sendo a mesma

confirmada apenas em 1989 (Armstrong *et al.*, 1989). Sua longa cadeia alifática polietérea ($C_{129}H_{223}N_3O_{54}$, 2680.148 Da, número CAS: 77734-91-9) é termicamente estável e contém regiões lipofílicas e hidrofílicas, com destaque para os grupos funcionais amida (2), amina (1) e hidroxila (42) (Boente-Juncal *et al.*, 2020; Mazzeo *et al.*, 2021). Já a característica estereoquímica da molécula foi comprovada somente alguns anos depois, com a utilização da técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). Contudo, devido à sobreposição de ressonâncias no espectro da PITX, a investigação da estrutura teve de ser realizada com a análise de pequenos produtos oriundos da degradação da toxina original, obtidos por tratamento com ozonólise ou outra reação oxidativa (Ismail; Nahar; Sarker, 2021). Ao final, foi constatado que a molécula apresenta 64 centros quirais, sendo capaz de realizar isomeria cis/trans e apresentando mais de 1021 estereoisômeros (Fernández-Sánchez *et al.*, 2021).

Após a identificação da PITX, um potencial análogo da toxina foi posteriormente identificado em cepas de *O. cf. ovata*, e nomeado de PITX putativa (pPITX). O termo “putativa” foi adicionado devido à complexa estrutura da molécula, o que não permitia com que fosse confirmado se a mesma se tratava de um análogo ou de um isômero da própria PITX. Porém, algum tempo depois foi constatado que ambas possuem a mesma fórmula molecular, mas com diferentes razões massa/carga (m/z) para um dos fragmentos típicos da toxina, o fragmento A (327.1910- $C_{16}H_{27}O_5N_2$ para PITX e 343.1863 - $C_{16}H_{27}O_6N_2$ para pPITX, respectivamente). A pPITX parece possuir um oxigênio a mais no fragmento A e um oxigênio a menos no fragmento B, e possivelmente uma hidroxila a mais em C42 e uma a menos em C17 ou C64. Sendo assim, em 2015, foi estabelecido que a pPITX é de fato um isômero estrutural da PITX, e a mesma foi renomeada para iso-PITX, o isômero de PITX mais descrito na literatura (García-Altarex *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2012).

A toxicidade global da PITX foi investigada em 1974 por Wiles, Vick, Christensen, muito antes de sua estrutura química ser elucidada. Os pesquisadores utilizaram um extrato da toxina obtida de corais de *P. toxica* (com base no conhecimento atual, acredita-se que o extrato continha PITX ou uma mistura de PITX e o análogo 42-OH-PITX) para administração em diferentes vias (intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intratraqueal, intragástrica, intra retal, percutânea e ocular) e em diferentes modelos animais (macacos, cães, coelhos, porquinhos-da-índia, ratos e camundongos) (Wiles; Vick; Christensen, 1974). Apesar de os pesquisadores terem utilizado material semi-purificado e assumido que diferentes lotes de extratos tóxicos resultaram em diferentes escores de letalidade animal, a toxicologia global

investigada pelos mesmos ainda é considerada a mais completa já publicada para PITX e vem sendo considerada até os dias atuais (Gémin *et al.*, 2022). Os sintomas e o tempo de início dos mesmos após a administração do extrato tóxico nos modelos animais variaram de acordo com as diferentes vias de administração, na seguinte ordem: intravenosa > intramuscular > subcutânea > intragástrica. Os valores de dose letal mediana (LD₅₀) obtidos com ratos através dessas vias foram 0,089, 0,24, 0,40 e > 40 µg kg⁻¹, respectivamente. Através da via intravenosa, todas as espécies apresentaram dano histológico (rins, fígado, pulmão, cérebro e sistema digestório). Ademais, a via de administração intragástrica apresentou a potência dos sintomas reduzida em 400 vezes quando comparada à intravenosa (Poli *et al.*, 2018; Wiles; Vick; Christensen, 1974).

Além da determinação da toxicidade global da PITX, seus mecanismos de ação também foram investigados em uma diversidade de estudos *in vitro* e *in vivo*. Sabe-se que a PITX possui uma alta habilidade de interação devido à presença de regiões hidrofílicas e lipofílicas em sua estrutura. Sendo assim, é sugerido que a PITX tenha mais de um sítio de ação em células excitáveis, podendo atuar como agonista de uma família de canais de troca iônica de baixa condutância (Na⁺/K⁺, H⁺ e Ca²⁺). Dentre eles, o principal mecanismo de ação conhecido envolve a ligação extracelular da toxina nas bombas de sódio e potássio. A PITX os mantém abertos, de maneira que se tornam canais catiônicos não seletivos e promovem a perda de potássio celular e o aumento citosólico de sódio (Boente-Juncal *et al.*, 2020). Esta atuação nos canais de troca iônica pode justificar alguns dos achados clínicos evidenciados pela intoxicação de PITX. Além dos sintomas similares aos causados pela doença de Haff, a intoxicação oral por PITX ainda pode gerar, em alguns casos, sintomas gastrointestinais (náusea, sabor metálico ou amargo, vômito, hipersalivação, câimbras abdominais, diarreia severa), bem como espasmos musculares e paralisia muscular progressiva, taquicardia, arrepios, cianose, vertigem, convulsões e dispnéia que pode evoluir para parada respiratória (Férrandez-Sánchez *et al.*, 2021).

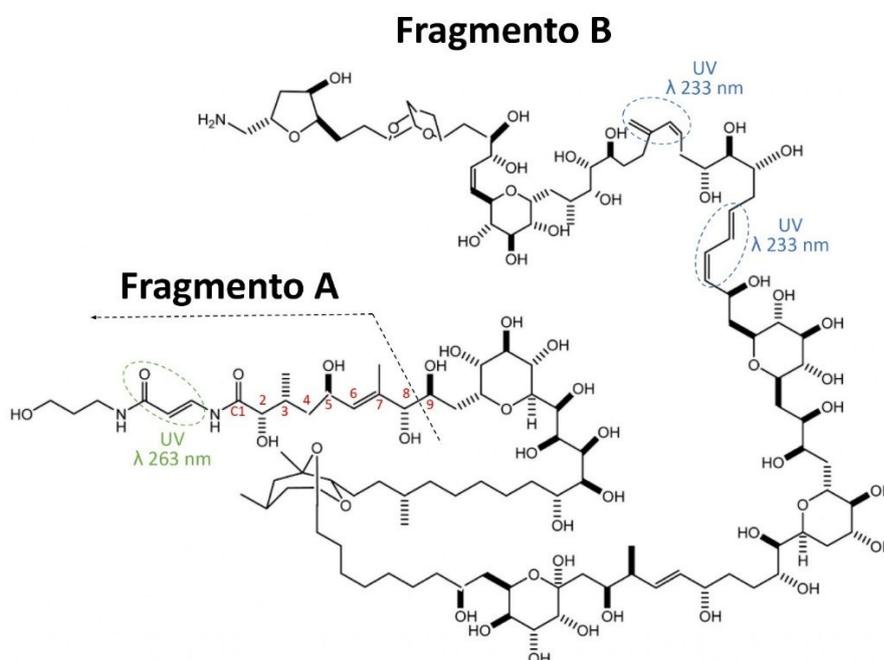
2.2.2 Análogos de palitoxina e organismos produtores

A partir da identificação da PITX, diversos análogos de PITX têm sido relatados na literatura, embora nem todos tenham sua estrutura química já elucidada. Diferentes espécies de corais, microalgas e cianobactérias têm apresentado produção destas biotoxinas. Ademais, bactérias associadas a microalgas (*Pseudomonas* spp., *Brevibacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp.) também já apresentaram atividade

hemolítica, indicando serem potenciais produtoras. Mas tendo em vista a característica qualitativa deste ensaio, e que outras biotoxinas também podem apresentar tal atividade em bactérias, pouco se sabe a respeito das biotoxinas especificamente produzidas pelas mesmas (Dembitsky, 2022). O perfil de biotoxinas identificado nos diferentes continentes depende principalmente dos organismos produtores ali presentes. Contudo, tem sido observado que em alguns casos, este perfil também pode variar de acordo com a região em que determinada cepa está localizada, influenciando, conseqüentemente, em sua toxicidade (Soliño *et al.*, 2020).

De maneira geral, novas biotoxinas são reconhecidas como análogas de PITX ao apresentarem algumas características em comum quando submetidas a ensaios analíticos e toxicológicos (Nascimento *et al.*, 2020; Ternon *et al.*, 2022). Se tratando dos ensaios analíticos, a principal semelhança envolve o padrão geral de fragmentação da molécula obtido em espectrometria de massas (MS), no qual são liberadas duas frações (A e B) devido à quebra entre C8 e C9 da cadeia carbônica (Figura 1). O fragmento A é usualmente o fragmento mais utilizado para identificação das biotoxinas deste grupo e, até o momento, as que já possuem valores de m/z deste fragmento conhecidas são PITX, 42-OH-PITX, OvTX-a, -d, -f, -g e -h e MsTX-a e -b (327), OvTX-b e -c (371), OvTX-e (343) e OsTC-D (313) (Brissard *et al.*, 2015; Lenoir *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2013). Ambas as frações ainda apresentam dois principais cromóforos correspondentes aos fragmentos A e B, cujas absorções ocorrem em 263 e 233 nm, respectivamente, sendo a intensidade da segunda o dobro da primeira (Arteaga-Sogamoso *et al.*, 2022). Os cromóforos estão localizados nas 3 regiões da molécula que possuem duas duplas conjugadas (uma no fragmento A, duas no fragmento B) (Ternon *et al.*, 2022). Já se tratando dos ensaios toxicológicos, a compreensão da toxicidade dos análogos de PITX ainda é limitada. Alguns compostos minoritários não têm sido isolados em concentração suficiente para realização de estudos de toxicidade global e específica. Contudo, os análogos parecem apresentar mecanismo de ação tóxica similares aos da PITX, mas em menor magnitude de efeito (Nascimento *et al.*, 2020).

Figura 1 - Localização dos fragmentos A e B e dos cromóforos das palitoxinas, utilizando a estrutura química planar da palitoxina como exemplo.



Fonte: Adaptado de Arteaga-Sogamoso *et al.* (2022) e Cavion *et al.* (2022).

Um grande número de análogos tem sido identificado em uma variedade de corais do gênero *Palythoa*. Em 1985 foram isolados 4 compostos minoritários de PITX em extratos de *P. tuberculosa* nas ilhas do Oceano Pacífico (Uemura *et al.*, 1985). Os mesmos foram caracterizados como homo-PITX ($C_{130}H_{225}N_3O_{54}$), bishomo-PITX ($C_{131}H_{227}N_3O_{54}$), neo-PITX ($C_{129}H_{221}N_3O_{53}$) e deoxi-PITX ($C_{129}H_{223}N_3O_{53}$), e apresentam pequenas diferenças estruturais quando comparados à PITX. Enquanto a homo-PITX e a bishomo-PITX possuem 1 e 2 grupos metilenos a mais, respectivamente, a neo-PITX apresenta um anel éter adicional derivado da desidratação entre as hidroxilas ligadas ao C2 e C5. Já a deoxi-PITX não possui um grupo funcional hidroxila na posição C73 (Botana; Alfonso, 2015). Em 2009, 2 diastereoisômeros de 42-OH-PITX ($C_{129}H_{223}N_3O_{55}$) também foram isolados e submetidos à elucidação estrutural em RNM (Ciminiello *et al.*, 2009). Os compostos possuem uma hidroxila a mais em C42 quando comparados à PITX, e foram caracterizados como 42S-OH-50S-PITX, proveniente de *P. toxica*, e 42S-OH-50R-PITX, proveniente de *Palythoa tuberculosa* (Botana; Alfonso, 2015; Patocka *et al.*, 2018). Ainda existem achados que indicam a possível produção de 42S-OH-50S-PITX em cianobactérias do gênero *Trichodesmium* spp. Aparentemente, a inversão da configuração em C50 das estruturas de 42-OH-PITX altera a citotoxicidade, sendo a do isômero S-R até 2 ordens de magnitude inferior à do S-S (Ternon *et al.*, 2022). Por fim, em 2022 foi descrita a primeira evidência de produção da 42-OH-PITX por microalgas *P.*

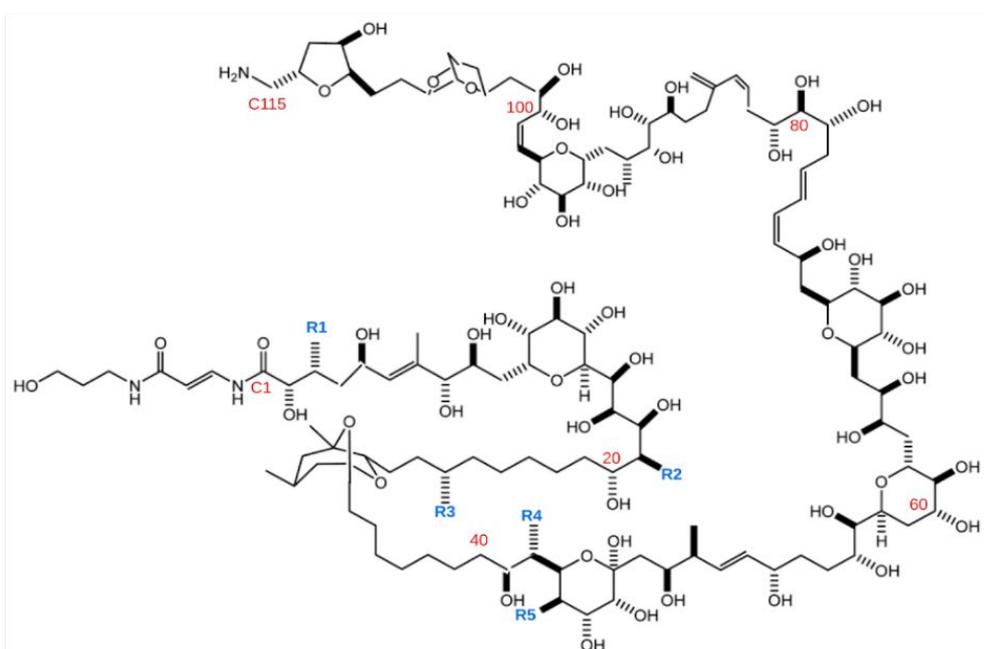
borbonicum. Apesar de a configuração da estrutura não ter sido especificada, a descoberta traz indícios de que este gênero, além de produzir borbotoxinas, também pode produzir PITXs (Arteaga-Sogamoso *et al.*, 2022).

Além destes, as OsTCs foram os primeiros análogos a serem isolados de fontes biogênicas que não os corais de *Palythoa* spp. Em 1995, foi isolada a OsTC majoritária (OsTC-D) ($C_{127}H_{219}N_3O_{53}$) de microalgas pertencentes à espécie *O. siamensis*, providenciando a primeira evidência de que este gênero também produzia biotoxinas do grupo da PITX (Usami *et al.*, 1995). A molécula se diferencia da PITX pela ausência de 2 grupos metil, um em C3e outro em C26, e pela hidroxila adicional em C42. Posteriormente, compostos minoritários de OsTC (< 10% do total de OsTCs) também foram detectados, como a OsTC-A, OsTC-B e OsTC-E1. Em 2018, foi atribuída a fórmula molecular $C_{127}H_{219}N_3O_{54}$ à OsTC-B (Terajima *et al.*, 2018), enquanto que em 2019, atribuíram a mesma fórmula molecular à OsTC-A, indicando que os mesmos devem ser isômeros. Para a OsTC-E1, no mesmo ano, foi atribuída a fórmula molecular $C_{127}H_{217}N_3O_{52}$ (Terajima *et al.*, 2019). Outros compostos nomeados ostreotoxinas (OsTX-1 e -3) também foram reportados na literatura como sendo produzidos por microalgas de *Ostreopsis lenticularis*, mas sua estrutura ainda não foi elucidada, e a diferença percebida até então em seu mecanismo de ação tóxica quando comparada às PITXs, torna sua inclusão neste grupo ainda incerta (Chomérat *et al.*, 2019).

Em 2004, ainda foi descrita a identificação de compostos nomeados como MsTX-a, -b e -c em microalgas de *O. mascarenensis* (Lenoir *et al.*, 2004). Sua presença também foi detectada em diversas cepas de alga de *O. cf. ovata*, mas uma vez que o perfil de biotoxinas produzidos por esta espécie varia entre as regiões, a produção de MsTXs foi relatada até então apenas nas cepas de *O. cf. ovata* isoladas no Golfo de Nápoles (Itália) (Ternon *et al.*, 2022). Alguns anos depois de sua identificação, as fórmulas moleculares $C_{127}H_{222}N_3O_{50}$, $C_{129}H_{222}N_3O_{51}$ e $C_{129}H_{221}N_3O_{51}$ foram atribuídas a MsTX-a, -b e -c, respectivamente (Rossi *et al.*, 2010; Botana; Alfonso, 2015). Além das MsTXs, a *O. cf. ovata* também foi descrita como produtora de outros análogos nomeados OvTX-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, -h, i, j₁, j₂ e -k (Poli *et al.*, 2018). A estrutura química da OvTX-a ($C_{129}H_{223}N_3O_{52}$) se diferencia da PITX por apresentar uma hidroxila adicional em C52 e a ausência de 3 hidroxilas nos grupos C17, C44 e entre C53 e C78. Já a determinação estrutural de outras OvTXs é limitada devido às baixas concentrações encontradas na maioria das amostras analisadas, assim como muitas destas propostas de análogos ainda não são totalmente conclusivas e requerem confirmação em futuros estudos (Nascimento *et al.*, 2020; Ternon *et al.*, 2022; Verma, 2018). Entretanto, já existem algumas

hipóteses estruturais das mesmas baseadas em seu comportamento quando analisadas em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) (Tabela 1) (Terajima *et al.*, 2018; Verma, 2018).

Tabela 1 - Hipóteses estruturais das ovatoxinas ainda não completamente elucidadas em comparação com a estrutura química planar da palitoxina.



Toxina	R1	R2	R3	R4	R5	Outras modificações
PITX	OH	H	OH	OH	OH	-
OvTX-b	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₄ O em C8
OvTX-c	H	OH	OH	OH	H	+ C ₂ H ₄ O em C8 + O no fragmento B
OvTX-d	H	OH	OH	OH	H	+ O no fragmento B
OvTX-e	H	OH	H	OH	H	+ O em C8
OvTX-f	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₄ entre C95 e C102
OvTX-g	H	OH	H	OH	H	+ O em C46
OvTX-h	H	OH	H	H	H	Anel aberto entre C42 e C49
OvTX-i	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₄ O ₂ - 1 insaturação entre C49 e C52 - O entre C53 e C78

OvTX-j ₁	H	OH	OH	OH	H	+ C ₂ H ₂ O ₂ - 1 insaturação entre C49 e C52 - O entre C53 e C78
OvTX-j ₂	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₂ O ₂ - 1 insaturação entre C49 e C52
OvTX-k	H	OH	OH	OH	H	+ C ₂ H ₂ O ₂ - 1 insaturação entre C49 e C52

Fonte: Adaptado de Cavion *et al.* (2022) e Poli *et al.* (2018).

2.3 ANÁLISE DE PALITOXINAS

A análise de PITXs em amostras alimentícias ainda é uma tarefa desafiadora. A ausência da caracterização de suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade em água, hidrofobicidade, coeficiente de partição e grau de ionização, os quais são dependentes do pH, limita a compreensão do comportamento destes analitos durante os processos de extração e análise instrumental, bem como limita a interpretação dos resultados analíticos obtidos e a comparação entre os métodos já desenvolvidos (Ortiz *et al.*, 2022). Ademais, um dos principais desafios atrelados à análise de PITXs se encontra na limitada disponibilidade de padrões analíticos. Por esta razão, alguns pesquisadores tem utilizado o extrato bruto de microalgas como material biológico de referência para realização de análises qualitativas. Mazzeo *et al.* (2021) ainda compilaram alguns estudos que avaliaram a possibilidade de aplicação de um processo de extração e purificação dos análogos de PITX em amostras de microalgas, para o preparo de padrões com concentração conhecida destas biotoxinas, com o intuito de também possibilitar a realização de análises quantitativas. Contudo, até o momento, o conteúdo de microalgas necessário para obter uma quantidade satisfatória destas biotoxinas demonstrou ser extremamente elevado. Em estudos já publicados neste tema foi relatada a necessidade de se utilizar aproximadamente 80 L de cultura de *O. cf. ovata* para obter 700 µg de OvTX-a, ou ainda 45 kg de material proveniente da cultura de *P. tuberculosa* contendo diferentes análogos para obter 4 mg de cada biotoxina. A obtenção de uma concentração satisfatória de análogos minoritários se torna ainda mais difícil. Segundo os autores, não existem evidências experimentais que expliquem se a baixa recuperação ocorre pela sua instabilidade na solução, por adsorção irreversível das mesmas nos materiais utilizados neste processo ou outros fatores. Mas como consequência, até o momento, há disponibilidade comercial apenas de padrão analítico de PITX proveniente de corais de *Palythoa* spp. Deste modo, as determinações qualitativas e quantitativas de seus análogos costumam ser realizadas assumindo que os mesmos se comportam de maneira similar à PITX durante o procedimento analítico, tendo em vista suas semelhanças estruturais (Ciminiello *et al.*, 2011). Deste modo,

em geral, as demais PITX são expressas como equivalentes de PITX (por exemplo, $\mu\text{g Eq PITX kg}^{-1}$)

Além da limitação relacionada ao padrão analítico, cabe destacar que até o momento também não foram estabelecidos limites regulatórios para a realização da análise destas biotoxinas em pescado (Fernández-Sánchez *et al.*, 2021). Porém, de acordo com os relatos existentes até 2009 sobre a toxicidade *in vitro* e *in vivo* de PITX e OsTC-D, o EFSA pôde estabelecer uma ARfD para humanos ($0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal), considerando estas duas biotoxinas. Baseado na ARfD e em um indivíduo pesando 60 kg, pode-se concluir que a quantidade das mesmas em 400 g de pescado não poderia ultrapassar 12 μg , o que corresponde a um limite de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ de tecido muscular, valor que foi sugerido como limite de ingestão provisório até que mais estudos sejam realizados (EFSA, 2009). Sendo assim, espera-se que tanto a técnica analítica quanto o preparo de amostras do método empregado na detecção de PITXs garantam a sensibilidade necessária para trabalhar em uma faixa que inclua este nível de interesse.

2.3.1 Técnicas analíticas

Apesar de os métodos biológicos (bioensaios, imunoenaios, ensaios de hemólise ou com biossensores) terem sido utilizados por muitas décadas na análise de biotoxinas, incluindo as PITXs, sua baixa sensibilidade, seletividade e/ou as preocupações éticas envolvidas no uso de modelos animais, tem incentivado sua substituição por métodos químicos (Carlin *et al.*, 2022; Riobó; Franco, 2011). Neste contexto, o uso da cromatografia líquida com detector de fluorescência (LC-FLD) na análise de PITXs já foi mencionado. Sua utilização é possível devido à presença do grupo amina na região terminal destas biotoxinas, a qual permite a realização de uma derivatização pré-coluna com 6-aminoquinolila-N-hidroxissuccinimidilcarbamato para posterior detecção da molécula por fluorescência, usando os comprimentos de onda de 250 (excitação) e 395 nm (emissão) (Riobó; Paz; Franco, 2006). Contudo, a técnica teve seu uso relatado apenas em amostras de microalgas (*Ostreopsis* spp.), não havendo dados referentes à sua aplicação em amostras de pescado até o momento. Ademais, a utilização da cromatografia líquida com detector ultravioleta (LC-UV) também é possível em virtude da presença dos cromóforos presentes na estrutura das PITXs (absorção em 233 e 263 nm). Mas mesmo já tendo sido aplicada na análise de amostras de caranguejo (Yasumoto *et al.*, 1986), a técnica apresenta uma sensibilidade muito inferior ao LC-FLD e, dentre os métodos químicos, ainda tem sido considerada insuficiente para o uso em amostras

alimentícias (Ciminiello *et al.*, 2011). Sendo assim, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) tem demonstrado ser uma alternativa mais vantajosa. As principais vantagens incluem sua maior seletividade, uma vez que diferente dos métodos espectrofotométricos mencionados, as informações de massa molecular e padrões de fragmentação específicos fornecidos em MS pode permitir a distinção entre diferentes moléculas pertencentes ao grupo das PITXs, bem como sua elevada sensibilidade, em especial quando analisadores em *tandem* (MS/MS) são empregados (EFSA, 2009).

2.3.1.1 Cromatografia líquida

Em sistemas de cromatografia líquida (LC), a fase móvel (também denominada eluente) é impulsionada por uma bomba de alta pressão em direção à coluna. Em paralelo, a amostra é introduzida por meio de uma válvula (válvula de injeção) e arrastada na mesma direção e sentido. A coluna possui partículas sólidas em meio fixo (fase estacionária), e permite com que a fase móvel transporte a amostra uniformemente através dela (Suzuki; Uchida; Watanabe, 2017). Uma vez que cada analito interage de uma forma diferente com as fases estacionária e móvel, é possível então realizar sua separação (Braga, 2018). Além do sistema convencional de LC, também é possível utilizar a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), cuja diferença consiste basicamente na pressão operacional exercida durante a corrida cromatográfica. O tempo de corrida, por sua vez, costuma ser inferior em sistemas de HPLC, assim como a mesma necessita de colunas feitas com partículas adsorventes menores, o que aumenta seu poder de resolução (Nahar; Onder; Sarker, 2020). Por fim, após a separação dos analitos na coluna, o detector localizado ao final transformará o sinal obtido pelos analitos em função do tempo em um gráfico com uma série de picos (cromatograma). As posições dos picos no eixo do tempo (tempo de retenção do analito) podem ser consideradas para identificar os componentes da amostra, enquanto as áreas dos picos provêm uma medida quantitativa de cada um dos analitos.

Em métodos clássicos de cromatografia (fase normal), a fase estacionária é constituída por uma fase polar, enquanto a fase móvel é composta por solventes orgânicos mais apolares. Contudo, para a separação das PITXs, usualmente tem sido empregada a cromatografia de fase reversa, onde a polaridade da fase móvel é maior que a da fase estacionária. Sendo assim, tem sido frequentemente citada a utilização de colunas C18, enquanto as fases móveis geralmente são compostas por água (H₂O) e acetonitrila (ACN), com a presença de um ou mais aditivos, tais como ácido fórmico, formiato de amônio, iodeto

de lítio e acetato de cálcio (Ciminiello *et al.*, 2012; Klijnstra; Gerssen, 2018; Selwood *et al.*, 2012, Suzuki *et al.*, 2013).

2.3.1.2 *Espectrometria de massas*

A instrumentação presente em MS é composta por três módulos: uma fonte de ionização, um analisador de massas, e um detector. Diversas técnicas de ionização, analisadores de massa e modos de varredura para posterior detecção estão disponíveis. A escolha das combinações mais adequadas depende da aplicação (Pimenta, 2021). Contudo, de maneira geral, os analitos separados anteriormente na coluna do cromatógrafo são transferidos para a fonte de ionização através da sonda (probe). Nela, ocorre a ionização dos analitos bem como a evaporação do solvente que provém da fase móvel. A ionização pode formar moléculas protonadas $[M+H]^+$, desprotonadas $[M-H]^-$, gerar perdas de moléculas de água $[M+H-(H_2O)_n]^+$ ou ainda, havendo a presença de outros elementos eletricamente carregados na amostra e aditivos na fase móvel, promover a formação de outros adutos contendo cátions ou ânions. Em seguida, no analisador de massas, é realizada a separação dos íons gerados segundo sua m/z . Alguns analisadores, como o MS/MS ainda fragmentam os analitos ionizados (íons precursores), gerando íons produto. Neste caso, o tamanho e as propriedades de ligação de cada íon formado no primeiro módulo podem induzir diferentes caminhos de fragmentação das moléculas devido às suas interações específicas com grupos funcionais que proporcionam rearranjos estruturais. Esta variação auxilia na diferenciação e identificação dos compostos analisados (Segalin, 2015).

O analisador de massas do tipo MS/MS é um dos mais conhecidos atualmente, o que se deve principalmente ao custo relativamente baixo e facilidade de operação. Este módulo consiste basicamente em quadrupolos em série (quadrupolo linear), cada qual com uma função distinta: o primeiro analisador quadrupolo (Q1) realiza a varredura das moléculas ionizadas (íons precursores) presentes; a célula de colisão (q2) introduz um gás de colisão (comumente Ar ou He) no caminho percorrido pelos mesmos, gerando fragmentos (íons produto); e o segundo analisador quadrupolo (Q3) realiza uma nova varredura, que inclui os íons produto gerados em q2. Ademais, diversos modos de varredura estão disponíveis no sistema que acompanha o instrumento. Dentre eles, o *multiple reaction monitoring* (MRM) tem sido muito empregado. O MRM permite que Q1 selecione o íon precursor desejado, e após a fragmentação em q2, a seleção de fragmentos mais intensos e seletivos. Sendo assim, uma relação de íons precursor e produto podem ser criados, o que aumenta a especificidade e o limite de detecção (LD) do método analítico empregado quando comparado a utilização do

modo *full scan*, uma vez que o tempo de detecção é direcionado para íons específicos (Braga, 2018). Por fim, os íons selecionados a partir da varredura realizada são transportados para o último módulo, o detector (Segalin, 2015).

No detector, o feixe dos íons é convertido em sinais elétricos que podem ser amplificados e traduzidos digitalmente em um espectro de massas, que além de apresentar dados de m/z dos íons precursor e produto, calcula a abundância relativa de cada espécie iônica detectada. Deste modo, o espectro de massas fornecido por MS permite determinar a composição isotópica e molecular do analito, através da determinação direta de sua massa nominal, bem como diferenciar moléculas com variação elementar muito discreta através dos dados obtidos pelos fragmentos ionizados (Segalin, 2015).

Apesar da ampla utilização de sistemas de baixa resolução, recentemente, também tem havido muito interesse na utilização de equipamentos de LC-HRMS, como os que contêm o analisador do tipo *time-of-flight* (TOF). Neste tipo de sistema, os íons formados na fonte de ionização são extraídos e acelerados em alta velocidade por um campo elétrico em um tubo longo (*drift tube*), após o qual atingem o detector. O princípio de operação do TOF baseia-se na medida do “tempo de voo” dos íons dentro *drift tube* (Araújo, 2022). Se as partículas apresentarem a mesma carga, a energia cinética será idêntica, e suas velocidades dependerão unicamente da massa. Sendo assim, quanto mais leve o íon, mais cedo ele chega ao detector. Durante o caminho percorrido até o detector, há agrupamento dos íons segundo sua velocidade. Uma vez que as dimensões do tubo e a energia cinética dos íons são bem conhecidas, o cálculo da m/z e da abundância de íons se torna possível (Luz, 2019).

Analisadores do tipo TOF podem analisar uma faixa de massa extremamente elevada (teoricamente ilimitada), fornecer espectros de massa rapidamente e com uma acurácia mássica superior (geralmente 4 casas decimais) quando comparada ao MS/MS, permitindo a identificação de ligeiras variações mássicas entre as moléculas (Turella, 2021). Ademais, quando é empregada a técnica híbrida de LC contendo tanto o MS/MS quanto o TOF (LC-qTOF-MS), a elevada especificidade do MS/MS, viabilizada através da fragmentação dos íons precursores, se une à elevada resolução e a alta velocidade de varredura proveniente do TOF, apresentando um melhor desempenho quando comparado ao uso isolado dos instrumentos (Luz, 2019; Bustillos, 2022). Desta forma, o LC-qTOF-MS tem contribuído expressivamente com a confirmação da presença de biotoxinas na amostra após identificação de suas transições em instrumentos de baixa resolução, além de viabilizar análises quantitativas ou semi-

quantitativas e contribuir com a elucidação estrutural de novos análogos (Terajima et al., 2018).

2.3.1.2.1 Fonte de ionização

Dentre as diferentes técnicas de ionização utilizadas em MS, a ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI) são algumas das mais empregadas. Enquanto a APCI fica restrita a moléculas de baixa massa molecular e polaridade, o ESI se enquadra muito bem na ionização de compostos de polaridade média a alta, e cuja massa molecular é mais elevada (> 1.000 Da), se tornando mais aplicável às PITXs. Neste contexto, o uso combinado dos modos positivo e negativo por ESI demonstrou ter um ótimo potencial na caracterização de análogos da PITX (Klijnstra; Gerssen, 2018; Terajima *et al.*, 2018, 2019; Uchida; Taira; Yasumoto, 2013). Os diferentes modos providenciaram informações importantes para a elucidação de suas estruturas planares. Enquanto os espectros de íons negativos viabilizam a interpretação dos fragmentos produzidos por clivagem entre carbonos, os grupos amino terminais tornam a formação de íons negativos desfavorável no segmento direito da molécula, de forma que o modo positivo se torne complementar. Neste modo, os políenos conjugados gerados pela perda de água sequencial possibilitam a elucidação teórica das posições das hidroxilas (Uchida; Taira; Yasumoto, 2013). Contudo, quando o propósito não é contribuir com a elucidação estrutural, mas realizar apenas a detecção de PITXs, o modo positivo, de maneira isolada, costuma ser empregado (Brissard *et al.*, 2015; Ciminiello *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2013).

O ESI em modo positivo tem demonstrado ser uma técnica rápida e sensível para a análise de PITXs em matrizes contendo estas toxinas. Sua capacidade em produzir moléculas multiplamente carregadas em condições brandas, permite com que haja detecção de compostos de elevada massa molecular, até mesmo em sistemas de MS com faixa de massas limitados (Ciminiello *et al.*, 2011). Por outro lado, sabe-se que mesmo poucas alterações estruturais em compostos de elevada massa molecular como as PITXs podem impactar a eficiência de sua ionização pelo equipamento. Ademais, a mistura complexa das espécies formadas, as quais incluem estados de diferentes cargas (+1, +2 e +3) provenientes de diferentes espécies iônicas (H^+ , NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+}) e sucessivas perdas de moléculas de água, resultam em ambiguidades na identificação dos analitos, mesmo com a utilização do padrão analítico disponível. Visando contornar este desafio, Ciminiello *et al.* (2012)

avaliaram a influência do uso de diferentes aditivos na fase móvel sobre o espectro de massas obtido para as PITXs. Dentre os aditivos utilizados, o acetato de cálcio demonstrou a possibilidade de evidenciar o pico associado ao íon precursor contendo aduto de cálcio $[M+H+Ca]^{3+}$ (m/z 906) ao mesmo tempo que a intensidade dos demais íons é reduzida, o que pode auxiliar na interpretação do espectro de massas e demonstra ser um aditivo promissor na obtenção de um íon marcador da presença de PITXs na amostra. Contudo, o método desenvolvido pelos autores ainda não resultou em uma sensibilidade satisfatória ($44 \mu\text{g kg}^{-1}$). Até o momento, os únicos métodos para a análise de PITXs intactas com sensibilidade suficiente para aplicação em amostras de pescado empregando LC-ESI-MS/MS, foram publicados por Suzuki *et al.* (2013) e por Klijnstra e Gerssen (2018) (LOQs de 3.5 e $8 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente).

2.3.1.2.2 Parâmetros otimizáveis

É importante destacar que em uma instrumentação de MS, é possível otimizar dois principais grupos de parâmetros, a saber: parâmetros dependentes do analito, tais como como *collision energy* (CE), *declustering potential* (DP), *entrance potential* (EP) e *collision cell exit potential* (CXP); e parâmetros da fonte de ionização, tais como *curtain gas* (CUR), gás de colisão (CAD), *ion source gas 1* (GS1), *ion source gas 2* (GS2), *ion spray voltage* (IS) e temperatura (TEM). As condições definidas para estes parâmetros influenciam diretamente na capacidade de ionização e fragmentação dos analitos, bem como permite obter a máxima sensibilidade instrumental possível para a sua detecção. Sendo assim, quando os melhores parâmetros instrumentais para a execução de um método analítico ainda não foram definidos, o processo de otimização pode ser empregado. Para tal, deve ser primeiramente realizada a injeção do analito, seja em coluna (quando não se tem padrão analítico disponível, sendo, portanto, utilizado um extrato da amostra contendo os analitos), ou diretamente em MS (quando há padrão analítico disponível, técnica conhecida como *flow injection analysis* – FIA). Em seguida, identifica-se um ou dois picos mais abundantes do analito em MS e cuja intensidade se enquadra na faixa exigida pelo software de aquisição de dados do instrumento, sendo possível, por fim, prosseguir com uma otimização semi-automática (Magalhães, 2021).

2.3.2 Preparo de amostras

Apesar dos poucos estudos desenvolvidos com o intuito de extrair PITXs em amostras de pescado, a recomendação de uma etapa inicial de extração sólido-líquido com metanol (MeOH) (Suzuki *et al.*, 2013) ou uma mistura de MeOH e H₂O (Ciminiello *et al.*, 2015;

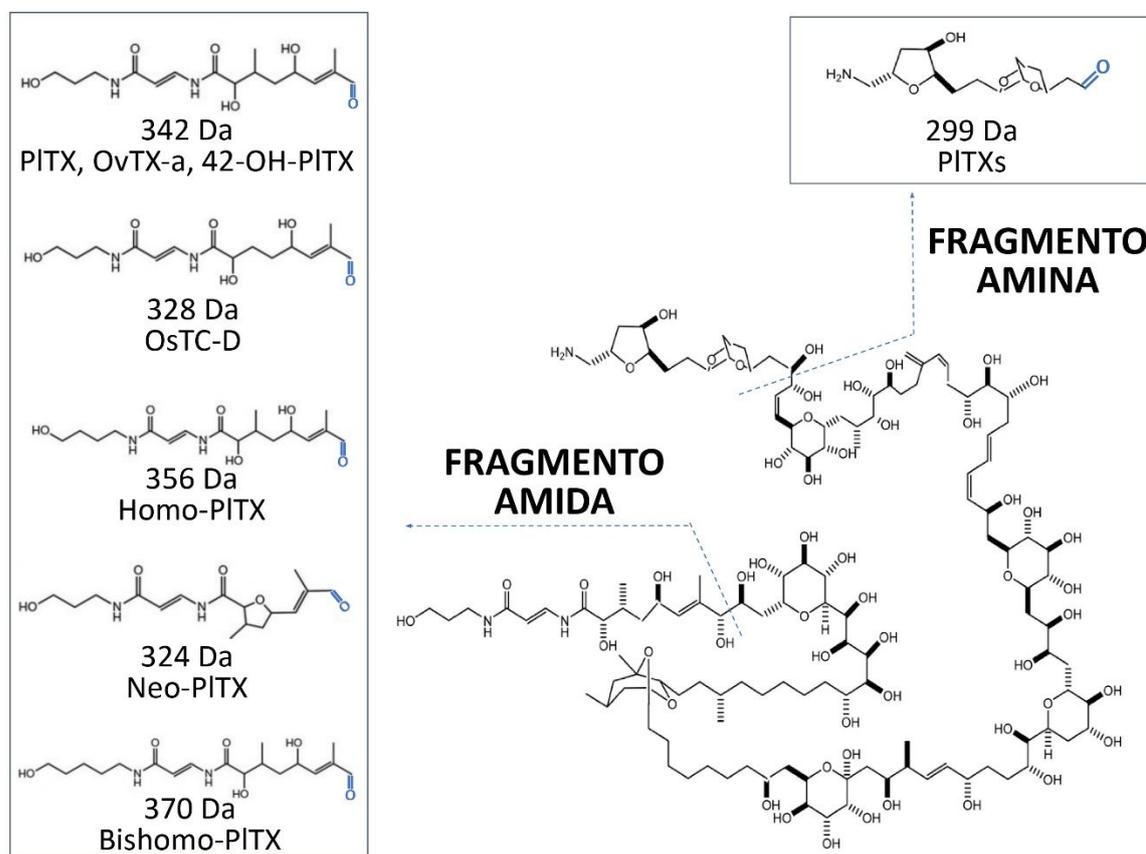
Klijnstra; Gerssen, 2018; Selwood *et al.*, 2012) tem sido predominante. De maneira geral, a mistura de solventes orgânico e aquoso parece permitir uma melhor extração dos analitos na amostra em virtude da natureza anfifílica das PITXs (Ciminiello *et al.*, 2015). Ademais, outros solventes orgânicos de maior polaridade já foram testados (etanol, isopropanol), mas o MeOH parece sempre proporcionar uma maior resposta analítica (área do pico de PITX no cromatograma) (Mazzeo *et al.*, 2021).

Após a extração sólido-líquido, a maioria dos autores prossegue com uma etapa de extração em fase sólida (SPE) (Selwood *et al.*, 2012; Ciminiello *et al.*, 2015; Klijnstra; Gerssen, 2018). Na técnica de SPE, a amostra é primeiramente transferida a uma coluna que contém um material adsorvente ao qual os analitos ficam retidos. Em seguida, ocorrem sucessivas etapas de lavagem, onde outros componentes indesejados são removidos, bem como uma etapa final de eluição, na qual os analitos são liberados do material e transferidos a um recipiente, por meio da aplicação de um solvente ou solução adequado. Como resultado, a técnica promove a limpeza da amostra, bem como pode promover um elevado fator de concentração a depender do volume de solvente empregado na eluição, se tornando extremamente vantajosa na extração de compostos traço como as PITXs (Avellar, 2020). Apesar disso, Ciminiello *et al.* (2015) relataram a necessidade de empregar volumes de até 36 mL para a eluição de PITXs intactas (havendo variações de acordo com a concentração de PITX presente na amostra), o que exigiu a inclusão de uma etapa de concentração do eluato ao final. De maneira geral, processos de concentração como a secagem não são recomendados em amostras contendo PITXs, tendo em vista que esta etapa parece diminuir consideravelmente o sinal dos analitos na análise instrumental. Estudos comparativos avaliando o efeito da secagem do extrato tanto em fluxo de nitrogênio quanto em concentrador a vácuo indicaram que ambos promovem perdas semelhantes e consideráveis de PITX (Mazzeo *et al.*, 2021). Portanto, é desejável que na etapa de SPE, seja possível coletar todo o analito retido em um pequeno volume de solvente, visando não provocar sua diluição e a necessidade de uma etapa de concentração.

Além do elevado volume de solvente requerido na etapa de eluição de PITXs intactas segundo os métodos já publicados, o extrato final obtido também parece ser extremamente instável, sendo recomendável que a sua injeção para análise ocorra imediatamente após o preparo da amostra (Ciminiello *et al.*, 2015). Aliando estes fatores limitantes à complexidade envolvendo a análise instrumental de PITXs intactas devido a diversidade de espécies iônicas formadas, o método analítico descrito por Selwood *et al.* (2012), que propõe a análise de

produtos de oxidação específicos da PITX tem surgido como uma alternativa promissora. O preparo de amostras do método envolve uma extração sólido-líquido seguida de SPE, como recomendado em boa parte dos estudos. Contudo, na etapa de SPE foi incluída uma reação de oxidação das PITXs com ácido periódico, o que viabilizou a eluição dos analitos em apenas 3mL de solução e descartou a necessidade de secagem da amostra. A oxidação de dióis vicinais com ácido periódico resulta na clivagem das ligações carbono-carbono que, no caso das PITXs, origina dois principais aldeídos nitrogenados que correspondem às extremidades inicial e terminal da molécula (fragmentos amida e amina, respectivamente) (Figura 2). Até o momento, todas as PITXs com estrutura já elucidada compartilham do mesmo grupamento amina, enquanto o fragmento amida de boa parte delas possui ligeiras variações estruturais, permitindo distingui-las. Estes produtos de oxidação fornecem um sinal consideravelmente mais alto em LC-ESI-MS/MS quando comparado a maioria dos métodos envolvendo a análise de PITXs intactas, assim com o extrato final é mais estável. O LQ também é um dos mais baixos já descritos para aplicação em matrizes alimentícias como o pescado ($10 \mu\text{g PITX L}^{-1}$), sendo este um dos únicos métodos que permitem trabalhar na faixa de concentração que inclui o limite de ingestão provisório estabelecido pelo EFSA (Ciminiello *et al.*, 2011, 2015).

Figura 2 - Estrutura química planar da palitoxina indicando as clivagens resultantes da reação com ácido periódico e os principais produtos de oxidação obtidos para a palitoxina e seus análogos segundo suas variações estruturais.



Fonte: adaptado de Cavion *et al.* (2022) e Selwood *et al.* (2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLVENTES, REAGENTES E PADRÃO ANALÍTICO

Todos os solventes e reagentes utilizados são de grau cromatográfico ou analítico. A ACN e o MeOH foram adquiridos da JT Baker Chemical Co (Phillipsburg, EUA). O ácido fórmico e o ácido acético foram obtidos da Tedia Co. (Fairfield, EUA) e da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). O ácido (orto)periódico foi fornecido pela Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, Brasil). A água de grau ultrapuro (resistividade mínima de 18,3 MΩ cm) foi produzida a partir do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

O padrão analítico de PITX foi adquirido da Wako Chemicals (Neuss, Alemanha). O padrão não é certificado e contém alguns contaminantes minoritários. Estudos preliminares publicados por Tartaglione *et al.* (2016) relataram a presença de 42-OH-PITX (5%) e de outros

contaminantes (12%), além da própria PITX (83%). A solução estoque de PITX foi preparada com 100 µg de padrão de PITX diluído em MeOH/H₂O (1:1, v/v) para obter uma concentração final de 1000 µg de PITX L⁻¹, a qual foi mantida congelada (- 28 °C) até o uso.

3.2 PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo de amostras foi realizado de acordo com o método previamente desenvolvido por Selwood *et al.* (2012), com algumas modificações, as quais são discriminadas no *tópico* 3.3 referente à otimização do método. Sendo assim, as amostras de pescado foram lavadas com água corrente e, em seguida, foi retirado o tecido muscular para sua homogeneização em processador de alimentos. Uma alíquota de $2,0 \pm 0,1$ g foi pesada em tubos de polipropileno de 50 mL, e 15 mL de solução extratora (MeOH/H₂O, 1:1, v/v) foram adicionados a cada tubo. As amostras foram homogeneizadas em ultra-turrax (modelo T18 basic, IKA, Staufen, Alemanha) a 15000 rpm por 1 min e depois centrifugadas (4500 rpm, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi transferido para um tubo de propileno limpo de 15 mL, que foi filtrado através de filtros de membrana de fibra de vidro de 0,45 µm (modelo GF/PET 45/25, Chromafil Xtra, Macherey-Nagel, Alemanha). Ao final, foi obtido o extrato a ser submetido ao procedimento de SPE, sendo utilizados cartuchos Strata-X de 500 mg/6 mL (Phenomenex, Califórnia, EUA).

O procedimento de SPE foi realizado a partir das seguintes etapas: pré-condicionamento (3mL de MeOH seguido de 3 mL de H₂O); carregamento de amostra; primeira lavagem (2 mL de MeOH/H₂O, 2:3, v/v); oxidação das PITXs (2 mL de ácido periódico, 50 mM); e segunda lavagem (4,5 mL de H₂O). Finalmente, os produtos de oxidação das PITXs foram eluídos com 3 mL de MeOH/H₂O (65:35, v/v) contendo 0,1% de ácido acético. Um fluxo contínuo de aproximadamente 2 gotas por segundo foi mantido durante o procedimento. O eluato foi transferido para frascos de vidro para injeção em LC-ESI-MS/MS.

3.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Todos os desenhos experimentais foram conduzidos com uma amostra branca de peixe de água doce (tambaqui) fortificada com 30 µg de PITX L⁻¹. A amostra foi armazenada em freezer (< -18 °C) até o momento da análise. Antes de qualquer procedimento de otimização, decidiu-se incluir no preparo de amostras uma etapa de filtração após a centrifugação. A decisão foi tomada pois de acordo com os testes previamente realizados, as amostras de peixe menos gordurosas, como o tambaqui e outras fortemente relacionados ao desencadeamento da doença de Haff, geram uma presença considerável de sólidos dispersos na fração sobrenadante, o que afetaria o desempenho da SPE. A velocidade de homogeneização no ultra-turrax também foi reduzida de

19000 para 15000 rpm, a fim de evitar perda de amostra no processo, tendo em vista que após a otimização do método, foi definida a utilização de um maior volume de solução extratora.

No que diz respeito à otimização do método, as condições analíticas que mais influenciam na extração de PITX foram previamente definidas através de um planejamento experimental de triagem (delineamento fatorial fracionário com 3 pontos centrais) que totalizou 19 experimentos. As condições avaliadas foram: a) o volume total (mL) da solução extratora b) a proporção (%) de MeOH da solução extratora; c) A proporção (%) de H₂O da primeira lavagem por SPE; d) o volume total (mL) de H₂O da segunda lavagem por SPE; e) o volume de ácido periódico (mL) empregado na oxidação por SPE; e f) a proporção (%) de MeOH na etapa de eluição por SPE. Diferenças significativas entre as extrações em termos de área do pico cromatográfico (cps min⁻¹) foram avaliadas pelo gráfico de Pareto de efeitos padronizados com intervalo de confiança de 95%. Os resultados obtidos foram analisados, com especial atenção em relação à PITX-amida, pois para a PITX-amina, a menor sensibilidade instrumental e, conseqüentemente, a maior dispersão dos dados gerou resultados menos conclusivos. As variáveis que demonstraram influência significativa foram selecionadas para serem submetidas a um delineamento composto central rotacional (DCCR) a fim de otimizar o método de extração de PITXs.

O DCCR incluiu três réplicas do ponto central e seis pontos axiais ($a=\sqrt{2}$), além dos níveis “baixo” (-) e “alto” (+) das variáveis selecionadas, que estão resumidos na Tabela 2. No total, foram avaliadas 17 combinações das condições de extração. O ponto central foi definido de acordo com os resultados obtidos no experimento de triagem. A variável resposta foi definida como sendo a área do pico cromatográfico (cps min⁻¹). Os modelos de extração foram avaliados através da ANOVA ($p < 0,05$), e o modelo matemático foi avaliado em termos de significância de regressão, significância de falta de ajuste e coeficiente de regressão, a fim de confirmar sua adequação ao propósito. Desta forma, a melhor condição de extração considerando tanto o fragmento amida quanto o fragmento amina da PITX foi definida pela função “desejabilidade” de Derringer e Suich (Derringer; Suich, 1980). A conveniência geral da extração foi combinada após estabelecer a conveniência individual dos fragmentos. Ao final, a eficiência do método otimizado foi comparada com o método previamente desenvolvido por Selwood *et al.* (2012) em termos de área do pico cromatográfico (cps min⁻¹) através da ANOVA ($p < 0,05$), utilizando amostra branca fortificada em 30 µg kg⁻¹. Toda a análise de dados e a modelagem matemática foram realizadas utilizando o software Statistica v. 13 (Statsoft, Tulsa, EUA). Adicionalmente, o pH das soluções testadas foi medido (pHmetro modelo 913, Metrohm, Herisau, Suíça), assim como foi realizada

uma previsão *in silico* de propriedades físico-químicas da PITX-amida e PITX-amina (software plugin de calculadora ChemAxon v. 1.6, Budapeste, Hungria), com o objetivo de explicar alguns dos resultados obtidos na otimização do método.

Tabela 2 - Desenho experimental elaborado para a otimização da extração de palitoxinas empregando amostras de peixe de água doce (tambaqui).

Amostra	Vol. solução extratora (mL)	Vol. H ₂ O 2ª lavagem SPE (mL)	% MeOH eluição SPE
01	7,5	2	30
02	7,5	2	70
03	7,5	4	30
04	7,5	4	70
05	12,5	2	30
06	12,5	2	70
07	12,5	4	30
08	12,5	4	70
09 (A)	5,8	3	50
10 (A)	14,2	3	50
11 (A)	10	1,3	50
12 (A)	10	4,7	50
13 (A)	10	3	16,4 ^a
14 (A)	10	3	83,6 ^b
15 (C)	10	3	50
16 (C)	10	3	50
17 (C)	10	3	50

A: ponto axial; C: ponto central. ^aajustado para 16 mL; ^bajustado para 84 mL.

Fonte: elaborado pela autora.

3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Um processo de validação intralaboratorial foi realizado com o intuito de verificar o desempenho do método otimizado. O procedimento foi realizado de acordo com o Regulamento de Execução 2021/808/EC, com algumas adaptações (EC, 2018). A complexidade e as limitações ainda enfrentadas na análise das PITXs resultam em um método que diferente dos convencionalmente utilizados na determinação de resíduos de antibióticos ou pesticidas em

amostras alimentícias, ainda não pode aderir estritamente às normativas de validação internacionais.

Assim, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade (incluindo efeito de matriz), precisão (em termos de repetibilidade e reprodutibilidade interna), razão iônica, estabilidade, LD, LQ, limite de decisão para confirmação ($CC\alpha$) e incerteza de medição. A recuperação não foi avaliada devido à ausência de padrão analítico dos produtos de oxidação da PITX e de dados relacionados a eficiência da reação da PITX com o ácido periódico. Para contornar esta limitação, as curvas de calibração foram todas preparadas em matriz (*matrix-matched*), sem a necessidade de correção dos resultados utilizando fatores de recuperação ou outros ajustes. O padrão analítico de PITX ainda possui disponibilidade limitada e um custo elevado, assim como a complexidade da sua estrutura dificulta a identificação de um bom candidato para utilização como padrão interno. Deste modo, o método ainda não inclui o uso de padrão interno. Por fim, a robustez será avaliada quando o método for implementado na rotina laboratorial e um número mais adequado de amostras brancas estiver disponível.

A linearidade foi avaliada pela reprodutibilidade de curvas analíticas preparadas em matriz (amostra branca de peixe de água doce tambatinga) com 0, 10, 15, 30, 45 e 60 $\mu\text{g PITX L}^{-1}$. O critério de aceitação é o coeficiente de determinação médio ($R^2 \geq 0,95$). A seletividade foi verificada através da análise de 16 amostras brancas variadas (peixes de água doce e salgada, crustáceos e moluscos bivalves) (Tabela 3), que foram mantidas em freezer (< -18 °C) até o momento da análise. Os cromatogramas resultantes foram avaliados quanto à presença de picos interferentes na janela de tempo de retenção dos fragmentos de oxidação da PITX.

Tabela 3 – Resumo das amostras utilizadas na avaliação da seletividade do método otimizado para extração de palitoxinas.

Nº	Natureza da amostra	Espécie	Nome popular
1	Peixe	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	Pescada-Amazonica
2	Peixe	<i>Mugil liza</i>	Tainha
3	Peixe	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia
4	Peixe	<i>Thunnus atlanticus</i>	Atum-negro
5	Peixe	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia
6	Peixe	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia
7	Peixe	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia
8	Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta-arco-íris
9	Crustáceo	<i>Panulirus laevicauda</i>	Lagosta
10	Crustáceo	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Camarão
11	Crustáceo	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Camarão
12	Crustáceo	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Camarão
13	Molusco bivalve	<i>Perna perna</i>	Mexilhão
14	Molusco bivalve	<i>Perna perna</i>	Mexilhão
15	Molusco bivalve	<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra
16	Molusco bivalve	<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra

Fonte: elaborado pela autora.

O efeito da matriz (fator de matriz) foi calculado através da razão entre a área dos picos em extrato de matriz branca fortificada (peixe tambatinga, concentração no ponto central da curva de calibração, 30 µg PITX L⁻¹) e a área dos picos em solvente, de acordo com a Equação 1, onde: TS: *tissue standard*. O coeficiente de variação (CV) não deve ultrapassar 20%.

$$FM(\%) = \frac{\text{média das áreas do TS}}{\text{médias das áreas do solvente}}$$

(1)

A precisão em termos de repetibilidade foi avaliada por análise intra-dia utilizando 3 níveis de concentração pertencentes à região central da curva de calibração (15, 30 e 45 µg PITX L⁻¹). Assim, o experimento incluiu a extração de 6 amostras brancas fortificadas (peixe tambatinga) nas concentrações especificadas, além de uma curva de calibração. A avaliação da

precisão foi baseada na concordância entre medições sucessivas realizadas nas mesmas condições. O CV máximo aceitável para esta faixa de trabalho é estabelecido em 20%. A precisão em termos de reprodutibilidade interna foi avaliada considerando as mesmas 6 amostras brancas fortificadas nas concentrações especificadas e uma curva de calibração, levando em consideração a concordância entre os resultados de medições sucessivas nas mesmas condições, mas variando em termos de dias ($n = 3$) e analistas ($n = 2$) envolvidos. O limite de CV para esta faixa de trabalho é estipulado em 30%.

A razão iônica para a PITX-amida foi medida a partir do teste de precisão. Primeiramente, foi calculada a razão entre o íon qualificador ($m/z 343 > 76$) e o íon quantificador ($m/z 343 > 123$) na curva analítica preparada em matriz. Em seguida, também foi calculada a razão iônica obtida em um dos lotes de validação, sendo calculada a diferença (%) entre ambos. O desvio padrão relativo (DPR) não deve exceder $\pm 40\%$. Não foi possível avaliar este parâmetro para PITX-amina uma vez que a mesma possui apenas uma transição.

A estabilidade dos produtos de oxidação da PITX no extrato final do teste de precisão foi avaliada em triplicata durante 7 dias (4-8 °C). O teste consistiu em comparar a diferença (CV, %) entre as áreas dos picos do primeiro dia (amostras brancas de peixe tambatinga fortificadas com 30 μg de PITX L^{-1}) ao longo dos demais dias avaliados. O CV não deve exceder 15%. O LD foi definido como a metade da concentração mínima capaz de ser calibrada. O LQ foi definido como o ponto inferior da curva de calibração. O $\text{CC}\alpha$ também foi avaliado levando em consideração o nível de interesse (30 μg PITX L^{-1}). Essa concentração mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondeu ao $\text{CC}\alpha$ ($\alpha = 5\%$). A incerteza foi estimada por simples extrapolação do valor $\text{CC}\alpha$ de forma bicaudal. O critério de aceitabilidade para a incerteza (%) deve ser inferior a 30%.

3.5 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA EMPREGADA

A detecção de PITXs foi obtida por LC-MS/MS com ESI em modo positivo. A cromatografia foi realizada em um equipamento de modelo ExionLC™ (Sciex, Foster City, EUA). A separação cromatográfica foi obtida por fase reversa utilizando uma coluna *Symmetry* C18 de 3,5 μm e dimensões de 2,1 x 150 mm (Waters, Milford, MA, EUA). A coluna foi mantida a 35 °C. O volume de injeção foi de 10 μL , enquanto o fluxo de fase móvel foi mantido em 250 $\mu\text{L min}^{-1}$. A fase móvel foi composta pelo solvente A (H_2O com 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (ACN com 0,1% de ácido fórmico). A eluição foi realizada em modo gradiente, da seguinte maneira: 100% A (0 - 0,5 min); rampa linear decrescente até 40% A (0,5 - 5 min); e 0% A (5,1 - 6 min). Um tempo de equilíbrio de 4 min (0% A) foi aplicado entre as corridas.

A análise em MS foi realizada em um instrumento híbrido triplo quadrupolo-*linear ion trap* do modelo Qtrap 5500 (Sciex, Foster City, EUA). Os parâmetros da fonte de ionização foram definidos da seguinte forma: IS 5500 V; CUR 20 psi; GS1 50 psi; GS2 50 psi; CAD alto; e TEM 650 °C. Além dos íons da própria PITX, para os quais existe um padrão analítico, também foram monitorados os íons dos análogos de PITX propostos por Selwood *et al.* (2012). Fragmentos adicionais dos análogos foram incluídos após predição *in silico* pelo software Sciex OS (Foster City, EUA). A Tabela 4 apresenta os parâmetros dependentes do analito definidos, incluindo DP, EP, CE e CXP, assim como os íons de palitoxinas (carga +1) a serem monitorados pelo método.

Tabela 4 - Parâmetros de LC-ESI-MS/MS otimizados para a análise de palitoxinas em amostras alimentícias (peixes de água doce e salgada, crustáceos e moluscos bivalves).

Composto	Produto de oxidação	Íon precursor [M-H] ⁺ (m/z, Da)	Íon produto [M-H] ⁺ (m/z, Da)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	Tr (min)
PITX e análogos	Amina	300,2	107	176	10	59	8	3,55
PITX, 42-OH-PITX, OvTX-a	Amida	343,2	76	41	10	17	12	4,41
			123	46	10	31	16	
OsTC-D	Amida	329,2	76	35	10	25	13	ND
			109	35	10	25	13	ND
Homo-PITX	Amida	357,2	90	35	10	25	13	ND
			123	30	10	25	13	ND
			250,3	30	10	25	13	ND
Bishomo-PITX	Amida	371,2	104	100	10	45	13	ND
			123	100	10	45	13	ND
Neo-PITX	Amida	325,2	76	30	10	22	13	ND
			268	30	10	22	13	ND
			123	30	10	22	13	ND
			307	30	10	22	13	ND

DP: *declustering potential*; EP: *entrance potential*; CE: *collision energy*; CXP: *cell exit potential*; Tr: tempo de retenção; ND: não determinado devido a ausência de padrão analítico dos análogos. Sendo assim, a sua presença é assumida quando os valores de m/z das transições monitoradas são identificados, além de obter um tempo de retenção similar ao conhecido para os fragmentos da PITX.

Os parâmetros dependentes do analito para a PITX foram definidos por otimização semiautomática gerada pelo sistema após a infusão dos produtos de oxidação de PITX (200 µg de PITX L⁻¹ com 5 mM de ácido periódico) por FIA. A PITX-amida foi o fragmento que apresentou intensidade suficiente para ser utilizada como base para esta otimização. Posteriormente, procedeu-se à otimização dos parâmetros da fonte de ionização. Ademais, parâmetros dependentes do analito específicos também foram definidos para alguns dos análogos de PITX mesmo sem disponibilidade de padrão analítico, uma vez que um extrato contendo um *pool* de amostras de algas (*Ostreopsis* spp.) que produzem algumas dessas toxinas foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luiz Laureno Mafrá Júnior (UFPR). Sendo assim, a otimização dos análogos de PITX foi executada por injeção em coluna com o *pool* mencionado, também adicionado de ácido periódico. Todas as transições desejadas foram monitoradas usando o modo de análise em MRM. O software Analyst 1.6.2 (Sciex, Foster City, EUA) foi utilizado para aquisição e processamento de dados.

3.6 AMOSTRAS DE PESCADO ASSOCIADAS À DOENÇA DE HAFF

Visando investigar a possível correlação entre os episódios da doença de Haff no Brasil e as PITXs, 16 amostras de alimentos diretamente associadas ao desencadeamento da doença (amostras de pescado *in natura* e sobra de refeições à base de pescado) foram analisadas através do método otimizado e validado. As amostras foram coletadas a partir dos episódios ocorridos em 2022 por equipes treinadas associadas ao Ministério da Saúde, como a Vigilância Sanitária, e recebidas na Seção Laboratorial Avançada de Santa Catarina (SLAV/SC) vinculada ao MAPA, com a qual foi firmada uma parceria para a execução do projeto. As amostras foram mantidas congeladas (-28 °C) até a análise em LC-ESI-MS/MS. Para a quantificação, as áreas de pico do analito foram integradas e as concentrações das amostras foram calculadas a partir de curvas de calibração preparada em matriz produzidas usando amostras brancas de tambaqui fortificadas com o padrão de PITX.

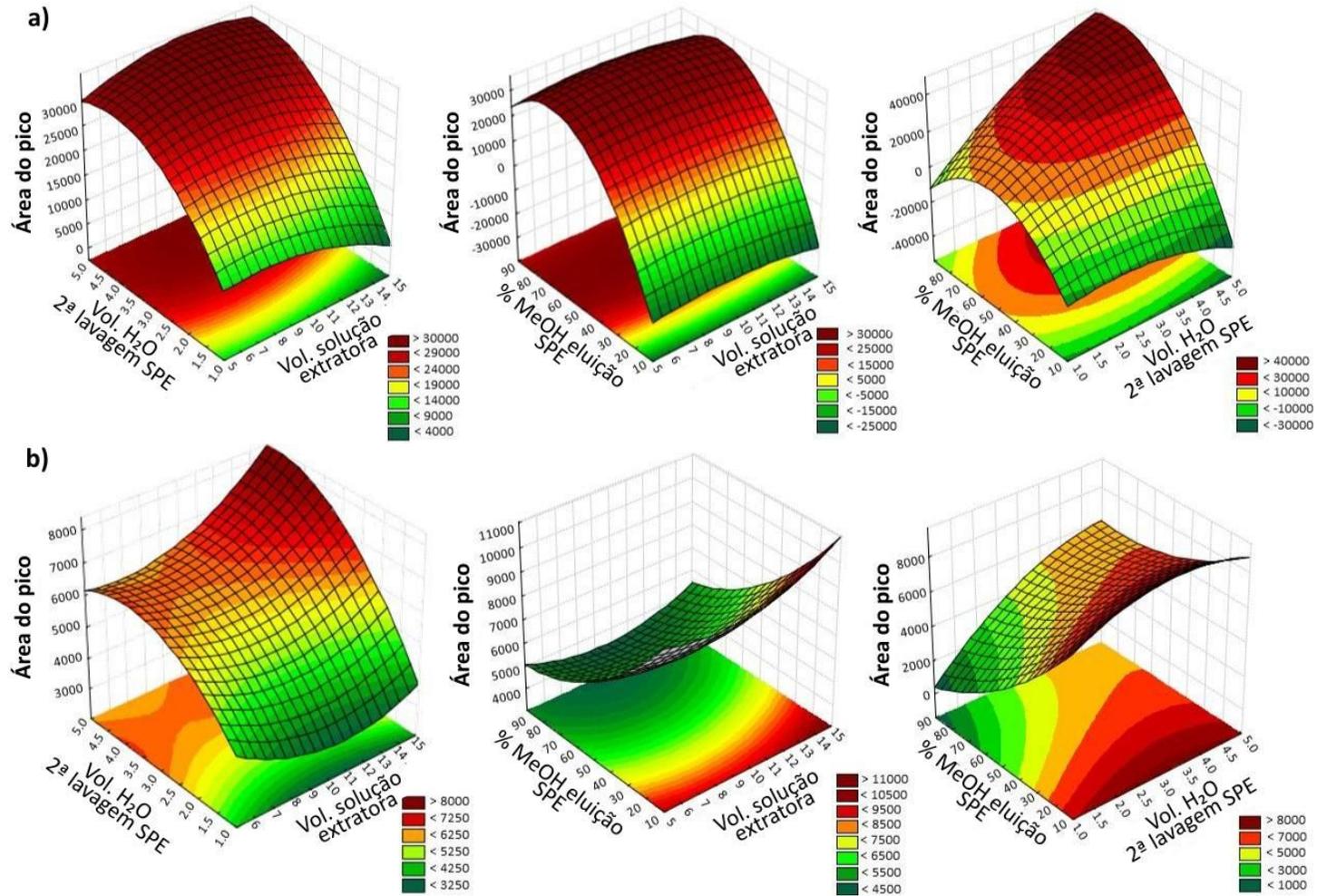
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

As superfícies de resposta obtidas no processo de otimização do método de extração de PITXs são apresentadas na Figura 3. A análise de regressão (regressão significativa) demonstrou que o modelo matemático utilizado para a otimização do método descreveu adequadamente a influência das três variáveis testadas na extração de PITXs (volume de solução extratora, volume de H₂O na 2ª lavagem por SPE e porcentagem de MeOH na eluição por SPE). Foi obtido um

coeficiente de regressão de 0,72 e 0,73 para PITX-amina e PITX-amida, respectivamente, indicando que pelo menos 72% da variabilidade resposta pode ser explicada pelo modelo proposto. Para a variável resposta avaliada (área do pico), não houve falta de ajuste (significância de 95%). Ademais, a superfície de resposta da PITX-amida apresentou valores próximos do ótimo para o modelo (formato de cela) (Figura 3a), o que foi considerado satisfatório mesmo que para a PITX-amina o mesmo não tenha sido obtido (Figura 3b). Isso se justifica pelo fato de a PITX-amina gerar menor sensibilidade instrumental e conseqüentemente maior dispersão de dados. Assim, os resultados obtidos são menos conclusivos.

Figura 3 - Superfícies de resposta geradas pelas variáveis de extração testadas para a) PITX-amida e b) PITX-amina.



Fonte: elaborado pela autora.

Em relação à influência individual das variáveis testadas na resposta dos fragmentos oxidados de PITX, foi possível observar que para ambos os fragmentos (amida e amina), o volume de solução extratora e o volume de água aplicado na segunda etapa de lavagem por SPE influenciaram positivamente, sendo a influência da última variável mais expressiva (Figura 3). Maiores volumes de lavagem tendem a aumentar a eliminação de compostos indesejáveis (ácido periódico residual, interferentes de matriz) sem comprometer a recuperação dos analitos durante a etapa de eluição, o que pode ter impactado diretamente na ionização em MS e, conseqüentemente, justificar a maior resposta obtida para os analitos (Nadal *et al.*, 2022). Ademais, para a PITX-amina, foi observada uma relação inversamente proporcional entre a porcentagem de MeOH empregada na eluição por SPE e a resposta analítica (Figura 3b), enquanto para a PITX-amida a relação foi diretamente proporcional (Figura 3a). Embora ainda não existam dados experimentais a respeito das propriedades físico-químicas dos fragmentos oxidados de PITX, a predição *in silico* realizada demonstrou que a PITX-amina deve ser mais solúvel em água (LogD: -4,27) que a PITX-amida (LogD: -1,99) na condição de pH das soluções de eluição testadas (~3,5). Desta forma, a recuperação da PITX-amina durante a etapa de eluição é favorecida quando se utiliza maiores proporções de H₂O na solução. As demais propriedades físico-químicas obtidas por predição *in silico* são apresentadas nos Apêndices A e B.

Além das influências individuais das condições testadas, a função de desejabilidade de Derringer permitiu combinar todos os modelos gerados, a fim de fornecer a condição de máxima extração para ambos os fragmentos oxidados de PITX (conveniência geral). A função de desejabilidade foi obtida em uma escala de 0 a 1, sendo 1 a condição considerada ideal para todos os modelos. Para os modelos gerados, foi obtido um valor de 0,88. O volume ótimo de solução extratora foi apontado como sendo 14,2 mL, enquanto que para o volume total de H₂O e a porcentagem de MeOH empregados na etapa de SPE os valores foram 4,7 mL e 66,8%, respectivamente. Para fins práticos, os valores foram ajustados para 15 mL, 4,5 mL e 65%. Desta forma, o método analítico empregando esta condição de extração apresentou 88% da desejabilidade para a extração das PITXs. O protocolo otimizado aumentou significativamente ($p < 0,05$) a área dos picos dos analitos (aproximadamente 20%) quando comparado ao protocolo previamente desenvolvido por Selwood *et al.* (2012).

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Os principais resultados obtidos no procedimento de validação do método são apresentados na Tabela 5. Para linearidade, o modelo de regressão quadrática apresentou o

melhor ajuste tanto para a PITX-amida quanto para a PITX-amina. Como o R^2 foi maior que 0,95 para todos os analitos, a faixa linear testada (10-60 $\mu\text{g PITX kg}^{-1}$) demonstrou ser aceitável e foi adotada como faixa de trabalho.

Tabela 5 - Performance do método otimizado para a análise de palitoxinas avaliada com amostras brancas de peixe tambatinga.

Parâmetro	Critério de aceitabilidade ^a	Resultados	
		PITX-amida	PITX-amina
Linearidade	$R^2 \geq 0,95$	0,9965	0,9699
Seletividade	-	Ausência de picos interferentes na janela de eluição dos analitos	
Efeito de matriz	CV < 20%	88% (CV > 20%)	168% (CV > 20%)
Repetibilidade ^b	CV < 20%	1,9%	8,7%
Reprodutibilidade intralaboratorial ^b	CV < 30%	16,2%	26,8%
Razão iônica ^c	DPR < $\pm 40\%$	2,91%	-
Estabilidade (7 dias, 4-8°C)	CV < 15%	4,6%	12,7%
LD	-	5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
LQ	-	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
CC α	-	37,98 $\mu\text{g kg}^{-1}$	43,42 $\mu\text{g kg}^{-1}$
U ^c	U < 30%	26,6%	44,8%

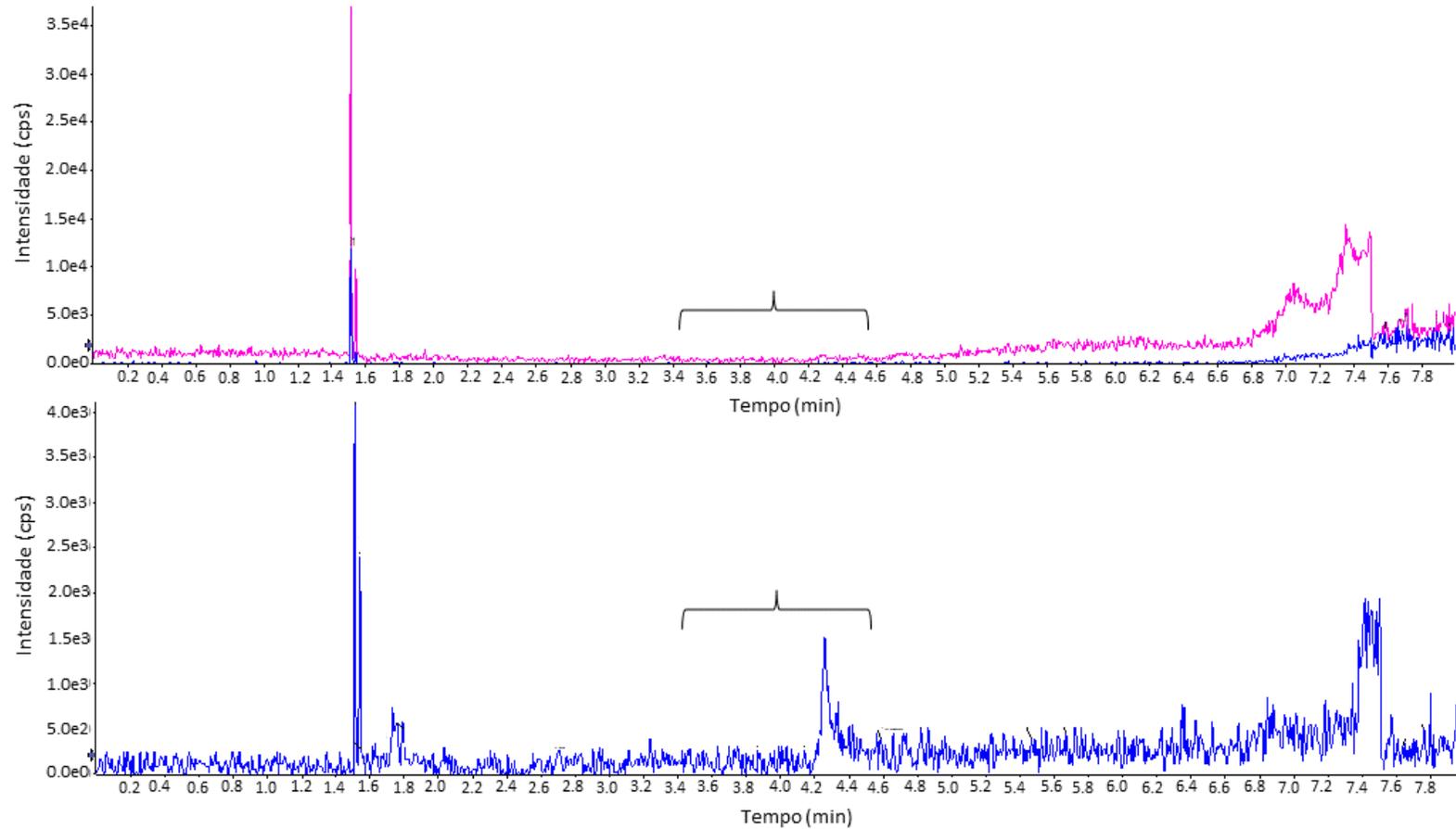
^a De acordo com a diretriz europeia 2021/808/EC (EC, 2018); ^b Dados obtidos com amostras fortificadas com 30 $\mu\text{g PITX L}^{-1}$; ^c Parâmetro aceito apenas para a PITX-amida; CV: coeficiente de variação; DPR: desvio padrão relativo; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CC α : limite decisório para confirmação; U: incerteza.

Fonte: elaborado pela autora.

Considerando as amostras brancas analisadas neste estudo, não houve picos interferentes que pudessem resultar em coeluição na mesma janela de tempo de retenção dos produtos de oxidação das PITXs. Os cromatogramas obtidos com amostra branca de peixe tambatinga são apresentados como exemplo na Figura 4. Em geral, as amostras brancas apresentaram um cromatograma com pouco ruído e sem presença de interferentes. Assim, concluiu-se que o método apresenta seletividade suficiente para todas as matrizes incluídas no seu escopo (peixes de água doce e salgada, crustáceos e moluscos bivalves). Entretanto, foi observado um efeito de matriz expressivo para ambos os fragmentos oxidados de PITX, com supressão iônica observada para PITX-amida (-12%) e incremento iônico para PITX-amina (+68%). Sendo assim, a utilização de curvas de calibração preparadas em matriz se torna compulsória em todos os lotes analisados, visando evitar erros sistemáticos nas análises de rotina. A curva preparada em matriz envolve amostras brancas fortificadas em concentrações crescentes de analito. Este procedimento produz uma curva de calibração que replica as condições da amostra e contempla os processos que envolvem o seu preparo. Sendo assim, se torna adequada na compensação do efeito de matriz, além de ser eliminada a necessidade de fatores de recuperação e outros ajustes como já

mencionado, uma vez que as variações inerentes à matriz já foram consideradas na construção da curva (Molognoni *et al.*, 2019).

Figura 4 - *Extracted ion chromatogram* obtido para a) PITX-amida e b) PITX-amina na avaliação da seletividade do método empregando amostra branca de peixe tambatinga, indicando a janela de tempo de retenção dos fragmentos.

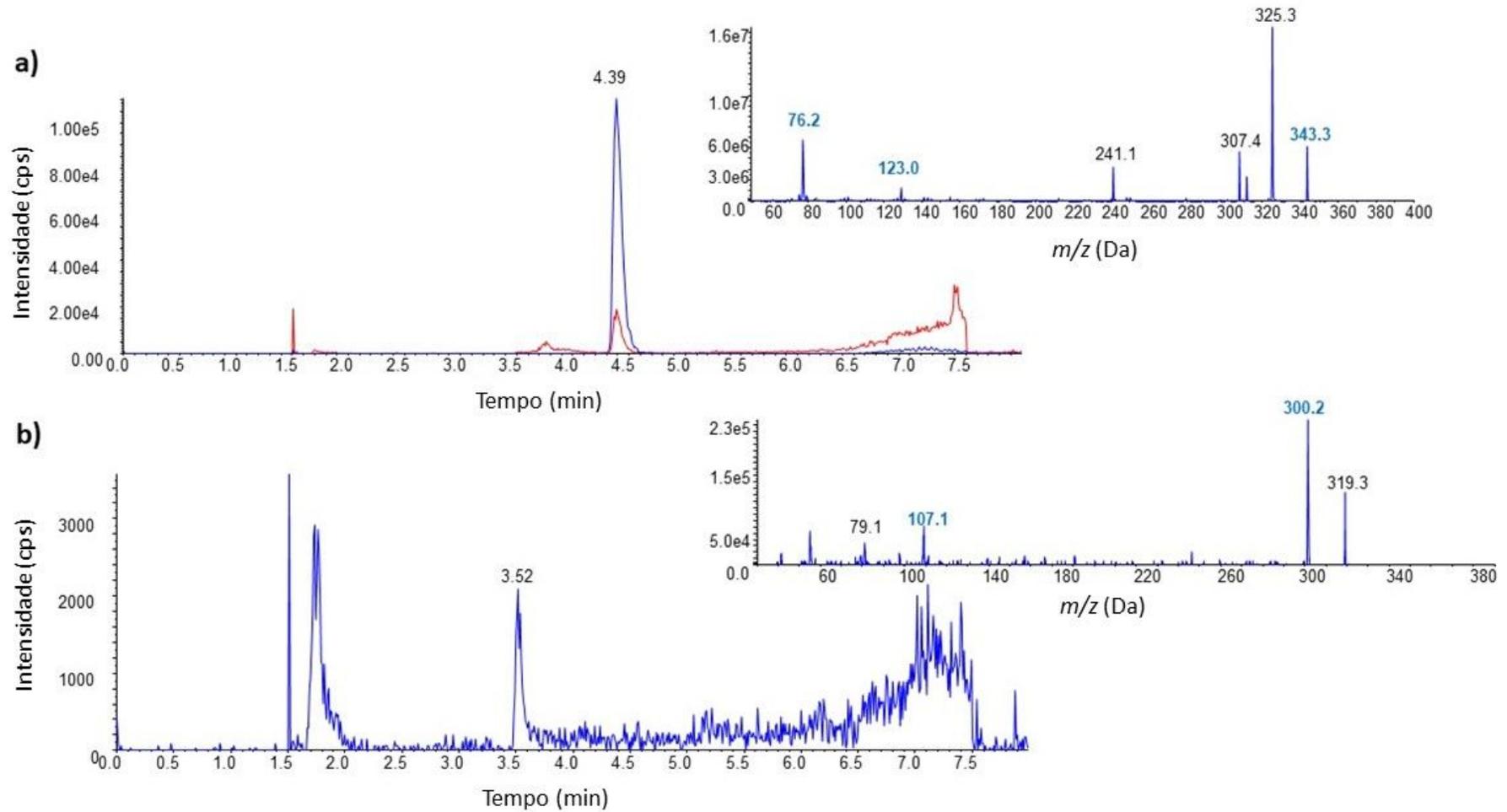


Fonte: elaborado pela autora.

As medidas de precisão foram satisfatórias, com CVs < 20% para repetibilidade e < 30% para reprodutibilidade interna. A razão iônica para PITX-amida também foi considerada adequada para o propósito, com DPR de 2,91%. Em relação à estabilidade do extrato final, estudos realizados por Ciminiello *et al.* (2015) revelaram que extratos contendo PITXs intactas sofrem uma redução dramática na resposta instrumental após 48h. Assim, os autores sugerem que as amostras sejam analisadas diretamente após o preparo. Já se tratando dos produtos de oxidação das PITXs, Selwood *et al.* (2012) não realizaram um teste de estabilidade, mas de acordo com os resultados obtidos no presente projeto, o extrato final apresentou uma estabilidade satisfatória (CV < 15%) para fragmentos de PITX durante os 7 dias avaliados, quando armazenados em temperaturas de refrigeração. Desta forma, a maior estabilidade observada para os produtos de oxidação das PITXs torna o método mais exequível para a rotina laboratorial quando comparado ao das PITXs intactas. Uma vez obtidas amostras reais contaminadas com PITX, estudos mais aprofundados sobre a estabilidade do extrato após o tratamento com ácido periódico poderão ser conduzidos.

Se tratando dos limites de detecção e quantificação do método, os valores obtidos no processo de validação vão ao encontro dos publicados por Selwood *et al.* (2012) (5 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Até o momento, este LQ é um dos mais baixos já relatados para a análise de PITXs em amostras de pescado empregando LC-ESI-MS/MS, sendo comparável apenas com os métodos propostos por Klijnstra e Gerssen (2018) e Suzuki *et al.* (2013), os quais empregam análise para PITXs intactas. Deste modo, o método garante a sensibilidade analítica necessária para o seu emprego na rotina laboratorial. Os padrões de separação e fragmentação da PITX-amina e PITX-amida obtidos com amostra branca fortificada, são apresentados na Figura 5. Além dos limites de detecção e quantificação, o $CC\alpha$ também foi definido, uma vez que este parâmetro expressa a dispersão do procedimento analítico levando em consideração a incerteza de medição na concentração decisória, ou seja, no nível de interesse (limite provisório definido pelo EFSA, 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Os valores de $CC\alpha$ foram estabelecidos como 38 e 43 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para PITX- amida e -amina, respectivamente. Assim, o resultado das análises será considerado não conforme quando a concentração de PITXs quantificada nas amostras se apresentar igual ou superior ao $CC\alpha$.

Figura 5 - Cromatogramas e respectivos espectros de massa obtidos por *enhanced product ion scan* para a) PITX-amida e b) PITX-amina empregando amostra branca de peixe tambatinga fortificada com $45 \mu\text{g PITX kg}^{-1}$. Os íons monitorados estão destacados em azul.



Fonte: elaborado pela autora.

Quanto ao parâmetro incerteza, apenas a PITX-amida satisfaz os critérios de aceitabilidade (incerteza < 30%), enquanto que uma maior amplitude foi observada na incerteza de medição para a PITX-amina. Sendo assim, a quantificação de PITXs pode ser realizada através do fragmento amida, enquanto o fragmento amina deve ser avaliado apenas de maneira semi-quantitativa. Quando o fragmento amida característico da PITX for detectado, os resultados da quantificação podem ser expressos em μg de PITX kg^{-1} , apesar de ainda não ser possível discriminar quais das três biotoxinas que compartilham o mesmo fragmento amida (PITX, 42-OH-PITX e OvTX-a) estarão envolvidos na amostra contaminada. Já para os demais análogos de PITX com produtos de oxidação monitorados (OsTC-D, homo-, bishomo e neo-PITX), para os quais não há disponibilidade comercial de padrão analítico, sua presença nas amostras é assumida quando as transições m/z monitoradas coincidem, e quando se obtém um tempo de retenção semelhante ao da própria PITX, em virtude de suas semelhanças estruturais. Nestes casos, os resultados podem ser expressos em μg Eq PITX kg^{-1} .

Devido a escassez de dados relacionados à toxicidade dos análogos de PITX, ainda não se tornou claro se o método analítico empregado na análise de amostras de pescado associadas à episódios de intoxicação humana deve discriminar individualmente as PITXs presentes, ou se a quantificação conjunta é suficiente (Ciminiello *et al.*, 2015). Caso futuros estudos experimentais evidenciem variações consideráveis de toxicidade entre as PITXs, poderá se tornar necessário aprimorar a seletividade do método, principalmente em relação à PITX, 42-OH-PITX e OvTX-a. De maneira geral, as principais diferenças estruturais entre a PITX e seus análogos ocorrem na parte intermediária da molécula, as quais não são monitoradas no método atual (Selwood *et al.*, 2012). A formação de fragmentos de PITX nesta região a partir da reação com ácido periódico já foram citados por Moore, Woolard e Bartolini (1980) durante a tentativa de elucidação da PITX, décadas antes de um método analítico para extração de PITXs com esta reação ter sido desenvolvido. Contudo, Selwood *et al.* (2012) aponta que os mesmos não são detectados em LC-MS devido ao seu baixo peso molecular, elevada polaridade e condições de ionização desfavoráveis devido à ausência de grupos contendo nitrogênio. Desta forma, experimentos realizados com o intuito de proporcionar a formação de fragmentos de sinal satisfatório nesta região poderiam ser uma estratégia interessante para superar a limitação quanto a seletividade do método.

4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PESCADO ASSOCIADAS À DOENÇA DE HAFF

O resumo das amostras de pescado associadas ao desencadeamento da doença de Haff analisadas a partir do método otimizado e validado é apresentado na Tabela 6. O fragmento amina característico das PITXs foi detectado em 15 das 16 amostras, o que representa uma forte indicação de que amostras de alimentos relacionadas à doença de Haff podem de fato estar contaminadas com estas biotoxinas aquáticas. Contudo, não é possível especificar o análogo ou grupo de análogos envolvidos, uma vez que não foi detectado nenhum dos fragmentos amida monitorados.

Tabela 6 - Resumo das amostras de pescado associadas à doença de Haff analisadas através do método otimizado e validado.

Nº	Natureza da amostra	Espécie	Habitat	Nome popular
Alta relevância ^a				
1	Peixe	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Água doce	Pacu
2	Peixe	<i>Colossoma macropomum</i>	Água doce	Tambaqui
3	Peixe	<i>Scomber colias</i>	Água salgada	Cavalinha
4	Peixe	<i>Seriola spp.</i>	Água salgada	Arabaiana
5	Sobra à base de peixe	<i>Seriola spp</i>	Água salgada	Arabaiana
6	Sobra à base de pescado	NI	Água salgada	NI
7	Sobra à base de peixe, camarão e caranguejo	<i>Seriola spp.</i> ^d	Água salgada	Olho-de-boi ^d
Média relevância ^b				
8	Peixe	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Água doce	Pacu
9	Peixe	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Água doce	Pacu
10	Peixe	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Água doce	Pacu
11	Peixe	<i>Colossoma macropomum</i>	Água doce	Tambaqui
12 ^c	Peixe	<i>Colossoma macropomum</i>	Água doce	Tambaqui
13	Peixe	<i>Salminus maxillosus</i>	Água doce	Dourado
14	Peixe	NI	NI	NI
15	Sobra à base de pescado	NI	Água salgada	NI
16	Sobra à base de molusco	<i>Perna perna</i>	Água salgada	Mexilhão

NI: não informado; ^a peixe ou sobra de refeição diretamente envolvida no episódio da doença; ^b peixe que é idêntico ao envolvido no episódio da doença e foi adquirido no mesmo local ou em data próxima ou no mesmo local/lote que o peixe diretamente envolvido; ^c Amostra sem detecção de PITX-amina; ^d Especificações quanto à espécie e nome popular do camarão e caranguejo presentes na amostra não foram informados.

Fonte: elaborado pela autora.

A ausência do fragmento amida nas amostras poderia ser explicada pela possibilidade de o pescado metabolizar as PITXs acumuladas em seus tecidos. Neste caso, os metabólitos de PITXs formados poderiam conter o fragmento amina sem a ocorrência concomitante do fragmento amida. A ação do metabolismo animal sobre a estrutura química original de biotoxinas aquáticas, tais

como AZAs, já foi relatado (Dhanji-Rapkova *et al.*, 2019). Ademais, Aligizaki *et al.* (2011) já sugeriu a possibilidade de formação de diferentes derivados de PITXs devido a processos de biotransformação das mesmas quando acumuladas no pescado, o que pode impedir sua detecção, uma vez que os métodos analíticos atualmente são desenvolvidos unicamente considerando moléculas de PITXs não metabolizadas provenientes de corais ou microalgas produtoras. Certamente, a futura aplicação de abordagens metabolômicas poderá auxiliar na investigação de possíveis produtos de biotransformação presentes no tecido do pescado.

Além da possibilidade de metabolização das PITXs, a supressão do sinal observada para o fragmento amida durante a validação do método também pode ter sido suficiente para impedir sua detecção, enquanto o fragmento amina foi detectado. Ademais, vários outros análogos de PITX descritos na literatura (deoxi-PITX, OsTC-A e -E1, MsTX-a, -b e -c, OvTX-b, -c, -d, -e, -f, -g, -h, -i, -j1, -j2 e -k) (Botana; Alfonso, 2015; Poli *et al.*, 2018; Rossi *et al.*, 2010; Terajima *et al.*, 2018) ainda não possuem sua estrutura elucidada e/ou não possuem fragmentos de oxidação conhecidos, não sendo monitorados no presente método. Isso inclui boa parte dos íons característicos de PITXs previamente identificados por Cardoso *et al.* (2022) em amostras de peixe associadas à doença de Haff no Brasil (OvTX-b e -d, iso-PITX). Sendo assim, algum destes análogos não monitorados podem estar presente nas amostras, de modo que o fragmento amina (fragmento comum às PITXs) tenha sido detectado sem, contudo, haver detecção do fragmento amida específico da biotoxina envolvida. Deste modo, estudos de elucidação estrutural e do conhecimento a respeito dos produtos de oxidação que podem ser obtidos para os demais análogos de PITX ainda não monitorados devem ser estimulados, uma vez que poderão viabilizar sua futura incorporação no método.

Até o momento, com os resultados obtidos, não é possível assumir que as PITXs de fato estão envolvidas no desencadeamento da doença de Haff. O futuro emprego de sistemas de alta resolução, tais como o LC-qTOF/MS, se torna necessário para a realização de uma análise confirmatória. As amostras de pescado analisadas também foram enviadas à equipe de pesquisadores liderada pelo Professor Dr. Andrew Selwood, em *Cawthron Institute* (Nelson, Nova Zelândia), tendo em vista a sua vasta experiência no emprego de LC-MS/MS e na análise de palitoxinas. Ademais, futuras colaborações com a Professora Dra. Carmela Dell'Aversano, da *Università degli Studi di Napoli Federico II* (Napoli, Italia), responsável por inúmeras das pesquisas voltadas ao desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de palitoxinas intactas em pescado e identificação/elucidção estrutural de novos análogos, está sendo firmada. Por outro lado, além da possível relação entre PITX e a ocorrência da doença de Haff, cabe destacar que as PITXs são biotoxinas emergentes, e alguns organismos conhecidos por produzirem

essas toxinas (*P. borbonicum* e *O. cf. ovata*) já foram relatados no litoral brasileiro (Borsato *et al.*, 2023; Nascimento *et al.*, 2020; Tibiriçá *et al.*, 2019). Um estudo realizado com extratos da alga *O. cf. ovata* isolados em diferentes regiões ao longo da costa tropical e subtropical do país (Rio de Janeiro, Paraná e Bahia) apresentou uma elevada concentração de OvTX-a e -b (63 e 32%, respectivamente), enquanto as OvTX-c, -d, -e eram compostos minoritários (Arteaga-Sogamoso *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2020; Tibiriçá *et al.*, 2019). Da mesma forma, a iso-PITX também já foi identificada (Nascimento *et al.*, 2012). Considerando, portanto, que seu monitoramento poderá ser necessário no futuro em virtude da crescente ocorrência e distribuição de biotoxinas no ambiente aquático, o presente método otimizado e validado pretende ser implementado no laboratório oficial da SLAV/SC, de modo que este se torna um laboratório pioneiro em se tratando da análise de PITXs no país.

5 CONCLUSÃO

O resultado obtido com a otimização do método para a análise de produtos de oxidação de PITX foi satisfatório e resultou em um aumento de sinal de aproximadamente 20% para os analitos. Ademais, mesmo com as limitações ainda existentes para a validação de métodos envolvendo a análise de PITXs, o processo de validação executado no presente projeto é um dos mais completos já publicados. O método demonstrou ser apropriado para análises quantitativas em amostras de pescado (peixes de água doce e salgada, crustáceos e moluscos bivalves) e apresentou elevada sensibilidade (LQ de 10 $\mu\text{g PITX kg}^{-1}$), sendo capaz de trabalhar em uma faixa que inclui o limite de ingestão provisório sugerido pelo EFSA (30 $\mu\text{g PITX kg}^{-1}$). Apesar da suspeita, ainda não foi possível confirmar a relação entre a presença de PITXs em amostras de pescado e o desencadeamento da doença de Haff no Brasil. Para futuros estudos, recomenda-se a realização de uma análise confirmatória empregando espectrometria de massas de alta resolução.

REFERÊNCIAS

ALIGIZAKI, K. *et al.* Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. **Toxicon**, v. 57, n. 3, p. 390-399, 2011.

ALMEIDA, L. K. R. *et al.* Rhabdomyolysis following fish consumption: a contained outbreak of Haff Disease in São Paulo. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, p. 278-280, 2019.

ARAUJO, L. X. **Estudos proteômicos em cérebro de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) expostos à 2, 3butanodiona**. 2022. 89 f. Tese (doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

ARMSTRONG, R.W. *et al.* Total synthesis of palytoxin carboxylic acid and palytoxin amide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 7530–7533, 1989.

LAWETZKY, V. Die Haffkrankheit. **Deutsche Medicinische Wochenschrift**, v. 50, p. 1444, 1924.

ARTEAGA-SOGAMOSO, E. *et al.* First record of the dinoflagellate *Prorocentrum borbonicum* in the continental coast of Colombian Caribbean: A new 42 hydroxi-palytoxin producer. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 973250, 2022.

AVELLAR, A. A. S. **Determinação multirresíduo de agrotóxicos em água empregando SPE e UHPLC-MS/MS**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2020.

BANDEIRA, A. C. *et al.* Clinical and laboratory evidence of Haff disease – case series from an outbreak in Salvador, Brazil, December 2016 to April 2017. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 24, p. 30-52, 2017.

BOENTE-JUNCAL, A. *et al.* Reevaluation of the acute toxicity of palytoxin in mice: Determination of lethal dose 50 (LD50) and No-observed-adverse-effect level (NOAEL). **Toxicon**, v. 177, p. 16-24, 2020.

BORSATO, G. T. *et al.* Taxonomy and abundance of epibenthic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species from the tropical and subtropical Southwest Atlantic Ocean including a review of their global diversity and distribution. **Harmful Algae**, p. 102470, 2023.

BOTANA, L. M.; ALFONSO, A. **Phycotoxins: chemistry and biochemistry**. Oxford: John Wiley & Sons, 2015.

BRAGA, S. L. **Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de fármacos**. 2018. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 2018.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Portaria N° 884, de 06 de setembro de 2023**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2023.

BRISSARD, C. *et al.* Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 87-101, 2015.

BUSTILLOS, O. V. **A resolução de massas na espectrometria de massas**. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/a-resolucao-de-massas-na-espectrometria-de-massas/>. Acesso em: 02 de agosto de 2022.

CAMPOS, G. A. C. et al. Haff disease in the pandemic COVID-19 period in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. 1-8, 2021.

CARDOSO, C. W. et al. Haff Disease in Salvador, Brazil, 2016-2021: Attack rate and detection of toxin in fish samples collected during outbreaks and disease surveillance. **The Lancet Regional Health-Americas**, v. 5, p. 1-11, 2022.

CARLIN, M. et al. Functional and Structural Biological Methods for Palytoxin Detection. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 10, n. 7, p. 916, 2022.

CARVALHO, G. D. et al. Aspectos relevantes sobre as intoxicações pelo consumo de pescado. In: VERRUCK, S. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Guarujá: Editora Científica Digital, 2021, p. 116-131.

CAVION, F. et al. Ecotoxicological Impact of the Marine Toxin Palytoxin on the Micro-Crustacean *Artemia franciscana*. **Marine Drugs**, v. 20, n. 2, p. 81, 2022.

CHOMÉRAT, N. et al. *Ostreopsis lenticularis* (Dinophyceae, Gonyaulacales) from French Polynesia (South Pacific Ocean): A revisit of its morphology, molecular phylogeny and toxicity. **Harmful Algae**, v. 84, p. 95-111, 2019.

CIMINIELLO, P. et al. High resolution LC-MSn fragmentation pattern of palytoxin as template to gain new insights into ovatoxin-a structure. The key role of calcium in MS behavior of palytoxins. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 23, n. 5, p. 952-963, 2012.

CIMINIELLO, P. et al. LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives. **Toxicon**, v. 57, n. 3, p. 376-389, 2011.

CIMINIELLO, P. et al. Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for palytoxins in mussels. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 5, p. 1463-1473, 2015.

CIMINIELLO, P. et al. Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: a new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, P. 1851–1859, 2009.

DEMBITSKY, V. M. Natural Polyether Ionophores and Their Pharmacological Profile. **Marine Drugs**, v. 20, n. 5, p. 292, 2022.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of quality technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DHANJI-RAPKOVA, M. et al. Variability and profiles of lipophilic toxins in bivalves from Great Britain during five and a half years of monitoring: azaspiracids and yessotoxins. **Harmful Algae**, v. 87, p. 101629, 2019.

EC – European Commission. Regulamento de execução (UE) 2021/808 da comissão. Relativo ao desempenho dos métodos analíticos para os resíduos de substâncias farmacologicamente ativas utilizadas em animais produtores de géneros alimentícios e à interpretação dos resultados. **Official Journal of the European Union**, v. 4, p. 210-230, 2018.

EFSA - European Food Safety Authority. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish - palytoxin group. **EFSA J.** v. 7, n. 12, p. 1393, 2009.

ESTEVEZ, P. et al. Emerging marine biotoxins in seafood from European coasts: Incidence and analytical challenges. **Foods**, v. 8, n. 5, p. 149, 2019.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. *et al.* Potential neurotoxins: Palytoxins. In: NOVELLI, A. *et al.* **Advances in Neurotoxicology: marine toxins**. Cambridge: Academic Press, 2021. p. 223-273.

FUTIGAMI, L. S.; DUTRA, M. O.; VERRUCK, S. Ocorrência de ficotoxinas diarreicas em ostras e mexilhões cultivados entre 2019 e 2020 em Governador Celso Ramos, SC. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. v. 11, n. 2, p. 363-369, 2021.

GARCÍA-ALTARES, M. *et al.* The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis cf. ovata* (NW Mediterranean Sea): Structural insights by LC-high resolution MSn. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 4, p. 1191-1204, 2015.

GÉMIN, M. *et al.* Toxicity of palytoxin, purified ovatoxin-a, ovatoxin-d and extracts of *Ostreopsis cf. ovata* on the Caco-2 intestinal barrier model. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 103909, 2022.

ISMAIL, F. M. D; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Application of inadequate NRM for directly tracing out the carbon skeleton of a natural product. **Phytochemical Analysis**, v. 32, n. 1, p. 7-23, 2021.

KLIJNSTRA, M. D.; GERSSSEN, A. A sensitive lc-ms/ms method for palytoxin using lithium cationization. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 537, 2018.

LENOIR, S. *et al.* First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. **Journal of Phycology**, v. 40, 1042–1051, 2004.

LUZ, L. R. **Perfil Químico e Atividade Citotóxica dos extratos de folha, galho e casca de baraúna: abordagem metabolômica e quimiométrica**. 2019. 87 f. Dissertação (Mestre) - curso de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2019.

MAGALHÃES, L. M. V. C. **Validação do teste lactulose: manitol através de HPLC-MS/MS para análise de barreira morfofuncional gastrointestinal**. 2021. 121 f. Teste (doutorado) Ciências médicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). **Mapa monitora casos de Doença de Haff**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-monitora-casos-de-doenca-de-haff>. Acesso em: 14 jan. 2022.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **NOTA TÉCNICA Nº 52/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS: Orienta a notificação e investigação integrada de caso compatível com a doença de Haff**. Brasil, 2021.

MAZZEO, A. *et al.* Toward isolation of palytoxins: Liquid chromatography coupled to low-or high-resolution mass spectrometry for the study on the impact of drying techniques, solvents and materials. **Toxins**, v. 13, n. 9, p. 650, 2021.

MEYER, S. Haffkrankheit und Paralytische Hämoglobinurie der Pferde-Identische Krankheitszustände. **Klinische Wochenschrift**, v. 3, n. 48, p. 2189-2190, 1924.

MOLOGNONI, L. *et al.* Cost-effective and high-reliability analytical approach for multitoxin screening in bivalve mollusks by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 9, p. 2691-2699, 2019.

MOORE, R.E.; SCHEUER, P.J. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. **Science**, v. 172, p. 495–8, 1971.

MOORE, R. E.; WOOLARD, F. X.; BARTOLINI, G. Periodate oxidation of N-(p-bromobenzoyl) palytoxin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 24, p. 7370-7372, 1980.

MS – Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico: informe nº 7- casos compatíveis com a doença de Haff no Brasil (SE 44)**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. v. 52, n. 45, p. 1-11, 2021a.

MS - Ministério da Saúde. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021. **Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2021b.

NADAL, J. C. *et al.* Hypercrosslinked polymer microspheres decorated with anion- and cation-exchange groups for the simultaneous solid-phase extraction of acidic and basic analytes from environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1661, p. 462715, 2022.

NASCIMENTO, S. M. *et al.* Growth and toxin profile of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. **Harmful algae**, v. 13, p. 1-9, 2012.

NASCIMENTO, S. M. *et al.* *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae) molecular phylogeny, morphology, and detection of ovatoxins in strains and field samples from Brazil. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 70, 2020.

ORTIZ, R. S. **Fase sortiva baseada em papel aplicada na microextração em filme fino em sistema de alta frequência analítica para determinação de desreguladores endócrinos por cromatografia**. 2022. 94 f. Dissertação (mestrado) Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

PATOCKA, J. *et al.* Palytoxin congeners. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 143-156, 2018.

PEI, P. *et al.* The emergence, epidemiology, and etiology of Haff disease. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 32, n. 10, p. 769-778, 2019.

PIEREZAN, M. D. *et al.* Doença de Haff no Brasil: uma preocupação emergente e seu impacto sobre a cadeia produtiva de pescado nas regiões Norte e Nordeste. In: 1º congresso de segurança e qualidade dos alimentos, 1., 2023, Evento Online. **Resumo**. Evento Online: Softaliza, 2023. p. 1-2. Disponível em: <https://publicacoes.softaliza.com.br/csqa/article/view/3402/2616>. Acesso em: 12 jan. 2024.

PIMENTA, J. V. C. **Uso da espectrometria de massas com ionização por paper spray (PS-MS) no estudo de reações orgânicas em superfície**. 2021. 132 f. Dissertação (mestrado) - curso de química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

POLI, M. *et al.* Toxicity and pathophysiology of palytoxin congeners after intraperitoneal and aerosol administration in rats. **Toxicon**, v. 150, p. 235-250, 2018.

RIOBÓ, P.; PAZ, B.; FRANCO, J. M. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. **Analytica chimica acta**, v. 566, n. 2, p. 217-223, 2006.

RIOBÓ, P.; FRANCO, J. M. Palytoxins: Biological and chemical determination. **Toxicon**, v. 57, n. 3, p. 368-375, 2011.

ROCHA, E. C. *et al.* **Síndrome de Haff: a precarização da pesca artesanal e os impactos do surto da doença da urina preta em Santarém-PA.** Uberaba: FSRamos edições, 2021, 84 p.

ROSSI, R. *et al.* New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1381-1387, 2010.

ROUÉ, M.; DARIUS, H. T.; CHINAIN, M. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) technology for the monitoring of aquatic toxins: A review. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 167, 2018.

SEGALIN, J. **Utilização da Espectrometria de Massas no Estudo de Produtos de Transformação/Degradação de Fármacos de uso Humano e Veterinário.** 2015. 193 f. Tese (doutorado) – Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

SELWOOD, A. I. *et al.* A sensitive assay for palytoxins, ovatoxins and ostreocins using LC-MS/MS analysis of cleavage fragments from micro-scale oxidation. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 810-820, 2012.

SOLIÑO, L. *et al.* Toxin profile of *Ostreopsis cf. ovata* from Portuguese continental coast and Selvagens Islands (Madeira, Portugal). **Toxicon**, v. 181, p. 91-101, 2020.

SUZUKI, T. *et al.* LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 8, p. 1358-1364, 2013.

SUZUKI, T.; UCHIDA, H.; WATANABE, R. LC/MS Analysis of Marine Toxins. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 78, p. 137–192, 2017.

TARTAGLIONE, L. *et al.* Determination of palytoxins in soft coral and seawater from a home aquarium. comparison between *Palythoa*-and *Ostreopsis*-related inhalatory poisonings. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 1023-1030, 2016.

TERAJIMA, T. *et al.* Simple structural elucidation of ostreocin-B, a new palytoxin congener isolated from the marine dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using complementary positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 12, p. 1001-1007, 2018.

TERAJIMA, T. *et al.* Structure elucidation of ostreocin-A and ostreocin-E1, novel palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using LC/Q-TOF MS. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 83, n. 3, p. 381-390, 2019.

TERNON, E. *et al.* On the Hunt for New Toxin Families Produced by a Mediterranean Strain of the Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. **Toxins**, v. 14, n. 4, p. 234, 2022.

TIBIRIÇÁ, C. E. J. A. *et al.* *Ostreopsis cf. ovata* bloom in Currais, Brazil: phylogeny, toxin profile and contamination of mussels and marine plastic litter. **Toxins**, v. 11, n. 8, p. 446, 2019.

TURELLA, T. C. **Avaliação da remoção de pesticidas em vinho branco por membranas de microfiltração.** 2021. 71 f. Dissertação (mestrado) - curso de engenharia de processos, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2021.

UCHIDA, H.; TAIRA, Y.; YASUMOTO, T. Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of

positive and negative ion liquid chromatography/ quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid communication in mass spectrometry**, v. 27, p. 1999-2008 , 2013.

UEMURA, D.; H., Y.; IWASHITA, T.; NAOKI, H. Studies on palytoxins. **Tetrahedron**, v. 41, p. 1007–101, 1985.

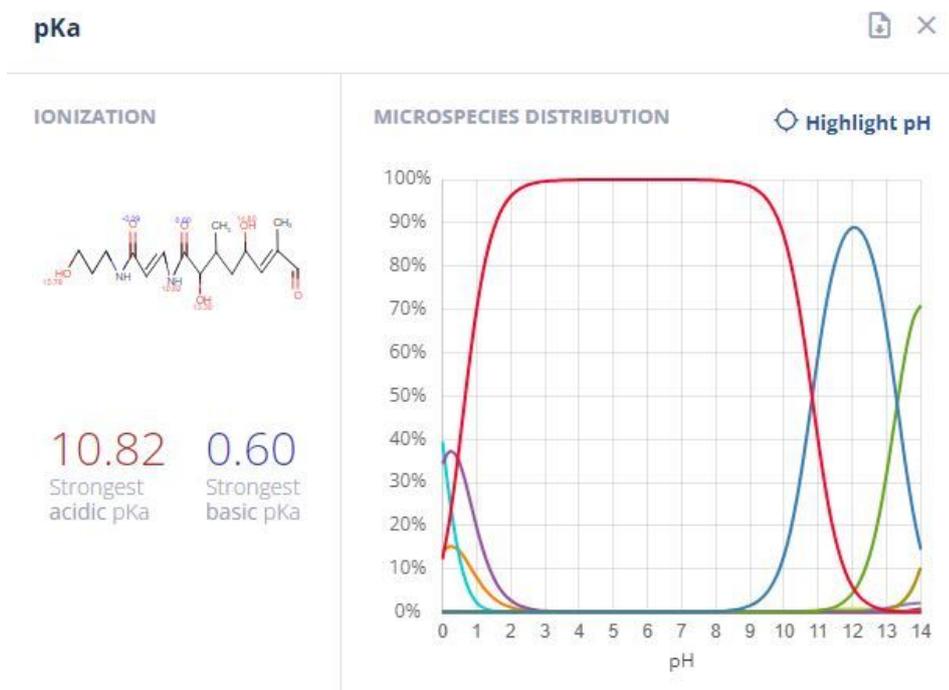
USAMI, M. *et al.* Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 5389–5390, 1995.

VERMA, A. **Through the looking glass: diversity and its functional significance in marine benthic microbial eukaryotes**. 2018. 378 f. Tese (doutorado) - curso de filosofia, Universidade de Tecnologia, Sydney, 2018.

WILES, J.S.; VICK, J.A.; CHRISTENSEN, M.K. Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. **Toxicon**, v. 12, n. 4, p. 427-433, 1974.

YASUMOTO, Takeshi *et al.* Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. **Agricultural and Biological chemistry**, v. 50, n. 1, p. 163-167, 1986.

APÊNDICE A – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FRAGMENTO AMIDA DE PALITOXINA OBTIDAS POR PREDIÇÃO *IN SILICO*

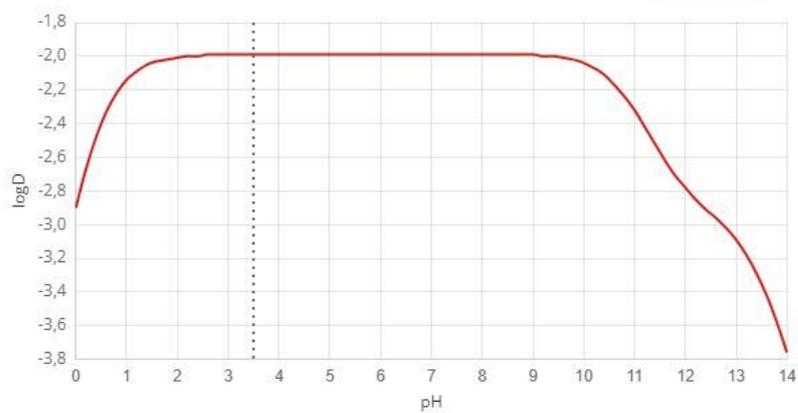


Lipophilicity



PH DEPENDENT LIPOPHILICITY

pH 3.50



-2.41
logP

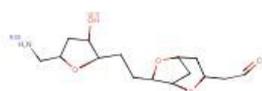
-1.99
logD at pH 3.50

APÊNDICE B – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FRAGMENTO AMINA DE PALITOXINA OBTIDAS POR PREDIÇÃO *IN SILICO*

pKa



IONIZATION



14.11

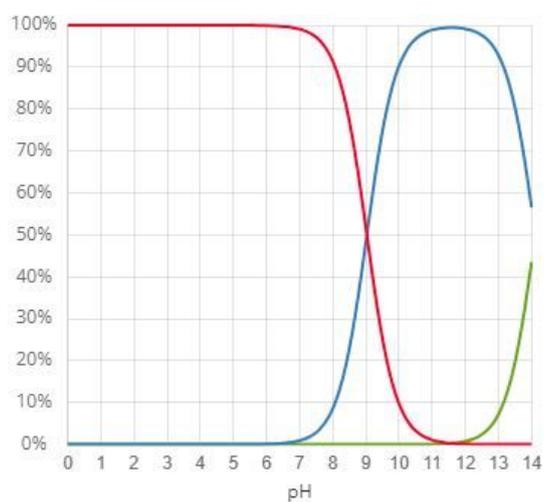
Strongest
acidic pKa

9.03

Strongest
basic pKa

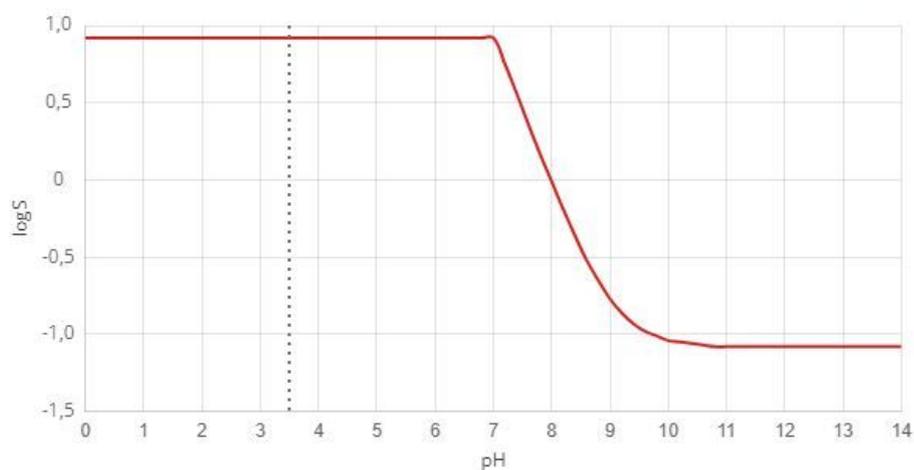
MICROSPECIES DISTRIBUTION

Highlight pH



PH DEPENDENT SOLUBILITY

pH 3.50



-1.08

Intrinsic solubility

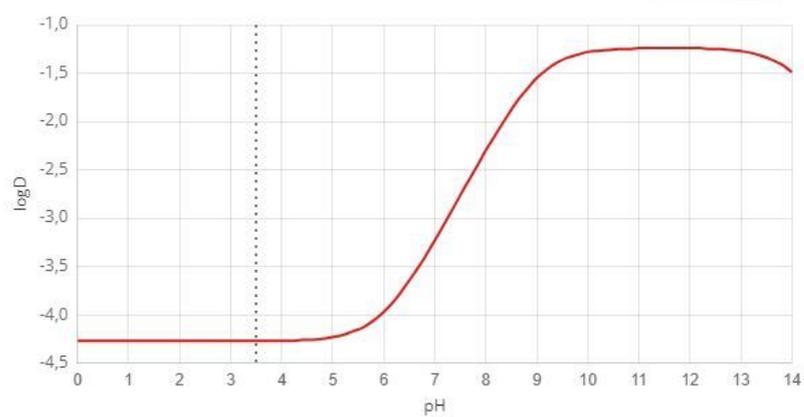
0.92

logS at pH 3.50

Lipophilicity



PH DEPENDENT LIPOPHILICITY

pH 3.50 ×

-1.92
logP

-4.27
logD at pH 3.50