



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

CAROLINA TURNES PASINI DEOLINDO

**BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES: USO DE AMOSTRAS
NATURALMENTE CONTAMINADAS NO APRIMORAMENTO DE MÉTODO POR
LC-ESI-MS/MS**

FLORIANÓPOLIS/SC

2021

CAROLINA TURNES PASINI DEOLINDO

**BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES: USO DE AMOSTRAS
NATURALMENTE CONTAMINADAS NO APRIMORAMENTO DE MÉTODO POR
LC-ESI-MS/MS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa

FLORIANÓPOLIS/SC

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Deolindo, Carolina Turnes Pasini

Biotoxinas marinhas em moluscos bivalves: Uso de amostras naturalmente contaminadas no aprimoramento de método por LC-ESI-MS/MS / Carolina Turnes Pasini Deolindo ; orientador, Ana Carolina de Oliveira Costa, 2021.
66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Química de Alimentos. 3. Biotoxinas marinhas. 4. Desenvolvimento de métodos. 5. LC MS/MS. I. Costa, Ana Carolina de Oliveira . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Carolina Turnes Pasini Deolindo

**Biotoxinas marinhas em moluscos bivalves: Uso de amostras naturalmente
contaminadas no aprimoramento de método por LC-ESI-MS/MS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Heitor Daguer, Dr.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Prof. Mathias Schramm, Dr.

Instituto Federal de Santa Catarina

Prof. Walter Quadros Seiffert Dr.

Universidade 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 mestre em Ciência dos Alimentos.

Ana Carolina Maisonnave Arisi

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sandra e Jones, por sempre me incentivarem. Vocês são responsáveis por instigar minha sede pelo conhecimento, pelo espírito questionador. Muito obrigada por me apoiarem em todas as etapas da minha vida. Se estou aqui hoje é porque vocês me disseram que era possível. Obrigada, eu amo vocês!

Sou grata à toda a minha família. Em especial a minha irmã Júlia, que esteve presente em todos os meus momentos, me ajudou a amenizar a saudade da família e me ensinou a ser uma mulher melhor. Agradeço aos tios, mas principalmente ao Humberto e a Joseane, que acompanharam de perto cada conquista e sofreram junto nos momentos de angústia.

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/SC) por aceitar e apoiar este projeto. À equipe da Seção Laboratorial Avançada de São José (SeLAV/SC) por me acolherem tão bem e participarem de grande parte dos meus dias de rotina em bancada e me incentivando. Em especial, meu muito obrigada ao Heitor Daguer por me dar votos de confiança ao longo de todo trabalho juntos, além de todos os ensinamentos.

Agradeço imensamente ao Rodrigo Hoff por todo conhecimento que me transmitiu, pela sua tranquilidade e positividade, mas principalmente por despertar em mim o amor pela ciência. Ao mestre das biotoxinas marinhas e papai, Cristian Kleemann, por me manter animada o tempo todo, compartilhar seu conhecimento e sofrer juntos quando nos encontrávamos “paralisados”. Agradeço ao Luciano Molognoni, por ceder seu tempo, com tamanha dedicação e paciência para ensinar e instigar a vontade de conhecer mais. À Cristina, uma espanhola manezinha, que com toda sua graça, transmitiu seus conhecimentos e carisma. E ao Luan, por todas as ajudas durante a rotina em bancada.

À Professora Ana Carolina, minha querida orientadora, que me apresentou uma nova visão da pesquisa. Obrigada por me acolher, me ouvir e conversar, seus conselhos me guiaram e me permitiram crescer como pessoa e profissional. Agradeço à toda equipe do Laboratório de Química de Alimentos por me receberem e me guiarem nos primeiros passos da pós-graduação.

Agradeço aos amigos, que foram responsáveis pelos mais diversos momentos, mas que de alguma forma se fizeram presentes em minha jornada nestes dois anos e tornaram meus dias melhores. Meu muito obrigada a vocês! A Maryella, por me apoiar e guiar nos primeiros passos no CCA. Ao querido Marcello, que provavelmente foi a pessoa mais presente nas conversas em mesas de bares. A sensata Adriane, por ser minha parceira dentro e fora da pesquisa, além de me manter pé no chão. Ao Ivan, que foi guia e companheiro, além de ser a força que precisei

por alguns momentos. Ao Fábio e a Patrícia, que estiveram próximos a mim, conversando, compartilhando, e instigando novas ideias. Ao Bruno, Gerson e Laércio, o trio que esteve presente comigo já antes de ingressar na Pós-Graduação, e se fazem presentes desde então. Ao André, que chegou aos poucos, mudou minha forma de pensar a vida e me fez mais feliz! Aos demais, Priscila, Camila, Gabriela, Helena, obrigada por estarem por perto!

Aos membros da banca, pela disponibilidade em participar deste momento e por todas as contribuições com este trabalho. À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, que me proporcionaram estrutura física, profissionais e atividades complementares de extrema qualidade. À CAPES pela concessão da bolsa.

Acredito que nenhuma etapa de nossas vidas é feita sem a presença das pessoas que encontramos pelo caminho; as que nos trazem conhecimento, ou momentos de alegria e companheirismo. Mas também acredito na importância das dificuldades, dos testes em bancada que deram errado, dos dias que começaram cedo e terminaram tarde demais, dos prazos. Pois foram nesses momentos em que mais obtive conhecimento, orientação e novas ideias.

Meu muito obrigada!

*“Do what you can, with what you have,
where you are.”*

Theodore Rossevelt

RESUMO

O consumo de mexilhões e ostras é permeado pelo risco decorrente da presença de biotoxinas marinhas lipofílicas (LMB). Diversos países produtores procuram garantir a segurança dos consumidores através de programas de controle sanitário, com métodos e protocolos analíticos capazes de detectar essas toxinas antes que atinjam níveis tóxicos. Diferentes estratégias de controle são adotadas, e vários métodos são empregados com esse propósito. No entanto, os padrões analíticos de biotoxinas marinhas podem ser escassos e impactar no orçamento de laboratórios de rotina devido seu elevado custo de aquisição. Demonstramos, neste trabalho, como amostras reais naturalmente contaminadas podem ser utilizadas para realizar estudos de validação e controle de qualidade interno para o método de controle brasileiro. Amostras reais contendo ácido okadáico foram avaliadas em termos de homogeneidade e estabilidade para ser elaborado um material de controle de qualidade interno. Também foram utilizadas amostras naturalmente contaminadas para avaliar, otimizar e validar um procedimento de extração assistida por ultrassom, mais simples e rápido em relação ao método vigente no laboratório. Foi utilizado um delineamento composto central na otimização do solvente de extração. O método de extração desenvolvido apresentou resultados desejáveis para linearidade ($R^2 > 0,998$), precisão intra-dia ($RSD < 9\%$) e acurácia entre 60 e 100%. O protocolo de extração foi aplicado com sucesso em mais de 380 amostras, onde pelo menos 74 se demonstraram positivas para a presença de toxinas do grupo ácido okadáico. O método encontra-se vigente na Seção Laboratorial Avançada de São José, laboratório do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento responsável pelas análises de controle de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves no Estado de Santa Catarina.

Palavras-chave: Ácido okadáico. Ficotoxinas. Extração assistida por ultrassom.

ABSTRACT

The consumption of mussels and oysters is permeated by the potential risk from the presence of marine lipophilic biotoxins (LMB). Several producer countries aim to ensure consumer safety through health control programs, with analytical methods and protocols capable of detecting these toxins before they reach toxic levels. Different control strategies are adopted, and several methods are employed for this purpose. However, analytical standards for LMB can be scarce and impact on routine laboratory budgets due to their high acquisition cost. We demonstrate, in this work, how real incurred samples can be used to carry out validation and internal quality control studies for the Brazilian control method. Actual samples containing okadaic acid were evaluated in terms of homogeneity and stability to produce an internal quality control material. Incurred samples were also used to evaluate, optimize, and validate a simpler and faster ultrasound-assisted extraction procedure. A central composite design was used to optimize the extraction solvent. The developed extraction method showed desirable results for linearity ($R^2 > 0.998$), intra-day precision ($RSD < 9\%$), and accuracy between 60 and 100%. The extraction protocol was successfully applied to more than 380 samples, where at least 74 were positive for the presence of toxins from the okadaic acid group. The method is implemented in the *Seção Laboratorial Avançada de São José*, Laboratory of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply responsible for the analysis of control of marine biotoxins in shellfish in Santa Catarina.

Keywords: Okadaic acid; Phycotoxins; Ultrasound-assisted extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa das áreas de monitoramento de biotoxinas marinhas em SC.....	26
Figura 2 Procedimento adotado para determinar a homogeneidade do material de controle de qualidade interno.....	43
Figura 3 Cromatogramas do ácido domóico para amostra extraída de acordo com o método de referência (A) e o método por UAE (B).....	46
Figura 4 Superfície de desejabilidade para a otimização da concentração de metanol (MeOH) e de ácido acético (AA) no solvente de extração por UAE para ácido domóico, yessotoxina e ácido okadáico.....	48
Figura 5 Contribuição das fontes de incerteza na avaliação do material de controle interno desenvolvido.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Critério para liberação da colheita de moluscos bivalves de acordo com o PNCMB27	
Tabela 2 Preparo de amostras empregados na análise de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves	30
Tabela 3 Delineamento composto central para extração assistida por ultrassom para biotoxinas marinhas em moluscos.	39
Tabela 4 Parâmetros de LC-ESI-MS/MS adotados para a determinação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves.	41
Tabela 5 Intensidade do sinal cromatográfico (cps) para yessotoxina, ácido okadáico e ácido domóico sob diferentes tempos de extração em banho de ultrassom.	45
Tabela 6 Efeitos do delineamento composto central para a composição do solvente de extração.	47
Tabela 7 Influência do <i>probe</i> e da temperatura na extração de ácido okadáico, ácido domóico e yessotoxina por UAE.	49
Tabela 8 Resultados da validação parcial do método para UAE de biotoxinas marinhas lipofílicas em moluscos bivalves e análise por LC-MS/MS.	50
Tabela 9 Cálculo da incerteza de medição do material de referência contendo ácido okadáico.	53
Tabela 10 Efeitos da temperatura e luminosidade em extratos de ácido okadáico em curto período de armazenamento.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido acético
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
ASP	Intoxicação amnésica por molusco (do inglês <i>amnesic shellfish poisoning</i>)
CCD	Delineamento composto central (do inglês <i>central composite design</i>)
CRM	Material de referência certificado (do inglês <i>certified reference material</i>)
DSP	Intoxicação diarreica por molusco (do inglês <i>diarrheic shellfish poisoning</i>)
dSPE	Extração em fase sólida dispersiva (do inglês <i>dispersive solid phase extraction</i>)
EMB	Extrato de matriz branca
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
HCl	Ácido clorídrico
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>liquid chromatography</i>)
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem com ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>liquid chromatography -tandem mass spectrometry with electrospray ionization</i>)
LMB	Biotoxinas marinhas lipofílicas (do inglês, <i>lipophilic marine biotoxins</i>)
LTP	Precipitação a baixa temperatura (do inglês <i>low temperature precipitation</i>)
MB	Moluscos bivalves
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
MSPD	Dispersão de matriz em fase sólida (do inglês <i>matrix solid phase dispersion</i>)
NaOH	Hidróxido de sódio

PNCMB	Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves
PSA	Amina primária-secundária (do inglês <i>primary secondary amine</i>)
PSP	Intoxicação paralítica por molusco (do inglês <i>paralytic shellfish poisoning</i>)
QCM	Material de controle de qualidade (do inglês <i>quality control material</i>)
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (do inglês <i>quick, easy, cheap effective, rugged and safe</i>)
SeLAV/SC	Seção Laboratorial Avançada de São José
SLE	Extração sólido líquido (do inglês <i>solid liquid extraction</i>)
SOP	Procedimento operacional padronizado (SOP, do inglês <i>standard operating procedure</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)
UAE	Extração assistida por ultrassom (do inglês <i>ultrasound assisted extraction</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	PRODUÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES	21
3.2	BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES.....	22
3.3	MONITORAMENTO DE BIOTOXINAS MARINHAS.....	24
3.3.1	Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves. 24	
3.3.1.1	<i>Histórico de interdições</i>	27
3.4	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES	29
3.4.1	Extração sólido-líquido.....	32
3.4.2	Extração assistida por ultrassom	32
3.4.3	Extração em fase sólida	33
3.4.4	Extração em fase sólida dispersiva.....	34
3.4.5	Precipitação proteica	35
3.4.6	QuEChERS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	REAGENTES E AMOSTRAS.....	37
4.2	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	37
4.2.1	Preparo de amostra	37
4.2.2	Otimização do procedimento de extração.....	38
4.2.3	Avaliação do método de extração por UAE	39
4.2.4	Análise quantitativa.....	40

4.3	DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO.....	41
4.3.1	Preparo do material.....	41
4.3.2	Avaliação da homogeneidade	42
4.3.3	Avaliação da estabilidade	43
4.4	APLICABILIDADE DO MÉTODO UAE EM AMOSTRAS REAIS.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM	44
5.1.1	Otimização da extração por ultrassom	45
5.1.2	Avaliação da performance do método de extração.....	49
5.2	DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO.....	50
5.3	APLICABILIDADE DO MÉTODO	54
6	CONCLUSÃO.....	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICE A – Estrutura química das principais biotoxinas marinhas.....	62
	APÊNDICE B – Critério de aceitabilidade para homogeneidade da amostra de controle de qualidade interno.....	66

Informações contidas neste trabalho foram submetidas à publicação na Revista Talanta.

1 INTRODUÇÃO

Produtos da pesca e maricultura são muito associados à uma dieta saudável, rica em nutrientes, sendo os moluscos bivalves (MB) um dos representantes de elevado impacto econômico, principalmente no Estado de Santa Catarina (SC) – Brasil. Santa Catarina é responsável por cerca de 98 % da produção nacional de moluscos bivalves de cultivo do país (FONTANA et al., 2020). De elevado valor nutricional, rico em proteínas e baixo teor de gorduras, os MB não são isentos de riscos sanitários.

A presença das biotoxinas marinhas (também chamadas ficotoxinas) está entre as principais preocupações acerca da segurança deste alimento (MOLOGNONI et al., 2019). Tais toxinas são produzidas por diferentes espécies de algas e bactérias e sua ocorrência nas regiões de cultivo de MB é difícil de ser prevista. Os MB, tais como ostras, mexilhões e berbigões, por serem animais filtradores, acabam por acumular em seu tecido muscular tais toxinas durante certo período, dependendo da classe de toxina e taxa de exposição. De acordo com o próprio mecanismo de filtração dos animais, e em função das condições ambientais do local, as toxinas podem ser eliminadas naturalmente.

Dependendo da classe e da concentração da toxina ingerida, através do consumo de MB contaminados, alguns danos à saúde podem ser observados, como no caso das biotoxinas marinhas lipofílicas (LMB). As LMB incluem o ácido okadáico (OA), dinophysistoxinas (DTX), azaspirácidos (AZA), pectenotoxinas (PTX) e yessotoxinas (YTX), entre outros. Os principais efeitos tóxicos deste grupo são os sintomas neurológicos ou distúrbios gastrointestinais.

Tendo em vista a dificuldade de prever as florações de algas potencialmente nocivas, a garantia à segurança do consumidor desses moluscos bivalves é realizada através do controle da concentração das ficotoxinas nos MB. Dessa forma, é necessário que haja um controle periódico delineado de acordo com os locais de cultivo. Além da detecção e quantificação das ficotoxinas, o nível das florações de algas deve ser avaliado em paralelo, permitindo que o risco sanitário seja controlado com precisão (FONTANA et al., 2020).

Existem diversos métodos químicos e biológicos que são utilizados nesse controle fico-sanitário. De modo geral, para garantir a rapidez dos resultados das biotoxinas marinhas, métodos de triagem são utilizados, em que, na presença de resultados negativos das ficotoxinas, os MB são rapidamente liberados para colheita e consumo. Assim, os métodos de triagem,

principalmente para este setor, devem ser rápidos, reproduzíveis e de operacionalização fácil. A etapa que pode permitir maior agilidade no processo, podendo ser otimizada a fim de reduzir o tempo de análise é o preparo de amostras.

Técnicas como extração sólido-líquido (SLE, do inglês *solid liquid extraction*), extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), QuEChERS (abreviatura de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), precipitação em baixa temperatura (LTP, do inglês *low temperature precipitation*) têm sido empregadas para as biotoxinas marinhas em moluscos bivalves (BOUNDY et al., 2015; MOLOGNONI et al., 2019; RODRÍGUEZ et al., 2018; WANG et al., 2019; XU et al., 2019a). Entretanto, tais técnicas e a maioria destes métodos apresenta laborioso preparo de amostra, podendo ocasionar demasiado tempo para a obtenção de resultados. Ademais, outra vantagem de protocolos simplificados, é a de viabilizar que laboratórios menos equipados possam realizar as etapas de extração e enviar os extratos prontos para serem analisados em laboratórios credenciados. Esta estratégia reduz os custos com o transporte das amostras íntegras. Tal abordagem permitiria que locais muito distantes do laboratório de referência possam ser monitorados com reduzidos custos operacionais.

O ultrassom, como ferramenta no preparo de amostras, é atrativo e demonstra potencialidade, pois devido às diversas vantagens da técnica, proporciona tempo de extração reduzido em relação a outros métodos, baixo custo de aquisição e manutenção dos equipamentos (disponível na maioria dos laboratórios de química analítica) além de permitir a extração de grandes lotes de amostras simultaneamente. Dessa forma, a extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *ultrasound assisted extraction*) pode ser empregada como uma alternativa viável para as análises de biotoxinas marinhas e já vem sendo utilizada por alguns pesquisadores (XU et al., 2019a; ZHUO et al., 2013a).

Diversos protocolos têm sido desenvolvidos e aplicados ao longo dos últimos anos, com o objetivo de avançar em métodos mais precisos, reproduzíveis e simples para garantir o controle das biotoxinas marinhas em MB (LEE et al., 2018; XU et al., 2019b; ZHUO et al., 2013b). Geralmente, no desenvolvimento desses métodos, assim como é recomendado pelos principais guias de validação (COMMISSION, 2002; INMETRO, 2016), são utilizadas amostras fortificadas em um ou mais níveis de concentrações alvo. Devido às características de aquisição dos padrões analíticos das ficotoxinas, o uso de materiais de referência certificados (CRM, do inglês *certified reference materials*) pode inviabilizar os protocolos de validação, devido ao elevado custo e disponibilidade restrita destes padrões. Dessa forma, alternativas aos

protocolos devem ser exploradas, e o uso de amostras naturalmente contaminadas (*incurred samples*) pode ser a saída.

Ao comparar protocolos de extração, por exemplo, o uso de amostras que contenham naturalmente os analitos de interesse, é mais apropriado, em relação ao uso de amostras fortificadas. Dessa forma, o desempenho do método é avaliado considerando as condições reais de extração da rotina analítica. Tal diferença, no processo extrativo se deve por vários fatores, como por exemplo o conteúdo intracelular da matriz, ligação analito-proteína, diferenças de pH intra e extracelular, entre outros fatores (TAN et al., 2009). Assim sendo, após uma breve avaliação de homogeneidade da matriz, uma amostra naturalmente contaminada pode ser a alternativa mais adequada no desenvolvimento de um protocolo de validação.

Após a publicação de um relatório de desenvolvimento e validação de um método multi-toxinas para análise de moluscos bivalves pelo grupo de pesquisa da Seção Laboratorial Avançada de São José do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SeLAV/SC) (MOLOGNONI et al., 2019) aprimoramentos do método foram necessários para atender a rotina analítica. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso do ultrassom como uma alternativa mais simples e rápida para o método de preparação de amostra adotado na SeLAV/SC. Para tanto, um pool de amostras naturalmente contaminadas contendo ácido okadáico foi avaliado em termos de homogeneidade e estabilidade, para promover a elaboração de um material de controle de qualidade interno. Em seguida, a comparação entre a UAE e o método atual foi realizada usando amostras naturalmente contaminadas contendo as principais toxinas encontradas no Estado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de extração para determinação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves com o uso de ultrassom, a fim de aprimorar o protocolo atual empregado pela Seção Laboratorial Avançada de São José do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, utilizando amostras naturalmente contaminadas com as principais toxinas avaliadas. Além de desenvolver um material de controle de qualidade interno, contendo ácido okadáico, para ser utilizado como controle da extração no mesmo laboratório.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo de extração mais rápido, menos laborioso com características de desempenho equivalentes ao método em vigor para biotoxinas marinhas em moluscos bivalves na SeLAV/SC;
- Avaliar o uso do ultrassom como técnica de extração para as biotoxinas marinhas;
- Utilizar amostras naturalmente contaminadas contendo as principais toxinas encontradas em Santa Catarina como ferramenta para o delineamento experimental no desenvolvimento do método de extração por ultrassom;
- Desenvolver um material de controle de qualidade interno contendo ácido okadáico;
- Avaliar a estabilidade deste material desenvolvido frente a diferentes temperaturas, tempos de exposição e condições de luminosidade;
- Aplicar o método de extração por ultrassom na rotina de análises da SeLAV/SC na avaliação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves em Santa Catarina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção mundial de moluscos bivalves foi de 17,1 milhões de toneladas no ano de 2016. A maior produção fica a cargo da Ásia (15.835 mil toneladas, deste total 14.200 mil de toneladas são produzidas na China), seguida da Europa (613 mil toneladas) e Américas (574 mil toneladas), nesse cenário, o Brasil fica atrás do Chile (307,4 mil toneladas) e Estados Unidos da América (173,7 mil toneladas) (FAO, 2018).

O Estado de Santa Catarina (SC) é o maior produtor de moluscos bivalves (mexilhões, ostras e vieiras) no Brasil, abrangendo 98,1 % do cultivo de moluscos no país (IBGE, 2017). De acordo com a última Síntese Informativa da Maricultura do Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca (CEDAP), publicada em 2017, foram produzidas 13.699 toneladas de moluscos bivalves no Estado de Santa Catarina. Atuaram diretamente na produção 565 maricultores distribuídos em onze municípios litorâneos, e o número total de pessoas

envolvidas na cadeia produtiva foi de 1.935 (SANTOS; GIUSTINA, 2017). Segundo relatório publicado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), a estimativa econômica da comercialização de moluscos no Estado de Santa Catarina é de R\$ 67.348.739,69, valores 22,6 % maiores quando comparado ao ano anterior (R\$ 54.917.813,40).

3.2 BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES

Algas planctônicas, presentes em todo os oceanos, são importantes fontes de alimentos para moluscos bivalves, peixes e alguns crustáceos. Aproximadamente 5.000 espécies de algas são conhecidas, e destas, aproximadamente 300 ocorrem em elevado número, ocasionando alterações de cor na superfície marinha, fenômeno conhecido como “floração”. As florações podem ocorrer em diferentes colorações, variando em tons de vermelho (marés vermelhas), amarelo, verde, marrom ou azul, dependendo da alga e sua concentração. Algumas espécies produzem florações inofensivas; outras podem florescer densamente causando esgotamento de oxigênio, podendo levar à morte de peixes e invertebrados. Além destas, cerca de 75 algas, são produtoras de toxinas (ficotoxinas), que podem entrar na cadeia alimentar chegando até os seres humanos, com potencial de causar intoxicações em diferentes graus de severidade (HALLEGRAEFF; ANDERSON; CEMBELLA, 1995).

Tais toxinas podem contaminar peixes e outros animais marinhos utilizados na alimentação humana (MAFRA et al., 2019). Os moluscos bivalves, por serem animais filtradores, ao se alimentarem em regiões com presença de toxinas, concentram-nas, tornando-se vetores para seres humanos (COSTA et al., 2017). Diversos surtos associados à ingestão das toxinas foram reportados em inúmeros países (FAO, 2004) e devido à ocorrência destes surtos, diversos programas de monitoramento foram implementados nos países com produção e consumo significativo de moluscos bivalves. As principais biotoxinas marinhas monitoradas nos mais diversos países são classificadas em 3 grupos: toxinas amnésicas (ASP), toxinas paralisantes (PSP) e toxinas lipofílicas (com os subgrupos do ácido okadáico e seus ésteres, azaspirácidos e yessotoxinas) (BRASIL, 2012a).

O grupo de toxinas amnésicas (ASP) é representado pelo ácido domóico (DA, do inglês *domoic acid*) (Estrutura química do grupo ASP encontra-se no apêndice A) e seus isômeros. Essas toxinas são produzidas principalmente pela diatomácea *Pseudo-nyctschia* spp

(LEFEBVRE; ROBERTSON, 2010). Em humanos, os sintomas da ingestão de ASP consistem em desconforto gastrointestinal, confusão, desorientação, convulsões, perda permanente de memória, podendo culminar na morte do paciente, nos casos severos (PERL et al., 1990). Em diversos países, assim como no Brasil, o limite regulatório de 20 mg DA g⁻¹ de molusco bivalve tem sido adotado (LEFEBVRE; ROBERTSON, 2010; BRASIL, 2012a).

As toxinas paralisantes (PSP) compreendem mais de 36 toxinas, sendo a principal delas a saxitoxina (STX, do inglês *saxitoxin*) (Estrutura química das PSP encontra-se no apêndice A). Seu elevado número de análogos torna a quantificação destas toxinas desafiadora (BOUNDY et al., 2015). A PSP pode ocorrer em moluscos bivalves que consomem dinoflagelados como *Gonyaulax catenella*, *Anabaena circinalis*, *Alexandrium tamarensis*, e *Pyrodinium bahamense* e o consumo destes animais pode provocar formigamento e dormência de lábios e língua, vertigem, náusea, vômito, e em casos mais graves paralisia respiratória, podendo levar à morte (BRICELJ; SHUMWAY, 1998). O limite regulatório adotado no Brasil, assim como em outros países, é de 0,8 mg STX g⁻¹ de molusco bivalve (BRASIL, 2012a).

O grupo das toxinas lipofílicas (LMB) provoca a intoxicação diarreica (DSP, do inglês *diarrhoeic shellfish poisoning*) e é caracterizado por três grupos de toxinas i) ácido okadáico (OA, do inglês *okadaic acid*) e seus derivados dinophysistoxinas (DTX-1 e DTX-2, do inglês *dinophysistoxins-1 and -2*); ii) yessotoxinas (YTX, do inglês *yessotoxin*) e iii) pectenotoxinas (PTX, do inglês *pectenotoxin*). A ingestão destas toxinas é relacionada a inflamações no trato gastrointestinal provocando diarreia em humanos. Outra classe de toxinas, que contém mais de 60 análogos da toxina azaspirácido (sendo os principais os AZA-1 a AZA-5), também classificada pelo Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) como toxinas lipofílicas, é responsável pela intoxicação por azaspirácidos (AZA) e apresenta sintomas de intoxicação parecidos com a DSP. As estruturas químicas das LMB encontram-se no apêndice A. Estas toxinas são produzidas por diversos dinoflagelados. Conforme o PNCMB a determinação da concentração de toxinas lipofílicas (grupos OA, YTX e AZA) tem como método de referência a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*) (Referência EU-RL-MB-Harmonised-LIPO-LCMS/MS - Regulamento UE n° 15/2011) sendo limite regulatório de 0,16 mg AO g⁻¹ de molusco bivalve para o OA, DTXs e PTX, 1,00 mg YTX g⁻¹ de molusco bivalve para as YTXs e 0,16 mg AZA g⁻¹ de molusco bivalve para os AZAs.

3.3 MONITORAMENTO DE BIOTOXINAS MARINHAS

A União Europeia, por meio do Regulamento (UE) n° 853/2004 e n° 786/2013, estabelece os valores limites das toxinas em moluscos bivalves vivos, e o Regulamento (UE) n° 15/2011 que modifica o anterior (Regulamento UE n° 2074/2005) e inclui a LC-MS/MS como técnica de referência para detecção de toxinas lipofílicas a ser usada nas rotinas de controle periódico, como método alternativo aos bioensaios. Estes últimos consistem basicamente em ensaios biológicos de desafio direto utilizando camundongos. Os bioensaios, de acordo com o mesmo regulamento, apresentam alta variabilidade de resultados, baixa capacidade de detecção das toxinas e especificidade limitada, o que justifica o desenvolvimento de outras técnicas a serem empregadas no controle destas toxinas. No próprio Regulamento (EU) n° 15/2011 é definido que se pode aplicar outro método, diferente da cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e da espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), desde que este seja validado intralaboratorialmente e os critérios de desempenho estabelecidos pelo Laboratório de Referência da União Europeia para as biotoxinas marinhas (LR-EU) sejam atingidos.

No Brasil, a produção de moluscos bivalves é monitorada, da colheita à comercialização, por meio do PNCMB, que determina a coleta periódica de amostras de moluscos bivalves para monitoramento de micro-organismos contaminantes e de biotoxinas marinhas (BRASIL, 2012a). O PNCMB estabelece o método de referência que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV para a quantificação de ASP (Referência EU-RL-MB-Harmonised-ASP-HPLC-UV - Regulamento CE n° 1244/2007) e o método de LC-MS como método alternativo (Referência EU-RL-MB-Harmonised-ASP-HPLC-MS - Regulamento CE n° 1244/2007).

3.3.1 Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves

A Instrução Normativa Interministerial do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) n° 07, de 08 de maio de 2012, com o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos necessários para a garantia da qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar o atendimento destes requisitos, institui o PNCMB (BRASIL, 2012a).

O PNCMB inclui as etapas de retirada, trânsito, processamento e transporte, bem como os limites máximos de biotoxinas e micro-organismos presentes nos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, o PNCMB estabelece ainda a colheita periódica de amostras de moluscos bivalves e água de cultivo para realização de análises de micro-organismos contaminantes, toxinas presentes nos animais e monitoramento das algas produtoras destas toxinas (BRASIL, 2012a). O PNCMB classifica as toxinas que devem ser monitoradas em 3 grupos: toxinas amnésicas (ASP), toxinas paralisantes (PSP) e toxinas lipofílicas (com os subgrupos do ácido okadáico e seus ésteres, azaspirácidos e yessotoxinas).

A Portaria MPA N° 204, de 28 de junho de 2012 estabelece os procedimentos para coleta de amostras para realização de análises de microrganismos contaminantes e de toxinas em moluscos bivalves e de análises para o monitoramento de espécies de microalgas potencialmente produtoras de toxinas, bem como define as metodologias analíticas oficiais que deverão ser adotadas pelo laboratório de análise (BRASIL, 2012b). A Portaria MPA n° 175, de 15 de maio de 2013 acrescenta à portaria anterior algumas informações acerca de retirada dos moluscos bivalves na área de extração no monitoramento e controle de micro-organismos contaminantes e de biotoxinas marinhas (BRASIL, 2013).

O PNCMB tem abrangência nacional, porém atua com operacionalização regionalizada, tendo em vista que no estado de Santa Catarina o PNCMB foi implementado como piloto. O Estado de Santa Catarina apresenta produção de moluscos bivalves entre as cidades de São Francisco do Sul e a Palhoça, e as áreas controladas são divididas de acordo com locais georreferenciados de cultivo e/ou extração de moluscos bivalves, totalizando 39 áreas de cultivo monitoradas em Santa Catarina (Figura 1).

Figura 1 Mapa das áreas de monitoramento de biotoxinas marinhas em SC



Fonte: Adaptado de CIDASC (2021).

No presente momento, o PNCMB está sendo rediscutido de modo a migrar finalmente da condição de programa piloto restrito ao estado de Santa Catarina para status de abrangência nacional. O novo desenho do programa incluirá ainda o monitoramento de outros contaminantes inorgânicos (cádmio, chumbo, mercúrio) e orgânicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos).

De acordo com o plano amostral estabelecido pelo PNCMB, cada área de cultivo é analisada quinzenalmente, periodicidade esta que pode ser alterada, aumentando a frequência de coleta, quando condições oceanográficas favoráveis ao crescimento de algas produtoras de toxinas for evidenciado. São realizadas pelo menos duas coletas de 500 gramas de parte comestível de moluscos bivalves, embaladas separadamente, obtidas no mesmo dia e em dois pontos distintos de uma área de cultivo e a partir do momento da coleta, a partir de então o laboratório responsável pelas análises tem até 72 horas para processar as amostras (BRASIL, 2012a).

De modo a atender o PNCMB e considerando o número de áreas de cultivo para análise de biotoxinas marinhas em Santa Catarina, a rotina analítica é atualmente composta por dois lotes semanais (geralmente terças e quintas-feiras). Os valores de referência para a tomada de decisão para interdição das áreas encontram-se na Tabela 1. Quando um resultado de análise é maior ou igual ao limite de interdição, a área é interditada para colheita, comercialização e consumo de mexilhões, ostras, vieiras e berbigões. Nesse caso, a área passa a ser monitorada intensivamente até obtenção de dois resultados negativos consecutivos, para então ocorrer a liberação para colheita, comercialização e consumo.

Tabela 1 Critério para liberação da colheita de moluscos bivalves de acordo com o PNCMB

	PSP	DSP	DSP	ASP	AZA
Colheita liberada	< 0,8 mg STX eq kg ⁻¹	< 0,16 mg OA eq kg ⁻¹	< 1,0 mg YTX eq kg ⁻¹	< 20 mg DA kg ⁻¹	< 0,16 mg AZA eq kg ⁻¹
Colheita suspensa	≥ 0,8 mg STX eq kg ⁻¹	≥ 0,16 mg OA eq kg ⁻¹	≥ 1,0 mg YTX eq kg ⁻¹	≥ 20 mg DA kg ⁻¹	≥ 0,16 mg AZA eq kg ⁻¹

Concentração de biotoxinas por quilograma (kg) da parte comestível de moluscos bivalves. Fonte: Adaptado de Brasil (2012a).

3.3.1.1 Histórico de interdições

Nos anos de 2008 e 2007 diversas localidades produtoras foram interditadas para colheita e comercialização de moluscos bivalves no litoral de Santa Catarina, sendo que no ano de 2007 houve 150 registros de pessoas intoxicadas pela ingestão de DSP (PROENÇA et al., 2007). Em 2014, a toxina diarreica foi responsável pela interdição da colheita de moluscos bivalves em todo o litoral de Santa Catarina, devido a presença da toxina diarreica (DSP) em São Francisco do Sul e Porto Belo bem como pela presença de algas *Dynophysis* no município de Palhoça. A interdição de todos os locais de cultivo no litoral foi tomada como medida preventiva, tendo em vista que os resultados encontrados poderiam indicar uma contaminação generalizada no estado (CIDASC, 2014). Em 2009, foram detectadas concentrações de ácido domóico acima de 20 mg kg⁻¹ de moluscos (PROENÇA; FONSECA; PINTO, 2010).

No ano de 2016 foi encontrada a toxina diarreica (DSP) em Florianópolis, e alta contagem de algas produtoras em Palhoça, em Governador Celso Ramos, e em Balneário Camboriú (CIDASC, 2016). No ano seguinte, no mês de outubro, ocorreu a interdição da colheita, comercialização e consumo de moluscos bivalves em Porto Belo, em decorrência da presença de toxinas paralisantes (PSP). A toxina paralisante foi observada no Estado de Santa Catarina, pela primeira vez em 1997 (CIDASC, 2017) e em 2006 (SCHRAMM et al., 2006).

Entre os meses de agosto a novembro de 2019, os municípios de Bombinhas, Porto Belo, Penha, Balneário Camboriú, Florianópolis, Governador Celso Ramos e Palhoça (SC) tiveram suas áreas de cultivo interditadas para retirada, comercialização e consumo de mexilhões, ostras e vieiras, devido à presença de OA (CIDASC, 2019a; CIDASC, 2019b) e no início do mês de novembro, nos municípios de Balneário Camboriú e Penha, a DA foi detectada (CIDASC, 2019b). Mais recentemente, nos meses de agosto a novembro de 2020, uma intensa floração de *Dinophysis acuminata* foi observada concomitantemente à presença de ácido okadáico em mexilhões e ostras, em praticamente todas as áreas de cultivo de SC.

Nos demais casos de interdições decorrentes da presença de toxinas em MB, poucas informações foram encontradas acerca do número de intoxicações, provavelmente por falta de conhecimento da população para diferenciar a contaminação pelas biotoxinas marinhas com outras contaminações, como intoxicações alimentares, e/ou também por não terem tratado os sintomas em centros de saúde. De modo que, visualizando a recorrência destas toxinas no estado, sabendo da severidade das intoxicações e escassez de conhecimento por parte da população a respeito da importância do assunto, percebe-se a importância de um rigoroso controle destas toxinas em moluscos bivalves.

3.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES

O preparo de amostras pode incluir diversas etapas que antecedem a análise, desde uma simples diluição até etapas que envolvam a aplicação de métodos de extração, *clean-up*, derivatização ou concentração, sendo que tais procedimentos podem ocorrer de forma isolada ou sucessiva. O preparo de amostras pode atuar no enriquecimento dos analitos, na eliminação de interferentes, no aumento da seletividade e até mesmo na melhora da detectabilidade do método. Dada a complexidade de matrizes alimentares somado muitas vezes à presença de analitos na ordem de ng L^{-1} ou kg^{-1} o preparo de amostras é uma etapa crítica e tão importante quanto o método de análise, e este deve ser minuciosamente avaliado de acordo com as demandas analíticas.

A rotina de controle de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves demanda alta frequência analítica e carece que os resultados sejam reportados rapidamente de modo a garantir a segurança do consumidor deste produto. Nesse contexto, a rotina ideal para o preparo de amostras que antecedem a aplicação do método de análise, incluindo o controle periódico de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves deve consistir em métodos simplificados, de baixo custo operacional, que demandem pouco tempo de extração facilitando assim os procedimentos laboratoriais.

A escolha do método de extração mais apropriado comumente é realizada com base nas interações matriz-analito, nos requisitos do método analítico e na concentração do analito na amostra (DEAN, 2009), sendo assim, uma série de estudos foram desenvolvidos acerca do preparo de amostras para determinação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves. A Tabela 2 contempla trabalhos envolvendo métodos de análise para biotoxinas marinhas evidenciando informações acerca do preparo de amostra adotado.

Tabela 2 Preparo de amostras empregados na análise de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves

Técnica de extração	Solvente extrator	Clean-up	Tempo total estimado de preparo de amostra	Número/ Classe de biotoxinas avaliadas	Faixa de recuperação (%)	Referência
UAE	Metanol:água (80:20, v/v)	MSPE	> 60 min	6 / Lipofílicas	82,8 – 118,6	XU et al. (2019)
QuEChERS	Ácido fórmico 0,1%	LTP + dSPE	> 90 min + evaporação	13 / PSP	79,0 – 113,0	MATTAROZZI et al. (2016)
UAE	Metanol	FLF e SPE	120 min	6 / Lipofílicas	80,0 - 103,1	LEE et al. (2018)
QuEChERS	Acetonitrila	-	40 min + evaporação	13 / Lipofílicas	79,0 – 114,0	RÚBIAS et al. (2015)
QuEChERS	Metanol:etanol:isopropanol (7:2:1, v/v/v)	dSPE + LTP	> 130 min + evaporação	9 / Lipofílicas	85,0 – 117,4	WANG et al. (2019)
SLE	Metanol:Água (90:10, v/v) com 0,1% ácido fórmico	LTP	60 min	11 / Lipofílicas, 9 / PSP e DA	70,0 – 130,0	MOLOGNONI et al. (2019)
SLE	Ácido acético 0,1 %	SPE	30 min	21 / PSP	28,0 - 107,0	BOUNDY et al. (2015)
UAE	Acetonitrila:água (90:10, v/v) com 0,1 % ácido fórmico	QuEChERS	300 min	18 / PSP	71,3 – 104,6	ZHUO et al. (2013)
SLE	Ácido acético 1 %	SPE	40 min	13 / PSP 2 / TTX	Não informado	RODRÍGUEZ et al. (2018)

SLE	Metanol	-	16 min	8 / Lipofílicas	Não informado	
SLE	Metanol:água (50:50, v/v)	-	13 min	DA	Não informado	
SLE	Ácido clorídrico 0,1 N Água Hexano	SPE	15 min	STX	Não informado	ABALLAY- GONZALEZ et al. (2016)
SLE	Metanol:água (80:20, v/v)	-	16 min	8 / Lipofílicas	97,2 – 102,4	REGUEIRO et al. (2011)
SLE	Metanol	SPE	20 min	19 / Lipofílicas	71,2 – 102,0	WU et al. (2014)
SLE	Metanol	SPE + LLP	40 min + evaporação	4 / Lipofílicas	64 - 128	THESE; SCHOLZ; PREISS- WEIGERT (2009)
SLE	0,1 M HCl	TCA 30 % + CH ₂ Cl ₂ + SPE	> 60 min	15 / PSP	74,1 – 119,6	REY et al. (2018)
SLE	0,1 N HCl	SPE	30 min	5 / PSP	82,7 – 110,7	SHIN et al. (2017)
SLE	Acetonitrila:Água (80:20, v/v) com 0,1 % ácido fórmico	LTP + SPE	> 240 min	12 / PSP	Não informado	SAYFRITZ; AASEN; AUNE (2008)

MSPE: Extração em fase sólida magnética; QuEChERS: Método de extração “Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro”; dSPE: Extração em fase sólida dispersiva; FLF: Filtração lipídica congelada; SPE: Extração em fase sólida; SLE: Extração sólido-líquido; LLP: partição líquido-líquido; CH₂Cl₂: diclorometano; PSP: Toxinas que provocam a intoxicação paralisante por molusco; DSP: Toxinas que provocam a intoxicação diarreica por molusco; ASP: Toxinas que provocam a intoxicação amnésica por molusco; DA: Ácido domóico; PTX: Pectenotoxinas; YTX: Yessotoxina; TTX: Tetrodotoxina; STX: Saxitoxina; LTP: precipitação a baixa temperatura. Fonte: Próprio autor.

3.4.1 Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido (SLE) consiste na remoção dos analitos de uma matriz sólida por meio de um solvente (LANÇAS, 2004). Por permitir que os analitos de interesse, assim como interferentes, sejam transferidos para uma fase líquida (solvente), sendo mais utilizada na extração das BM em moluscos bivalves. A SLE por vezes é facilitada com o uso de altas temperaturas, ultrassom ou fluídos pressurizados, sendo a tradicional (somente com agitação mecânica) (LANÇAS, 2004), a de maior recorrência na extração de BM.

A escolha do solvente de extração é a realizada de acordo com a polaridade dos analitos de interesse sendo, no caso das LMB o metanol o mais comum e para as hidrofílicas a água acidificada. Após a etapa de extração sólido-líquido, praticamente todos os extratos são submetidos à uma etapa de *clean-up* objetivando melhorar no desempenho analítico. Contudo, dois trabalhos apresentam para a extração das LMB protocolos onde o desempenho analítico foi alcançado somente com a etapa de extração sólido-líquido com metanol (REGUEIRO et al., 2011a; RODRÍGUEZ et al., 2018), não sendo aplicada nenhuma etapa de *clean-up*.

3.4.2 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom (UAE) permite redução do tempo de extração em relação às técnicas convencionais devido o processo de cavitação provocado pelo ultrassom. A radiação ultrassônica provoca distúrbios repetitivos no sistema, ocasionando formação e colapso de bolhas, tal fenômeno proporciona o aumento da pressão e temperatura do sistema, aumentando a penetração do solvente na matriz e assim aumentando a transferência de massa (analito-solvente) (ALBERO; TADEO; PÉREZ, 2019). É importante avaliar a estabilidade dos analitos à essas condições. Sabe-se, em função dos trabalhos já publicados utilizando a técnica para extração destas ficotoxinas, que estas são estáveis ao processo de ultrassom (LEE et al., 2018; XU et al., 2019a; ZHUO et al., 2013b).

A UAE pode ser utilizada em banhos ultrassônicos, *probes*, entre outros modelos de equipamentos (ALBERO; TADEO; PÉREZ, 2019). Os banhos de ultrassom, tem reduzido custo de aquisição e permitem a extração de diversas amostras por vez em um reduzido tempo. Entretanto, alguns métodos de extração tanto para biotoxinas marinhas apresentam elevado tempo total de extração (LEE et al., 2018; XU et al., 2019a; ZHUO et al., 2013a). Isso se deve,

em sua maioria às etapas de *clean-up* estabelecidas nos trabalhos, por isso é necessário comparar apenas as etapas extrativas.

Os protocolos desenvolvidos por Xu et al. (2019) e Zhuo et al. (2013) utilizam 20 e 10 min de extração em ultrassom para extrair as biotoxinas marinhas, respectivamente. Ambos os protocolos utilizam duas etapas de extração (10 e 5 min cada), entretanto Lee et al. (2018) atinge bons resultados com apenas 3 min de extração para as LMB em uma única etapa. Os protocolos que utilizam duas etapas de extração (re-extração do material sólido paletizado com as mesmas condições da primeira extração) levam em consideração a saturação do solvente pelos analitos extraídos. Porém, ao proceder com tal protocolo, uma etapa de centrifugação é adicionada e pode ocasionar aumento considerável no tempo total de extração. Uma alternativa seria otimizar o tempo de extração bem como o volume de solvente adotado, almejando uma extração única.

3.4.3 Extração em fase sólida

Provavelmente a técnica mais empregada no preparo de amostras para análises por cromatografia, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é uma forma simplificada da própria cromatografia líquida clássica, onde na SPE é utilizada uma coluna aberta contendo uma fase sólida (denominado cartucho de extração) (LANÇAS, 2004). Simplificadamente, o procedimento operacional para a SPE é o condicionamento do cartucho com solventes apropriados, seguida da aplicação da amostra, e por fim a eluição com solventes adequados dos compostos de interesse ou da matriz.

A SPE pode ser empregada para diversas finalidades, sendo as principais: i) concentração dos analitos, em que grande volume de amostra é adicionado ao cartucho e a eluição conta com pequeno volume de solvente; ii) isolamento dos analitos, onde o protocolo adotado tem como objetivo reter os analitos de interesse no cartucho, removendo os interferentes; iii) isolamento da matriz, ao contrário da anterior, nesse procedimento os analitos da matriz são retidos no cartucho e os analitos de interesse são coletados junto com o solvente da amostra e; iv) estocagem da amostra, é utilizada quando a coleta da amostra é realizada distante do local de análise, o procedimento conta com a adição da amostra ao cartucho que permanece armazenado ou é transportado.

A SPE é muito utilizada para as extrações de biotoxinas marinhas paralisantes (hidrofílicas) pois ao utilizar uma extração aquosa como solvente de extração, além de obter os

analitos de interesse diversos outros interferentes de matriz são extraídos, efeito reduzido ao utilizar solventes orgânicos (como o metanol) para extração das LMB (ABALLAY-GONZALEZ et al., 2016; BOUNDY et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2018; SHIN et al., 2017). Poucos trabalhos para biotoxinas marinhas utilizam a SPE (LEE et al., 2018; THESE; SCHOLZ; PREISS-WEIGERT, 2009; WU et al., 2014), por se tratar de uma técnica com custo relativamente alto (cartuchos e *manifolds*), com tempos de extração elevado, o que demanda alta atenção e manuseio dos cartuchos por um profissional durante o procedimento.

O sorvente utilizado no cartucho é o primeiro parâmetro para ser definido na SPE, de modo geral para as biotoxinas marinhas o cartucho mais utilizado são os que contém C₁₈ como fase estacionária. Os principais protocolos adotados são os de concentração e *clean-up*, onde maior volume de amostra é adicionado em relação ao que é coletado e uma etapa de lavagem do cartucho para remoção dos analitos é utilizada. A concentração das biotoxinas marinhas utilizando o SPE pode permitir limites de detecção próximos a 1 µg kg⁻¹ (THESE; SCHOLZ; PREISS-WEIGERT, 2009).

Nos três trabalhos apresentados para biotoxinas marinhas, foi possível promover *clean-up* dos extratos metanólicos, reduzir a precipitação proteica ao longo do tempo de armazenamento e reduzir os efeitos da matriz na detecção por LC-MS/MS, além de concentrar os analitos nos extratos. Dessa forma, para as biotoxinas marinhas, o SPE é uma técnica de grande valia, apesar das desvantagens anteriormente citadas, pois em termos analitos promove ganhos consideráveis. É necessário, entretanto, ponderar o custo-benefício da técnica de modo a atingir os objetivos esperados para a rotina analítica.

3.4.4 Extração em fase sólida dispersiva

A extração em fase sólida dispersiva (dSPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) é uma técnica que pode ser comparada à dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) pois utiliza um sorvente para promover a limpeza da matriz. O sorvente atua como espécie de filtro, removendo após a centrifugação os interferentes de matriz (LANÇAS, 2004). Diversos sorventes podem ser aplicados dependendo do tipo de interferente de matriz a ser removido, os principais são amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*), C₁₈, carbono grafitizado, entre outros (REGUEIRO et al., 2011b).

A dSPE garante maior homogeneidade da limpeza que as técnicas de SPE e MSPD pois o sorvente é adicionado ao próprio solvente já extraído. Outra vantagem em relação a essas duas técnicas, é que a dSPE demanda menor consumo dos sorventes, sendo então mais barata, além da possibilidade de combinar diversos sorventes em uma mesma etapa de *clean-up*. Os principais trabalhos que utilizam a dSPE para biotoxinas marinhas em MB serão discutidos no item 3.4.6, onde é apresentada a técnica QuEChERS que faz uso da dSPE em seu protocolo de execução.

3.4.5 Precipitação proteica

As principais formas de remoção das proteínas nos extratos é o uso de sais para promover o *salting-out*, uso de solventes orgânicos e precipitação isoelétrica. O *salting-out* ocorre quando ao adicionar um sal ao extrato, as proteínas têm sua solubilidade reduzida, promovendo então sua precipitação. A principal desvantagem dessa técnica é a necessidade de limpeza posterior do extrato bem como o custo dos sais empregados. A precipitação isoelétrica explora a baixa solubilidade das proteínas quando estão no seu ponto isoelétrico. Dessa forma, o extrato deve ter seu pH ajustado para o pH do ponto isoelétrico das proteínas interferentes, seguido então de filtração para separação do precipitado.

A precipitação isoelétrica foi utilizada para biotoxinas marinhas em moluscos bivalves por Rey et al. (2018) e no método oficial AOAC (AOAC 2011.02) ao adicionar ácido tricloroacético 30 % no extrato. Nesse caso, é importante corrigir o pH dos extratos antes de submetê-los à quantificação, pois no caso destas toxinas o pH do meio pode ocasionar interconversão entre as toxinas paralisantes.

O uso de solventes orgânicos promove o que é conhecido como precipitação a baixa temperatura (LTP, do inglês *low temperature precipitation*). Ao adicionar um solvente orgânico ao meio, ocorre a diminuição da constante dielétrica da solução, o que reduz a solvatação das moléculas de proteína pela água, promovendo sua precipitação. A técnica deve ocorrer à baixas temperaturas, a fim de evitar a desnaturação proteica, por isso o nome da técnica. Esta é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para limpeza dos extratos de MB, devido sua carga proteica elevada.

A técnica de LTP foi utilizada por Molognoni et al. (2019) e Wang et al. (2019) para extratos de biotoxinas marinhas e por Mattarozzi et al. (2016) e Sayfritz; Aasen; Aune (2008)

para extratos de biotoxinas marinhas paralisantes. Esta técnica, apesar de ser muito utilizada para precipitação proteica, acarreta um aumento do tempo de preparo de amostras, pois demanda o armazenamento das mesmas de 1 a 4 horas em freezer (ou tempos menores, quando temperaturas mais baixas são utilizadas).

3.4.6 QuEChERS

Um método clássico de extração e *clean-up* foi proposto em 2003 por Anastassiades et al., o QuEChERS sigla que abrevia as principais vantagens da técnica (**Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**), de acordo com os autores. A técnica tem diversas adaptações já elaboradas para os mais diversos tipos de matrizes e analitos e sua versão original consiste basicamente em adicionar acetonitrila à amostra, agitação seguida da adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, agitação e centrifugação. Em uma alíquota de 1 mL desse sobrenadante é então adicionado sulfato de magnésio e PSA, agitação e centrifugação.

A técnica basicamente pode ser resumida em uma extração sólido-líquido, seguida de um *salting-out* e uma dSPE. Portanto, diversos outros protocolos baseados nessa combinação podem ser desenvolvidos. A exemplo, metanol:etanol:isopropanol (7:2:1, v/v/v) foi utilizado para extração de LMB em moluscos bivalves, seguida da adição de sulfato de magnésio. Nesse protocolo os autores incluíram, antes da etapa de dSPE, uma LTP e concentração do extrato, de modo a diminuir o limite de detecção do método, promovendo então recuperações superiores a 85 % (WANG et al., 2019). O método proposto por Rúbies et al. (2015) utiliza acetonitrila com sulfato de magnésio e cloreto de sódio para extração das LMB, seguida de um dSPE com C₁₈ e concentração do extrato, obtendo recuperações de 79 – 114 %.

Para as biotoxinas marinhas paralisantes, um método proposto por Mattarozzi et al. (2016) empregou extração aquosa, com LTP pela adição de metanol ao extrato, seguida de concentração deste e dSPE. Pela variabilidade de protocolos que podem ser empregados nesta técnica, não é possível afirmar que ela é rápida, entretanto atende muito bem os requisitos analíticos. Porém, pode ser de elevado custo ao laboratório, dependendo dos sorventes utilizados.

Assim, levando em conta as diferentes técnicas de extração que podem ser empregadas para as biotoxinas marinhas e dependendo das necessidades, diferentes protocolos podem ser

explorado, para atender os requisitos dos laboratórios de controle ou ainda, novos protocolos podem ser desenvolvidos, considerando as técnicas já consolidadas em literatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E AMOSTRAS

Foi utilizado ácido clorídrico (HCl) e ácido acético (AA), e ácido fórmico (AF) de grau analítico, e metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) de grau cromatográfico adquiridos da J.T. Baker, EUA. Formiato de amônio e hidróxido de sódio (NaOH) da Sigma Aldrich, EUA. Água em grau ultrapuro (resistividade mínima de $18,3 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Para as extrações por UAE, foram utilizados um banho ultrassônico (Unique USC-1800, 40 kHz, Brasil) e uma sonda de ultrassom (Unique, Brasil). Os padrões analíticos de biotoxinas marinhas foram fornecidos pelo Laboratório CIFGA S.A. (Lugo, Espanha). Amostras em branco e naturalmente contaminadas (mexilhões *Perna perna*) contendo ácido domóico, yessotoxina e ácido okadáico foram obtidas, após devida descaracterização, do PNCMB, tais amostras foram previamente analisadas pelo método do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MOLOGNONI et al., 2019).

Todas as amostras foram previamente lavadas com água da torneira antes da abertura das cascas e da remoção do conteúdo interno. O tecido foi homogeneizado em um processador de alimentos (Philips Walita, 400 Watt, 60 Hz). Cada amostra foi composta por cerca de 100 g de tecido homogeneizado de vários animais, dependendo do peso e tamanho de cada um. Todas as amostras foram mantidas congeladas ($-4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) até o momento da análise.

4.2 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

4.2.1 Preparo de amostra

O material homogeneizado de mexilhões (n maior que 10) foi pesado em um tubo de polipropileno de 50 mL ($2,0 \pm 0,1 \text{ g}$). Um volume de 10 mL de MeOH:H₂O (90:10, v/v) com 0,1% AA foi adicionado a cada tubo. Em seguida, os tubos foram agitados por 5-10 s em vórtex. Os tubos propriamente fechados foram então alocados imersos no banho de ultrassom por 20 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3844 g por 10 min a 4 °C. Em seguida, os

tubos foram colocados em ultra freezer (-80 ± 2 °C) por 15 min para a LTP. Em seguida, os tubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições descritas acima. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um frasco de HPLC.

Para a extração de referência, o protocolo seguido foi de acordo com o método de Molognoni et al. (2019). Onde, resumidamente, os tubos contendo amostra e solvente de extração foram colocados em um vórtice orbital (Warmnest, Brasil) por 20 min seguido por uma centrifugação (10 min), o sobrenadante foi reservado e o palete residual é re-extraído nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e então colocados a -80°C por 15 min para LTP.

Para as amostras contendo OA, após o procedimento de extração uma etapa de hidrólise alcalina foi necessária: para 2 mL do extrato metanólico $250 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 2,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados em um tubo de 15 mL e então procedeu-se a hidrólise por 40 min a 76 ± 2 °C. Após atingir a temperatura ambiente a mistura foi neutralizada com $250 \mu\text{L}$ de $\text{HCl } 2,5 \text{ mol L}^{-1}$, e a solução resultante foi centrifugada nas mesmas condições já descritas.

As amostras foram diretamente injetadas no sistema LC-ESI-MS/MS.

4.2.2 Otimização do procedimento de extração

O tempo de extração foi avaliado em 10, 20 e 30 min. Duas temperaturas foram avaliadas (23 ± 2 e 45 ± 2 °C), simulando a condição ambiente de extração e a temperatura máxima de aquecimento disponível, respectivamente. O tipo de equipamento de ultrassom também foi avaliado (banho de ultrassom *versus* sonda de ultrassom). As extrações foram realizadas em triplicata e os dados estão expressos como concentrações médias \pm desvio padrão ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Para identificar diferenças significativas entre os procedimentos de extração, os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey ($p < 0,05$).

Com o objetivo de avaliar e otimizar a composição do solvente de extração, foi aplicado um delineamento composto central (CCD). O planejamento experimental (Tabela 3) incluiu três repetições do ponto central e quatro pontos axiais ($\alpha = \sqrt{2}$). O ponto central foi definido a partir do solvente de extração aplicado no método de referência (MeOH:H₂O, 90:10, v/v, com 0,1% AA). A variável de resposta foi a intensidade do sinal do pico cromatográfico (cps).

Tabela 3 Delineamento composto central para extração assistida por ultrassom para biotoxinas marinhas em moluscos.

Ponto	Ponto codificado		Valores reais	
	% MeOH	% AA	% MeOH	% AA
1	-1	-1	80	0,05
2	1	-1	100	0,05
3	-1	1	80	0,15
4	1	1	100	0,15
5 (ponto central)	0	0	90	0,10
6 (ponto central)	0	0	90	0,10
7 (ponto central)	0	0	90	0,10
8 (ponto axial)	-1,41	0	76	0,10
9 (ponto axial)	1,41	0	100*	0,10
10 (ponto axial)	0	-1,41	90	0,03
11 (ponto axial)	0	1,41	90	0,17

% MeOH: porcentagem de metanol na solução de extração; % AA; porcentagem de ácido acético na solução de extração; *: 104% ajustado para 100%. Fonte: Próprio autor.

A melhor condição para composição do solvente de extração foi otimizada pela “função de desejabilidade” de Derringer & Suich (1980). A conveniência geral da extração foi combinada após estabelecer a conveniência individual das respostas para maximizar a extração das toxinas.

Todas as análises de dados e modelagem matemática foram feitas nos *softwares* Statistica v. 13 (Statsoft, Tulsa, EUA) e Action 2.9 (Statcamp, Campinas, Brasil).

4.2.3 Avaliação do método de extração por UAE

Para avaliar o desempenho de extração do método de ultrassom e a adequação do uso de amostras naturalmente contaminadas no desenvolvimento de um novo método de extração, uma amostra em branco foi adicionada a 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ácido domóico, 32 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ácido okadáico, dinophysistonixa-1 e dinophysistonixa-2 e 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de gymnodinetoxina,

pectenotoxina, azaspirácidos-1, -2 e -3. A recuperação da extração e a repetibilidade foram avaliadas em triplicata.

O efeito da matriz foi avaliado conforme proposto por Hoff et al. (2015), comparando dois tipos de curvas de calibração. A primeira foi preparada com soluções padrão diluídas em MeOH (padrão externo ou “S”) e a segunda curva de calibração foi preparada com extrato de amostra sem a presença dos analitos (extrato de matriz branca ou “EMB”), a qual foi submetida a todos os procedimentos de extração e limpeza. Todas as curvas de calibração foram preparadas e analisadas no mesmo dia para garantir maior precisão. Após a análise, as curvas foram plotadas e avaliadas visualmente, e o efeito da matriz foi calculado de acordo com a equação 1:

$$Efeito\ de\ matriz = \left(\left(\frac{\alpha S}{\alpha EMB} \right) \times 100 \right) - 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: αS = coeficiente angular médio de curvas de calibração preparadas com padronização externa em solvente e αEMB = coeficiente angular médio de curvas de calibração preparadas com padronização externa em extrato de matriz branca. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.2.4 Análise quantitativa

O conteúdo de toxinas foi determinado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem com ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS) de acordo com o método de referência. Um sistema 1290 Infinity HPLC da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha) acoplado a um espectrômetro de massa híbrido triplo quadrupolo-linear de armadilha iônica Qtrap 5500 da Sciex (Foster City, CA, EUA) foram usados. Foi utilizada uma coluna de HPLC Zorbax 300 Stand Boat-CN, com 150 x 4,6 mm de comprimento e diâmetro interno e tamanho de partícula de 5 μm , 300 Å (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, EUA). A coluna foi mantida a 35 °C durante as análises.

Volume de injeção foi de 15 μL e o fluxo da fase móvel foi de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$. A fase móvel A foi composta de água com 0,1 % de AF e 2,5 mol L^{-1} de formato de amônio enquanto a fase móvel B composta de acetonitrila com 0,1 % de AF e 2,5 mol L^{-1} de formato de amônio. A eluição se deu em modo gradiente da seguinte forma: de 0 a 2 min (95 % A), de 2 a 4 min

(15 % A), de 4 a 7 min (10 % A) e de 7 a 10 min (95 % A), com 3 min de equilíbrio (95 % A) entre as corridas. Os parâmetros usados para a quantificação estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 Parâmetros de LC-ESI-MS/MS adotados para a determinação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves.

Analito	Íon de quantificação (m/z)	Íon de confirmação (m/z)	EC (V)	DP (V)	Tempo de retenção (min)
DA	312,0 > 266,2	312,0 > 159,0	21 / 31	51	4,56
GYM	508,3 > 490,4	508,3 > 392,4	46 / 46	120	6,01
AZA 1	842,4 > 824,5	842,4 > 806,5	41 / 55	201	8,04
AZA 2	856,5 > 838,5	856,5 > 820,5	41 / 55	136	8,13
AZA 3	829,4 > 811,4	829,4 > 793,5	41 / 53	66	7,86
PTX	876,5 > 823,4	876,5 > 213,2	39 / 51	66	7,05
OA/DTX 2	803,5 > 255,0	803,5 > 113,0	- 62 / - 60	- 120	6,83
DTX 1	817,3 > 255,1	817,3 > 151,1	- 62 / - 58	- 200	7,01
YTX	1141,4 > 1061,6	1141,4 > 855,4	- 52 / - 104	- 160	6,68
hYTX	1155,4 > 1075,6	1155,4 > 896,5	- 62 / - 106	- 300	6,68

EC – Energia de colisão (V); DP – Potencial da fonte (V), Potencial de entrada: 10 V. Analitos: *ESI em modo positivo*: DA – ácido domóico; GYM – gymnodinetoxina; SPX - espirulideo; AZA 1 azaspirácido 1; AZA 2 – azaspirácido 2; AZA 3 – azaspirácido 3; PTX – pectenotoxina; *ESI em modo negativo*: OA – ácido okadáico; DTX 2 - dinophysistoxina 2; DTX 1 - dinophysistoxina 1; YTX – yessotoxina; hYTX – homoyessotoxina. Fonte: Adaptado de Molognoni et al. (2019).

4.3 DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

4.3.1 Preparo do material

A fim de preparar o material de controle de qualidade contendo ácido okadáico (QCM, do inglês *quality control material*), foram coletadas amostras naturalmente contaminadas provenientes do laboratório de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e

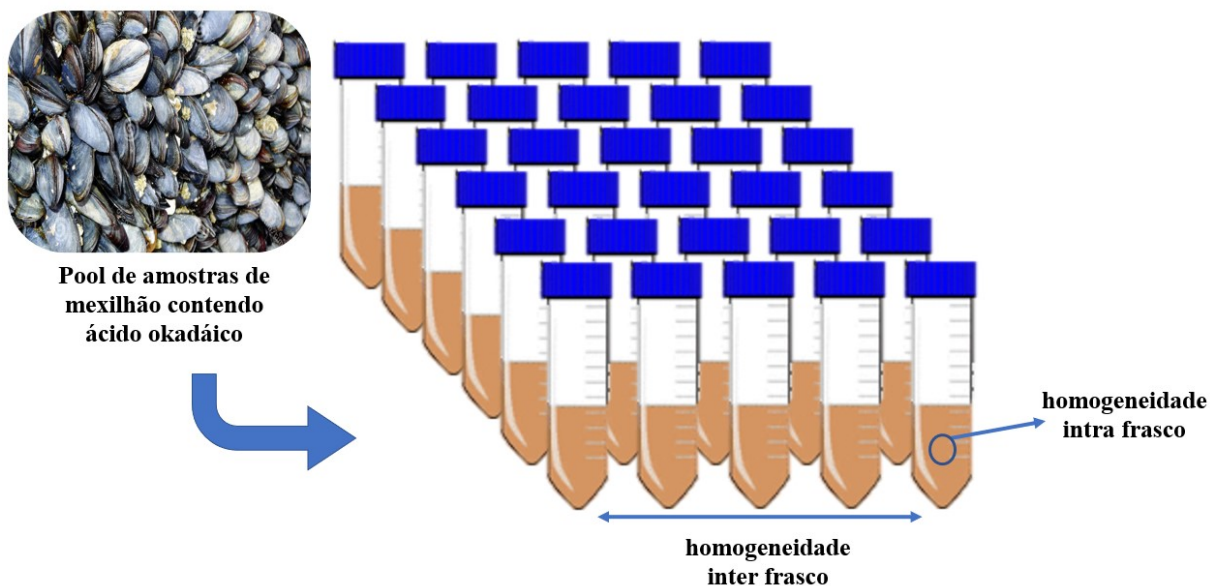
Abastecimento, devidamente descaracterizadas, contendo OA em concentração próxima ao limite regulatório ($160 \mu\text{g kg}^{-1}$). Todas as amostras foram limpas e homogeneizadas conforme item 4.2.1. Para preparar o material, todos os lotes ($n = 23$) foram descongelados e resfriados a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, misturados manualmente. O conteúdo então preparado foi submetido à um moinho analítico (Blixer® 3D Robot Coupe, 750 Watt, 60 Hz), de modo a remover qualquer pedaço de tecido que pudesse ser visualizado (aproximadamente 5 min). O QCM foi então transferido para frascos de 50 mL e armazenado a $-80 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3.2 Avaliação da homogeneidade

Para verificar a viabilidade de uso do QCM para os devidos fins, foi conduzido um estudo de homogeneidade. Foram avaliados um total de 24 pontos do material (*data set*) quanto à homogeneidade intra/frasco (condições de repetibilidade) e homogeneidade inter/frasco (condições de precisão intermediária) (Figura 2). Após a verificar a ausência de *outliers* (*Grubbs test*, 95 % confiança) os resultados foram avaliados por meio da análise de variância – ANOVA. Para estabelecer a homogeneidade do material, foi comparada a incerteza padrão da homogeneidade estimada do QCM em relação ao desvio alvo. Os cálculos podem ser observados no Apêndice B.

A incerteza-padrão combinada (u_c) foi determinada por meio da propagação das incertezas-padrão de entradas experimentais (curva analítica, variabilidade conforme a repetitividade e reprodutibilidade interna e homogeneidade do material) e as herdadas de instrumentos de medida (massa e volume). Por fim, a incerteza-padrão expandida (U_y) foi calculada multiplicando-se o valor de u_c pelo coeficiente de abrangência, com probabilidade de acerto de 95%.

Figura 2 Procedimento adotado para determinar a homogeneidade do material de controle de qualidade interno



Fonte: Próprio autor.

4.3.3 Avaliação da estabilidade

Considerando possíveis atrasos na injeção dos extratos, pausas para manutenção do LC-MS/MS, necessidade de repetir injeções durante as análises, e com o objetivo de avaliar possíveis condições de transporte dos extratos, foi executado um estudo de estabilidade a partir da avaliação de diferentes temperaturas de armazenamento e condições de incidência luminosa. Desse modo, o QCM foi extraído aos 28 dias, 14 dias, 7 dias, 72 horas, 24 horas e “0 hora” (dia da análise instrumental), e foram armazenados sob quatro temperaturas distintas (-30 ± 2 °C; 4 ± 2 °C; 20 ± 3 °C e 37 ± 4 °C). Cada conjunto de amostra foi avaliado também frente à exposição à luz (exposto *versus* protegido).

Todas as amostras do estudo foram submetidas à hidrólise alcalina (conforme item 4.2.1) de forma aleatória e no “tempo zero”, imediatamente antes da análise por LC-MS/MS. Após a aplicação do teste para avaliar a presença de *outliers* (*Grubbs test*, 95 % confiança) a estabilidade foi avaliada por ANOVA *One-Factor*. Para realizar comparações múltiplas onde houve diferença significativa, o teste de Tukey foi aplicado, com nível de significância de 0,05. Os extratos foram considerados estáveis desde que não houvesse diferença significativa entre o “tempo zero”.

4.4 APLICABILIDADE DO MÉTODO UAE EM AMOSTRAS REAIS

Após validar o método de extração no banho de ultrassom, o método foi implementado na SeLAV/SC, situada em São José (SC). Foram analisadas amostras de mexilhões (*Perna perna*) e ostras (*Crassostrea gigas*) provenientes do plano amostral do PNCMB entre agosto e dezembro de 2020.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O programa de controle de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves brasileiro, situado no Estado de Santa Catarina, é relativamente recente e as florações com riscos mais significativos à produção de MB são as de *Dinophysis acuminata*, principal produtora de biotoxinas marinhas lipofílicas, mas também há a presença de *Pseudo-nyctzschia* spp, produtora de ácido domóico. Dessa forma, estas são as principais amostras naturalmente contaminadas presentes no momento dos estudos e que puderam ser utilizadas no desenvolvimento do novo método de extração e no desenvolvimento do QCM. Dessa forma, o estudo foi realizado com foco nas biotoxinas marinhas lipofílicas e ácido domóico, após as etapas de otimização do procedimento extrativo a verificação do desempenho do método foi realizada com todas as biotoxinas marinhas lipofílicas.

5.1 MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM

Principalmente em períodos de floração (desenvolvimento intenso de algas produtoras de toxinas), o volume de amostras a serem analisadas pode chegar a 50 amostras por semana na SeLAV/SC. E, considerando que métodos de triagem de amostras em rotinas de controle devem ser simplificados, a redução do tempo de análise e de etapas de extração são de suma importância para o aumento da frequência analítica. A UAE além de exigir instrumentação simples, demanda poucas etapas de preparo facilitando a extração. Ademais, a UAE pode permitir uma redução do tempo de extração devido ao aumento da energia gerada no sistema, causando um aumento da transferência de massa analito-solvente (TIWARI, 2015).

5.1.1 Otimização da extração por ultrassom

Ao comparar o tempo de extração entre a UAE e o método de referência (item 4.2.1.) foi possível observar que para o DA, independente do tempo as técnicas são equivalentes ($p = 0,144$). No entanto, para a YTX e o OA, é necessário no mínimo 20 min em banho de ultrassom para que a extração seja equivalente ao método de referência ($p < 0,05$) (Tabela 5). Estes resultados condizem com o trabalho de Xu et al. (2019), em que foram empregados 20 min em banho de ultrassom para a extração de AZA, OA e DTX.

Para o grupo de biotoxinas paralisantes, apenas 5 min de ultrassom foram adequados à extração utilizando acetonitrila acidificada (ZHUO et al., 2013a). No entanto, quando avaliamos a extração por 10 min (menor tempo de extração testado), a extração não foi completa. Dessa forma fez-se necessário pelo menos 20 min em banho de ultrassom para atender a extração de todas as biotoxinas avaliadas. De todo modo, o tempo obtido foi igual ou inferior a outros trabalhos publicados (EU-RL-MB, 2011; MOLOGNONI et al., 2019; XU et al., 2019a).

Tabela 5 Intensidade do sinal cromatográfico (cps) para yessotoxina, ácido okadáico e ácido domóico sob diferentes tempos de extração em banho de ultrassom.

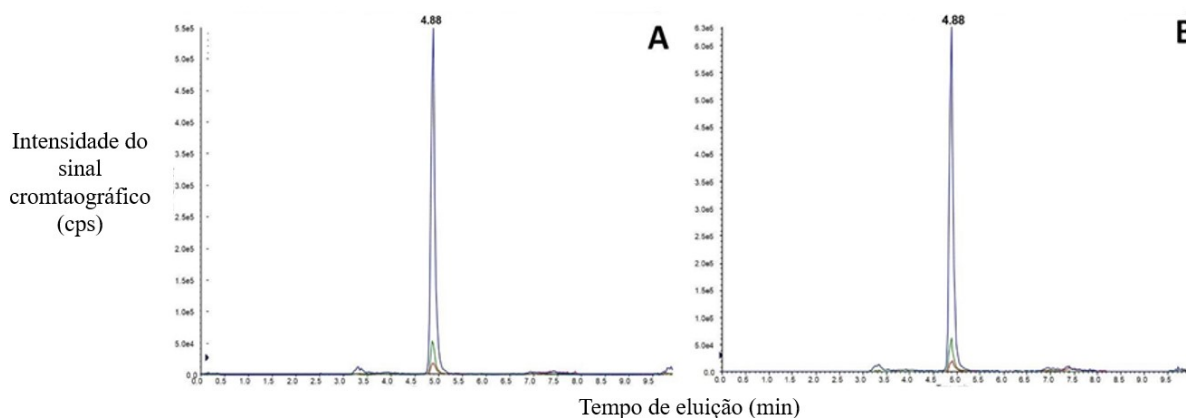
Método	Yessotoxina	Ácido Okadáico	Ácido Domóico
Extração de referência	$4,7.10^3 \pm 1,2.10^3$ ^a	$1,4.10^6 \pm 1,2.10^5$ ^a	$5,8.10^5 \pm 6,2.10^4$
10 min	$3,2.10^3 \pm 1,0.10^3$ ^b	$8,5.10^5 \pm 8,1.10^4$ ^b	$5,3.10^5 \pm 3,9.10^4$
UAE 20 min	$4,4.10^3 \pm 1,2.10^3$ ^{ab}	$1,4.10^6 \pm 8,0.10^4$ ^a	$5,5.10^5 \pm 1,9.10^4$
30 min	$3,7.10^3 \pm 8,5.10^2$ ^{ab}	$1,3.10^6 \pm 6,5.10^4$ ^a	$5,4.10^5 \pm 1,9.10^4$
ANOVA	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p = 0,145$

Valores expressos como sinal de pico cromatográfico (cps). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

Com a extração por UAE não houve nenhum prejuízo à sensibilidade analítica, pois quando comparados os cromatogramas dos dois métodos de extração, todas as transições eluem em tempos de retenção iguais e com intensidade de pico cromatográfico na mesma ordem de grandeza. Assim, como pode ser observado na Figura 3, a extração proposta não interferiu nas condições cromatográficas do método instrumental previamente validado.

Portanto, a UAE ao permitir redução de etapas de transferências de tubos, centrifugações e manuseio das amostras reduziu o tempo de extração em mais de 50 %. Além do maior risco da perda de amostra e conseqüente perda de analitos, a redução de etapas torna a rotina analítica menos laboriosa.

Figura 3 Cromatogramas do ácido domóico para amostra extraída de acordo com o método de referência (A) e o método por UAE (B).



Tempo de retenção do ácido domóico: 4,8 min. Fonte: Próprio autor.

Ao alterar a técnica empregada na extração dos analitos, é interessante avaliar a composição do solvente de extração. Dessa forma, o segundo fator otimizado no desenvolvimento do método extrativo foi o solvente de extração. A partir do planejamento composto central, 11 combinações de solvente foram avaliadas (item 4.2.2). Os modelos para as toxinas foram calculados e validados por ANOVA (Tabela 6). A análise de regressão demonstrou que o modelo matemático era adequado ao propósito, descrevendo adequadamente a influência do metanol na extração dessas toxinas.

A concentração de ácido acético na solução de extração não influenciou significativamente a concentração de nenhuma das toxinas avaliadas. Assim, pode-se utilizar a concentração (dentre as avaliadas – 0,05 a 0,17 % AA) que melhor se adapte às condições cromatográficas, ou mesmo concentrações estabelecidas pelo laboratório em outros métodos.

Tabela 6 Efeitos do delineamento composto central para a composição do solvente de extração.

Resposta ^a	Coeficientes ^b						Regressão		Falta de ajuste	
	Média	A	A ²	B	B ²	AB	F _R	p	F _{la}	p
DA	370702,1*	-89022,7*	-41255,9	26113,6	-16919,1	72525,0	2,41	0,179	4,29	0,195
OA	1631606*	713520*	-629734*	-79924	-86571	83700	38,1	0,001	0,20	0,892
YTX	4815,44*	2040,05	-1390,21	189,29	701,11	-826,50	1,84	0,259	0,32	0,813

^a Sinal do pico cromatográfico para ácido domóico (DA), ácido okadáico (OA) e yessotoxina (YTX).

^b A: % MeOH e B: % AA.

F_R = Quadrado médio da Regressão/ Quadrado médio dos resíduos F_{tab,95%} = 5,05.

F_{la} = Quadrado médio da falta de ajuste/Quadrado médio do erro puro, F_{tab,95%} = 19,16.

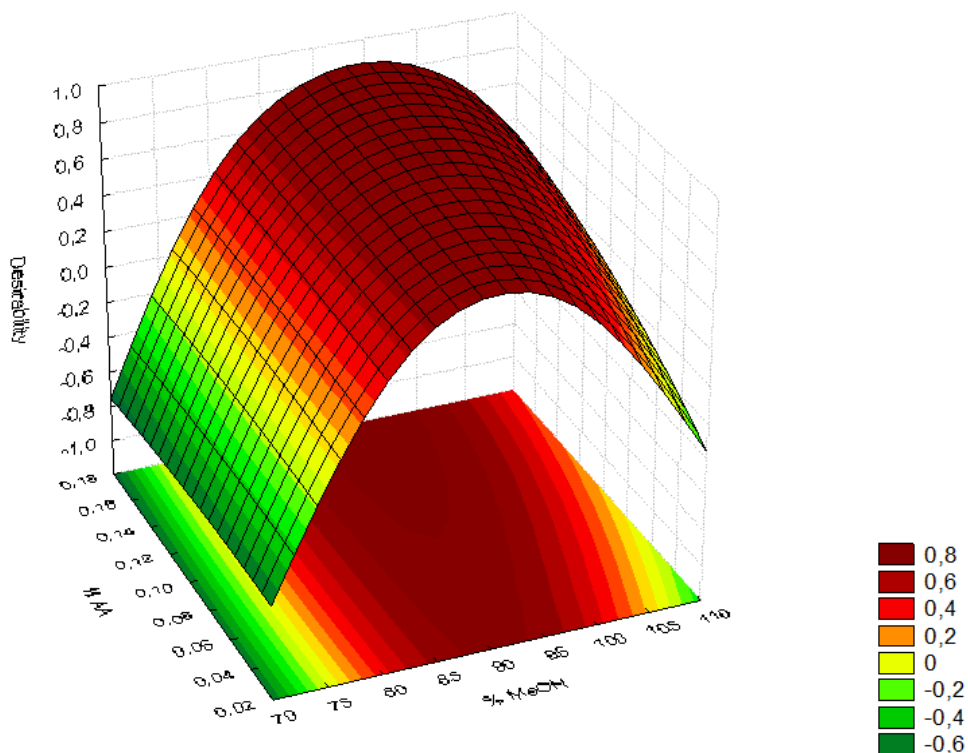
Fonte: Próprio autor.

O rendimento da extração de OA e YTX foi influenciado positivamente pelo aumento da concentração de metanol, resultado condizente com as características lipofílicas destas toxinas. Entretanto, verificou-se a relação inversa para o DA, pois ao aumentar a concentração de metanol ocorreu um decréscimo na concentração. Resultado também condizente com as características hidrofílicas desta toxina (LEFEBVRE; ROBERTSON, 2010). De acordo com o Procedimento operacional padronizado (SOP, do inglês *standard operating procedure*) para DA, sua extração deve ser realizada com metanol em água (1:1). Toda via, Molognoni et al. (2019) propuseram uma extração com metanol:água (9:1) e obtiveram um *z-score* de 0,5 e uma recuperação de 95 % para o DA. O resultado dos autores indicou que concentrações superiores de metanol podem promover a extração de DA com eficiência.

Todos os modelos obtidos foram combinados, através da função de desejabilidade de Derringer, de modo a obter uma condição otimizada para a composição da solução de extração. A função de desejabilidade foi obtida em uma escala de 0 a 1, sendo 1 a condição ideal para todos os modelos. Para os modelos desenvolvidos, foi obtido um valor de desejabilidade global de 0,77, onde as condições do delineamento experimental indicadas foram 0 para a concentração de metanol e 0 para a concentração de ácido acético (ponto central do delineamento experimental). Dessa forma, a solução contendo 90 % de metanol e 0,1 % de

ácido acético apresentou 77 % da desejabilidade para a extração das toxinas avaliadas (Figura 4).

Figura 4 Superfície de desejabilidade para a otimização da concentração de metanol (MeOH) e de ácido acético (AA) no solvente de extração por UAE para ácido domóico, yessotoxina e ácido okadáico.



Fonte: Próprio autor.

Alguns métodos para biotoxinas marinhas empregam aquecimento durante a extração (AOAC, 2000; BEACH; MELANSON; PURVES, 2015), portanto este parâmetro também foi avaliado para a UAE. Entretanto, para todas as toxinas avaliadas o aquecimento em 45 ± 3 °C não influenciou de forma significativa a extração ($p > 0,05$) (Tabela 7). Assim, foi possível concluir que a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) foi suficiente para promover uma extração adequada dos analitos, e que, pequenas variações de temperatura tendem a não interferir na extração destas toxinas, nestas condições. Em virtude de os banhos de ultrassom utilizados no laboratório não apresentarem a funcionalidade de controle de temperatura, não foi possível avaliar outras faixas de aquecimento. Toda via, ao concluir que, sob temperatura ambiente a extração foi adequada, não se fez necessário incluir outra variável no processo de extração.

Tabela 7 Influência do *probe* e da temperatura na extração de ácido okadáico, ácido domóico e yessotoxina por UAE.

	Yessotoxina	Ácido Okadáico	Ácido Domóico
Banho de ultrassom: 23 °C	$1,0 \cdot 10^4 \pm 2,8 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^6 \pm 6,4 \cdot 10^4$ ^a	$5,8 \cdot 10^5 \pm 3,5 \cdot 10^4$
Banho de ultrassom: 45 °C	$1,2 \cdot 10^4 \pm 1,8 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^5$ ^a	$5,9 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^4$
<i>Probe</i>	$7 \cdot 10^3 \pm 1,6 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^6 \pm 6,1 \cdot 10^4$ ^b	$4,9 \cdot 10^5 \pm 6,6 \cdot 10^4$
ANOVA	$p = 0,06$	$p < 0,05$	$p = 0,06$

Valores expressos como intensidade sinal cromatográfico (cps). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

Existem diversos dispositivos que podem ser empregados na UAE, sendo os mais frequentes os banhos de ultrassom e *probes*, ambos com diferentes modelos e aplicações (TIWARI, 2015). Foi avaliada a performance da extração por UAE em banho de ultrassom comparada à extração utilizando o *probe* (Tabela 7) para verificar se poderiam ocorrer ganhos em intensidade de sinal ao utilizar tal instrumento. Durante a execução do procedimento foi possível observar o aumento considerável do tempo despendido na extração do mesmo número de amostras.

Enquanto o banho de ultrassom tem capacidade de extrair diversas amostras simultaneamente, a extração com o *probe* é dependente da quantidade disponível (sendo utilizado um por amostra). Em relação a intensidade do sinal cromatográfico, o uso deste recurso não promoveu ganhos extrativos, somente para o OA, onde o uso do *probe* reduziu significativamente sua concentração ($p = 0,01$). Além do mais, pode ocorrer contaminação entre amostras, caso não ocorra a limpeza adequada do instrumento entre as extrações, podendo afetar a confiabilidade dos resultados. Desse modo, o banho de ultrassom foi considerada a abordagem mais rápida, simples e eficiente em relação ao *probe*.

5.1.2 Avaliação da performance do método de extração

Considerando que o método de extração proposto para as biotoxinas marinhas foi uma proposta de aprimoramento da etapa de extração do método já validado anteriormente pelo grupo de pesquisa da SeLAV/SC, foi aplicado um número mínimo de ensaios para avaliar a performance da UAE, de modo a evitar gasto com padrões. Com os resultados obtidos nesta

etapa de avaliação e durante a rotina de análise, foi possível observar que o método atendeu aos requisitos metrológicos (Tabela 8). As curvas de calibração preparadas tanto em metanol como em extrato de matriz branca apresentaram coeficientes de determinação satisfatórios ($r^2 > 0,98$). Com resultados inferiores a 9 % para desvio padrão relativo (RSD). Ademais, para a repetibilidade intra-dia, a precisão do método se mostrou adequada.

Tabela 8 Resultados da validação parcial do método para UAE de biotoxinas marinhas lipofílicas em moluscos bivalves e análise por LC-MS/MS.

Toxina	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Desvio padrão relativo (%)	Efeito de matriz (%)
DA	40	100	2,5	-8,0
OA/DTX 2	32	98	5,6	-3,0
DTX 1	32	97	4,2	-13,3
GYM	16	70	2,1	-7,2
AZA 3	16	61	8,7	-18,2
AZA 1	16	70	5,6	-11,6
AZA 2	16	76	5,9	-4,9
PTX	16	20	2,1	-67,9

Fonte: Próprio autor.

A exatidão, avaliada em termos de recuperação, se demonstrou satisfatória, com valores de recuperação entre 61 e 100 %. A única exceção foi a pectenotoxina cuja recuperação foi de apenas 20 %, resultado este parcialmente explicado pela alta supressão de sinal (67,9 %). Essa toxina não faz parte das toxinas analisadas pela legislação brasileira (BRASIL, 2012a), portanto deveria ser reavaliada no caso de produtos para exportação. Para os demais analitos o efeito de matriz foi satisfatório, em torno de 3,0 a 18,2 % de supressão de sinal, sendo que o AO/DTX-2 sofreram menor influência da matriz na ionização por *electrospray*, resultado condizente com a alta recuperação destes.

5.2 DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

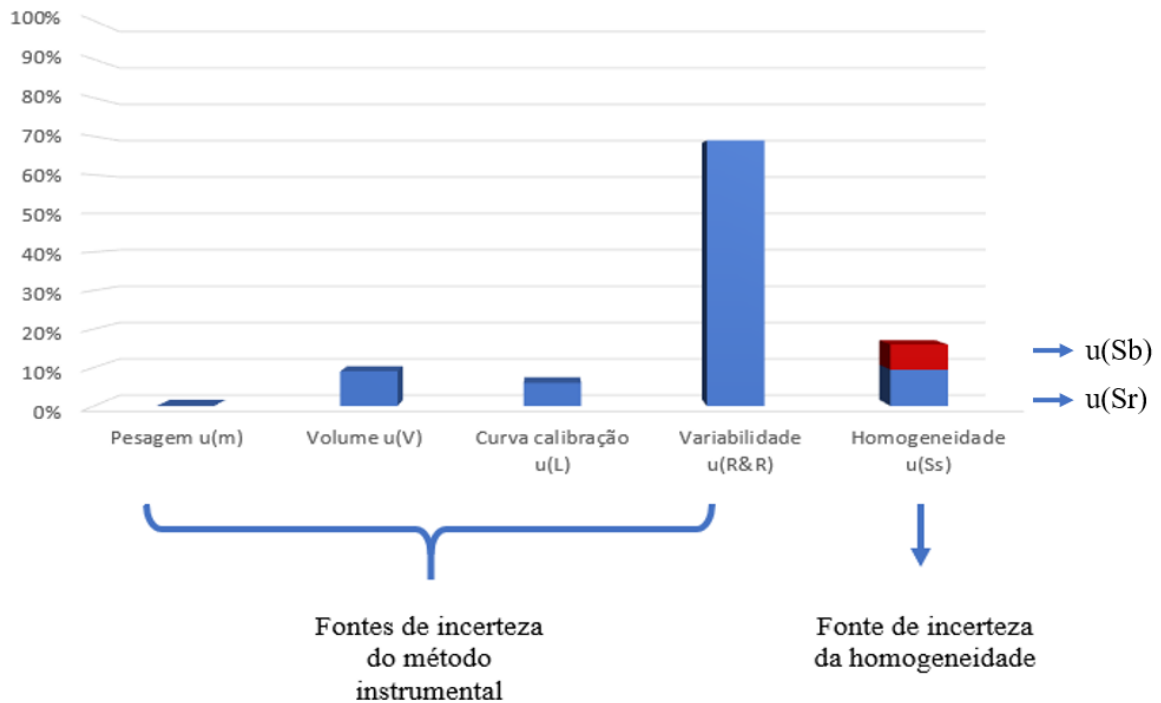
Visando garantir resultados a longo prazo, em rotinas analíticas é fundamental que o método de extração e de análise instrumental estejam de acordo com os parâmetros validados. Para avaliar tais parâmetros, uma abordagem que pode ser empregada é a análise de uma amostra controle com concentração conhecida, por exemplo: CRM, amostras de controle de qualidade ou amostras fortificadas. Entretanto, dependendo da frequência analítica do método, dos custos destes materiais ou padrões, o custo desta abordagem pode ter elevado impacto no custo da análise. Dessa forma, alternativas como a elaboração de amostras de controle *in-house* podem ser desenvolvidas.

Com o intuito de obter uma amostra de controle que represente as condições reais de extração, para promover alta confiabilidade dos resultados, amostras naturalmente contaminadas podem ser a melhor alternativa. Assim, após um longo período com presença de ácido okadáico em mexilhões e ostras nas amostras analisadas pela SeLAV/SC (agosto a novembro de 2019), foi preparado um material contendo OA. Este material foi submetido à um estudo de homogeneidade e estabilidade para ser utilizado como controle de qualidade nas rotinas de análise. Com esse material, durante as rotinas do programa de controle, uma amostra com valor conhecido pode ser extraída e analisada sob as mesmas condições das amostras recebidas.

O material preparado contendo ácido okadáico apresentou homogeneidade satisfatória. Pois a incerteza padrão referente à homogeneidade ($8,20 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi inferior ao desvio alvo ($35,1 \mu\text{g kg}^{-1}$). A fonte de incerteza de maior impacto na homogeneidade do material é referente a repetibilidade intra/frasco ($u(S_r) = 6,72 \mu\text{g kg}^{-1}$), enquanto a repetibilidade inter/frasco ($u(S_b)$), de menor impacto, foi de $4,71 \mu\text{g kg}^{-1}$.

As fontes de incerteza expandida do material preparado foram compostas pela variabilidade do método instrumental e pela homogeneidade do material ($u(S_s)$). De maior impacto, a variabilidade do método representou mais de 65 % da incerteza total do material elaborado, enquanto a homogeneidade correspondeu apenas a 16 % da incerteza total (Figura 5). A concentração de ácido okadáico neste material foi de $227 \pm 45,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 9).

Figura 5 Contribuição das fontes de incerteza na avaliação do material de controle interno desenvolvido.



Fontes de incerteza da homogeneidade do material de controle interno: $u(Sb)$: repetibilidade inter/frasco e $u(Sr)$: repetibilidade intra/frasco Fonte: Próprio autor.

O estudo de estabilidade do material de controle interno foi elaborado de modo a avaliar por quantos dias e quais as condições de armazenamento os extratos se mantem estáveis antes da análise instrumental. Foi considerada a estabilidade da matriz a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ baseado em outros estudos que já avaliaram este parâmetro de toxinas em matriz (MCCARRON et al., 2011, 2015). Contudo, conforme a rotina analítica foi e continua sendo desenvolvida no laboratório, os resultados (em cps) são monitorados, a fim de constatar a estabilidade do analito na matriz proposta.

Tabela 9 Cálculo da incerteza de medição do material de referência contendo ácido okadáico.

Tipo	Fonte	Valor	Valor incerteza	Divisor	u(xi)	Unidade de entrada	Distribuição	Ci	u(yi)	Unidade de saída	V _{eff}	Contribuição
B	Pesagem u(m)	2,0000	0,0001	2,00	0,0000	g	t-Student	98,50	0,0028	µg kg ⁻¹	∞	0%
B	Volume u(V)	20,00	1,0000	2,00	0,50	ml	t-Student	9,85	4,9250	µg kg ⁻¹	∞	9%
A	Curva calibração u(L)	19,70	0,5758	2,00	0,29	µg kg ⁻¹	t-Student	10,00	2,8792	µg kg ⁻¹	17,00	6%
A	Variabilidade u(R&R)	35,20	20,56	1,00	20,56	µg kg ⁻¹	t-Student	1,00	20,5600	µg kg ⁻¹	17,00	69%
A	Homogeneidade u(Ss)	35,19	8,20	1,00	8,20	µg kg ⁻¹	t-Student	1,00	8,2000	µg kg ⁻¹	15,00	16%
								Incerteza combinada (u _c) = 21,34	V _{eff} = 19			
								Incerteza expandida (U) = 45,87	U% = 20			
								Fator de abrangência (K) = 2,15				

Fonte: Próprio autor.

Tabela 10 Efeitos da temperatura e luminosidade em extratos de ácido okadáico em curto período de armazenamento

Temperatura	Luminosidade	0 horas	24 horas	72 horas	7 dias	14 dias	28 dias	p-valor
-30 ± 2 °C	Exposto	22,7 ± 0,8 ^{AB}	25,3 ± 0,9 ^{aA}	21,9 ± 1,0 ^{abAB}	20,3 ± 0,5 ^{cB}	22,9 ± 2,7 ^{AB}	24,6 ± 2,3 ^{AB}	< 0,05
	Protegido	22,7 ± 1,0 ^{AB}	20,6 ± 1,0 ^{bAB}	21,6 ± 0,2 ^{abAB}	25,5 ± 3,2 ^{abA}	23,4 ± 2,6 ^{AB}	19,6 ± 1,2 ^B	< 0,05
4 ± 2 °C	Exposto	22,3 ± 1,2	21,4 ± 0,2 ^b	20,9 ± 0,9 ^b	22,9 ± 1,3 ^{bc}	21,4 ± 1,4	22,0 ± 1,6	0,409
	Protegido	22,3 ± 1,2	21,0 ± 0,3 ^b	22,3 ± 0,7 ^{ab}	24,8 ± 1,6 ^{abc}	23,2 ± 3,4	20,9 ± 0,2	0,102
20 ± 3 °C	Exposto	24,2 ± 2,7	21,0 ± 1,0 ^b	22,0 ± 0,7 ^{ab}	24,7 ± 1,7 ^{abc}	23,8 ± 0,5	21,0 ± 2,2	0,085
	Protegido	23,9 ± 2,5	20,1 ± 0,7 ^b	23,0 ± 0,7 ^{ab}	23,2 ± 1,8 ^{bc}	23,6 ± 1,8	22,8 ± 1,9	0,167
37 ± 4 °C	Exposto	23,1 ± 1,0 ^B	20,3 ± 0,6 ^{bB}	23,2 ± 1,5 ^{abB}	29,0 ± 1,4 ^{aA}	24,2 ± 3,0 ^{AB}	23,0 ± 2,6 ^B	< 0,05
	Protegido	22,9 ± 0,4 ^{AB}	20,6 ± 1,1 ^{bB}	23,5 ± 0,5 ^{aAB}	25,6 ± 1,4 ^{abA}	23,3 ± 1,3 ^{AB}	23,3 ± 2,5 ^{AB}	< 0,05
p-valor		0,755	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,902	0,121	

Exposto: exposto aos efeitos de luminosidade; Protegido: não exposto aos efeitos de luminosidade. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

Sob condições de armazenamento de 4 ± 2 e 20 ± 3 °C a concentração de ácido okadáico se manteve constante por todo o período avaliado ($p > 0,05$). Dessa forma, pode-se inferir que os extratos armazenados sob refrigeração (4 ± 2 °C) ou alocados no *autosampler rack* do cromatógrafo aguardando análise (20 ± 3 °C) se mantêm estáveis por todo o período avaliado. Entretanto, sob as temperaturas extremas avaliadas neste estudo foi possível observar variações na concentração de OA nos extratos ao longo dos dias de armazenamento ($p < 0,05$). Por outro lado, uma possível degradação do AO na matriz poderia ser observada frente a um perfil constante de queda de sinal, o que não foi observado. Deste modo, a variabilidade de sinal para OA pode estar relacionada à própria variabilidade do sistema de LC-ESI-MS/MS, que representa a maior fonte de incerteza no material elaborado (Figura 5).

A concentração de OA nos extratos analisados no tempo 0 horas, com 14 e 28 dias de armazenamento não apresentou diferença significativa independente da temperatura e das condições de luminosidade avaliadas ($p > 0,05$). Para os demais tempos analisados, há diferença significativa entre as temperaturas e a condição de luminosidade de armazenamento ($p < 0,05$), entretanto, para o extrato analisado com 24 e 72 horas de armazenamento, dois pontos em temperaturas distintas apresentaram maiores concentrações, e em 72 horas um ponto apresentou menor concentração que os demais. Tais resultados indicaram a ausência de relação do tempo, temperatura e incidência luminosa na concentração de OA nos extratos metanólicos.

Dessa forma, se demonstra viável o armazenamento e/ou transporte, sob condições de refrigeração, dos extratos metanólicos por até 28 dias, sem que haja prejuízo na quantificação destes extratos. Possíveis alterações de temperatura na faixa de -30 ± 2 a 37 ± 4 °C não seriam prejudiciais, assim como a incidência luminosa (desde que a temperatura não seja superior a 37 ± 4 °C) não promoveria o decréscimo da concentração dos analitos.

5.3 APLICABILIDADE DO MÉTODO

A extração proposta neste trabalho foi utilizada pela Seção Laboratorial Avançada de São José/SC o qual é responsável pelas análises de controle de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves no Estado de Santa Catarina. Amostras provenientes de 39 pontos de coleta distintos, situadas ao longo do litoral do Estado de Santa Catarina foram analisadas. Entre os meses de julho a novembro de 2020 ocorreu o elevado desenvolvimento de *D. acuminata* nestas regiões e foi possível observar a presença de ácido okadáico e dinophysistoxina-1 em mexilhões

(*Perna perna*) e ostras (*Crassostrea gigas*). De agosto a dezembro do mesmo ano foram analisadas 381 amostras pelo método de ultrassom para biotoxinas marinhas em MB, e destas amostras, 74 apresentaram concentração de equivalentes ácido okadáico superior ao limite regulatório, sendo consideradas positivas. A presença de ácido okadáico foi superior à de dinophysistoxina-1.

6 CONCLUSÃO

Ao utilizar a extração assistida por ultrassom foi possível reduzir em 50 % o tempo de extração de um método de triagem para análise de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves. A extração por ultrassom, além de reduzir o tempo de extração, permitiu menor contato do analista com as amostras ao reduzir o número de etapas envolvidas na extração, possibilitando assim evitar possíveis perdas de amostras e consequentemente de analitos.

A abordagem de usar amostras naturalmente contaminadas, contendo analitos representativos das principais classes de biotoxinas marinhas analisadas pelo laboratório, se demonstrou eficaz para o propósito estabelecido. Ao utilizar tal estratégia foi possível avaliar diferentes parâmetros de extração para as biotoxinas marinhas em MB, além de reduzir o consumo de padrões certificados, resultando em um menor custo operacional.

As amostras naturalmente contaminadas permitiram ainda a elaboração de um material de referência contendo $227,8 \pm 45,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ de ácido okadáico. Este material apresentou homogeneidade satisfatória e potencial para ser utilizado como controle analítico da extração proposta ao longo das rotinas. Seus extratos permaneceram estáveis por até 28 dias em temperaturas de até $37 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ independente de incidência luminosa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos podem ser base para iniciar a discussão sobre o desenvolvimento de um protocolo de extração em unidades laboratoriais simples, mais próximas de regiões de cultivo (em outros estados, por exemplo). Assim, a estrutura laboratorial já investida na SeLAV/SC (equipamentos, funcionários, reagentes, entre outros) bem como as aquisições de padrões de toxinas certificados poderiam ser ainda mais aproveitados, ao analisar mais de um estado produtor.

Para tanto, seria necessário avaliar como garantir a rastreabilidade dos resultados. Além desse ponto, a inclusão de outras toxinas no protocolo de extração e a redução do tempo de análise instrumental, ainda podem ser desenvolvidos. Enquadrando-se nos possíveis trabalhos futuros a serem desenvolvidos em parceria da Universidade Federal de Santa Catarina com a SeLAV/SC, com o objetivo de aprimorar o controle das biotoxinas marinhas em moluscos bivalves em Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

- ABALLAY-GONZALEZ, A. et al. Matrix effects on a cell-based assay used for the detection of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish samples. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 33, n. 5, p. 869–875, 2016.
- ALBERO, B.; TADEO, J. L.; PÉREZ, R. A. Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 739–750, 2019.
- AOAC. Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison Biological Method. **AOAC**, p. 1–2, 2000.
- BEACH, D. G.; MELANSON, J. E.; PURVES, R. W. Analysis of paralytic shellfish toxins using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry with liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 9, p. 2473–2484, 2015.
- BOUNDY, M. J. et al. Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1387, p. 1–12, 2015.
- BRASIL. Instrução Normativa Interministerial MPA/MAPA nº 07, de 08 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves, estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. 2012a.
- BRASIL. MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. Portaria MPA nº 204, de 28 de junho de 2012. 2012b.
- BRASIL. MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. Portaria nº 175, de 15 de maio de 2013. 2013.
- BRICELJ, V. M.; SHUMWAY, S. E. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: Occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. **Reviews in Fisheries Science**, v. 6, n. 4, p. 315–383, 1998.
- CIDASC. Cultivos de ostras e mexilhões de Bombinhas e Porto Belo estão interditados devido à presença de toxina diarreica. 06 de ago. de 2019a. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2019/08/06/cultivos-de-ostras-e-mexilhoes-de-bombinhas-57e-porto-belo-estao-interditados-devido-a-presenca-de-toxina-diarreica/>>. Acesso em: 05 de dez. de 2020.

CIDASC. Resultado do Monitoramento de Algas Nocivas e ficotoxinas em Moluscos Bivalves. 30 de nov de 2021. <<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimais/monitoramento-de-algas-nocivas/>>. Acesso em: 05 de maio de 2021.

CIDASC. Secretaria da Agricultura informa interdição preventiva das áreas de cultivo de ostras e mexilhões em Santa Catarina. 22 de ago. de 2014. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2014/08/22/secretaria-da-agricultura-informa-interdicao-preventiva-das-areas-de-cultivo-de-ostras-e-mexilhoes-em-santa-catarina/>>. Acesso em: 05 de dez. de 2020.

CIDASC. Secretaria da Agricultura mantém interdição dos cultivos de ostras e mariscos de Santa Catarina. 25 de out. de 2017. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2017/10/25/secretaria-da-agricultura-mantem-interdicao-dos-cultivos-de-ostras-e-mariscos-de-santa-catarina/>>. Acesso em: 05 de dez. de 2020.

CIDASC. Secretaria da Agricultura mantém interdição preventiva das áreas de cultivo de ostras e mexilhões em SC. 13 de jun. de 2016. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2016/06/13/secretaria-da-agricultura-mantem-interdicao-preventiva-das-areas-de-cultivo-de-ostras-e-mexilhoes-em-sc/>>. Acesso em: 05 de dez. de 2020.

COMMISSION, E. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Official Journal of the European Union**, n. 3, p. 1–29, 2002.

COSTA, P. R. et al. Relevance and challenges in monitoring marine biotoxins in non-bivalve vectors. **Food Control**, v. 76, p. 24–33, 2017.

DEAN, J. R. **Extraction Techniques in Analytical Sciences**. [s.l: s.n.].

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

EU-RL-MB, E. U. R. L. FOR M. B. EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. v. 4, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Marine Biotoxins. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 80, 2004.

FAO. The State of Fisheries and Aquaculture in the world 2018 - Meeting the sustainable development goals. 2018.

FONTANA, I. et al. A sampling plan for phycotoxins surveillance in bivalve mollusc farms along the Santa Catarina coast, Brazil. **Aquaculture**, v. 518, n. October 2019, p. 734732, 2020.

HALLEGRAEFF, G.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. [s.l.] UNESCO Publishing, 1995.

HOFF, R. B. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443–450, 2015.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2017. **Produção Pecuária Municipal**, v. 45, 2017.

INMETRO. Doq-Cgcre-008 - Orientação sobre validação de métodos Analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, p. 31, 2016.

LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida. São Carlos: RiMa, 2004.

LEE, M. E. et al. Reliable quantification of trace diarrhetic shellfish poisoning toxins in high-lipid bivalves by UHPLC-ESI-MS/MS in time segment polarity switching mode: Comparison of three extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 441–449, 2018.

LEFEBVRE, K. A.; ROBERTSON, A. Domoic acid and human exposure risks: A review. **Toxicon**, v. 56, p. 218–230, 2010.

MAFRA, L. L. et al. Multi-species okadaic acid contamination and human poisoning during a massive bloom of *Dinophysis acuminata* complex in southern Brazil. **Harmful Algae**, v. 89, p. 101662, 2019.

MATTAROZZI, M. et al. Optimization of a rapid QuEChERS sample treatment method for HILIC-MS² analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in mussels. **Food Control**, v. 60, p. 138–145, 2016.

MCCARRON, P. et al. A mussel (*Mytilus edulis*) tissue certified reference material for the marine biotoxins azaspiracids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 11, p. 2985–2996, 2015.

MCCARRON, P. et al. A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 3: Homogeneity and stability. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 3, p. 847–858, 2011.

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, p. 2691–2699, 2019.

NSC. Secretaria da Agricultura mantém interdição das áreas de cultivo de ostras e mexilhões em SC. 01 de jul. de 2016. Disponível em: <<https://www.nsctotal.com.br/noticias/secretaria-da-agricultura-mantem-interdicao-das-areas-de-cultivo-de-ostras-e-mexilhoes-em>>. Acesso em: 05 de dez. de 2020.

PERL, T. M. et al. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 25, p. 1775–1780, 1990.

PROENÇA, L. A. O. et al. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. **Harmful Algae News**, v. 33, p. 19–20, 2007.

PROENÇA, L. A. O., FONSECA, R. S., PINTO, T. O. Microalagas em Área de Cultivo do Litoral de Santa Catarina. In: XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010, Paraty. Anais do XIII Congresso Brasileiro de Ficologia- CBFIC 2010, 2010.

REGUEIRO, J. et al. Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish. **Food Chemistry**, v. 129, p. 533–540, 2011a.

REGUEIRO, J. et al. High throughput analysis of amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs by dispersive solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography using a monolithic column. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1884–1891, 2011b.

REY, V. et al. Rapid analysis of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a porous graphitic carbon column. **Food Chemistry**, v. 269, n. May 2017, p. 166–172, 2018.

RODRÍGUEZ, I. et al. A single run UPLC-MS/MS method for detection of all EU-regulated marine toxins. **Talanta**, v. 189, p. 622–628, 2018.

RÚBIES, A. et al. New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1386, p. 62–73, 2015.

SANTOS, A. A. DOS; GIUSTINA, E. G. DELLA. Síntese Informativa da Maricultura 2017. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina**, p. 1–8, 2017.

SAYFRITZ, S. J.; AASEN, J. A. B.; AUNE, T. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 330–340, 2008.

SCHRAMM, M. A. et al. TOXINAS PARALISANTES EM MEXILHÃO Perna perna EM ÁREAS DE CULTIVO DA COSTA SUL DO BRASIL: ESTUDO DE CASO. **ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 443–450, 2006.

SHIN, C. et al. Development and validation of an accurate and sensitive LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish and tunicate. **Food Control**, v. 77, p. 171–178, 2017.

TAN, A. et al. Bioanalytical method development and validation using incurred samples-Simultaneous quantitation of ramipril and ramiprilat in human EDTA plasma by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 29, p. 3673–3680, 2009.

THESE, A.; SCHOLZ, J.; PREISS-WEIGERT, A. Sensitive method for the determination of lipophilic marine biotoxins in extracts of mussels and processed shellfish by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on enrichment by solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 21, p. 4529–4538, 2009.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.

WANG, L. et al. Determination of lipophilic marine toxins in fresh and processed shellfish using modified QuEChERS and ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 272, n. July 2017, p. 427–433, 2019.

WU, H. et al. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 172–180, 2014.

XU, F. et al. Reversed-phase/weak anion exchange magnetic mesoporous microspheres for removal of matrix effects in lipophilic marine biotoxins analysis by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 294, p. 104–111, 2019a.

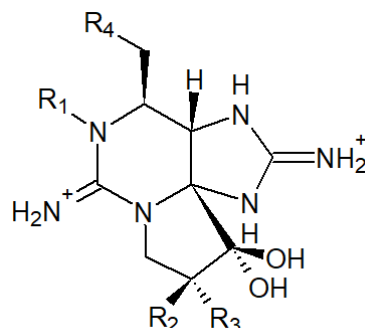
XU, J. L. et al. Simultaneous roasting and extraction of green coffee beans by pressurized liquid extraction. **Food Chemistry**, v. 281, n. December 2018, p. 261–268, 2019b.

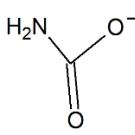
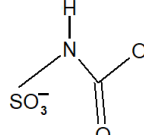
ZHUO, L. et al. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. **Food Chemistry**, v. 137, p. 115–121, 2013a.

ZHUO, L. et al. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. **Food Chemistry**, v. 137, n. 1–4, p. 115–121, 2013b.

APÊNDICE A – Estrutura química das principais biotoxinas marinhas

Estrutura química das principais toxinas paralisantes

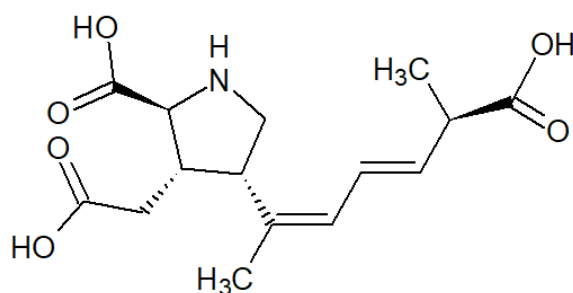


R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
					OH	H
			I	II	III	IV
H	H	H	STX	GNTX5	dcSTX	doSTX
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX2	C1	dcGTX2	
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX3	C2	dcGTX3	
OH	H	H	neoSTX	GNTX6	dcneoSTX	doneoSTX
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX1	C3	dcGTX1	doGTX1
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX4	C4	dcGTX4	

Legenda: ^IToxinas carbamato, ^{II}toxinas N-sulfo-carbamoyl, ^{III}toxinas decarbamoyl, ^{IV}toxinas deoxi-decarbamoyl.

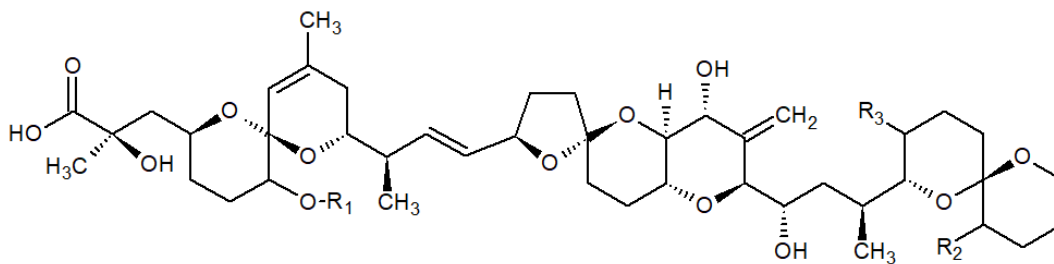
Fonte: Próprio autor.

Estrutura química do ácido domóico



Fonte: Próprio autor.

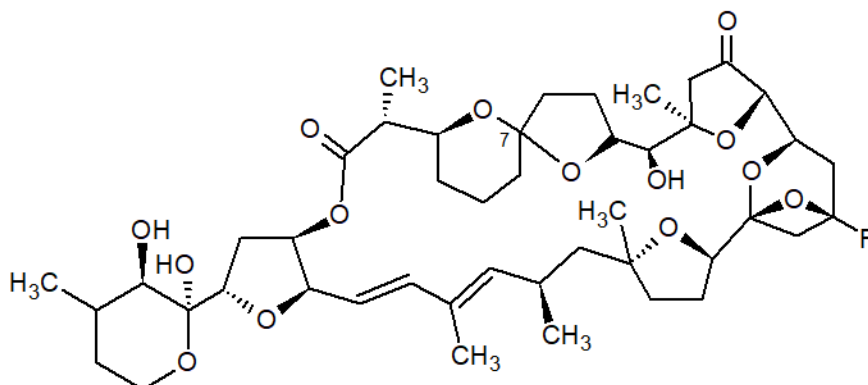
Estrutura química do ácido okadáico e dinophysistoxinas



	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido okadáico (AO)	H	H	CH ₃
Dinophysiotoxina-1 (DTX-1)	H	CH ₃	CH ₃
Dinophysiotoxina-2 (DTX-2)	H	CH ₃	H
Dinophysiotoxina-3 (DTX-3)	acila	CH ₃	CH ₃

Fonte: Próprio autor.

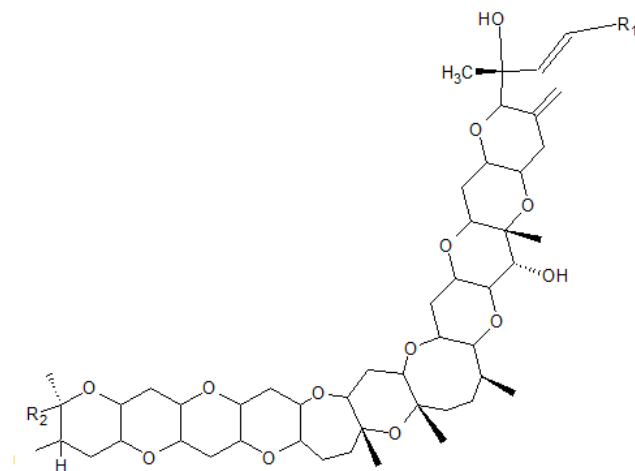
Estrutura química das pectenotoxinas.



	R	C ₇
Pectenotoxina-1 (PTX-1)	CH ₂ OH	R
Pectenotoxina-2 (PTX-2)	CH ₃	R
Pectenotoxina-3 (PTX-3)	CHO	R
Pectenotoxina-4 (PTX-4)	CH ₂ OH	S
Pectenotoxina-6 (PTX-6)	COOH	R
Pectenotoxina-7 (PTX-7)	COOH	S

Fonte: Próprio autor.

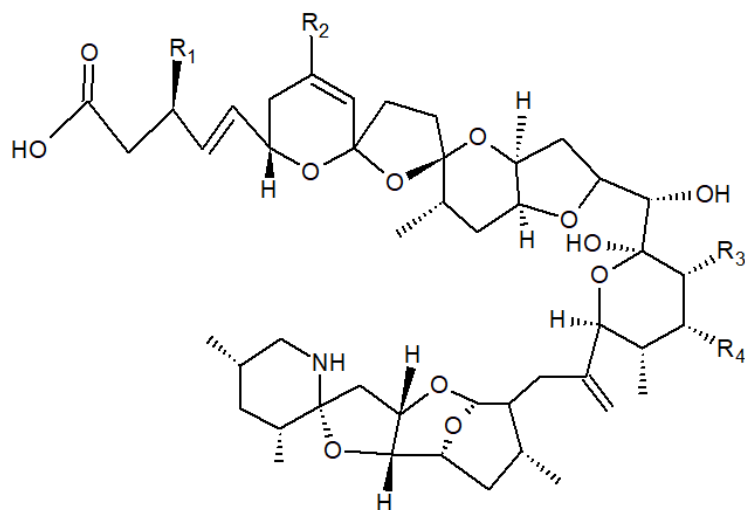
Estrutura química das yessotoxinas.



	R ₁	R ₂
YTX		CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H
45-hydroxy-YTX		CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H
hYTX		CH ₂ CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H
45-hydroxy-hYTX		CH ₂ CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H
Carboxy-YTX		CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H
Carboxy-hYTX		CH ₂ CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H
45-hydroxy-carboxy-YTX		CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H

Fonte: Próprio autor.

Estrutura química dos azaspirácidos.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Azaspirácido (AZA)	H	H	CH ₃	H
Azaspirácido-2 (AZA-2)	H	CH ₃	CH ₃	H
Azaspirácido-3 (AZA-3)	H	H	H	H
Azaspirácido-4 (AZA-4)	OH	H	H	H
Azaspirácido-5 (AZA-5)	H	H	H	OH

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE B – Critério de aceitabilidade para homogeneidade da amostra de controle de qualidade interno

$$u_c(S_S)^2 = u(S_r)^2 + u(S_b)^2$$

Equação 1.

$$u(S_S) \leq \sqrt{2} \cdot t \cdot u(S_{zi})$$

Equação 2.

Onde $u(S_S)$: incerteza padrão da homogeneidade, $u(S_r)$: incerteza padrão referente a repetibilidade (intra/frasco), $u(S_b)$: incerteza padrão referente a precisão intermediária (inter/frasco) $u(S_{zi})$: incerteza padrão do método de ensaio e t : n de distribuição t-student.