

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

AMANDA ANATER

**MICOTOXINAS: UMA ABORDAGEM EM RAÇÃO E PESCADO DE TILÁPIA DO
NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

*(Mycotoxins: An Approach in Fish Feed and Nile Tilapia Fish [*Oreochromis niloticus*])*

CURITIBA

2020

AMANDA ANATER

**MICOTOXINAS: UMA ABORDAGEM EM RAÇÃO E PESCADO DE TILÁPIA DO
NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

*(Mycotoxins: An Approach in Fish Feed and Nile Tilapia Fish [Oreochromis
niloticus])*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientadora: Cláudia Turra Pimpão.

Coorientador: Giuseppe Meca.

CURITIBA

2020



**Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**ATA Nº 020 E PARECER FINAL DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM
CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA AMANDA ANATER**

Aos vinte e sete dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte, às 09:00 horas, realizou-se a sessão pública de defesa da tese da doutoranda Amanda Anater, intitulada: **“Micotoxinas: Uma Abordagem em Ração e Pescado de Tilápia do Nilo (Oreochromis Niloticus)”**. A doutoranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pela Professora orientadora e Presidente da banca, Dra. Claudia Turra Pimpão (PUCPR), auxiliada pelos Professores Doutores Keliani Bordin (PUCPR), Almir Petersen Barreto (PUCPR), Maria José Ruiz (University of Valencia) e Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense (UEL). Procedeu-se à exposição da tese, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a tese, que foi considerada **APROVADA**.

MEMBROS

ASSINATURA

Profa Dra Claudia Turra Pimpão (Presidente)

Profa Dra Keliani Bordin (PUCPR)

Prof Dr Almir Petersen Barreto (PUCPR)

Profa Dra Maria José Ruiz (University of Valencia)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Prof Dra Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro
Bracarense (UEL)

Ana Paula Frederico Loureiro

Proclamado o resultado, a Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Aline Francielle Bueno Rézlaiff, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 27 de julho de 2020.

Aline Rézlaiff

Aline Francielle Bueno Rézlaiff
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Renata Ernlund Freitas de Macedo

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-------------|
| DEDICATÓRIA | vi |
| AGRADECIMENTOS | vii |
| FORMATO DA TESE | viii |
| RESUMO GERAL | ix |
| ABSTRACT | x |
| CAPÍTULO 1 | 11 |
| INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO..... | 11 |
| CAPÍTULO 2 | 24 |
| ASPECTOS DO CONSUMO DE PESCADO E DA CONSCIENTIZAÇÃO DE CONSUMIDORES QUANTO À POSSÍVEL CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS NO PESCADO NA REGIÃO DE CURITIBA-PR, SUL DO BRASIL | 24 |
| CAPÍTULO 3 | 48 |
| COOCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM RAÇÕES PARA PEIXES NO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL E AVALIAÇÃO DE RISCO UTILIZANDO A INGESTÃO DIÁRIA TOLERÁVEL | 48 |
| CAPÍTULO 4 | 71 |
| OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM PESCADO COMERCIALIZADO EM CURITIBA, PARANÁ, SUL DO BRASIL E AVALIAÇÃO DE RISCO PARA O CONSUMIDOR..... | 71 |
| CAPÍTULO 5 | 90 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 90 |
| REFERÊNCIAS | 91 |
| ANEXOS | 96 |

“À Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.”

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me concebido saúde, serenidade e força para concluir mais uma etapa em minha vida.

Ao amor da minha vida, **Deivid Roni Ribeiro** por todo amor, companheirismo, apoio, compreensão e ajuda nos muitos momentos de minha vida, sem ele eu não teria chego até aqui.

Ao meu filho **Lucas Anater Ribeiro**, que mesmo ainda na barriga foi quem me motivou a concluir meu doutorado.

A professora **Cláudia Turra Pimpão** pela orientação, amizade, incentivo, confiança, horas de dedicação, palavras sábias, pela capacidade de me acalmar e encorajar, e que de forma simples e materna conduziu-me neste período importante da minha formação profissional e pessoal.

A todos os professores que contribuíram para minha formação e execução desse trabalho, em especial, ao professor **Giuseppe Meca**, que com seu notório saber me transmitiu valiosos ensinamentos.

A aluna de graduação **Iliaria Pompei**, pelas incansáveis horas no laboratório trabalhando arduamente para que esse trabalho pudesse ser concluído, encarando com vontade cada desafio vencido, além de toda amizade.

Ao **Tiago de Melo Nazareth** e a **Dionisia Carbalho**, por todo apoio, auxílio e ensinamentos na realização das análises, sem vocês com toda certeza tudo teria sido mais difícil.

À **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, a **Capes** e ao programa **MycoKey** pela minha formação profissional e auxílio financeiro.

Aos **meus familiares** e todos aqueles que me apoiaram e torceram por mim em todos os momentos.

Aos demais **alunos de graduação** e **amigos** que de alguma forma contribuíram para a concretização de mais essa etapa da minha vida e pelas palavras de incentivo nas horas mais difíceis.

Por fim, afirmo minha gratidão aos **animais**, companheiros com quem tenho o privilégio de dividir a vida e aprender lições importantes, e pelos quais desenvolvi minha vocação de ser, orgulhosamente, médica veterinária. Em especial a **Nala**, ao **Dunga**, ao **Ruffus**, a **Cacau**, a **Arya**, ao **Carlton**, ao **Urso**, a **Bella**, a **Malu**, a **Duda**, ao **Frajola**, a **Ruby**, a **Lica**, a **Loba Junior**, a **Pandalee**, a **Shiva**, a **Penélope**, a **Juba**, ao **Julian**, a **Nina**, ao **Rabicho Pai**, a **Rabicha Mãe**, ao **Rabicho Junior**, a **Rabicha Filha**, o **Pimenta** e o **Batata** com quem tive ou ainda tenho o privilégio e a felicidade de compartilhar meus dias, tornando-os mais leves, simples e repletos de amor.

Muito obrigada!

FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral com a contextualização do tema e os objetivos do estudo. O capítulo 2 trata-se de artigo científico completo, intitulado: “*Aspectos do Consumo de Pescado e da Conscientização de Consumidores Quanto à Possível Contaminação por Micotoxinas no Pescado na região de Curitiba-PR, sul do Brasil*”, formatado nas normas da revista *Semina: Ciências Agrárias – B1*. O capítulo 3 contempla o artigo científico completo, intitulado: “*Coocorrência de Micotoxinas em Rações para Peixes no Estado do Paraná, sul do Brasil e Avaliação de Risco Utilizando a Ingestão Diária Tolerável*”, formatado nas normas da revista *Aquaculture – A1*. O capítulo 4 contempla o artigo científico completo, intitulado: “*Ocorrência de Micotoxinas em Pescado Comercializado em Curitiba, Paraná, sul do Brasil e Avaliação de Risco para o Consumidor*”, formatado nas normas da revista *Aquaculture Reports – A2*. O capítulo 5 finaliza esta tese através das considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

RESUMO GERAL

Introdução: O consumo de pescado vem acompanhando o crescimento populacional em todo o mundo, sendo que a aquicultura tem ganhado destaque frente à pesca extrativista. Com isso um melhor controle de qualidade das rações é necessário, sendo a verificação de contaminantes uma etapa importante. Um exemplo de contaminantes são as micotoxinas, compostos tóxicos que causam uma ampla variedade de efeitos deletérios em animais e humanos. **Objetivos:** Avaliar os hábitos de consumo de pescado e o conhecimento relativo à micotoxinas da população curitibana, bem como, avaliar a presença de micotoxinas em amostras de ração para peixes e de pescado na cidade de Curitiba, estado do Paraná, sul do Brasil. **Metodologia:** Um questionário contendo 17 perguntas foi aplicado a 358 consumidores de 12 supermercados escolhidos aleatoriamente em 5 regiões da cidade de Curitiba; juntamente com isso um total de 160 amostras de ração para peixes e 160 amostras de pescado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), foram adquiridas de 16 agropecuárias e 16 peixarias selecionadas aleatoriamente na cidade de Curitiba. Todas as amostras foram analisadas através de cromatografia líquida de alta performance acoplada à detector de espectrometria de massas para 21 tipos de micotoxinas. **Resultados:** O pescado mais consumido pela população curitibana é a tilápia, com 64,80% de preferência, sendo o filé o corte de eleição; as principais motivações para essa preferência foram a facilidade de aquisição e de preparo. A grande maioria dos consumidores não soube responder o que são (89,91%) e quais são os efeitos (93,95%) das micotoxinas na alimentação humana. 100% das amostras de ração apresentaram contaminação por alguma das micotoxinas analisadas, sendo que houve coocorrência em 86,80% de pelo menos duas classes distintas desses compostos; a eniatina B (EN B) foi a de maior prevalência (87,50%), enquanto que a fumonisina B₃ apresentou a maior concentração, com média de 498,22 ± 118,96 µg/kg. Somente EN B foi encontrada nas amostras de pescado, com uma prevalência de 86,88% e concentração média de 0,039 ± 0,01 µg/kg. **Considerações finais:** O presente estudo contribui para um melhor entendimento do possível risco de exposição à micotoxinas para peixes e humanos. No geral há um desconhecimento generalizado sobre micotoxinas por parte da população. Medidas de controle e/ou preventivas devem sempre ser adotadas sob o aspecto de contaminação das rações. Aparentemente o consumo de pescado não oferece risco de exposição à micotoxinas para humanos, entretanto estudos para definição de doses toleráveis tanto para humanos, quanto para peixes devem ser realizados a fim de garantir uma melhor avaliação dessa potencial exposição.

Palavras-chave: Consumidores. Fungos. Eniatinas. Peixes. Segurança alimentar.

ABSTRACT

Introduction: The world consumption of fish follows the population growth, and aquaculture has been gaining prominence compared to capture fishing. Thus, better quality control of fish feed is necessary, this involves the verification of contaminants, such as mycotoxins, which are toxic compounds that cause a wide variety of harmful effects on animals and humans. **Objectives:** The objective was to evaluate the fish consumption habits and the knowledge related to the mycotoxins of the Curitiba population, besides to assess the presence of mycotoxins in fish feed and fish meat samples in the city of Curitiba, Paraná state, southern Brazil. **Methodology:** A questionnaire containing 17 questions was applied to 358 consumers from 12 supermarkets chosen randomly in 5 regions of Curitiba; 160 samples of fish feed and 160 samples of fish meat from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), were acquired from 16 agrocenters and 16 fish markets randomly selected in Curitiba city, all samples were analyzed using high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometry for 21 types of mycotoxins. **Results:** The most consumed fish by Curitiba population is tilapia, with 64.80% of preference, the fillet was the presentation of choice; the main motivations for this preference were the ease of acquisition and preparation, the vast majority of consumers do not know what are (89.91%) and what are the effects (93.95%) of mycotoxins in humans. 100% of the fish feed samples showed contamination by some of the mycotoxins analyzed, and the co-occurrence of at least two distinct classes of these compounds was found in 86.80% of the samples, enniatin B (EN B) was the most prevalent (87.50%), while fumonisin B₃ showed the highest concentration with an average of 498.22 ± 118.96 µg/kg. Only EN B was found in fish samples, with a prevalence of 86.88% and an average concentration of 0.039 ± 0.01 µg/kg. **Final considerations:** The present study contributes to a better understanding of the possible risk of exposure to mycotoxins for fish and humans. In general, there is a lack of knowledge about mycotoxins by the population. Control and/or preventive measures must always be adopted regarding the contamination of fish feed. Apparently, fish consumption does not pose a risk of exposure to mycotoxins for humans, however studies to define tolerable doses for both humans and fish must be carried out in order to ensure a better assessment of this potential exposure.

Keywords: Consumers. Enniatins. Fish. Food security. Mold.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, principalmente os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Claviceps* (Ashiq, 2015; Adeyeye, 2016). Esses metabólitos não possuem uma função aparente no metabolismo regular dos fungos. A produção dessas substâncias ocorre principalmente quando os fungos atingem o estágio de maturidade e/ou durante sua fase estacionária (Rocha et al., 2014).

Aproximadamente 400 micotoxinas são conhecidas e podem causar efeitos tóxicos quando ingeridas por animais vertebrados (Escrivá et al., 2017; Liew e Mohd-Redzwan, 2018). Além da ingestão, a exposição à micotoxinas pode também ocorrer via inalação e via contato com a pele (Montanha et al., 2018; Pietsch, 2020).

Algumas dessas micotoxinas são produzidas por mais de uma espécie de fungo, como por exemplo, as aflatoxinas que são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Udomkum et al., 2017). Além disso, alguns fungos podem produzir mais de um tipo de micotoxina, como é o caso do *Fusarium graminearum* que produz tricotecenos e zearalenona (Liew e Mohd-Redzwan, 2018).

Essas toxinas podem ser contaminantes diretos de alimentos como cereais (arroz, milho, trigo, cevada, aveia, entre outros), frutas e nozes, que podem ser ingeridos por humanos e animais (Montanha et al., 2018). Quando ingeridas por animais podem se tornar contaminantes indiretos no leite, ovos, carnes e vísceras (Escrivá et al., 2017).

As mais relevantes encontradas nos alimentos são: aflatoxinas (AFs); ocratoxina A (OTA); tricotecenos (toxinas T-2 e HT-2, deoxinivalenol [DON] e nivalenol [NIV]), fumonisinas (FBs), zearalenona (ZEA) e outras emergentes como fusaproliferina, moniliformina, beauvericina (BEA) e eniatinas (ENs) (Adejumo e Adejoro, 2014; Ashiq, 2015; Jeswal e Kumar, 2015; Nathanail et al., 2015; Adeyeye, 2016).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), cerca de 25% dos cereais produzidos no mundo estão contaminados pelas principais micotoxinas (FAO, 2014; Liew e Mohd-Redzwan, 2018). A contaminação por fungos produtores de micotoxinas nos alimentos pode ocorrer em qualquer estágio da cadeia produtiva: produção, colheita, transporte e armazenamento (Montanha et al., 2018; Pietsch, 2020).

Existem muitos fatores que afetam a produção de micotoxinas nos alimentos, entre eles os fatores físicos: temperatura, umidade relativa e colonização de fungos, fatores químicos: tipo de substrato, uso de fungicidas e fertilizantes, além de condições ambientais, meteorológicas e econômicas, que quando combinadas podem favorecer o crescimento de fungos e a síntese de micotoxinas (Khazaeli et al., 2014).

1.2 Toxicidade

O conjunto de sinais clínicos e alterações causadas pela intoxicação por micotoxinas é chamado de micotoxicose (Rocha et al., 2014). Devido ao fato de que a estrutura molecular varia grandemente entre as diferentes micotoxinas, seus efeitos tóxicos também variam em larga escala (Pitt, 2013), muitas vezes sendo inespecíficos e afetando diferentes sistemas orgânicos. Além disso, a maioria dos sinais clínicos e sintomas das micotoxicoses se apresentam de forma crônica, sendo raras as intoxicações agudas (Gajecka et al., 2013; Khazaeli et al., 2014).

Entre os diferentes efeitos causados pelas micotoxinas, destacam-se os carcinogênicos, os danos renais e hepáticos, os distúrbios gastrointestinais, as desordens reprodutivas, a imunossupressão e a teratogenicidade (Anater et al., 2016). A toxicidade depende primordialmente da estrutura molecular da micotoxina em questão, mas, é influenciada também por fatores como a concentração, o tempo de exposição e o estágio de desenvolvimento do animal acometido. Ademais, efeitos sinérgicos e aditivos podem ocorrer quando há uma combinação de diferentes micotoxinas (Pietsch, 2020).

Sob o ponto de vista do efeito carcinogênico, pode-se classificar as micotoxinas numa escala de 1 a 4 de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 1993; 2012):

1. Agente cancerígeno: evidência científica em humanos → AF;

2. Agentes potenciais: evidência limitada;
 - a. Agente provavelmente carcinogênico: evidência limitada em humanos, mas suficiente em estudos com animais.
 - b. Possivelmente agente cancerígeno: Evidência limitada em humanos e animais → OTA.
3. Agente possivelmente não carcinogênico: as evidências indicam que não é possível classificá-lo como tal de acordo com as informações científicas disponíveis → DON; ZEA; T-2; HT-2;
4. Agente provavelmente não carcinogênico: há evidências para mostrar que o agente não está associado ao câncer em humanos.

1.3. Principais fungos produtores de micotoxinas

Os principais e mais importantes gêneros de fungos produtores de micotoxinas são o *Aspergillus*, o *Fusarium* e o *Penicillium*. A presença desses gêneros de fungos é um fator importante para a diminuição da disponibilidade e/ou do tempo de prateleira de alimentos, já que por meio da produção de micotoxinas eles deterioram a qualidade e higiene dos produtos (Dailé et al., 2010). A Tabela 1 demonstra as principais micotoxinas e os fungos que as produzem.

Tabela 1. Principais micotoxinas e seus fungos produtores (FAO, 2014).

| Gênero e espécie de fungo | Micotoxina produzida |
|-----------------------------------|--|
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ |
| <i>Aspergillus flavus</i> | Aflatoxina B ₁ e B ₂ |
| <i>Fusarium sporothrichioides</i> | Toxina T-2 |
| <i>Fusarium graminearum</i> | Deoxinivalenol, zearalenona |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | Fumonisina B ₁ |
| <i>Penicillium verrucosum</i> | Ocratoxina A |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | Ocratoxina A |

1.3.1 *Aspergillus*

O *Aspergillus* spp. é um gênero de fungo amplamente distribuído na natureza devido à falta de abióticos seletivos e a um mecanismo eficaz de

dispersão de esporos. A maioria das espécies pertencentes a esse gênero cresce em uma ampla faixa de temperatura (6-55° C) e baixa umidade relativa, a qual seu crescimento ótimo parece ocorrer entre 25-30° C. Esta espécie pode viver e se desenvolver em uma ampla variedade de substratos (incluindo polímeros vegetais, fezes e tecidos de animais), pois são capazes de secretar enzimas que os degradam em compostos nutricionais úteis (Hesseltine, 1976; Adejumo e Adejoro, 2014). São considerados fungos de armazenamento, pois geralmente sua contaminação ocorre pós-colheita, durante o processamento e armazenagem (Montanha et al., 2018).

Há estimativas de que existam entre 260 e 837 espécies de *Aspergillus*, algumas das quais são micotoxigênicas, como *A. flavus* e *A. parasiticus* os quais produzem AFs, e o *A. ochraceus* que produz a OTA (Xie et al., 2015).

1.3.2 *Fusarium*

A maioria das 90 espécies do gênero *Fusarium* spp. conhecidas são capazes de produzir metabólitos tóxicos (Escrivá et al., 2015). Sua faixa de temperatura ótima para crescimento é de 10 a 30 °C (Gomes, 2003).

Este gênero de fungo está distribuído nos solos e em substratos orgânicos, podendo afetar a produção vegetal como um todo, por isso são considerados quase que exclusivamente de campo, podendo contaminar os alimentos ainda na planta, mas também na colheita e durante o transporte (Gomes, 2003).

Este gênero produz três das classes mais importantes de micotoxinas: tricotecenos, zearalenonas e fumonisinas. Os tricotecenos são metabólitos secundários com uma estrutura básica semelhante e podem ser classificados em dois tipos de acordo com a estrutura química: tricotecenos do tipo A (toxinas T-2 e HT-2) e tricotecenos do tipo B (nivalenol, DON e seus derivados) (Escrivá et al., 2015; Guerre, 2015).

1.3.3 *Penicillium*

Cerca de 150 espécies deste gênero são reconhecidas e encontradas como contaminantes comuns de vários substratos, sendo capazes de produzir diversas micotoxinas. Suas colônias crescem rapidamente como densos aglomerados de conidióforos e, muitas vezes, apresentam coloração

esverdeada (Castilho, 2007), sendo o principal agente causador da deterioração dos alimentos (Richard, 2007). São contaminantes de pós-colheita, desenvolvendo-se principalmente durante a armazenagem em ambientes fechados (Prencipe et al., 2018).

O crescimento ótimo da maioria das espécies de *Penicillium* spp. parece ocorrer ao redor de 25 °C, porém crescimento considerável pode ocorrer de 20 a 30 °C (Leggieri et al., 2017).

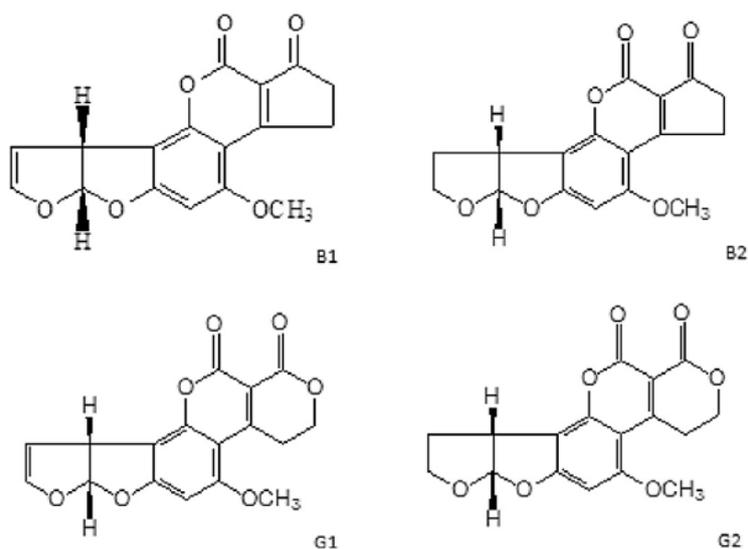
A micotoxina mais importante produzida por esse gênero de fungos é a OTA, porém outras micotoxinas de menor importância também são produzidas, entre elas a citrinina (CIT), o ácido ciclopiazônico, a patulina (PAT) e ácido penicil (Adeyeye, 2016).

1.4 Características gerais das principais classes de micotoxinas

Apesar de serem agrupadas em um grande grupo chamado micotoxinas, essas toxinas produzidas por fungos variam grandemente em estrutura, composição, peso molecular e caracterização química. Isso explica em parte seus diferentes graus de toxicidade, bem como a diferença na resistência a processos químicos e físicos (Bennett e Klich, 2003).

1.4.1 Aflatoxinas

Apesar de serem conhecidos 18 tipos de aflatoxinas, apenas seis possuem destaque na contaminação de alimentos: B₁, B₂, G₁ e G₂ são denominadas dessa forma devido à cor de sua fluorescência sob luz ultravioleta (azul [B = blue] e verde [G = green], respectivamente), além das aflatoxinas M₁ e M₂ (metabólitos de AFB₁ e AFB₂) que são encontradas no leite e carne (Adejumo e Adejoro, 2014; Rocha et al., 2014). A Figura 2 ilustra a estrutura química das aflatoxinas.



Fonte: Rocha et al., 2014.

Figura 2. Estruturas químicas das principais aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂).

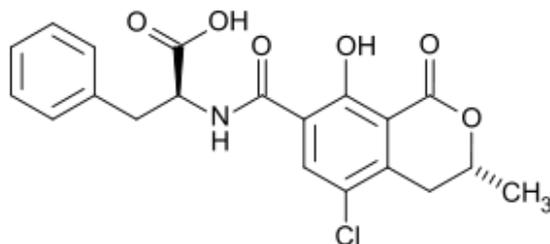
A condição ótima para a produção de aflatoxinas se dá com 33 °C e 0,99 de atividade de água (a_w), entretanto a quantidade e qualidade do substrato podem influenciar a produção (Ashiq, 2015).

Dentre esses seis tipos a AFB₁ é a mais frequentemente produzida por fungos toxigênicos e também a mais estudada, já que é o composto natural com maior potencial carcinogênico que se tem conhecimento (Bennett e Klich, 2003).

No Brasil, as aflatoxinas podem ser encontradas principalmente no amendoim e seus derivados (Caldas et al., 2002), porém também em rações animais, em leite fluido (Pereira et al., 2005), castanha de caju, entre outros alimentos (Rocha et al., 2014).

1.4.2 Ocratoxina A

Na natureza existem diferentes tipos de ocratoxinas (A, B e C, por exemplo), porém a OTA é a mais prevalente, relevante e tóxica desse grupo (Adejumo e Adejoro, 2015; Liuzzi et al., 2017). Sua nomenclatura deriva da primeira espécie de fungos da qual foi isolada, o *A. ochraceus* (Adejumo e Adejoro, 2015). A faixa temperatura e a_w ideais para produção da OTA são de 25 a 30 °C e 0,98, respectivamente (Ashiq, 2015). A estrutura química da OTA está ilustrada na Figura 3.



Fonte: Rocha et al., 2014.

Figura 3. Estrutura química da ocratoxina A.

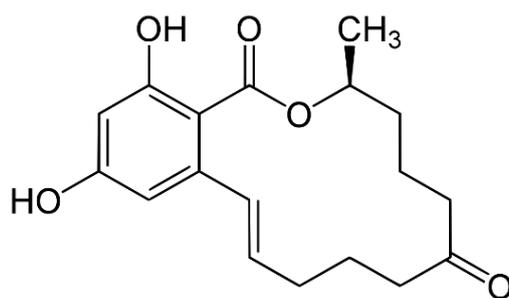
Essa micotoxina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e é removida lentamente, possuindo uma meia-vida relativamente longa no organismo de mamíferos, sendo detectada em amostras de sangue (Pitt, 2013). Uma das características da intoxicação por OTA é a nefrotoxicidade, que ocorre tanto em animais de produção como em humanos (Matejova et al., 2017).

Pode estar presente principalmente em cereais de inverno (aveia, trigo e cevada) (Rocha et al., 2014), mas também em arroz, milho e feijão (Caldas et al., 2002), além de grãos de café, cacau, vinhos, entre outros (Ashiq, 2015).

1.4.3 Zearalenona

O nome zearalenona deriva de seu fungo produtor *F. graminearum*, mais especificamente de seu teleomorfo que é denominado *Gibberella zeae*, e também da sua estrutura química que possui uma cetona (Bennett e Klich, 2003). Esses autores sugerem que ela não seja uma toxina propriamente dita, pois dificilmente apresenta sinais graves de toxicidade.

Seus efeitos biológicos se devem principalmente a semelhança de sua estrutura química (Figura 4) com o estradiol, principal hormônio produzido nos ovários de mamíferos, tanto que também é chamada de micoestrógeno (Ashiq, 2015). Devido a essa semelhança, os principais sinais encontrados em intoxicações por zearalenona são relacionados ao sistema reprodutivo: redução da libido, anovulação, hiperestrogenismo, problemas de concepção, abortos, entre outros (Zinedine et al., 2007; Matejova et al., 2017).



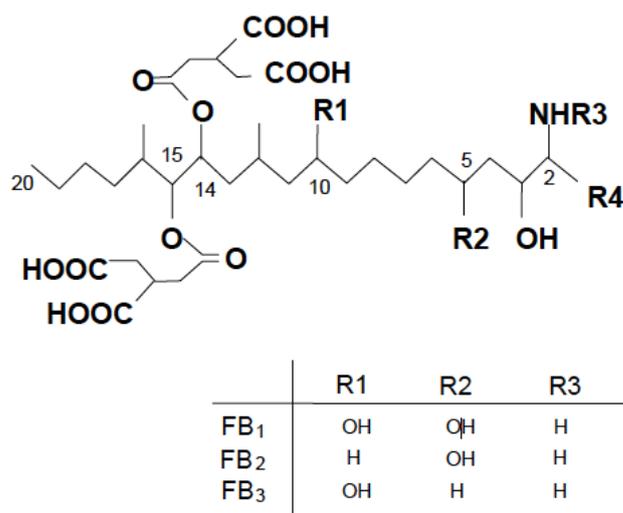
Fonte: Rocha et al., 2014.

Figura 4. Estrutura química da zearalenona.

Como toda micotoxina produzida pelo gênero *Fusarium* spp., sua contaminação ocorre ainda no campo, em lavouras de cereais (trigo, cevada, aveia, arroz e milho) (Oliveira et al., 2002; Rocha et al., 2014).

1.4.4 Fumonisinás

As fumonisinás constituem um grupo que inclui 16 substâncias separadas em grupo B (FB₁, FB₂, FB₃ e FB₄) que variam principalmente na composição química e combinação de seus radicais (Figura 5), grupo A (A₁, A₂, A₃, AK₁), e nos grupos de menor importância C (C₁, C₃, C₄) e P (P₁, P₂, P₃, PH_{1a} e PH_{1b}) (Ah-Seo e Won Lee, 1999; Rocha et al., 2014).



Fonte: Minami et al., 2004.

Figura 5. Estrutura química das fumonisinás B₁, B₂ e B₃.

Entretanto, somente os grupo B e A são consideradas relevantes na toxicologia (Ahangarkani et al., 2014). Dentro do grupo B, a FB₁ é o metabólito mais abundante e tóxico, representando cerca de 70% nos alimentos naturalmente contaminados, já a FB₂ e FB₃ ocorrem em menores concentrações (Escrivá et al., 2015).

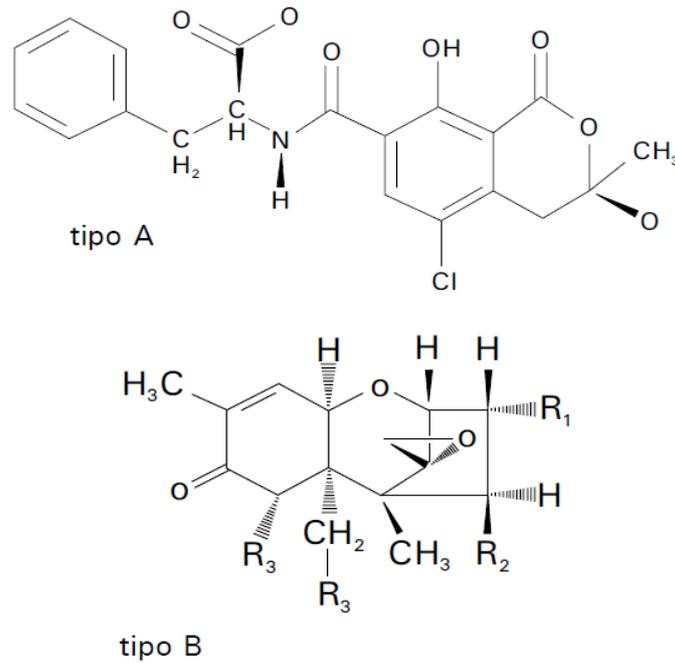
As fumonisinas têm uma estrutura semelhante à esfingosina e esfinganina, componentes importantes no metabolismo de esfingolípídeos da membrana celular; essa similaridade ocasiona alterações na permeabilidade e na comunicação celular, levando à diferentes efeitos adversos em espécies distintas, por exemplo: leucoencefalomalácia em equinos (Ahangarkani et al., 2014), edema pulmonar em suínos (Pitt, 2013) e câncer de esôfago em humanos (Escrivá et al., 2015).

Temperaturas de 15 a 30 °C e a_w de 0,90 a 0,99 foram reportadas como sendo as condições ótimas para que ocorra a produção de FBs (Ashiq, 2015). Como o principal fungo produtor (*F. verticillioides*) é endofítico da cultura de milho (Bennett e Flicht 2003), as fumonisinas são encontradas comumente em alimentos e rações à base desse cereal (Rocha et al., 2014), entretanto podem contaminar outros tipos de alimentos à base de cereais.

1.4.5 Tricotecenos

Mais de uma centena de tricotecenos são conhecidos e de acordo com a estrutura química são divididos em quatro grandes grupos: A, B, C e D; porém apenas os grupos do tipo A e B possuem importância sob o ponto de vista toxicológico; esses são representados principalmente pelas toxinas T-2 e H-T2 (grupo A) e deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) (grupo B) (Escrivá et al., 2015; Matejova et al., 2017).

A diferença básica entre os grupos A e B é pela estrutura química (Figura 6), os quais são considerados macrocíclicos e não-macrocíclicos, respectivamente (Bennett e Flicht, 2003).



Fonte: Freire et al., 2007.

Figura 6. Estruturas químicas dos tricotecenos do grupo A e grupo B.

As condições ótimas para a produção de tricotecenos desses grupos (A e B) parece ser obtida com uma temperatura de 30 °C e a_w de 0,99, porém com um período de cerca de 43 dias de incubação (Ashiq, 2015).

De forma geral, os tricotecenos afetam a síntese proteica das células, causando uma disfunção celular grave principalmente em tecidos de rápida regeneração (Escrivá et al., 2015), além disso, possuem rápida absorção através do sistema digestório (Pinton e Oswald, 2014), o que pode explicar os principais sinais clínicos e sintomas presentes nas intoxicações por DON e T-2: recusa de alimentos, vômitos, diarreias, hemorragias orais e nasais, entre outros (Bennett e Flicht, 2003; Matejova et al., 2017).

Geralmente são encontrados em cereais (cevada, trigo, milho, aveia, sorgo e centeio) e por possuírem alta estabilidade térmica (Ashiq, 2015) também podem estar presentes nos produtos derivados dos cereais (Gonçalves et al., 2017; Piacentini et al., 2017).

1.5 Legislação

A presença das micotoxinas em alimentos possui efeito negativo no comércio internacional, invariavelmente levando a perdas de ordem financeira.

Diversos países estabeleceram legislações objetivando a proteção de suas cadeias produtivas e também de seus consumidores, contra os potenciais efeitos nocivos causados pela presença de micotoxinas em alimentos destinados à alimentação animal e/ou humana (Anukul et al., 2013).

Desde 1965 uma comissão conjunta entre a FAO e a Organização Mundial da Saúde (OMS) reúne um comitê de especialistas em aditivos alimentares (*Joint Expert Committee on Food Additives* [JECFA]). Esse comitê avalia a presença e o risco de diversos compostos presentes nos alimentos: aditivos alimentares, compostos tóxicos naturais, poluentes e resíduos de produtos veterinários, com a finalidade de limitar o risco de contaminação para a população (JECFA, 2001).

Ferrão et al. (2017) citaram que cerca de 100 países possuem normas e regulamentações para o controle dos níveis de micotoxinas em alimentos e em rações destinadas a alimentação animal. Para a formulação dessas regulamentações o tipo de alimento e o tipo de micotoxinas foram levados em consideração, já que há diferenças no consumo dos alimentos e também na presença e níveis de micotoxinas em determinados alimentos (Nones et al., 2017).

A Comissão da Comunidade Europeia (EC) através do regulamento 1881/2006 estabelece os limites máximos de algumas micotoxinas nos alimentos para garantir a saúde humana, como por exemplo, AFB₁ nos alimentos deve permanecer entre 0,1 e 8 µg/kg; para OTA, esse limite deve encontrar-se entre 0,5-10 µg/kg, para PAT entre 10-50 µg/kg, para DON entre 200-1750 µg/kg e para FBs entre 200-2.000 µg/kg (EC, 2006).

Os limites máximos de AFB₁ para alimentação animal na Europa foram estabelecidos no Regulamento de 07 de maio de 2002; rações para peixes, por exemplo, possuem um limite de 20 µg/kg dessa micotoxina (EC, 2002).

De forma semelhante a outras normativas (União Europeia e Estados Unidos da América), no Brasil a legislação referente aos limites máximos de micotoxinas presentes nas dietas humanas foi atualizada em 2011 (ANVISA, 2011). A resolução RDC n° 07, de 18 de fevereiro de 2011, desenvolvida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentou limites de aplicações imediatas para diversas micotoxinas (AFs, OTA, DON, FBs, ZEA e PAT), a aplicação desses limites tinha como prazo final o ano de 2016, porém

esse prazo foi alterado para 2017, visando uma melhor avaliação dos limites a partir de uma maior quantidade de dados disponíveis que retratem a realidade nacional, ou seja, que sejam suficientes para a segurança do consumidor, porém com o menor impacto possível na produção (Nones et al., 2017).

Cabe também ressaltar que produtos brasileiros destinados à exportação devem seguir as legislações estipuladas pelo país de destino do produto. Como exemplo, pode-se citar o regulamento nº 1152/2009, publicado pelo Jornal Oficial da União Europeia (EC, 2009), o qual regulamenta que 100% das amostras de castanhas do Brasil devam ser analisadas. A amostragem e os laudos de análise, para estes casos, devem ser realizados de acordo com o Regulamento nº 519/2014, os quais são analisados por fiscais do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelos laboratórios oficiais e/ou credenciados (EC, 2014).

Entretanto, para alimentação animal a legislação brasileira é considerada antiga e permissiva, visto que o MAPA estabelece somente os níveis de AFs somadas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em qualquer matéria prima a ser utilizada de forma direta ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal, esse limite é de 50 µg/kg e foi definido em 1988 (DOU, 1988). Desde lá não houve atualizações desses níveis e nem a inclusão de outras micotoxinas importantes na produção animal (Fonseca, 2010).

Há também a percepção de que no Brasil a portaria citada não é cumprida com o devido rigor, já que as fiscalizações parecem ser esporádicas e os laboratórios encarregados de realizar as análises na sua maioria estão desprovidos de mão de obra e de insumos especializados (Freire et al., 2007).

Entretanto, as discrepâncias das legislações que tratam de micotoxinas nos países da América Latina parecem não ser muito diferentes das discrepâncias observadas entre países desenvolvidos, pois em ambas as situações há grandes variações nas concentrações permitidas para uma mesma micotoxina em diferentes nações (Anater et al., 2016; Montanha et al., 2018).

Por outro lado tem-se observado uma tendência de harmonização das legislações em todos os continentes, bem com uma tendência à redução dos limites máximos permitidos especialmente para as AFs e, além disso, é

provável que em virtude do crescente comércio de alimentos entre os países, ocorra uma harmonização da legislação para micotoxinas em nível global.

2 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o grau de conhecimento ou conscientização da população curitibana em relação à possível contaminação de pescado com micotoxinas e os hábitos de consumo de pescado pela população.

Objetivou-se também avaliar através de cromatografia líquida de alta performance acoplada a um detector de espectrofotometria de massas (LC-MS/MS-LIT) a presença de micotoxinas em pescados e ração para peixes comercializados em Curitiba, Paraná. Com isso estimar a provável ingestão diária pelos animais e humanos das micotoxinas encontradas nessas amostras.

CAPÍTULO 2

(Artigo científico que será submetido para publicação no periódico
Semina: Ciências Agrárias)

Aspectos do Consumo de Pescado e da Conscientização de Consumidores Quanto à Possível Contaminação por Micotoxinas no Pescado na região de Curitiba-PR, sul do Brasil

Amanda Anater^{1*}, Bruno Machuca Thon¹, Francisco Pizzolato Montanha¹,
Saulo Henrique Weber¹, Deivid Roni Ribeiro², Cláudia Turra Pimpão¹

¹ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, 80215-901, Brasil.

² Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR, 80035-050, Brasil.

* AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA:

Amanda Anater

E-mail: amanda_anater@hotmail.com

Telefone: +55xx41988244049

ABSTRACT

Fish meat represents an important source of food worldwide. Global per capita fish consumption reached a record of 20 kg in 2016. In recent years contamination of food products by toxigenic fungus and its toxins have been treated with greater attention. An important consideration should be given to the indirect human contamination by the consumption of fish from intensive fish farming, such as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with possible mycotoxin contaminated feed. This study aimed to evaluate the aspects of Nile tilapia meat consumption and consumer awareness of potential mycotoxin contamination of fish in Curitiba, Paraná, south Brazil. A pre-established questionnaire was used to obtain this information. The questionnaire was adapted to the needs of the project and applied in five different regions of Curitiba. All major supermarkets

for each region were listed and randomly selected by picking up to three supermarkets per region. A total of 358 questionnaires were applied to consumers, approximately 70 questionnaires per region. For data analysis, the Spearman correlation test was employed by using the Statgraphics software. It was observed that many of the demographic data obtained through the questionnaires significantly influenced the frequency of fish consumption (education level, age, gender and social class). It was also observed that 64.80% of respondents prefer Nile tilapia meat instead other fish meat available on the supermarkets, 89.91% of people do not know what mycotoxins are, 93.95% do not know what mycotoxins can cause to human and animal health and 86.17% were not aware of any disease that can be carried or transmitted by fish meat. It was noted that education level had a significant correlation with the issues mentioned above, demonstrating that levels of education influences on the awareness about of foodborne diseases. The conclusion is that the most consumed fish by consumers is Nile tilapia, and it is important because this specie is reared in captivity, so should be exposed to mycotoxins. Furthermore, the consumers unknown what are mycotoxins and its negative impact on human health, as well as the possibility of mycotoxins presence. There is also a widespread ignorance regarding diseases caused by fish meat contaminants.

Keywords: Food safety. Nile tilapia. *Oreochromis niloticus*. Pisciculture. Toxins.

RESUMO

A carne de pescado representa uma importante fonte de alimentos em todo o mundo. O consumo anual de pescado per capita global atingiu seu recorde de 20 kg em 2016. A contaminação de produtos alimentícios por fungos toxigênicos e suas toxinas tem sido tratada com maior atenção nos últimos anos. Uma importante consideração deve ser feita quanto à contaminação humana indireta pelo consumo de peixes provenientes de piscicultura intensiva, em especial a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que são alimentadas com ração que pode estar contaminada por micotoxinas. Este estudo teve como objetivo avaliar os aspectos do consumo do pescado de tilápia do Nilo e da conscientização dos consumidores quanto à possível contaminação do pescado por micotoxinas na cidade de Curitiba, Paraná, sul do Brasil. Foi

utilizado um questionário pré-estabelecido para a obtenção destas informações. O questionário foi adaptado às necessidades do projeto e aplicado em cinco diferentes regiões de Curitiba. Em cada região todos os grandes supermercados foram listados, e posteriormente até três supermercados por região foram definidos aleatoriamente através de sorteio. Foram aplicados 358 questionários aos consumidores desses supermercados, totalizando-se aproximadamente 70 questionários por região. Foi feita a análise descritiva dos dados e, para a análise estatística foi empregado o teste de correlação Spearman, utilizando-se o *software* Statgraphics. Observou-se que muitos dos dados demográficos obtidos através dos questionários influenciaram significativamente a frequência de consumo de pescado (ex. idade, gênero e classe social). Um total de 64,80% dos entrevistados preferiu carne de tilápia do Nilo em detrimento de outras espécies de peixes, 89,91% das pessoas não sabiam o que são micotoxinas, 93,95% não sabem quais danos as micotoxinas podem causar a saúde humana e animal e 86,17% não conheciam nenhuma doença relacionada ao consumo de pescado. No geral, a escolaridade teve correlação significativa com as questões citadas acima, demonstrando que níveis de escolaridade mais baixos influenciaram negativamente a percepção sobre doenças carregadas por alimentos. Concluiu-se que o pescado mais consumido pela população amostrada é a carne de tilápia, ou seja, de animais criados em cativeiro e com possibilidade de exposição à micotoxinas, além disso, os consumidores desconhecem o que são micotoxinas e seus impactos negativos na saúde humana, bem como da possibilidade da presença das mesmas no pescado. Há também um desconhecimento generalizado sobre doenças causadas por contaminantes presentes no pescado.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*. Piscicultura. Tilápia do Nilo. Toxinas. Segurança alimentar.

1 INTRODUÇÃO

A pesca e aquicultura representam importantes fontes de alimentos em todo o mundo, essa importância tende a crescer, já que o consumo anual *per capita* global atingiu o recorde de 20 kg em 2016 (FAO, 2018). Além disso,

ambas são consideradas pela Organização das Nações Unidas (ONU) como atividades estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta, pois são capazes de fornecer fontes proteicas de alta qualidade nutricional (Bombardelli et al., 2005).

Um fator que contribui para importância e crescimento desse tipo de alimentos é a percepção por parte dos consumidores de que são alimentos facilmente digeríveis, altamente proteicos e de baixo valor calórico, comparados aos demais alimentos proteicos disponíveis no mercado (Gonçalves et al., 2008).

Entretanto, como em toda a cadeia de produção de alimentos, mais especificamente de produção animal, esse crescimento deve ocorrer de forma ordenada e sustentável, com garantia de qualidade e de procedência/rastreabilidade. Sob o ponto de vista de qualidade, um dos pontos a ser controlado é a presença de contaminantes. Dentre eles as toxinas produzidas por fungos apresentam relativa importância, pois podem ser encontradas em todas as etapas do ciclo produtivo e/ou consumidor (Cruz, 2010; Montanha et al., 2018).

Com o aumento da demanda global de pescados, a piscicultura intensiva vem ganhando espaço em relação à pesca ou extrativismo (FAO, 2018), porém para que seja obtida elevada produtividade em larga escala, o uso de rações balanceadas é imprescindível, ou seja, assim como em outros sistemas intensivos de produção animal, os animais são alimentados com rações potencialmente contaminadas por micotoxinas (Atayde et al., 2014), podendo acarretar em resíduos desse contaminantes no produto final.

Um exemplo desse potencial risco é o consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas e/ou ocratoxina o qual é potencialmente perigoso para a saúde humana por indução de efeitos agudos e crônicos com impacto teratogênico, carcinogênico e/ou imunossupressor (Abd-Elghany e Sallam, 2015).

Este estudo teve como objetivo avaliar os aspectos relacionados ao consumo do pescado e a conscientização dos consumidores quanto à possível contaminação do alimento por micotoxinas na cidade de Curitiba, Paraná, sul do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob parecer de nº 2.310.264, 2ª versão (Anexo 1).

O delineamento experimental possuiu caráter observacional transversal, no qual uma amostra da população de consumidores de supermercados da cidade de Curitiba foi entrevistada no interior desses estabelecimentos. Todos os entrevistados possuíam mais de 18 anos de idade no momento da entrevista. Ao iniciar a abordagem dos consumidores, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 2) era apresentado para conhecimento dos participantes com posterior assinatura para autorização da divulgação dos resultados da pesquisa.

O questionário utilizado no estudo foi adaptado de Gonçalves et al. (2008) e Flores et al. (2014), sendo que sua versão final continha 17 questões de múltipla escolha, abordando aspectos relativos ao nível educacional, aos aspectos do consumo de pescado criado em cativeiro e ao conhecimento relativo à micotoxinas (Anexo 3). Todos os questionários foram aplicados para clientes de supermercados previamente selecionados em cinco regiões (norte, sul, leste, oeste e central) da cidade de Curitiba, no Paraná.

A seleção inicial dos supermercados foi realizada através de busca na internet utilizando a plataforma de pesquisa do Google® (Google, 2018). Os termos utilizados para a busca e seleção foram adaptados de Moutinho et al. (2015): “supermercado” + “Curitiba” + “PR” + “região”.

Utilizando os termos citados, a plataforma de busca retornou ao todo 130 resultados, os quais foram listados, numerados e separados por região. Utilizando o *software* Excel® (Microsoft Corporation, 2011), aproximadamente 10% dos estabelecimentos de cada região foram selecionados aleatoriamente com o auxílio do comando “aleatório”. Do total de 130 mercados, 12 foram selecionados.

Para a apresentação dos dados foi utilizada estatística descritiva, com números absolutos e relativos de cada alternativa em relação ao número de entrevistados ou de respondentes das questões específicas.

O teste de correlação de Spearman foi aplicado para avaliar possíveis correlações entre as respostas de variáveis qualitativas. Para a análise de

correlação foi utilizado o *software Statgraphics Centurion*, versão XVI para Windows®. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) (Petrie e Watson, 2009).

3 RESULTADOS

3.1 Dados Demográficos

O questionário foi aplicado a 358 participantes, apresentando a seguinte distribuição entre as regiões de Curitiba: norte ($n=70$), leste ($n=70$), sul ($n=71$), oeste ($n=72$) e região central ($n=75$).

Dos 358 participantes, 54,19% ($n=194$) eram do sexo feminino e 45,81% ($n=164$) do sexo masculino. A média seguida do desvio padrão (\pm DP) da idade dos homens foi de $41,85 \pm 16,73$ anos e das mulheres foi de $39,77 \pm 16,22$ anos. O peso médio (\pm DP) dos homens foi de $79,76 \pm 13,71$ kg e das mulheres foi de $68,83 \pm 12,60$ kg. Já a média (\pm DP) de altura dos homens entrevistados foi de $1,73 \pm 0,07$ m e das mulheres foi de $1,62 \pm 0,07$ m (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das repostas dos entrevistados conforme o sexo (%), idade, peso e altura (média \pm desvio padrão).

| | Feminino | Masculino |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| Total (%) | 54,19 (194) | 45,81 (164) |
| Idade (Anos) | $39,77 \pm 16,22$ | $41,85 \pm 16,73$ |
| Peso (Quilos) | $68,83 \pm 12,60$ | $79,76 \pm 13,71$ |
| Altura (Metros) | $1,62 \pm 0,07$ | $1,73 \pm 0,07$ |

O quesito escolaridade foi dividido em ensino fundamental incompleto (EFI), ensino fundamental completo (EFC), ensino médio incompleto (EMI), ensino médio completo (EMC), ensino superior incompleto (ESI) e ensino superior completo (ESC). Os resultados obtidos em relação à escolaridade das pessoas entrevistadas ($n=358$) foram: 9,78% ($n=35$) dos entrevistados possuíam EFI, 12,29% ($n=44$) EFC, 3,63% ($n=13$) EMI, 36,03% ($n=129$) EMC, 6,98% ($n=25$) ESI, 5,87% ($n=21$) possuíam ESC e 25,42% ($n=91$) preferiram não responder sobre a escolaridade.

As classes sociais dos entrevistados foram divididas em classe A, B, C, D ou E, de acordo com definição de 2017 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (IBGE, 2017), o qual caracteriza classe A como pessoas que possuem renda mensal igual ou superior a R\$ 18.740,01; classe B com uma renda mensal entre R\$ 9.370,01 e R\$ 18.740,00; classe C com renda mensal variando entre R\$ 3.748,01 a R\$ 9.370,00; classe D com uma renda mensal de R\$ 1.874,01 a R\$ 3.748,00 e a classe E com uma renda mensal igual ou inferior a R\$ 1.874,00.

A distribuição dos respondentes (n=358) dentro das classes sociais foi: classe A = 1,12% (n=4), B = 2,79% (n=10), C = 20,95% (n=75), D = 23,74% (n=85) e E = 49,16% (n=176), os entrevistados que preferiram não responder representaram 2,23% (n=8) do total. A Tabela 2 apresenta os dados de escolaridade e classe social dos entrevistados.

Em relação à ocupação dos entrevistados (n=358), foram registradas 75 profissões distintas, dentre elas as seis com maior frequência foram: vendedor(a) com 11,17% (n=40), aposentado(a) e comerciante com 5,87% (n=21), estudante com 4,75% (n=17), do lar e taxista com 3,91% (n=14) e outros com 64,53% (n=231) do total de respostas (Tabela 2).

Foram registrados 50 bairros em Curitiba, os com maior frequência de resposta foram: Cidade Industrial de Curitiba com 16,48% (n=59), Sítio Cercado com 12,01% (n=43), Santa Felicidade com 6,98% (n=25), Cajuru com 5,87% (n=21), Mercês com 3,35% (n=12) e outros com 55,31% (n=198).

Tabela 2. Distribuição das respostas dos entrevistados de acordo com a escolaridade, classe social e profissão.

| Variável | %(n total) | Variável | %(n total) | Variável | %(n total) |
|----------|-------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| EFI | 9,78 (35) | Classe A | 1,12 (4) | Vendedor | 11,17 (40) |
| EFC | 12,29 (44) | Classe B | 2,79 (10) | Aposentado | 5,87 (21) |
| EMI | 3,63 (13) | Classe C | 20,95 (75) | Comerciante | 5,87 (21) |
| EMC | 36,03 (129) | Classe D | 23,74 (85) | Estudante | 4,75 (17) |
| ESI | 6,98 (25) | Classe E | 49,16 (176) | Do lar | 3,91 (14) |
| ESC | 5,87 (21) | PNR | 2,23 (8) | Taxista | 3,91 (14) |
| PNR | 25,42 (91) | | | Outros | 64,53 (231) |

Nota: n: número; EFI: ensino fundamental incompleto; EFC: ensino fundamental completo; EMI: ensino médio incompleto; EMC: ensino médio completo; ESI: ensino superior incompleto; ESC: ensino superior completo; PNR: preferiram não responder.

3.2 Questionário

De forma geral, as questões foram divididas em três seções distintas, que abordaram as características e preferências de consumo, quais os critérios para escolha do pescado e o nível de conhecimento relativo a possíveis contaminações e doenças adquiridas através do produto final.

3.2.1 Características e preferência do consumo de pescado

Do total de 358 respondentes, 71,23% (n=255) afirmaram serem os responsáveis pelas compras da casa e os 28,77% restantes (n=103) afirmaram realizar compras esporádicas, não sendo deles as decisões dos produtos a serem adquiridos. Essa variável teve correlação significativa ($p < 0,05$) positiva com a idade do entrevistado ($r = 0,3052$), ou seja, geralmente as pessoas mais velhas da casa são os responsáveis pela escolha e compra dos produtos. Além disso, houve uma correlação significativa ($p < 0,05$) positiva com o sexo feminino ($r = 0,8362$), demonstrando dessa forma que as mulheres são as principais encarregadas das decisões de compra em supermercados.

Quanto ao tipo de dieta, 3,07% (n=11) dos respondentes se intitularam como vegetarianos estritos, ou seja, sem qualquer ingestão de proteínas de origem animal, esses entrevistados não continuaram a responder o questionário, pois, as demais perguntas tiveram relação com o consumo e

aquisição de pescado. Para os 96,93% (n=347) dos entrevistados restantes que se caracterizaram como não vegetarianos, todo o restante das perguntas foi realizado. Essa definição não apresentou qualquer correlação significativa ($p>0,05$) com os demais resultados obtidos no questionário.

A principal motivação para o consumo de pescado foi devido ao sabor agradável que o pescado apresenta, já que 70,03% (n=243) dos entrevistados responderam a alternativa sabor como sendo o principal motivo para o consumo. A qualidade nutricional foi a razão de 12,97% (n=45) ingerirem pescado; a facilidade de acesso ao pescado foi a justificativa de 2,88% (n=10) dos respondentes para o consumo do mesmo; 2,31% (n=8) comem para variar o cardápio; 0,86% (n=3) consomem devido ao custo acessível dos diferentes pescados, o que representa a mesma proporção das pessoas que comem pescado devido a religião.

Ainda sobre a motivação para o consumo, 6,63% (n=23) das pessoas responderam ao menos duas alternativas (ex. qualidade nutricional e sabor da carne, ou qualidade e acessibilidade, etc.); enquanto 0,58% (n=2) citaram uma combinação de três fatores para consumirem pescado (qualidade nutricional, acessibilidade e sabor da carne). Nesse quesito apenas 2,88% (n=10) dos entrevistados não quiseram ou não souberam responder. Não houve correlação significativa ($p>0,05$) das motivações de consumo de pescado com as demais questões e os dados demográficos.

A maior frequência de consumo de pescado foi de uma vez por mês somente, com 36,61% (n=127) dos entrevistados enquadrados nessa categoria, enquanto 24,5% (n=85) dos respondentes comem uma vez por semana. A opção de consumo “raramente ou em comemorações religiosas” apareceu em 20,17% (n=70) das respostas; o consumo em duas a três vezes por semana apareceu em 11,24% (n=39) dos casos; 4,03% dos entrevistados (n=14) comem mais de 3 vezes por semana, e somente 0,58% (n=2) comem todos os dias, houve também 4,03% (n=14) das pessoas indicando que não consomem pescado. A porcentagem de pessoas que não quiseram ou não souberam responder foi de 0,86% (n=3) (Figura 1).

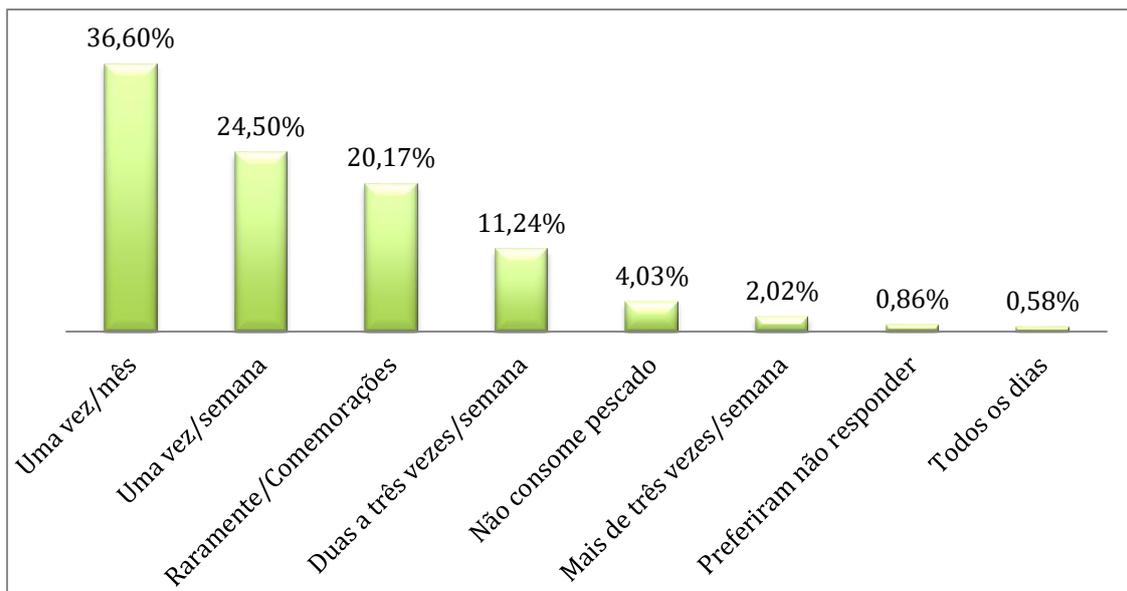


Figura 1. Distribuição das respostas dos entrevistados em relação à frequência de consumo de pescado.

A correlação da frequência de consumo e da idade dos participantes foi significativa ($p < 0,05$) e positiva ($r = 0,1291$), indicando uma leve tendência de que quanto maior a idade, maior a frequência de consumo de pescado.

O dado levantado em sequência foi relativo à frequência de aquisição de pescado para consumo na própria residência, nesse quesito, 36,31% ($n = 126$) dos participantes afirmaram comprar uma vez por mês, 21,90% ($n = 76$) não compram, 17,29% ($n = 60$) compram uma vez por semana, 15,56% ($n = 54$) compram raramente ou em comemorações religiosas; 7,78% ($n = 27$) compram de duas a três vezes por semana; 0,29% ($n = 1$) compram mais de três vezes por semana e nenhum participante respondeu que compra diariamente. Os não respondentes ou que não souberam responder foram 0,86% ($n = 3$) do total.

A frequência de aquisição de pescado apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) e positiva ($r = 0,1142$) com a região de residência dos entrevistados, residentes das regiões norte e central de Curitiba compram peixe para consumir em casa com mais frequência do que as que vivem nas demais regiões da cidade. Também houve correlação significativa ($p < 0,05$) entre a frequência de compra de pescado e a idade dos entrevistados ($r = 0,1793$), demonstrando que quanto maior a idade maior a frequência de compra para

consumo em casa, o que vai de encontro com a maior frequência de consumo de pescado comentado anteriormente.

No quesito local onde o pescado é comprado, a preferência geral foi para aquisição em supermercados, obtendo a maioria de 41,79% (n=145), seguido de 31,41% (n=109) das pessoas que responderam preferir comprar em peixarias; a compra do pescado em feiras e em pesque-pagues apresentou o mesmo percentual de respondentes, ambas com 8,07% (n=28); interessante, 2,88% (n=10) dos entrevistados responderam que possuem fornecedores particulares, sejam eles vizinhos ou parentes que produzem e/ou criam peixes em suas propriedades; uma parcela de 5,19% (n=18) das pessoas afirmou não comprar pescado e 2,59% (n=9) foi o percentual dos que preferiram não responder ou não sabiam a resposta (Figura 2). Essa variável não apresentou nenhuma correlação significativa ($p>0,05$) com outras variáveis.

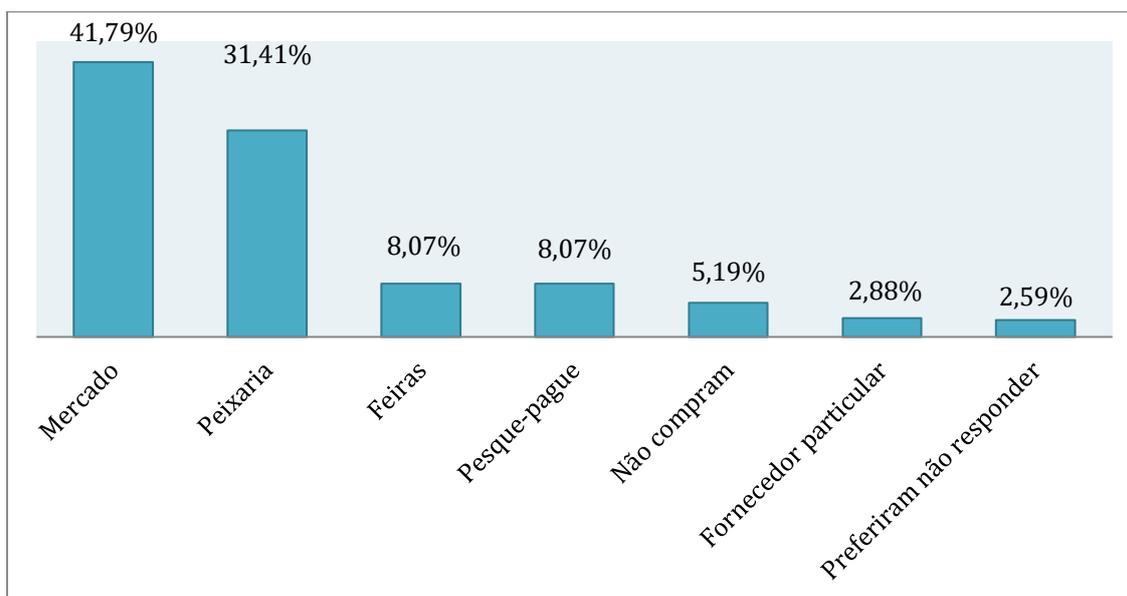


Figura 2. Distribuição das respostas dos entrevistados em relação a preferência do local de aquisição do pescado.

Em relação à preferência do preparo do pescado, quase metade dos entrevistados (44,67%, n=155) afirmaram preferir o peixe frito; 19,88% (n=169) preferem assado; 8,93% (n=31) preferem à milanesa; 8,65% (n=30) preferem grelhado, sendo essa a mesma proporção de preferência por peixe cru (8,65%,

n=30), já os que preferem ingerir o pescado na forma de ensopado representaram 8,36% (n=29) dos respondentes, finalmente apenas 0,86% (n=3) afirmaram não ter preferência pela forma de preparo. Não houve correlação significativa ($p>0,05$) entre a forma de preparo e as demais questões e dados demográficos.

Com mais da metade das respostas, a tilápia foi o pescado de preferência dos entrevistados com um total de 64,84% (n=225), seguido pelo consumo de salmão com 16,14% (n=56) das respostas, pintado com 5,76% (n=20) de preferência; 5,48% (n=19) dos entrevistados preferem tucunaré, e finalmente 4,90% (n=17) preferem tambaqui, houve também 2,88% (n=10) das pessoas que afirmaram preferir outras espécies, como por exemplo, pescada, linguado e tainha, porém essas espécies não são criadas em cativeiro e fugiam do propósito da pesquisa. A preferência por determinada espécie de peixe não apresentou correlação significativa ($p>0,05$) com nenhuma outra variável avaliada. A Figura 3 demonstra a distribuição da preferência pelas espécies de peixe para consumo.

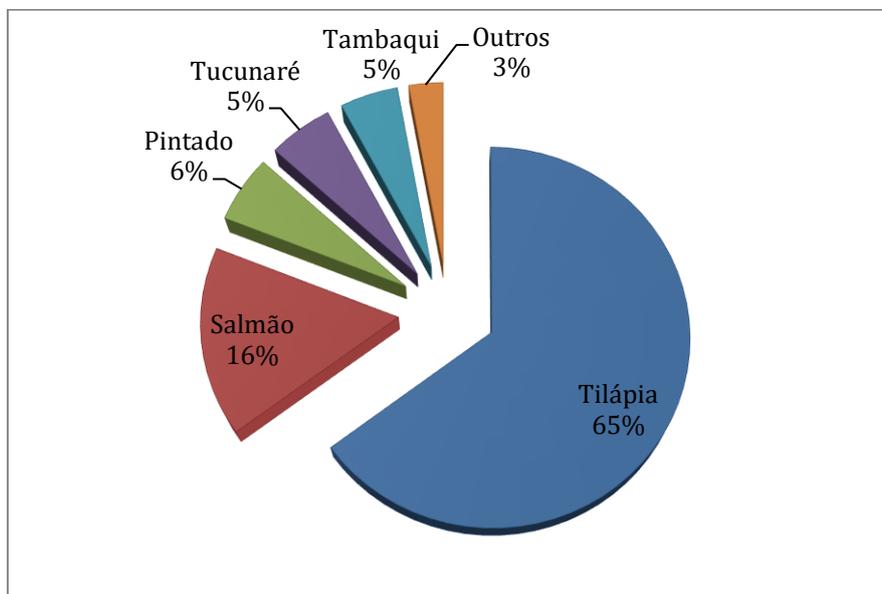


Figura 3. Distribuição das respostas dos entrevistados em relação a preferência do pescado para consumo.

3.2.2 Critérios de escolha do pescado

O primeiro item avaliado nessa seção foi qual a espécie de pescado o consumidor adquire no momento da compra, mesmo que parecida com a questão relativa à preferência pelo consumo de determinada espécie, o consumidor pode decidir pela aquisição de espécie diferente da qual possui preferência devido a outros fatores, como o preço por exemplo.

O pescado mais adquirido foi a tilápia, com 47,55% (n=165) dos entrevistados afirmando ser o pescado que adquirem com maior frequência; 10,09% (n=35) afirmaram preferir comprar salmão; 3,17% (n=11) preferem pintado, situação idêntica à aquisição de pescado de tucunaré, com 3,17% (n=11) das respostas, por fim 2,88% (n=10) preferem tambaqui e 33,14% (n=115) preferem outras espécies (já citadas anteriormente) (Figura 4). As preferências de compra quanto a espécie não foram correlacionadas com as demais variáveis ($p > 0,05$).

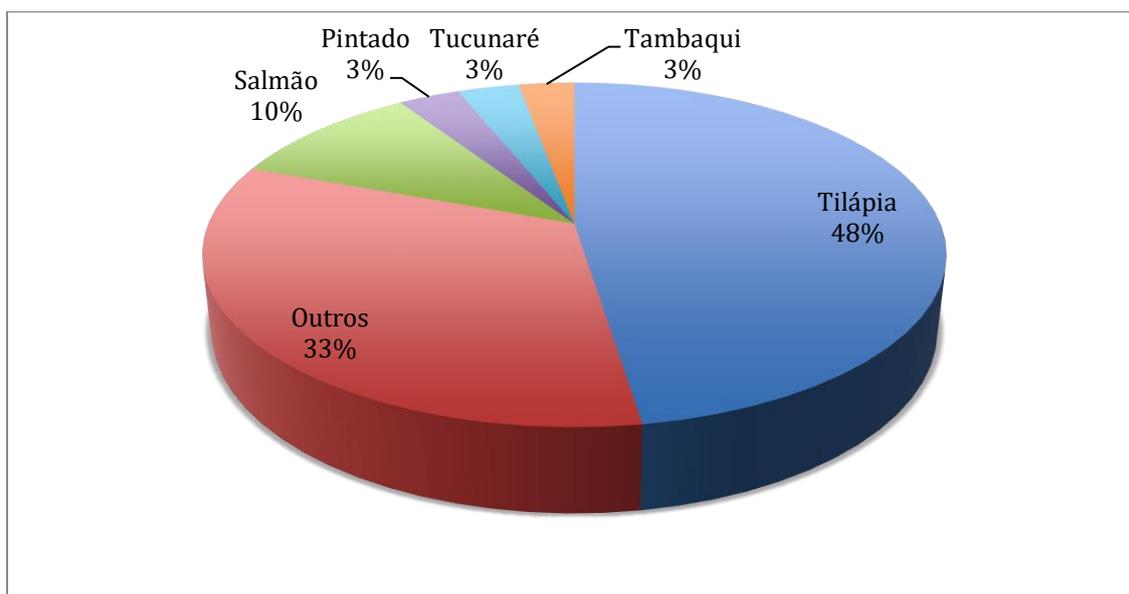


Figura 4. Distribuição das respostas dos entrevistados em relação a preferência do pescado para compra.

Em relação à forma de aquisição do pescado, dois terços dos entrevistados (66,86%, n=232) afirmaram preferir a compra de peixe fresco, 27,95% (n=97) preferem comprar peixes congelados; para 2,02% (n=7) dos respondentes a preferência foi para pescado resfriado; já para peixe salgado,

em conserva e defumado a preferência para ambas as formas foi de 0,29% (n=1). Um total de 2,02% (n=7) afirmou não comprar pescado de nenhuma forma, enquanto 0,29% (n=1) dos entrevistados preferiram não responder. Essa variável não apresentou correlação significativa ($p>0,05$) com as demais questões e os dados demográficos.

Quanto a forma de apresentação do pescado, a maioria dos respondentes (61,67%, n=214) afirmou sua preferência pelo filé; 23,63% (n=82) preferem o peixe inteiro, enquanto 9,80% (n=34) demonstraram preferência pelo peixe eviscerado, com a menor parcela dos entrevistados (4,90%, n=17) afirmando preferir o corte em postas. Não houve correlação significativa ($p>0,05$) da forma de apresentação com as demais questões e os dados demográficos.

Ao serem questionados de que forma avaliam a qualidade do pescado para a compra, 59,08% (n=205) dos entrevistados responderam que avaliam a qualidade do pescado através da aparência geral do produto; 19,60% (n=68) responderam que avaliam por mais de uma opção (ex. pela aparência e validade, ou aparência e preço, ou validade e frescor, e outros); 12,39% (n=43) responderam que avaliam somente pelo prazo de validade estipulado na embalagem; 3,46% (n=12) responderam que avaliam de outra forma fora as alternativas disponibilizadas (ex. olhos, aroma, procedência, e outros) e 1,15% (n=4) responderam que avaliam pelo tempo de prateleira. Por fim 4,32% (n=15) responderam que não compram peixe, então não sabem avaliar a questão da qualidade. Não houve correlação significativa ($p>0,05$) desta questão entre as demais questões e os dados demográficos.

Com relação a percepção dos preços de pescados nos supermercados, 59,94% (n=208) dos entrevistados acham o preço alto; 10,66% (n=37) responderam que acham excessivamente alto; 9,22% (n=32) afirmaram que o preço praticado pelos supermercados é baixo; 7,20% (n=25) acham que o preço é normal e 0,58% (n=2) das pessoas entrevistadas acham muito barato. Nessa questão 12,39% (n=43) das pessoas não quiseram ou não souberam responder. Houve uma correlação significativa ($p<0,05$) entre a percepção de preço dos pescados e o sexo dos entrevistados, sendo essa correlação positiva ($r=0,1357$) com o sexo masculino, demonstrando assim que os homens tendem a perceber o preço do peixe no mercado como mais caro em relação a percepção de preço das mulheres.

3.2.2 Conhecimento dos consumidores em relação a possíveis contaminantes do pescado

A primeira questão dessa sessão foi relacionada a opinião dos consumidores quanto à diminuição de possíveis contaminantes no pescado após a cocção, eles deveriam responder sim se achavam que a cocção diminui o nível de contaminantes e não em caso contrário. Com isso 56,77% (n=197) dos entrevistados responderam que não, que o peixe não deixa de apresentar riscos de contaminação, enquanto que 40,63% (n=141) responderam sim, que o peixe deixar de apresentar risco de contaminação após ser processado na cozinha. Apenas 2,59% (n=9) não souberam responder (Figura 5). Essa questão também não apresentou correlação significativa ($p>0,05$) com as demais questões e os dados demográficos.

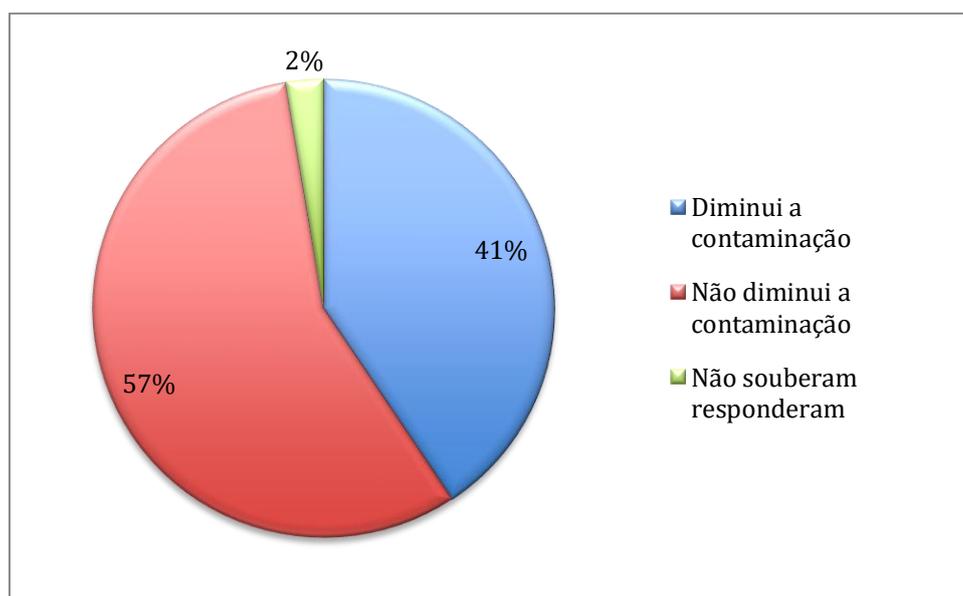


Figura 5. Distribuição das respostas dos entrevistados em relação a opinião sobre a diminuição dos possíveis contaminantes através da cocção do pescado.

Relativamente ao conhecimento quanto a possíveis doenças que podem ser adquiridas ao ingerir pescado, a grande maioria, 86,17% (n=299) das pessoas responderam que não sabem quais doenças podem ser adquiridas através do consumo desse tipo de produto, enquanto que 12,68% (n=44)

responderam que sim, sabem alguma doença que pode ser adquirida por essa via. Somente 1,15% (n=4) preferiram não responder.

O conhecimento das possíveis doenças adquiridas através do consumo de pescado apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) e negativa ($r = -0,2039$) com o nível de escolaridade dos entrevistados, demonstrando que pessoas com níveis inferiores de escolaridade (EFI, EFC e EMI) apresentam menor nível de compreensão desse risco. Houve também uma correlação significativa ($p < 0,05$) dessa questão com a classe social dos entrevistados ($r = -0,1565$), demonstrando que pessoas pertencentes a classes sociais inferiores (D e E) também possuem menor compreensão sobre esse aspecto.

A penúltima questão buscou verificar o grau de compreensão dos entrevistados quanto a existência de micotoxinas. Quase 90% dos respondentes (89,91%, n=312) demonstrou não saber o que são micotoxinas, enquanto 8,93% (n=31) responderam que sabem o que são micotoxinas. Os entrevistados que preferiram não responder somaram 1,15% (n=4) (Figura 6).

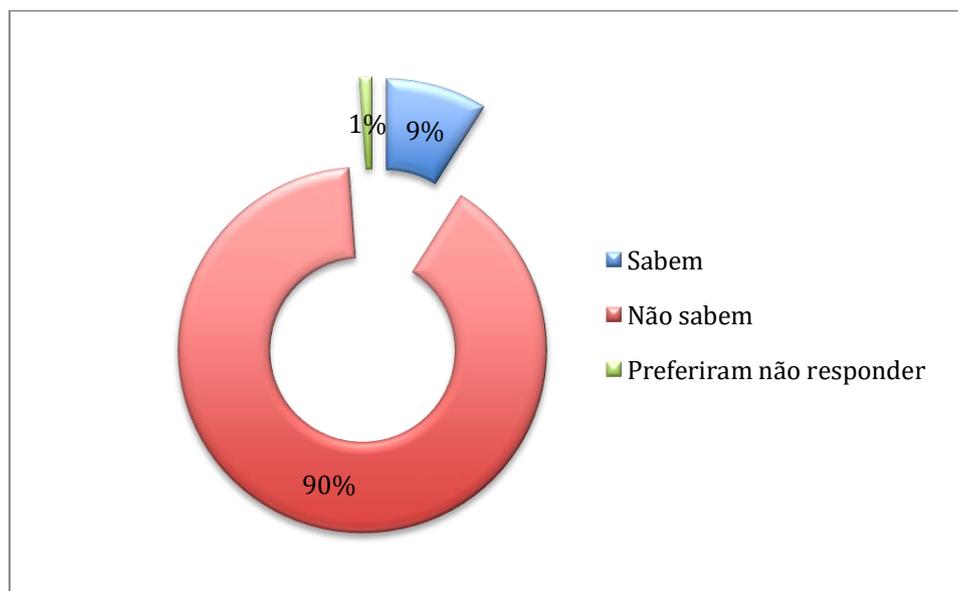


Figura 6. Distribuição das respostas dos entrevistados em relação ao conhecimento sobre o que são micotoxinas.

Houve correlação significativa ($p < 0,05$) e negativa ($r = -0,1559$) entre o conhecimento do que são micotoxinas e a escolaridade dos entrevistados, demonstrando que pessoas com menor escolaridade tendem a não saber o

que são micotoxinas. Como na questão anterior, a classe social também impactou de forma significativa ($p < 0,05$) com uma correlação negativa ($r = -0,1550$) em relação ao conhecimento sobre o que são micotoxinas, ou seja, indivíduos de classes sociais mais baixas (D e E) tendem a não compreender o que são esse tipo de toxinas.

A última questão indagava o entrevistado sobre os possíveis efeitos tóxicos que as micotoxinas podem causar aos seres humanos. Um total de 93,95% ($n = 326$) das pessoas responderam não saber quais são esses efeitos, ao mesmo tempo que somente 4,90% ($n = 7$) responderam ter ciência dos efeitos causados pela exposição à essas toxinas. Apenas 1,15% ($n = 4$) das pessoas preferiram não responder (Figura 7).

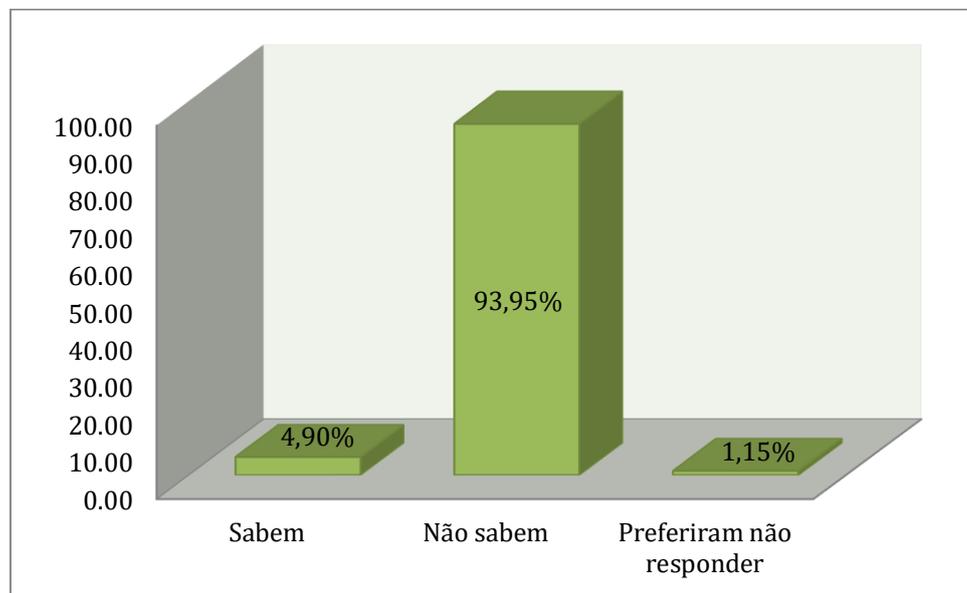


Figura 7. Distribuição das respostas dos entrevistados em relação ao conhecimento dos possíveis efeitos deletérios das micotoxinas na saúde humana.

Nessa última questão, verificou-se correlação significativa ($p < 0,05$) e negativa ($r = -0,1243$) com a escolaridade das pessoas entrevistadas, demonstrando que pessoas com níveis de escolaridade inferiores (EFI, EFC e EMC) tendem a não saber dos possíveis efeitos deletérios das micotoxinas sobre a saúde humana.

4 DISCUSSÃO

Sob a ótica do perfil de consumo alguns trabalhos também avaliaram essa variável em amostras populacionais de diferentes regiões do Brasil. Maciel et al. (2013) ao entrevistarem 1.966 pessoas de diferentes *campi* da Universidade de São Paulo, relatam que 27,11% dos entrevistados consumiam pescado apenas uma vez na semana, 25,94% de duas a três vezes ao mês, 17,40% consumiam uma vez ao mês e 14,80% consomem raramente.

Outro trabalho que buscou caracterizar o consumo de pescado, entrevistou pessoas em todas as regiões brasileiras (Lopes et al., 2016) e os autores classificaram como baixa a frequência média de consumo de pescado pelos brasileiros, citando que 39,52% dos entrevistados consomem de uma a duas vezes por mês, enquanto 30,65% ingerem ao menos uma vez por semana.

Ambos os trabalhos citados diferem em algum ponto do presente estudo em relação a frequência de consumo de pescado. A porcentagem de pessoas que consomem uma vez ao mês foi mais que o dobro do que a encontrada por Maciel et al. (2013), enquanto que o percentual de pessoas que consomem ao menos uma vez por semana foi 6 pontos percentuais menor que os de Lopes et al. (2016). Isso demonstra que de forma geral, a caracterização do consumo de pescados em uma população tende a ser complexa, pois envolve fatores socioeconômicos, padrões de consumo e preferências pessoais, entre outros (Maciel et al., 2012).

A baixa frequência de consumo de pescado encontrada nesse tipo de trabalho reflete o baixo consumo *per capita* anual de pescado pelo brasileiro, que gira em torno de 9,00 kg/ano (FAO, 2019) e que ainda é considerado baixo pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), que recomenda ao menos 12,00 kg/pessoa/ano. O consumo de pescado no Brasil também é baixo quando comparado a média global, que é de 20,50 kg/pessoa/ano, ou seja, ainda há espaço para aumento da participação do pescado na mesa dos brasileiros.

Esse baixo consumo parece ter um fator cultural importante no território brasileiro, pois a variação entre regiões é expressiva de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares de 2017 e 2018 (IBGE, 2020), a qual mostra que a aquisição de pescado *per capita* na Região Norte foi de 9,85

kg/ano contra 1,04 kg/ano na Região Sul. Fatores como a oferta constante de pescado com preços atrativos, além da diversidade e facilidade de aquisição provavelmente influenciem esse consumo maior na Região Norte (Lopes et al., 2016).

A preferência pela espécie do pescado também sofre influência regional. Flores et al. (2014) realizaram uma pesquisa de preferência no estado do Tocantins, sendo o tambaqui uma das espécies mais consumidas na região. De certa forma, a maior produção de tambaqui na Região Norte do Brasil, com 73,10% do total nacional (IBGE, 2019), explica essa preferência, pois há uma maior oferta desse tipo de peixe mais próximo às regiões produtoras. Mesmo efeito observado no presente estudo, já que a preferência foi por tilápia, espécie mais produzida no Brasil como um todo (60,00% do total), tendo o estado do Paraná como principal produtor (IBGE, 2019).

A decisão de consumo de pescado parece ser atrelada a características organolépticas do produto, como sabor e textura. Como demonstram os trabalhos de Kubitzka (2002) e Silveira et al. (2012), já que ambos encontraram a maior proporção dos entrevistados selecionando a preferência pelo sabor como decisão para o consumo de pescado. Dados esses que vêm de encontro aos reportados no presente estudo.

Outros fatores como qualidade da proteína, facilidade de digestão e indicação médica também aparecem como tendo relativa importância, porém em ordens distintas entre os trabalhos. A idade dos consumidores parece estar envolvida na decisão e na frequência de consumo e de aquisição do pescado, pois há relatos de correlações positivas entre essas variáveis (Maciel et al., 2012), provavelmente devido à possíveis efeitos benéficos do consumo de carne de peixe em relação a saúde dos indivíduos. Resultados também encontrados em correlações do presente estudo.

No Brasil, de antemão, tem-se a ideia de que o brasileiro não consome carne de peixe por não possuir costume ou hábito, associado à pequena oferta (Pereira, 2003). Porém, o principal fator citado como impeditivo ou desestimulante para a aquisição do pescado parece ser o preço do produto, já que os respondentes que não consomem ou que consomem em frequência reduzida citam isso como fator determinante para não comprarem (Kubitzka, 2002; Sonoda et al., 2012; Flores et al., 2014). Alguns trabalhos citam o preço

como fator importante mas não decisivo no momento da compra (Maciel et al., 2015), enquanto outros citam que o preço é irrelevante para essa decisão (Tavares et al., 2013).

Apesar de não ter sido avaliado de forma direta como possível fator decisivo na compra do pescado, no presente estudo a percepção do preço praticado por supermercados foi relatada como sendo um preço alto, indicando que o preço pode ser um fator limitante para o aumento do consumo. Essa percepção foi maior para consumidores do gênero masculino, resultado que difere do de Flores et al. (2014) os quais relatam que as mulheres são as que mais consideram o preço do pescado elevado.

O pescado em forma de filé foi o que apresentou maior preferência dentre os entrevistados, além disso, houve uma predileção por aquisição desses produtos em supermercados e na forma fresca. Fornari et al. (2017) citaram que a aquisição em supermercados pode estar relacionada à concentração da aquisição de alimentos em um só local, evitando assim deslocamentos a feiras ou peixarias. A preferência pela apresentação na forma de filés provavelmente está associada a questões relacionadas a facilidade de preparo e a não presença de espinhos (Maciel et al., 2015; Lopes et al., 2016).

Gagleazzi et al. (2002) citaram que problemas sanitários e tecnológicos, no sentido de não encontrar produtos frescos ou com boa aparência, impactam negativamente a decisão de aquisição do pescado pelo consumidor. Diferentes trabalhos corroboram os resultados obtidos na presente pesquisa, no que tange a avaliação do pescado no momento da compra (Silveira et al., 2012; Maciel et al., 2013, 2015), entre os principais atributos avaliados no momento da compra estão o odor, a coloração e a textura, geralmente avaliados em conjunto; outro aspectos encontrado na literatura citada, porém não no presente estudo, foi a presença do selo de inspeção sanitária.

Sob o ponto de vista de possíveis contaminantes e focando principalmente nas micotoxinas, alguns trabalhos demonstram a presença de algumas delas em diferentes espécies de pescado fresco ou curado. Tolosa et al. (2014; 2017), citam a presença de eniatinas e beauvericinas (micotoxinas emergentes do gênero *Fusarium* spp.) em pescado fresco oriundo de piscicultura. Sun et al. (2015) encontraram aflatoxina B₂, ocratoxina A e zearalenona em pescados frescos e curados na região de Xangai, na China.

No Brasil, não estão disponíveis avaliações de contaminações naturais por micotoxinas, seja em pescado oriundo de pesca ou de cultivo, as únicas avaliações de resíduos são provenientes de contaminações experimentais.

De forma geral, há também uma percepção por parte dos consumidores de que o processo de cocção reduz os níveis de contaminantes químicos (Pinho, 2015). Isso pode variar de acordo com o tipo de micotoxina, com resultados mostrando que diferentes métodos de tratamento térmico podem reduzir as eniatinas e beauvericinas, porém não de micotoxinas mais resistentes como é o caso das aflatoxinas (Tolosa et al., 2017).

Devido ao fato de haver pouca informação disponível sobre o nível de resíduo de micotoxinas em pescados e seus derivados, principalmente no Brasil, torna-se importante um maior controle e investigação dessas possíveis contaminações, mesmo que seja para demonstrar que não há quaisquer níveis desse tipo de contaminantes. Além disso, parece ser interessante a disseminação de informação sobre esses compostos principalmente à população de menor escolaridade, pois há uma correlação que demonstra que quanto menor a escolaridade, menor é o nível de conhecimento sobre o que são e o que causam as micotoxinas.

5 CONCLUSÃO

O pescado produzido em cativeiro mais consumido pela população curitibana avaliada é a carne de tilápia e sua preferência se deve à maior oferta nessa região e também à facilidade de preparo e aquisição, pois, como demonstrado os consumidores buscam adquirir o pescado em forma de filés e em supermercados, concentrando assim a compra de alimentos em um só local. Mesmo que não existam levantamentos da contaminação por micotoxinas desse tipo de pescado, a preferência por essa espécie pode indicar um maior risco do produto final (pescado) apresentar resíduos de micotoxinas, visto que os animais são criados em cativeiro e alimentados com rações que podem conter diferentes tipos dessas substâncias.

Outro ponto importante é que os consumidores desconhecem o que são micotoxinas e seus impactos negativos na saúde humana, bem como da possibilidade da presença das mesmas no pescado, mesmo que em baixa quantidade. Há também um desconhecimento generalizado sobre possíveis

doenças causadas por contaminantes presentes no pescado. Dessa forma, sugere-se que maiores esforços sejam tomados na investigação e divulgação desse tipo de informação, para que a cadeia cresça de forma saudável e segura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) pela ajuda financeira e profissional.

REFERÊNCIAS

- Abd-Elghany SM, Sallam KI. Rapid determination of total aflatoxins and ochratoxins a in meat products by immuno-affinity fluorimetry. *Food Chem* 2015;179:253-256.
- Atayde HM, Oliveira IMA, Inhamuns AJ, Teixeira MFS. Fungos toxigênicos e micotoxinas na alimentação de peixes: Uma revisão. *Sci Amazôn* 2014;3(3):59-71.
- Bombardelli RA, Syperreck MA, Sanches EA. Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. *Arq Ciên Vet Zool UNIPAR* 2005;8(2):181-195.
- Cruz JVS. Ocorrência das fumonisinas e fumonisinas em produtos a base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, estado de São Paulo. Pirassununga. Tese (Doutorado em Zootecnia e Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo; 2010.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fishery and Aquaculture Country Profiles. The Federative Republic of Brazil. Rome – Italy, 2019.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Agriculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome – Italy, 2018.
- Flores RMV, Chicrala PM, Soares SS. Avaliação das preferências dos consumidores de pescado do estado do Tocantins através de pesquisa de

- campo realizada no seminário caiu na rede é lucro. Braz J Aquat Sci Tech 2014;18(1):121-129.
- Fornari CAC, Costa RPB, Pires CRF, Kato HCA, Sousa, DN. Estudo sobre os hábitos alimentares e de consumo de pescado da população de Palmas (TO). Rev Desafios 2017;4(4):136-142.
- Gagleazzi UA, Garcia FT, Bliska FMM, Arima HK. Caracterização do consumo de carnes no Brasil. Rev Nac Carne, 2002;27(310):35-46.
- Gonçalves AA, Passos MG, Biedrzycki A. Tendência do consumo de pescado na cidade de Porto Alegre: Um estudo através de análise de correspondência. Est Tecnol 2008;4(1):21-36.
- Google, 2018. Disponível em: <<https://www.google.com.br>>. Acesso em: 19 de maio de 2019.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: <www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/estatisticas-economicas.html>. Acesso em: 5 de outubro de 2019.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal 2018. Rio de Janeiro, Brasil. 2019;46:1-8.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares – Avaliação nutricional da disponibilidade de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil. 2020;1-65.
- Kubitza F. Com a palavra os consumidores. Panor Aquicul 2002;69:48-53.
- Lopes IG, Oliveira RG, Ramos FM. Perfil do consumo de peixes pela população brasileira. Biota Amazôn 2016;6(2):62-65.
- Maciel ES, Savay-da-Silva LK, Galvão JA, Oetterer M. Atributos de qualidade do pescado relacionados ao consumo na cidade de Corumbá, MS. Bol Inst Pesca 2015;41(1):199-206.
- Maciel ES, Savay-da-Silva LK, Vasconcelos JV, Sonati JG, Galvão JA, Lima LKF, Oetterer M. Relationship between the price of fish and its quality attributes: A study within a community at the University of São Paulo, Brazil. Food Sci Technol 2013;33(3):451-456.
- Maciel ES, Vasconcelos JS, Sonati JG, Savay-da-Silva LK, Galvão JA, Oetterer M. Perfil dos voluntários de universidade brasileira a respeito do consumo de pescado. Segur Alim Nutri 2012;19(1):60-70.
- Microsoft® Excel® for Mac 2011. Versão 14.7.2. Microsoft Corporation, 2010.

- Montanha FP, Anater A, Burchard JF, Luciano FB, Meca G, Manyes L, Pimpão CT. Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food Chem Toxicol* 2018;111:494-502.
- Moutinho FFB, Nascimento ER, Paixão RL. Percepção da sociedade sobre a qualidade de vida e o controle populacional de cães não domiciliados. *Ciênc Anim Bras* 2015;16(4):574-588.
- Pereira AJ. Desenvolvimento de tecnologia para produção e utilização da polpa de carne de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) na elaboração de produtos reestruturados. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná; 2003.
- Petrie A, Watson P. Estatística em ciência animal e veterinária. 2. ed. São Paulo: Editora Roca; 2009.
- Pinho JPT. Consumo de pescado cru: Inquérito sobre o consumo e a percepção dos riscos. Porto. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade do Porto; 2015.
- Silveira LS, Abdallah PR, Hellebrandt L, Barbosa MN, Feijó FT. Análise socioeconômica do perfil dos consumidores de pescado no município de Rio Grande. *Sinergia* 2012;16(1):9-19.
- Sonoda DY, Campos SK, Cyrino JEP, Shiota R. Demand for fisheries products in Brazil. *Sci Agric* 2012;69(5):313-319.
- Sun W, Han Z, Aerts J, Nie D, Jin M, Shi W, Zhao Z, Saeger S, Zhao Y, Wu A. A reliable liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of multiple mycotoxins in fresh fish and dried seafoods. *J Chromatogr A* 2015; 1387(27):42-48.
- Tavares GC, Aquino RMA, Palhares MM, Santos RRD, Bonfim ML, Teixeira LV. Perfil do consumo de pescado na cidade de Belo Horizonte, MG. *Bol Ind Anim* 2013;70(3):230-236.
- Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Mitigation of enniatins in edible fish tissues by thermal processes and identification of degradation products. *Food Chem Toxicol* 2017;101:67-74.
- Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins in feed and fish from aquaculture. *J Agric Food Chem* 2014;62(51):12462-12470.

CAPÍTULO 3

**(Artigo científico que será submetido para publicação no periódico
Aquaculture)**

Coocorrência de Micotoxinas em Rações para Peixes no Estado do Paraná, sul do Brasil e Avaliação de Risco Utilizando a Ingestão Diária Tolerável

Amanda Anater^{1*}, Tiago de Melo Nazareth^{1,2}, Deivid Roni Ribeiro³, Giuseppe
Meca², Cláudia Turra Pimpão¹

¹ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, 80215-901, Brasil;

² Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, College of Pharmacy, Universitat de Valencia, Avenida Vicent Andres Estelles s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Espanha.

³ Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR, 80035-050, Brasil.

* AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA:

Amanda Anater

E-mail: amanda_anater@hotmail.com

Telefone: +55xx41988244049

ABSTRACT

Even undergoing by quality tests, raw materials used in feed may contain mycotoxins and, if the control measures are not appropriated taken, there is a risk that the final products of animal production contain residues of these contaminants. The objective was to evaluate the presence of different mycotoxins and their co-occurrence in commercial fish feed, as well as to evaluate the exposition risk through fish feed intake. A total of 160 samples of fish feed were collected in agrocenters of Curitiba city, Paraná state, south Brazil. These samples were analyzed for the presence of 21 distinct

mycotoxins, using high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometry detector (LC-MS/MS-LIT). The estimated daily intake (EDI) of each mycotoxin was performed and compared with the tolerable daily intake (TDI) for fish. A total of eight mycotoxins were detected in the samples, among them the four most prevalent were: eniatin B (EN B) present in 87.50% of the samples, with an average concentration of $1.57 \pm 0.48 \mu\text{g/kg}$; zearalenone (ZEA), detected in 86.88% of the samples, with an average concentration of $148.66 \pm 22.49 \mu\text{g/kg}$; fumonisin B₂ (FB₂) with a prevalence of 49.38%, with an average concentration of $384.09 \pm 134.02 \mu\text{g/kg}$ and enniatin B₁ (EN B₁), found in 42.50% of the samples, with an average concentration of $0.92 \pm 0.25 \mu\text{g/kg}$. The co-occurrence of at least two mycotoxins of different types was observed in 86.80% of the samples. The EDI/TDI ratio was higher for ZEA and ochratoxin (OTA), thus presenting a risk to animals. It is concluded that there is presence of mycotoxins in fish feed, as well as their co-occurrence. The evaluation of the EDI/TDI ratio is interesting, as it allows a better assessment of the risk to animals, however this interpretation is complicated due to the fact that different extrapolations must be performed in order to obtain TDI values. Thus, it is suggested that more studies should be carried out aiming the evaluation of specific toxic doses for different species, and the possible that the combinations effects among mycotoxins should be also evaluated.

Keywords: Contamination. EDI. LC-MS/MS-LIT. Multi-contamination. TDI.

RESUMO

Mesmo passando por testes de qualidade, as matérias primas utilizadas na alimentação animal podem conter micotoxinas e, se as medidas de controle necessárias não forem tomadas apropriadamente, há o risco de que os produtos finais da produção animal contenham resíduos desses contaminantes. O objetivo foi avaliar a presença de diferentes micotoxinas e sua coocorrência em rações comerciais para peixes, bem como avaliar o risco de exposição através da ingestão dessas rações. Foram coletadas 160 amostras de ração para peixes comercializadas em agropecuárias na cidade de Curitiba, estado do Paraná, sul do Brasil. Essas amostras foram analisadas quanto à presença de 21 micotoxinas distintas, através de cromatografia líquida de alta eficiência

acoplada a um detector de espectrometria de massas (LC-MS/MS-LIT). Após o resultado das análises, a ingestão diária estimada (IDE) de cada micotoxina foi estimada e comparada com a ingestão diária tolerável (IDT) por peixe. Um total de oito micotoxinas foram detectadas nas amostras, dentre elas as quatro com maior prevalência foram: eniatina B (EN B) presente em 87,50% das amostras e com concentração média de $1,57 \pm 0,48 \mu\text{g/kg}$; zearalenona (ZEA), detectada em 86,88% das amostras, com concentração média de $148,66 \pm 22,49 \mu\text{g/kg}$; fumonisina B₂ (FB₂) com prevalência de 49,38% e concentração média de $384,09 \pm 134,02 \mu\text{g/kg}$; além da eniatina B₁ (EN B₁), encontrada em 42,50% das amostras, com concentração média de $0,92 \pm 0,25 \mu\text{g/kg}$. A coocorrência de pelo menos duas micotoxinas de classes distintas foi observada em 86,80% das amostras. A relação IDE/IDT foi maior para ZEA e ocratoxina (OTA), apresentando assim maior risco aos animais. Conclui-se que há a micotoxinas em rações prontas, bem como a coocorrência destas nesses alimentos. A avaliação da relação IDE/IDT é interessante, pois permite uma melhor avaliação do risco aos animais, entretanto essa interpretação é dificultada devido ao fato de que diferentes extrapolações devem ser realizadas para que se obtenham valores de IDT. Com isso, sugere-se que mais estudos sejam realizados visando a avaliação de doses tóxicas específicas para as diferentes espécies e que os efeitos das combinações entre micotoxinas sejam também avaliados.

Palavras-chave: Contaminação. IDE. IDT. LC-MS/MS-LIT. Multi-contaminação.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, a piscicultura vem crescendo rapidamente, porém ela ainda é considerada nova na produção de alimento (Oliveira et al., 2013). As estimativas são de que em 2050 a população global chegue em 9,7 bilhões de pessoas, fazendo com que políticas dispostas a erradicar a desnutrição e possibilitar a população uma dieta nutritiva ganhem destaque no cenário internacional (FAO, 2018). Devido ao aumento da demanda por alimentos as perspectivas são de que o consumo global de peixes até o ano de 2025 seja de 178 milhões de toneladas/ano, para isso a piscicultura tende a assumir papel

primordial na oferta de pescado, superando a pesca extrativista na quantidade total de peixe ofertado (FAO, 2018).

Para que a produção seja eficiente, é necessário que se forneçam rações balanceadas nutricionalmente e com custo reduzido, aspectos que de forma geral se alcançam através de uma maior inclusão de ingredientes de origem vegetal. Esses ingredientes tendem a possuir maiores níveis de contaminação por micotoxinas, levando assim a possíveis reduções de desempenho zootécnico e até mesmo maior risco de exposição às micotoxinas para o consumidor final (Pietsch, 2020).

As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos, podem estar presentes em cereais (milho, trigo e cevada, entre outros) e também em oleaginosas (soja, amendoim e algodão, entre outros). A produção das micotoxinas pode ocorrer em diferentes etapas do ciclo produtivo, desde a colheita até o armazenamento desses grãos ou do produto acabado (Montanha et al., 2018; Pietsch, 2020). Algumas dessas micotoxinas apresentam grande estabilidade química, permanecendo nos alimentos mesmo após a inativação dos fungos e o processamento do alimento por diferentes vias (Khazaeli et al., 2014). Seus efeitos tóxicos podem ocorrer não só em animais de produção vertebrados, mas também no homem de forma direta ou indireta (Escrivá et al., 2017).

Dentre os diversos tipos de micotoxinas que podem ser encontradas nos alimentos e rações, as mais relevantes são: aflatoxinas (AFs); ocratoxina A (OTA); tricotecenos (toxinas T-2 e HT-2, deoxinivalenol [DON] e nivalenol [NIV]), fumonisinas (FBs), zearalenona (ZEA) e outras emergentes como beauvericina (BEA) e eniatinas (ENs) (Ashiq, 2015; Jeswal e Kumar, 2015; Nathanail et al., 2015; Adeyeye, 2016).

Os problemas e riscos associados à contaminação de alimentos e rações com micotoxinas têm levado ao desenvolvimento de métodos que buscam cada vez mais precisão, sensibilidade, exatidão e reprodutibilidade para a determinação da presença e dos níveis de micotoxinas nos produtos de origem animal, principalmente com destino ao consumo humano (Pietsch, 2020).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a possível presença de micotoxinas e a coocorrência das mesmas em rações destinadas a peixes, comercializadas em Curitiba, estado do Paraná, sul do Brasil. E, também,

estimar a ingestão diária estimada (IDE) dessas micotoxinas e comparar com valores de ingestão diária tolerável (IDT) para peixes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Brasil e no Laboratório de Química e Toxicologia de Alimentos da Universitat de Valencia, Espanha.

2.1 Químicos e reagentes

Todos os solventes (acetonitrila, metanol, clorofórmio e acetato de etilo) foram adquiridos da companhia Merck (Darmstadt, Alemanha). A água deionizada (>18 MΩ cm de resistividade) utilizada nas extrações, foi obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA). O formiato de amônio (HCO₂NH₄, 97%) e o ácido fórmico foram adquiridos via Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

2.2 Amostras de ração

Para a coleta de amostras de ração de peixe, lojas agropecuárias foram selecionadas em diferentes bairros de Curitiba. A seleção inicial dessas lojas foi realizada através de busca na *internet* utilizando a plataforma de pesquisa do Google® (Google, 2018). Os termos utilizados para a busca e seleção das mesmas foram definidos de acordo com metodologia citada por Moutinho et al. (2015), e foram: “agropecuária” + “Curitiba” + “PR”.

Ao todo foram encontradas 114 lojas agropecuárias em Curitiba. Após contato inicial, somente 78 agropecuárias comercializavam rações para peixe, as quais foram listadas em planilha do *software* Excel® (Microsoft Corporation, 2011) para que posteriormente através do comando “aleatório” fosse selecionado um total de 16 estabelecimentos.

Após a seleção das lojas a serem visitadas, 160 amostras de ração para peixes em crescimento foram coletadas durante um período de cinco meses, em que a cada visita mensal eram obtidas 2 amostras de rações de diferentes marcas por local (2 amostras x 16 lojas = 32 x 5 meses = 160 amostras). Após as coletas, as amostras de ração contendo aproximadamente 50 g foram moídas com peneira *mesh* 30 em moinho tipo Willey (Tecnal® Equipamentos

científicos), acondicionadas em sacos de polietileno, identificadas com informações de data, local de coleta, marca e lote da ração. As amostras foram mantidas em temperatura de -20° C até às extrações de micotoxinas e análises cromatográficas.

2.3 Micotoxinas analisadas

Foram avaliadas 21 micotoxinas: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina G₂ (AFG₂), fumonisina B₁ (FB₁), fumonisina B₂ (FB₂), fumonisina B₃ (FB₃), eniatina A (EN A), eniatina A₁ (EN A₁), eniatina B (EN B), eniatina B₁ (EN B₁), zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), 3-ácido deoxinivalenol (3DON), 15-ácido deoxinivalenol (15DON), nivalenol (NIV), neosolaniol (NEO), toxina HT-2 (HT-2), toxina-T2 (T-2) e beauvericina (BEA).

2.4 Validação do método

Os métodos foram validados de acordo com as recomendações da Comissão da União Europeia (EC, 2006). Características de desempenho, incluindo limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), especificidade, precisão, recuperação, efeito matriz e linearidade foram obtidas de amostras em branco da ração para peixe. Para determinar a linearidade, as curvas de calibração foram construídas a partir dos padrões preparados em MeOH e dos padrões preparados no extrato de amostra em branco.

O LOD foi medido como o valor mínimo encontrado nos padrões de calibração de matrizes correspondentes a uma relação sinal/ruído de pelo menos 3:1 e as LOQs de pelo menos 10:1.

A determinação da recuperação das extrações foi realizada pela análise da concentração de micotoxina nas amostras antes e após a extração, calculando a proporção das áreas de pico de cada micotoxina em cada amostra. Três níveis de adição foram injetados em amostras em branco para essas determinações (LOQ, 10LOQ e 100LOQ), todas as análises foram realizadas em triplicata durante 3 dias consecutivos. O desvio padrão relativo (DPR) foi utilizado para expressar a precisão da recuperação da extração.

A comparação da inclinação entre as curvas de calibração nos extratos das amostras e nas curvas de calibração em solvente puro (MeOH) na mesma

concentração foi utilizada para o cálculo do efeito da matriz (EM). A supressão/aprimoramento de sinal (SAS) devido ao EM foi realizada como o seguinte cálculo:

$$\text{SAS (\%)} = (\text{inclinação com matriz/inclinação em MeOH}) * 100$$

Valores próximos a 100% indicam que não há EM significativo, enquanto valores inferiores a 100% e superiores a 100% indicam supressão e aprimoramento de sinal, respectivamente.

2.5 Procedimentos de extração

Para as análises cromatográficas foi realizado o seguinte procedimento de extração: 25 mL de solução de metanol foram adicionados a uma amostra de 5 g de ração previamente moída e homogeneizada; após essa etapa, a amostra passou por nova trituração e homogeneização em ultraturrax a 7.000 RPM durante 3 minutos; seguida por centrifugação a 4.000 RPM durante 5 minutos a 4° C; após a centrifugação a camada superior foi então retirada e acondicionada em um balão de evaporação, posteriormente processada em evaporador rotativo (80 RPM, a 50° C, com uma pressão de vapor de 5 bar) até completa evaporação do solvente; após completa secagem, a amostra foi reconstituída com 5 mL de metanol e introduzida em um tubo tipo Falcon® de 15 mL. O tubo foi colocado em um evaporador em banho maria contendo vapor de nitrogênio para completa evaporação do solvente; a amostra foi novamente reconstituída com 1 mL de solução de metanol a 50%, sendo posteriormente filtrada (filtro nylon 0,22 µm) e armazenada em um vial para posterior análise em cromatógrafo.

Todas as extrações foram realizadas em triplicatas.

2.6 Análises em LC-MS/MS-LIT

As análises de LC-MS/MS-LIT foram conduzidas por um sistema de cromatografia Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), acoplada a um espectrômetro de massa 3200 QTRAP® (AB Sciex, Foster City, CA, EUA), equipado com uma interface turbo de ionização por eletropulverização (ESI). O analisador QTRAP® combina um triplo quadrupolo

totalmente funcional e um espectrômetro de massa de armadilha de íons lineares dentro do mesmo instrumento. A separação foi realizada utilizando uma coluna LC-Gemini-NX (Phenomenex, Barcelona, Espanha) (150 mm x 2 mm I.D., tamanho de partícula 5 µm).

A taxa de fluxo foi ajustada para 0,8 mL/min e a temperatura do equipamento foi de 40 °C, com um eluente de água ligeiramente acidificada com 0,1% de ácido fórmico e formiato de amônio 5 mM (fase móvel A), e eluente contendo metanol, formiato de amônio 5 mM e ácido fórmico a 0,1% (fase móvel B). O gradiente de diluição começou com 0% de solvente B, aumentando para 100% em 10 minutos, diminuindo para 80% em 5 minutos e, finalmente, diminuindo para 70% em 2 minutos. Durante os subsequentes 6 minutos, a coluna foi limpa, reajustada para as condições iniciais e equilibrada durante 7 minutos. O volume das injeções foi de 10 µL.

A otimização de parâmetros de MS como potencial de decomposição (PD), energia de colisão (EC) e potencial de entrada de células de colisão (PEC) foi realizada por análise de injeção de fluxo para cada micotoxina padrão. O potencial de entrada (PE) e o potencial de saída da célula de colisão (PSC) foram definidos em 10 e 4 V, respectivamente, para todos os analitos. O MS foi operado no modo de monitoração de reação múltipla (MRM) e com a resolução ajustada para a resolução da unidade para Q1 e Q3.

2.7 Avaliação da ingestão diária estimada (IDE) e da ingestão diária tolerável (IDT)

Para o cálculo da IDE foi utilizado um peixe padrão de 1,0 kg, com consumo alimentar (CA) de 1,2% do peso corporal (PC) ao dia. Esse consumo é referente a uma conversão alimentar de 1,2 kg de ração para cada 1,0 kg de peixe (ABP, 2019; Pietsch, 2020). Com isso, o consumo diário estimado de ração para um peixe de 1,0 kg de PC é de 0,012 kg.

A partir do consumo diário de ração foi calculada a IDE em µg/kg PC/dia. Para isso a concentração de cada uma das micotoxinas na ração (µg/kg) foi multiplicada por 0,012 (quantidade de ração ingerida), o resultado dessa multiplicação foi então dividido por 1,0 (peso do peixe em kg).

O cálculo de IDE pode então ser expresso da seguinte maneira:

$$IDE = (C*[PC*CA]) / PC$$

Sendo que "C" significa a concentração média de micotoxinas encontradas na amostra de ração, expressa em µg/kg; "PC" significa peso corporal em kg; "CA" representa o consumo alimentar em % do peso corporal.

Para o cálculo da IDT em µg/kg PC/dia, inicialmente buscaram-se na literatura os níveis mínimos de efeitos observados, na sigla em inglês LOEL (*lowest observed effect levels*), que nada mais são do que os menores níveis de exposição a micotoxinas em que determinados efeitos deletérios foram observados e esse nível é expresso em µg/kg de alimento.

Segundo Pietsch (2020) para avaliar o risco de exposição a determinado composto, devem-se usar os valores de LOEL seguido de ajuste por um fator de segurança. No presente estudo, o fator de segurança escolhido foi 50 devido aos possíveis problemas de extrapolação entre espécies, aos diferentes efeitos deletérios observados entre micotoxinas e também ao fato de que o trabalho que descreve o LOEL (Pietsch, 2020) avalia o efeito isolado de determinada micotoxina e não sua combinação com outras, o que de fato se torna complexo devido à grande variação entre esses compostos.

Além do LOEL e do fator de segurança, foram utilizados também os valores de ingestão diária de ração (1,2% do PC) e do peso corporal médio dos peixes.

$$IDT = (LOEL/FS)*(PC*CA)$$

Sendo que "LOEL" significa os níveis mínimos de efeitos observados; FS é o fator de segurança adotado; "PC" é o peso corporal em kg e "CA" representa o consumo alimentar em % do peso corporal.

Por fim, a relação entre o IDE e o IDT foi calculada e expressa em porcentagem, ou seja, a IDE/IDT representa quanto do tolerável o animal ingere por dia com base nas rações e micotoxinas analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação dos métodos

Para a otimização do método, as amostras de ração foram previamente analisadas quanto à presença de micotoxinas através de metodologia validada no laboratório para utilização em cereais. Após essas análises, amostras negativas para a presença de micotoxinas foram utilizadas como amostras em branco para realizar os ensaios de recuperação e curvas de calibração.

Antes de otimizar as condições do LC-MS/MS-LIT, a varredura completa e a varredura dos íons filhos em modo positivo e negativo foram realizadas. Além disso, os compostos também foram caracterizados pelos tempos de retenção (TR), conforme demonstra a Tabela 1.

Foi obtida boa sensibilidade para as micotoxinas selecionadas quando utilizado o modo positivo (ESI+), o pico de base observado foi $[M+H]^+$ para cada uma das micotoxinas estudadas.

Todas as amostras apresentaram boa linearidade em relação à faixa de trabalho (10LOQ e 100LOQ) e o coeficiente de regressão das curvas de calibração foi superior 0,9724. Os LODs e LOQs foram estimados a partir de um extrato de uma amostra em branco, fortificada com concentrações decrescentes das micotoxinas. As adições foram realizadas a partir de três amostras brancas diferentes. Os LODs e LOQs foram calculados usando o critério de $S/R \geq 3$ e $S/R \geq 10$ para LOD e LOQ, respectivamente (Tabela 1).

Os resultados de recuperação variaram entre 77,60% e 109,30%, o valor de DPR foi inferior a 12,20%. Os valores de repetibilidade intra-dia (n=3) e reprodutibilidade inter-dia (n=5), expressos em DPR variaram de 4,10% a 11,10% e 3,20% a 12,20%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros analíticos obtidos na validação do método. Efeitos de matriz (EM – SAS %), limites de detecção (LODs), limites de quantificação (LOQs), tempo de retenção (TR), linearidade (R^2), recuperações, variações inter-dia e intra-dia para cada uma das micotoxinas analisadas.

| Micotoxina | EM (SAS %) | LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | TR em MeOH (min) | R^2 | Recuperações (%) \pm DPR | | | |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|--------|----------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | | | | | Variação Inter-Dia | | Variação Intra-Dia | |
| | | | | | | 10LOQ | 100LOQ | 10LOQ | 100LOQ |
| AFB₁ | 99,86 | 0,08 | 0,27 | 6,06 | 0,9987 | 89,30 \pm 7,10 | 87,30 \pm 6,80 | 91,50 \pm 6,30 | 89,20 \pm 7,20 |
| AFB₂ | 99,74 | 0,08 | 0,27 | 5,98 | 0,9986 | 84,50 \pm 7,30 | 81,20 \pm 5,10 | 92,20 \pm 6,90 | 88,80 \pm 7,20 |
| AFG₁ | 99,64 | 0,16 | 0,53 | 5,89 | 0,9983 | 87,90 \pm 7,80 | 89,60 \pm 6,30 | 86,20 \pm 7,70 | 89,5 \pm 6,20 |
| AFG₂ | 100,24 | 0,30 | 1,00 | 5,89 | 0,9942 | 88,20 \pm 8,80 | 84,50 \pm 8,10 | 89,60 \pm 6,40 | 86,9 \pm 7,50 |
| FB₁ | 100,13 | 50,00 | 166,67 | 6,22 | 0,9956 | 78,40 \pm 8,10 | 83,60 \pm 3,20 | 88,40 \pm 6,60 | 87,40 \pm 6,70 |
| FB₂ | 100,80 | 30,00 | 100,00 | 6,65 | 0,9920 | 81,50 \pm 7,20 | 83,40 \pm 7,90 | 86,40 \pm 7,20 | 88,60 \pm 7,80 |
| FB₃ | 101,02 | 30,00 | 100,00 | 6,66 | 0,9850 | 91,60 \pm 8,30 | 95,80 \pm 7,10 | 94,30 \pm 8,60 | 96,50 \pm 8,10 |
| ENA A | 100,83 | 0,15 | 0,50 | 8,33 | 0,9848 | 99,40 \pm 7,30 | 94,50 \pm 6,10 | 92,20 \pm 6,10 | 96,90 \pm 5,70 |
| ENA A₁ | 101,62 | 0,08 | 0,25 | 8,18 | 0,9785 | 87,10 \pm 12,20 | 86,90 \pm 9,00 | 89,50 \pm 10,10 | 90,10 \pm 6,10 |
| ENA B | 100,18 | 0,03 | 0,10 | 7,81 | 0,9899 | 95,50 \pm 10,30 | 91,00 \pm 7,30 | 97,60 \pm 9,20 | 91,30 \pm 11,10 |
| ENA B₁ | 102,17 | 0,02 | 0,10 | 7,99 | 0,9754 | 88,00 \pm 6,80 | 89,60 \pm 6,30 | 88,30 \pm 4,10 | 91,90 \pm 6,70 |
| ZEA | 95,19 | 7,80 | 26,00 | 6,85 | 0,9999 | 101,20 \pm 7,30 | 102,20 \pm 5,80 | 105,20 \pm 6,20 | 102,80 \pm 7,20 |
| OTA | 99,93 | 0,05 | 0,17 | 6,83 | 0,9985 | 98,20 \pm 7,60 | 96,10 \pm 6,60 | 95,20 \pm 7,10 | 89,40 \pm 8,10 |
| DON | 100,32 | 20,50 | 68,33 | 3,92 | 0,9937 | 82,60 \pm 8,10 | 89,90 \pm 7,30 | 82,40 \pm 8,60 | 86,30 \pm 7,60 |
| 3DON | 99,96 | 20,50 | 68,33 | 5,64 | 0,9995 | 89,00 \pm 9,30 | 93,70 \pm 9,10 | 96,10 \pm 6,90 | 94,60 \pm 8,90 |

| | | | | | | | | | |
|--------------|--------|-------|-------|------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 15DON | 100,56 | 20,50 | 68,33 | 5,65 | 0,9941 | 91,20 ± 10,30 | 82,50 ± 12,00 | 85,60 ± 7,60 | 91,60 ± 7,60 |
| NIV | 99,10 | 1,2 | 2,5 | 6,04 | 0,9837 | 103,40 ± 6,90 | 105,20 ± 7,10 | 106,50 ± 7,40 | 109,30 ± 6,70 |
| NEO | 97,32 | 2,5 | 5 | 5,42 | 0,9957 | 88,30 ± 8,10 | 90,30 ± 9,80 | 87,10 ± 5,30 | 88,00 ± 7,40 |
| HT-2 | 96,69 | 4,95 | 5,87 | 6,29 | 0,9978 | 77,60 ± 6,40 | 82,80 ± 5,70 | 82,90 ± 6,10 | 83,40 ± 5,50 |
| T-2 | 92,19 | 1,76 | 16,50 | 6,51 | 0,9992 | 102,90 ± 5,80 | 105,20 ± 4,50 | 101,30 ± 7,20 | 106,20 ± 6,20 |
| BEA | 98,65 | 0,02 | 0,10 | 8,08 | 0,9724 | 93,00 ± 5,20 | 88,90 ± 5,90 | 89,20 ± 5,30 | 87,20 ± 9,50 |

Nota: EM: efeito matriz; SAS: supressão/aprimoramento de sinal; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; MeOH: metanol; min: minuto; DPR: desvio padrão relativo; AFB₁: aflatoxina B₁; AFB₂: aflatoxina B₂; AFG₁: aflatoxina G₁; AFG₂: aflatoxina G₂; FB₁: fumonisina B₁; FB₂: fumonisina B₂; FB₃: fumonisina B₃; ENA A: eniatina A; ENA A₁: eniatina A₁; ENA B: eniatina B; ENA B₁: eniatina B₁; ZEA: zearalenona; OTA: ocratoxina A; DON: deoxinivalenol; 3DON: 3-ácido deoxinivalenol; 15DON: 15-ácido deoxinivalenol; NIV: nivalenol; NEO: neosolaniol; HT-2: toxina HT-2; T-2: toxina T-2; BEA: beauvericina (BEA).

3.2 Ocorrência e coocorrência de micotoxinas em ração comercial

Todas as amostras (n=160) apresentaram algum nível de contaminação por uma ou mais micotoxinas. Mesmo que os níveis muitas vezes não sejam expressivos, esse resultado demonstra a importância do monitoramento desses contaminantes nos alimentos a serem destinados aos animais.

Dentre as 21 micotoxinas investigadas nas amostras de rações, foi evidenciada a presença de oito delas: AFB₂, FB₁, FB₂, FB₃, EN B, EN B₁, ZEA e OTA. As demais não apresentaram níveis detectáveis.

Entre a classe das aflatoxinas apenas AFB₂ foi detectada. Essa micotoxina foi encontrada em 10,63% (n=17) das amostras, sendo suas concentrações mínima e máxima de 2,04 e 6,98 µg/kg, respectivamente.

Pelo menos um tipo de fumonisina foi encontrada em cada amostra analisada, com prevalência de 30,63% (n=49) para FB₁, 49,38% (n=79) para FB₂ e 33,75% (n=54) para FB₃. O total de amostras que apresentou contaminação pelas três fumonisinas em conjunto foi de 23,75% (n=38). A concentração mínima da classe foi de 102,38 µg/kg para FB₂, enquanto a concentração máxima foi de FB₃ com um valor de 2.131,50 µg/kg. Vale ressaltar que essa concentração máxima também foi a maior entre todas as micotoxinas detectadas.

Entre a classe das eniatinas, apenas EN B e EN B₁ foram encontradas nas amostras, com prevalências de 87,50% (n=140) e 42,50% (n=68), respectivamente, sendo a EN B a micotoxina de maior prevalência no estudo. A quantidade mínima de EN B encontrada foi bastante reduzida em relação às demais, com concentrações mínima e máxima de 0,11 e 10,94 µg/kg, respectivamente. A concentração mínima de EN B₁ também foi de 0,11 µg/kg, enquanto a concentração máxima foi de 18,26 µg/kg. EN B e EN B₁ foram as micotoxinas com menor concentração dentre todas as encontradas.

ZEA foi encontrada em 88,68% (n=139) das amostras, com uma concentração mínima de 28,78 µg/kg e máxima de 743,76 ± 2,48 µg/kg.

Apenas 3,75% (n=6) das amostras de ração apresentaram contaminação por OTA, com os valores mínimos e máximos de 0,95 e 17,32 µg/kg, respectivamente.

A Tabela 2 demonstra as quantidades de amostras positivas para presença das micotoxinas, bem como as suas respectivas prevalências e concentrações ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de ração).

Tabela 2. Prevalência e concentração de micotoxinas encontradas em amostras de ração comercial para peixes.

| Micotoxina | Amostras positivas | Prevalência (%) | Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | |
|--------------------|--------------------|-----------------|--|----------|---------------------|
| | | | Mínima | Máxima | Média \pm DP |
| AFB ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| AFB ₂ | 17/160 | 10,63 | 2,04 | 6,98 | 4,13 \pm 0,52 |
| AFG ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| AFG ₂ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| FB ₁ | 49/160 | 30,63 | 178,89 | 231,68 | 202,56 \pm 16,91 |
| FB ₂ | 79/160 | 49,38 | 102,38 | 1.259,64 | 384,09 \pm 134,02 |
| FB ₃ | 54/160 | 33,75 | 124,56 | 2.131,50 | 498,22 \pm 118,96 |
| ENA A | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| ENA A ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| ENA B | 140/160 | 87,50 | 0,11 | 10,94 | 1,57 \pm 0,48 |
| ENA B ₁ | 68/160 | 42,50 | 0,11 | 18,26 | 0,92 \pm 0,25 |
| ZEA | 139/160 | 86,88 | 28,78 | 743,76 | 148,66 \pm 22,49 |
| OTA | 6/160 | 3,75 | 0,95 | 17,32 | 5,09 \pm 0,83 |
| DON | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| 3DON | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| 15DON | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| NIV | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| NEO | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| HT-2 | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| T-2 | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| BEA | 0/160 | ND | ND | ND | ND |

Nota: DP: desvio padrão; AFB₁: aflatoxina B₁; AFB₂: aflatoxina B₂; AFG₁: aflatoxina G₁; AFG₂: aflatoxina G₂; FB₁: fumonisina B₁; FB₂: fumonisina B₂; FB₃: fumonisina B₃; ENA A: eniatina A; ENA A₁: eniatina A₁; ENA B: eniatina B; ENA B₁: eniatina B₁; ZEA: zearalenona; OTA: ocratoxina A; DON: deoxinivalenol; 3DON: 3-ácido deoxinivalenol; 15DON: 15-ácido deoxinivalenol; NIV: nivalenol; NEO: neosolaniol; HT-2: toxina HT-2; T-2: toxina T-2; BEA: beauvericina (BEA); ND: não detectado.

Outros estudos também investigaram a presença de micotoxinas em rações destinadas à alimentação de peixes.

Gonçalves et al. (2016) utilizaram cromatografia líquida de alta performance, para verificar a presença de aflatoxinas (soma de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), ZEA, DON, OTA e fumonisinas (soma de FB₁ e FB₂) em 41 amostras de ração provenientes do continente asiático (n=31) e europeu (n=10). Desse total 76,00% estavam contaminadas por mais de uma micotoxina, 17,00% estavam contaminadas por apenas uma micotoxina e 7,00% foram negativas quanto à presença desses contaminantes.

Estes mesmos autores relatam que as amostras provenientes do continente asiático apresentaram maiores níveis de contaminação por aflatoxinas (51,80 µg/kg) e OTA (2,11 µg/kg) quando comparado às amostras do continente europeu, as quais apresentaram valores de 0,04 e 0,15 µg/kg para aflatoxinas e OTA, respectivamente. Já os valores de fumonisinas foram maiores nas amostras provenientes da Europa, com valores médios de 341,99 µg/kg, valores muito abaixo dos encontrados no presente estudo.

Olorunfemi et al. (2013) também realizaram uma análise multi-micotoxina por LC-MS/MS de 94 amostras de ração para peixes de diferentes locais na Zona Agro-Ecológica da Nigéria. O valor médio de ZEA encontrado foi de 4,50 µg/kg, muito menor em comparação com o valor de ZEA no presente trabalho. Além disso, as 94 amostras também apresentaram valores positivos para as micotoxinas NIV, DON, 3DON, AFB₁, AFG₁, AFG₂, que no presente trabalho foram negativas.

Mohamed et al. (2017), ao analisarem 25 amostras de ração provenientes do Egito, observaram que 24 delas encontravam-se contaminadas, sendo que 16 amostras tinham contaminação por AFB₁, AFB₂ e AFG₂, 5 amostras tinham presença de AFB₁ e AFG₂, 2 por AFB₂ e AFG₂ e uma amostra foi contaminada apenas por AFG₂. No presente estudo, as rações que continham presença de AFB₂ estavam em concentrações baixas.

Tolosa et al. (2014) encontraram 100% de amostras de ração para peixes positivas para ENs e 95,00% positivas para BEA (todas com coocorrência de ENs), entre as ENs, foram encontradas EN A e EN A₁, resultados que diferem do presente estudo pois, nenhuma destas foi encontrada, bem como BEA.

A coocorrência de micotoxinas distintas nas rações é um aspecto que tem sido avaliado em diferentes estudos. Essas combinações representam riscos desconhecidos à saúde e a produtividade animal, já que a presença de diferentes tipos de micotoxinas pode ocasionar efeito sinérgico ou ainda de potencialização (He et al., 2010). Os riscos dessas combinações são considerados desconhecidos, pois os efeitos deletérios podem depender dentre outros fatores, das micotoxinas envolvidas, das suas concentrações e da categoria animal (Pietsch, 2020), além disso, Barbosa et al. (2013) citaram o tempo de exposição e o estresse de produção dos animais como fatores agravantes.

Um exemplo é o relato de He et al. (2010), que trabalharam com DON e AFB₁ inoculadas de forma combinada ou não em cultivo *in vitro* de hepatócitos primários de carpa (*Cyprinus carpio*). Relataram que a destruição e a inibição do crescimento celular e a atividade das enzimas hepáticas, como alanino aminotransferase, aspartato aminotransferase e a lactato desidrogenase, foram maiores quando houve a combinação dessas micotoxinas.

Barbosa et al. (2013) investigaram a presença de micotoxinas em rações para peixes em pisciculturas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Das 60 amostras de ração para tilápias do Nilo, 50,00% (n=30) apresentaram coocorrência de AFB₁ e FB₁, enquanto 3,30% apresentaram contaminação pelas três micotoxinas analisadas (AFB₁, FB₁ e OTA). Além disso, 55,00% estavam contaminados somente por AFB₁ e apenas 3,30% das amostras apresentaram OTA individualmente.

Em um estudo realizado por Marijani et al. (2017), a coocorrência de micotoxinas foi verificada em 54,10% das amostras de ração analisadas. Com relação a coocorrência encontrada no presente estudo, 13,75% (n=22) das amostras apresentaram somente uma classe de micotoxina (ex.: eniatinas), 43,75% (n=70) estavam contaminadas com pelo menos 2 classes (ex.: fumonisinas + eniatinas) e 42,50% (n=68) das amostras apresentaram-se contaminadas com 3 ou mais classes de micotoxinas (ex.: fumonisinas + eniatinas + zearalenona). A Figura 1 ilustra a distribuição dessa coocorrência em 100% das amostras, visto que pelo menos uma micotoxina foi encontrada em cada amostra.

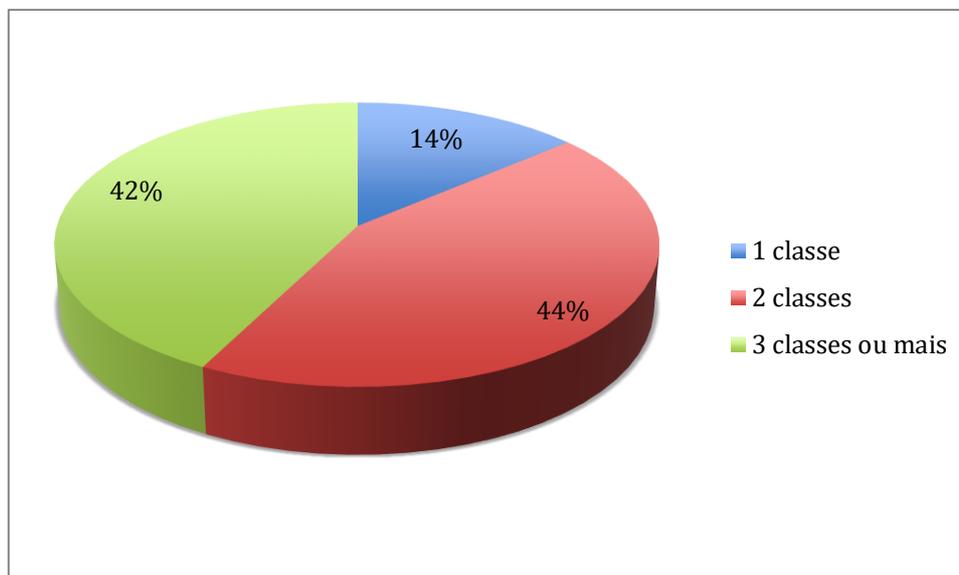


Figura 1. Distribuição da coocorrência de micotoxinas nas amostras de ração para peixes.

Essa coocorrência dificulta a avaliação de risco desses alimentos, já que não se sabe dizer quais os efeitos dessas combinações. Em outras espécies, esse conhecimento parece estar um pouco mais avançado, pois sabe-se que combinação de DON e FB₁, por exemplo, diminui a taxa de crescimento em suínos (Pierron et al., 2016) e frangos (Murugesan et al., 2015).

Uma das possíveis explicações da presença de micotoxinas em rações é devido à resistência das micotoxinas às etapas de aquecimento, secagem e resfriamento da ração pronta, pois esses processamentos são eficazes em diminuir a população fúngica, mas não em reduzir a concentração de micotoxinas como as AFs e FBs (Çakmak e Sahin, 2002; Tolosa et al., 2014). Um exemplo é a FB₁ que é inativada somente em temperaturas acima de 150° C, permanecendo, assim, em rações peletizadas e extrusadas, já que as temperaturas utilizadas nesses processos variam entre 70 e 90° C (Barbosa et al., 2013).

Um ponto limitante no que se refere às referências disponíveis é o número de amostras utilizadas nos levantamentos, com trabalhos gerando conclusões relativas a uma grande área geográfica com somente 20 amostras analisadas.

3.3 Avaliação da IDE/IDT pelos peixes

Um dos limitantes para a avaliação da relação IDE/IDT foi a pequena disponibilidade dos valores de LOEL de micotoxinas para peixes. Pietsch (2020) realizou extensa revisão para levantamento dessas informações e descreveu valores de LOEL para as seguintes micotoxinas AFB₁, ZEA, DON, OTA, FB₁, T-2 e moniliformina (MON). Destas apenas 3 foram encontradas no presente estudo (FB₁, OTA e ZEA) e os valores de LOEL para AFB₁ foram extrapolados considerando-se os valores de AFB₂.

Para as demais micotoxinas, não foram encontrados valores de LOEL na literatura. Na Tabela 3 estão descritos os valores de IDE, LOEL, IDT e a relação IDE/IDT para as micotoxinas encontradas.

Tabela 3. Estimativas de ingestão diária estimada (IDE) e ingestão diária tolerável (IDT) das diferentes micotoxinas encontradas no estudo.

| Micotoxina | Concentração média (µg/kg) | IDE (µg/kg PC/dia) | LOEL (µg/kg ração) | IDT (µg/kg PC/dia) | IDE/IDT (%) |
|-------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| AFB ₂ | 4,13 | 0,05 | 317 | 0,08 | 65,14 |
| FB ₁ | 80,09 | 0,96 | 30.600 | 7,34 | 13,09 |
| FB ₂ | 384,09 | 4,61 | N/A | N/A | N/A |
| FB ₃ | 498,22 | 5,98 | N/A | N/A | N/A |
| ZEA | 148,66 | 1,78 | 583 | 0,14 | 1.274,96 |
| OTA | 5,09 | 0,06 | 50 | 0,01 | 509,00 |
| EN B | 1,57 | 0,02 | N/A | N/A | N/A |
| EN B ₁ | 0,92 | 0,01 | N/A | N/A | N/A |

Nota: IDE: ingestão diária tolerável; PC: peso corporal; LOEL: níveis mínimos de efeitos observados; IDT: ingestão diária tolerável; AFB₂: aflatoxina B₂; FB₁: fumonisina B₁; FB₂: fumonisina B₂; FB₃: fumonisina B₃; ZEA: zearalenona; OTA: ocratoxina A; ENA B: eniatina B; ENA B₁: eniatina B₁; N/A: não se aplica.

A IDE de AFB₂ e FB₁ foram inferiores a 100% da IDT. Demonstrando-se dessa forma, que o consumo das rações avaliadas no presente estudo aparenta ser seguro, desde que mantidas as taxas de consumo. Apesar das aflatoxinas serem uma classe importante sob o ponto de vista de toxicidade, aparentemente elas não são encontradas em níveis elevados nos alimentos

para peixes (Deng et al., 2010; Barbosa et al., 2013; Greco et al., 2015), diminuindo assim os riscos de intoxicações.

Embora o IDE/IDT para OTA tenha sido maior que 100%, essa micotoxina foi encontrada em uma proporção pequena das amostras (3,75%), ou seja, parece não apresentar um problema grave para a produção de peixes. Além disso, como essa micotoxina é produzida por *Aspergillus* spp., sua produção geralmente ocorre no armazenamento, evidenciando que quando está presente o problema pode ter ocorrido após a armazenagem dos grãos ou fabricação da ração.

Os valores de IDE para ZEA foram muito superiores aos limites aceitáveis. Embora ao comparar as concentrações encontradas com o LOEL utilizado (148,60 µg/kg e 583,00 µg/kg, respectivamente) pareça não haver problemas, já com a utilização do fator de segurança essa concentração demonstra-se de fato insegura. O LOEL utilizado para ZEA refere-se à imunossupressão, a qual por sua parte é relacionada a diferentes micotoxinas (Matejova et al., 2017), quando comparado ao LOEL de efeitos estrogênicos (1256,00 µg/kg) que é o principal efeito relatado para ZEA na produção animal, o IDE/IDT tende a reduzir-se.

Um dos fatores limitantes para essa comparação são os valores de LOEL, principalmente em relação a espécies e ao efeito deletério escolhido, que muitas vezes não são padronizados. Como exemplos, pode ser citado o LOEL utilizado para AFB₁ e FB₁, que são descritos para efeitos genotóxicos e de limitação do crescimento, respectivamente. No tocante à espécie, os valores de LOEL aqui referenciados representam uma média de trabalhos citados por Pietsch (2020), os quais utilizaram diferentes espécies de peixe.

4 CONCLUSÃO

Rações para peixes podem conter diferentes micotoxinas em diferentes concentrações. Essa contaminação pode ocorrer ao longo da cadeia de produção, já que foram encontradas tanto micotoxinas oriundas da produção quanto também de armazenamento, entretanto com os resultados disponíveis não é possível precisar a origem das mesmas.

A coocorrência de diferentes micotoxinas parece ser um problema real em rações para peixes, pois foi expressiva a proporção de amostras que continham dois ou mais tipos desses compostos. Isso sugere que estudos avaliando os efeitos de potenciais combinações de micotoxinas são importantes para que níveis seguros sejam estabelecidos e que os mesmos sejam próximos à realidade.

Um ponto importante relativo a presença e a coocorrência de micotoxinas, é que o monitoramento das matérias primas e dos produtos acabados são essenciais. O uso preventivo de tecnologias como os adsorventes de micotoxinas também possui papel fundamental, visto que não há um controle total sobre a cadeia produtiva e de comércio desses produtos.

Outra categoria de estudos que apresenta potencial é o de definições de LOEL para diferentes espécies, visto que muitas vezes a extrapolação para outras espécies pode impactar negativamente a cadeia, já que superestimam os efeitos deletérios podem ocorrer ao adotar níveis muito baixos como sendo seguros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e ao Programa de Pesquisa e Inovação “*European Union’s Horizon 2018*” (MycoKey – nº 678781) pela ajuda financeira e profissional.

REFERÊNCIAS

- ABP – Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário PeixeBR da Piscicultura – Produção brasileira cresce 4,5% e atinge 722.560 t. 2019.
- Adeyeye SAO. Fungal mycotoxins in foods: A review. *Food Sci Technol* 2016; 2:1213127.
- Ashiq S. Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Compr Rev Food Sci F* 2015;14:159-175.
- Barbosa TS, Pereyra CM, Soleiro CA, Dias EO, Oliveira AA, Keller KM, Silva PPO, Cavaglieri LR, Rosa CAR. Mycobiota and mycotoxins present in

- finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State. *Int Aquat Res* 2013;5:1-9.
- Çakmak MN, Sahin K. Mycological and bacteriological survey on fish feed ingredients and mixed feeds in Elazığ Province. *J Biol Sci* 2002;2(11):757-758.
- Deng SX, Tian LX, Liu FJ, Jin SJ, Liang GY, Yang HJ, Du ZY, Liu YJ. Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture* 2010;307:233-240
- EC – European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 2006; L 364, 5-24.
- Escrivá L, Font G, Manyes L, Berrada H. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: An overview. *Toxins* 2017;9(251):1-33.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The State of World Fisheries and Agriculture 2018 – Meeting the sustainable development goals*. Rome – Italy, 2018.
- Gonçalves RA, Naehrer K, Santos GA. Occurrence of mycotoxins in commercial aquafeeds in Asia and Europe: A real risk to aquaculture? *Rev Aquacult* 2016;0:1-18.
- Google, 2018. Disponível em: <<https://www.google.com.br>>. Acesso em: 19 de maio de 2019.
- Greco M, Pardo A, Pose G. Mycotoxigenic fungi and natural cooccurrence of mycotoxins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds. *Toxins* 2015;7:4595-4609.
- He CH, Fan YH, Wang Y, Huang CY, Wang XC, Zhang HB. The individual and combined effects of deoxynivalenol and aflatoxin B₁ on primary hepatocytes of *Cyprinus carpio*. *Int J Mol Sci* 2010;11(10):3760-3768.
- Jeswal P, Kumar D. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. *Int J Microbiol* 2015;242486:1-8.
- Khazaeli P, Najafi ML, Bahaabadi GA, Shakeri F, Tahami AN. Evaluation of aflatoxin contamination in raw and roasted nuts in consumed Kerman and

- effect of roasting, packaging and storage conditions. *Life Sci J* 2014;10:578-583.
- Marijani E, Wainaina JM, Charo-Karisa H, Nzayisenga L, Munguti J, Gnonlonfin GJB, Kigadye E, Okoth S. Mycoflora and mycotoxins in finished fish feed and feed ingredients from smallholder farms in East Africa. *Egypt J Aquat Res* 2017;43:169-176.
- Matejova I, Svobodova Z, Vakula J, Mares J, Modra H. Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. *J World Aquacult Soc* 2017;48(2):186-200.
- Microsoft® Excel® for Mac 2011. Versão 14.7.2. Microsoft Corporation, 2010.
- Mohamed HM, Emeish WF, Braeuning A, Hammad S. Detection of aflatoxin-producing fungi isolated from Nile tilapia and fish feed. *Excli J* 2017;16:1308.
- Montanha FP, Anater A, Burchard JF, Luciano FB, Meca G, Manyes L, Pimpão CT. Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food Chem Toxicol* 2018;111:494-502.
- Moutinho FFB, Nascimento ER, Paixão RL. Percepção da sociedade sobre a qualidade de vida e o controle populacional de cães não domiciliados. *Ciênc Anim Bras* 2015;16(4):574-588.
- Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K, Berthiller F, Applegate TJ, Grenier B, Phillips TD, Schatzmayr G. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poult Sci* 2015;94:1298-1315.
- Nathanail AV, Varga E, Meng-Reiterer J, Bueschl C, Michlmayr H, Malachova A, Fruhmann P, Jestoi M, Peltonen K, Adam G, Lemmens M, Schuhmacher R, Berthiller F. Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins T-2 toxin and HT-2 toxin in wheat. *J Agric Food Chem* 2015;63:7862-7872.
- Oliveira STL, Gouveia GV, Santurio JM, Costa MM. *Aeromonas hydrophila* em tilápia (*Oreochromis niloticus*) após a ingestão de aflatoxinas. *Arq Inst Biol* 2013;80(4):400-406.
- Olorunfemi MF, Odebode AC, Joseph OO, Ezekiel C, Sulyok M, Krska R, Oyedele A. Multi-mycotoxin contaminations in fish feeds from different agro-ecological zones in Nigeria. In: *Annals "Agricultural Development*

Within the Rural–Urban Continuum”. Tropentag, Stuttgart-Hohenheim, Germany, 2013.

Pierron A, Alassane-Kpembé I, Oswald IP. Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porc Health Manag* 2016;2(21):1-8.

Pietsch C. Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. *Mycotoxin Res* 2020;36:41-62.

Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins in feed and fish from aquaculture. *J Agric Food Chem* 2014;62(51):12462-12470.

CAPÍTULO 4

(Artigo científico submetido para publicação no periódico *Aquaculture Reports*)

Ocorrência de Micotoxinas em Pescado Comercializado em Curitiba, Paraná, sul do Brasil e Avaliação de Risco para o Consumidor

Amanda Anater^{1*}, Tiago de Melo Nazareth^{1,2}, Deivid Roni Ribeiro³, Giuseppe Meca², Cláudia Turra Pimpão¹

¹ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, 80215-901, Brasil;

² Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, College of Pharmacy, Universitat de Valencia, Avenida Vicent Andres Estelles s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Espanha;

³ Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR, 80035-050, Brasil.

* AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA:

Amanda Anater

E-mail: amanda_anater@hotmail.com

Telefone: +55xx41988244049

ABSTRACT

Due to increasing importance of fish in human nourishment, there is also a need for better monitoring of contaminants in this type of food, in order to guarantee the quality of products to consumers. The objective of this study was to evaluate the presence of mycotoxins in fish samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the city of Curitiba, Paraná, south Brazil; as well as to evaluate the exposure risk of mycotoxins to humans. A total of 160 fish samples were collected; these samples were investigated for the presence of 21 mycotoxins through liquid chromatography coupled to a mass spectrometry detector (LC-

MS/MS-LIT). The risk assessment was performed by comparing the estimated daily intake (EDI) with the tolerated daily intake (TDI) of each mycotoxin. Only the presence of enniatin B (EN B) was evidenced, the prevalence of EN B was 86.88% (n=139), its concentrations ranged from 0.012 to 0.124 µg/kg. The IDE value was 1.35×10^{-2} ng/kg BW/day, but the risk assessment was not carried out as there is no suggestion of the levels tolerated by humans for EN B. The contamination of fish by mycotoxins is low or even non-existent, being apparently safe for human consumption. Good quality of raw material and use of nutritional additives in fish feed, may explain this low bioaccumulation in fish tissues.

Keywords: Contamination. Humans. LC-MS/MS-LIT. Nile tilapia.

RESUMO

Devido ao aumento da importância do pescado na alimentação humana, também se eleva a necessidade de maior monitoramento de contaminantes nesse tipo de alimento, visando garantir produtos seguros ao consumidor. O objetivo desse estudo foi avaliar a contaminação de micotoxinas em amostras de pescado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na cidade de Curitiba, Paraná, sul do Brasil; bem como avaliar o risco de exposição de micotoxinas para seres humanos. Foram coletadas 160 amostras de pescado, as quais foram investigadas quanto à presença de 21 micotoxinas, por meio de cromatografia líquida acoplada a um detector de espectrometria de massas. A avaliação do risco foi realizada comparando os valores de ingestão diária estimada (IDE) com os valores de ingestão diária tolerada (IDT) de cada micotoxina. Foi detectada a presença somente de eniatina B (EN B), com uma prevalência de 86,88% (n=139) e suas concentrações variaram de 0,012 a 0,124 µg/kg. O valor de IDE foi de $1,35 \times 10^{-2}$ ng/kg PC/dia, porém a avaliação de risco não foi realizada pois não há sugestão dos níveis tolerados por humanos para EN B. A contaminação de pescado por micotoxinas é baixa ou mesmo inexistente, sendo aparentemente seguro para o consumo humano sob esse aspecto. Boa qualidade de matéria prima e uso de aditivos nutricionais nas rações, podem explicar essa baixa bioacumulação nos tecidos de peixes.

Palavras-chave: Contaminação. Humanos. LC-MS/MS-LIT. Tilápia do Nilo.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) a aquicultura foi responsável por 47,00% da produção mundial de pescado. As perspectivas são de que o consumo global de peixes até o ano de 2025 seja de 178 milhões de toneladas/ano, para isso a piscicultura tende a assumir papel primordial na oferta de pescado, superando a pesca extrativista na quantidade total de peixe ofertado (FAO, 2018).

O fato de o pescado ser um alimento saudável e possuir alta qualidade proteica, faz com que seja indicado para alimentação humana (Andrade et al., 2003), além disso, dependendo da localização e da oferta, apresenta-se como fonte proteica economicamente acessível para famílias de baixa renda (Ikutegbe e Sikoki, 2014). Devido a estes fatores, o consumo de peixes tem aumentado em todo o mundo, principalmente em função do aumento da disponibilidade, do relativo fácil acesso e de preços competitivos em relação às carnes bovina, suína e de aves (Anater et al., 2016).

O Brasil possui algumas características importantes que colaboram para o seu grande potencial na produção aquícola, entre eles o clima tropical, a oferta de água e sua matriz energética renovável (Rocha et al., 2013), além disso sua grande extensão territorial e avanços na área ambiental fizeram a atividade crescer nos últimos anos (ABP, 2020).

Para que a produção de peixes alcance bons índices zootécnicos e econômicos, é necessária a utilização de rações balanceadas e com custo reduzido, para isso uma maior participação de ingredientes vegetais é imprescindível. Porém, ingredientes vegetais tendem a conter maiores níveis de contaminação por micotoxinas quando comparados aos de origem animal, aumentando assim o risco de exposição pelos animais e até mesmo maior risco de exposição à micotoxinas pelo consumidor final (Pietsch, 2020).

As micotoxinas são compostos tóxicos que podem induzir uma ampla gama de efeitos deletérios tanto em animais com em humanos, incluindo carcinogenicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e prejuízo ao desenvolvimento (Kolpin et al., 2014). Elas podem adentrar a cadeia de

proteína animal através da alimentação dos animais de produção, já que as matérias primas que compõem as rações podem conter níveis significativos de micotoxinas. Quando o animal ingere esses alimentos, há a possibilidade de deposição de resíduos desses contaminantes em seus tecidos, ou seja, há um efeito chamado de *carry-over*, em que carnes ou alimentos à base de carne podem apresentar contaminação por micotoxinas (Pleadin et al., 2015; Montanha et al., 2018).

Entretanto, é impossível eliminar completamente a contaminação da dieta humana por micotoxinas, já que as contaminações podem ser diretas ou indiretas. O que se tenta fazer é diminuir o risco de exposição através de um rigoroso programa de monitoramento de possíveis resíduos no produto final (Abd-Elghny e Sallam, 2015). Esse monitoramento geralmente é realizado por meio de análises desses contaminantes em um ou outro ponto da cadeia, porém avaliações dos impactos econômicos e na saúde de indivíduos expostos também são interessantes, visando principalmente o desenvolvimento de recomendações seguras de níveis máximos de exposição (Wu, 2006).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a possível contaminação de micotoxinas em amostras de pescado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) comercializadas na cidade de Curitiba, Paraná, sul do Brasil; bem como comparar estimativas de consumo dessas micotoxinas através do pescado, com níveis toleráveis pré-estabelecidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Brasil e no Laboratório de Química e Toxicologia de Alimentos da Universitat de Valencia, Espanha.

2.1 Químicos e reagentes

Todos os solventes (acetonitrila, metanol, clorofórmio e acetato de etilo) foram adquiridos da companhia Merck (Darmstadt, Alemanha). Água deionizada (>18 MΩ cm de resistividade) foi obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA). O

formiato de amônio (HCO_2NH_4 , 97%) e o ácido fórmico foram adquiridos via Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

2.2 Amostras de pescado

Amostras de pescado foram coletadas em 16 peixarias da cidade de Curitiba, PR, sul do Brasil. Essas peixarias foram selecionadas através de busca na *internet* através da plataforma de busca do Google[®] (Google, 2018) utilizando os termos “peixaria” + “Curitiba” + “PR”, de acordo com metodologia descrita por Moutinho et al. (2015). Ao todo foram encontradas 38 peixarias, das quais um total de 16 estabelecimentos foram selecionados por meio da utilização da ferramenta “aleatório” do *software* Excel[®] (Microsoft Corporation, 2011).

No total foram coletadas 160 amostras de pescado distribuídas da seguinte forma: cinco visitas por peixaria em 5 meses seguidos, em cada visita foram adquiridos 2 filés de pescado por estabelecimento, totalizando 10 amostras por peixaria. Todas as amostras foram provenientes de pescado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Após a coleta, as amostras de pescado (peso médio de 105 g) foram liofilizadas (Liofilizador LH501 – Terroni[®] Equipamentos Científicos) e acondicionadas em sacos de polietileno a vácuo, identificadas com o local e data da coleta, o peso natural e o peso seco e mantidas em temperatura ambiente, protegidas de umidade e luminosidade até as análises cromatográficas para determinação de micotoxinas.

2.3 Micotoxinas analisadas

Foram avaliadas 21 micotoxinas: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina G₂ (AFG₂), fumonisina B₁ (FB₁), fumonisina B₂ (FB₂), fumonisina B₃ (FB₃), eniatina A (EN A), eniatina A₁ (EN A₁), eniatina B (EN B), eniatina B₁ (EN B₁), zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), 3-ácido deoxinivalenol (3DON), 15-ácido deoxinivalenol (15DON), nivalenol (NIV), neosolaniol (NEO), toxina HT-2 (HT-2), toxina-T2 (T-2) e beauvericina (BEA).

2.4 Validação do método

Os métodos foram validados de acordo com as recomendações da Comissão da União Europeia (EC, 2006). Características de desempenho, incluindo limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), especificidade, precisão, recuperação, efeito matriz e linearidade foram obtidas de amostras em branco do pescado. Para determinar a linearidade, as curvas de calibração foram construídas a partir dos padrões preparados em MeOH e dos padrões preparados com a amostra em branco.

O LOD foi medido como o valor mínimo encontrado nos padrões de calibração de matrizes correspondentes a uma relação sinal/ruído de pelo menos 3:1 e as LOQs de pelo menos 10:1.

A determinação da recuperação das extrações foi realizada pela análise da concentração de micotoxina nas amostras antes e após a extração, calculando a proporção das áreas de pico de cada micotoxina em cada amostra. Três níveis de adição foram injetados em amostras em branco para essas determinações (LOQ, 10LOQ e 100LOQ) e todas as análises foram realizadas em triplicata durante 3 dias consecutivos. O desvio padrão relativo (DPR) foi utilizado para expressar a precisão da recuperação da extração.

A comparação da inclinação entre as curvas de calibração nos extratos das amostras e nas curvas de calibração em solvente puro (MeOH) na mesma concentração foi utilizada para o cálculo do efeito da matriz (EM). A supressão/aprimoramento de sinal (SAS) devido ao EM foi realizada como o seguinte cálculo:

$$\text{SAS (\%)} = (\text{inclinação com matriz/inclinação em MeOH}) * 100$$

Valores próximos a 100% indicam que não há EM significativo, enquanto valores inferiores a 100% e superiores a 100% indicam supressão e aprimoramento de sinal, respectivamente.

2.5 Procedimentos de extração

Para as análises cromatográficas foi realizado o seguinte procedimento de extração: uma alíquota de 5 g foi utilizada de cada amostra de filé de

pescado previamente triturada e homogeneizada, na qual foram adicionados 10 mL de solução de ácido fórmico à 2%, seguida de agitação durante 30 minutos em agitador rotativo à 350 rpm; após a etapa inicial foram adicionados 10 mL de acetonitrila com posterior agitação durante 30 minutos em agitador rotativo à 350 rpm; foram então adicionados 4 g de sulfato de magnésio + 1 g de cloreto de sódio, seguidos por vigorosa agitação manual durante 30 segundos + 30 segundos em agitação em vórtex e posterior centrifugação a 5.000 rpm durante 10 minutos a 5 °C; após completa centrifugação uma fração de 2 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo tipo Falcon® de 15 mL, no qual foram acrescentados 0,1 g de C₁₈ + 0,3 g de cloreto de sódio. Essa mistura foi então agitada por 30 segundos em vórtex e centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos a 5 °C; e a amostra então foi filtrada (filtro nylon 0,22 µm) e armazenada em vial para posterior análise em cromatógrafo.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.6 Análises em LC-MS/MS-LIT

As análises de LC-MS/MS-LIT foram conduzidas por um sistema de cromatografia Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), acoplada a um espectrômetro de massa 3200 QTRAP® (AB Sciex, Foster City, CA, EUA), equipado com uma interface turbo de ionização por eletropulverização (ESI). O analisador QTRAP® combina um triplo quadrupolo totalmente funcional e um espectrômetro de massa de armadilha de íons lineares dentro do mesmo instrumento. A separação dos analitos foi realizada utilizando uma coluna LC-Gemini-NX (Phenomenex, Barcelona, Espanha) (150 mm x 2 mm I.D., tamanho de partícula 5 µm).

A taxa de fluxo foi ajustada para 0,8 mL/min e a temperatura do equipamento foi de 40 °C, com um eluente de água ligeiramente acidificada com 0,1% de ácido fórmico e formiato de amônio 5 mM (fase móvel A), e eluente contendo metanol, formiato de amônio 5 mM e ácido fórmico a 0,1% (fase móvel B). O gradiente de diluição começou com 0% de solvente B, aumentando para 100% em 10 minutos, diminuindo para 80% em 5 minutos e, finalmente, diminuindo para 70% em 2 minutos. Durante os subsequentes 6

minutos, a coluna foi limpa, reajustada para as condições iniciais e equilibrada durante 7 minutos. O volume das injeções foi de 10 µL.

A otimização de parâmetros de MS como potencial de decomposição (PD), energia de colisão (EC) e potencial de entrada de células de colisão (PEC) foi realizada por análise de injeção de fluxo para cada micotoxina padrão. O potencial de entrada (PE) e o potencial de saída da célula de colisão (PSC) foram definidos em 10 e 4 V, respectivamente, para todos os analitos. O MS foi operado no modo de monitoração de reação múltipla (MRM) e com a resolução ajustada para a resolução da unidade para Q1 e Q3.

2.7 Avaliação da ingestão diária estimada (IDE) e da ingestão diária tolerável (IDT)

Para o cálculo da IDE foram utilizados valores médios de consumo de pescado e de peso da população brasileira. O consumo médio de pescado do brasileiro é de 9,00 kg/ano (FAO, 2019), ou seja, 0,024 kg de pescado/dia; enquanto que o peso médio do brasileiro maior de 18 anos é de 69,50 kg (IBGE, 2015). Além desses valores, foi utilizada a concentração média das micotoxinas encontradas no pescado. Dessa forma, para expressar a IDE em µg/kg PC/dia, pode-se usar o seguinte cálculo:

$$IDE = (CA * C) / PC$$

No qual “CA” significa consumo do alimento em kg/dia, “C” é a concentração média de determinada micotoxina no pescado em µg/kg do alimento e “PC” é o peso corporal médio da população.

Dados relativos ao limite de ingestão diária de micotoxinas foram compilados de uma publicação específica sobre o tema, publicada em conjunto pela FAO e Organização Mundial da Saúde (OMS) (JECFA, 2001). Essa ingestão é chamada de IDT e é expressa em ng/kg PC/dia. Para avaliação do risco de exposição à micotoxinas através do consumo de pescado, a relação IDE/IDT foi expressa em %, ou seja, o percentual ingerido em relação ao total tolerável, para isso a IDE foi transformada em ng multiplicando-se o valor em µg/kg por 1000.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação dos métodos

Para a otimização do método, as amostras de pescado foram previamente analisadas para verificação da contaminação pelas micotoxinas; após essas análises, amostras negativas para contaminação por micotoxinas foram utilizadas como amostras em branco para realizar ensaios de recuperação e curvas de calibração.

Antes de otimizar as condições do LC-MS/MS-LIT, a varredura completa e a varredura dos íons filhos em modo positivo e negativo foram realizadas. Além disso, os compostos também foram caracterizados pelos tempos de retenção (TR), conforme demonstra a Tabela 1.

Foi obtida boa sensibilidade para as micotoxinas selecionadas quando o modo ESI+ foi utilizado: o pico de base observado foi $[M+H]^+$ para cada uma das micotoxinas estudadas.

Todas as amostras apresentaram boa linearidade em relação à faixa de trabalho (10LOQ e 100LOQ), o coeficiente de regressão das curvas de calibração foi superior 0,9724.

Os LODs e LOQs foram estimados a partir de um extrato de uma amostra em branco, fortificada com concentrações decrescentes das 21 micotoxinas. As adições foram realizadas a partir de três amostras em branco diferentes. Os LODs e LOQs foram calculados usando o critério de $S/R \geq 3$ e $S/R \geq 10$ para LOD e LOQ, respectivamente (Tabela 1).

Os resultados de recuperação permaneceram entre 77,80% e 112,00% e o DPR foi inferior a 12,90%. Os valores de repetibilidade intra-dia (n=3) e reprodutibilidade inter-dia (n=5), foram expressos em DPR e variaram de 2,80% a 12,40% e de 3,60% a 12,90%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros analíticos obtidos na validação do método. Efeitos de matriz (EM – SAS %), limites de detecção (LODs), limites de quantificação (LOQs), tempo de retenção (TR), linearidade (R^2), recuperações, variações inter-dia e intra-dia para cada uma das micotoxinas analisadas.

| Micotoxina | EM (SAS %) | LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | TR em MeOH (min) | R^2 | Recuperações (%) \pm DPR | | | |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|--------|----------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| | | | | | | Variação Inter-Dia (%) | | Variação Intra-Dia (%) | |
| | | | | | | 10LOQ | 100LOQ | 10LOQ | 100LOQ |
| AFB₁ | 99,71 | 0,70 | 2,00 | 6.06 | 0,9987 | 91,50 \pm 10,30 | 94,70 \pm 6,10 | 93,10 \pm 6,80 | 93,90 \pm 5,10 |
| AFB₂ | 99,97 | 2,00 | 4,00 | 5.98 | 0,9986 | 85,30 \pm 12,90 | 86,40 \pm 4,60 | 96,90 \pm 12,40 | 87,10 \pm 3,30 |
| AFG₁ | 99,09 | 2,00 | 4,00 | 5.89 | 0,9983 | 84,00 \pm 6,20 | 86,80 \pm 3,60 | 85,30 \pm 5,30 | 86,40 \pm 4,60 |
| AFG₂ | 92,02 | 2,00 | 4,00 | 5.89 | 0,9942 | 78,60 \pm 7,50 | 89,30 \pm 9,20 | 92,60 \pm 9,20 | 93,90 \pm 3,30 |
| FB₁ | 90,26 | 8,00 | 17,00 | 6.22 | 0,9956 | 90,70 \pm 10,30 | 95,70 \pm 6,40 | 94,50 \pm 5,50 | 96,50 \pm 4,70 |
| FB₂ | 88,95 | 10,00 | 15,00 | 6.65 | 0,9920 | 88,90 \pm 7,30 | 88,50 \pm 6,30 | 78,90 \pm 8,30 | 79,10 \pm 3,20 |
| FB₃ | 99,44 | 12,00 | 17,00 | 6.66 | 0,9850 | 103,40 \pm 5,60 | 109,20 \pm 9,50 | 112,00 \pm 9,40 | 108,70 \pm 4,30 |
| ENA A | 101,40 | 0,50 | 1,00 | 8.33 | 0,9848 | 96,00 \pm 9,30 | 103,60 \pm 8,20 | 96,60 \pm 5,20 | 98,30 \pm 7,10 |
| ENA A₁ | 101,22 | 0,20 | 0,50 | 8.18 | 0,9785 | 94,00 \pm 10,10 | 92,30 \pm 11,70 | 95,30 \pm 7,30 | 101,60 \pm 5,80 |
| ENA B | 100,31 | 0,01 | 0,10 | 7.81 | 0,9899 | 91,00 \pm 9,90 | 99,70 \pm 9,60 | 92,00 \pm 3,30 | 94,00 \pm 6,50 |
| ENA B₁ | 102,15 | 0,01 | 0,10 | 7.99 | 0,9754 | 92,00 \pm 6,00 | 99,60 \pm 8,40 | 98,80 \pm 9,60 | 92,00 \pm 5,40 |
| ZEA | 99,27 | 8,00 | 16,00 | 6.85 | 0,9999 | 87,70 \pm 6,80 | 88,30 \pm 4,20 | 87,40 \pm 6,30 | 86,40 \pm 4,80 |
| OTA | 99,76 | 7,00 | 12,00 | 6.83 | 0,9985 | 94,30 \pm 9,10 | 93,60 \pm 4,70 | 88,90 \pm 11,00 | 95,70 \pm 4,30 |
| DON | 100,57 | 0,05 | 0,10 | 3.92 | 0,9876 | 95,30 \pm 9,60 | 88,00 \pm 4,90 | 96,90 \pm 7,30 | 99,30 \pm 2,80 |
| 3DON | 98,19 | 2,00 | 4,00 | 5.64 | 0,9995 | 101,30 \pm 2,90 | 104,90 \pm 5,20 | 99,90 \pm 7,40 | 106,50 \pm 6,20 |

| | | | | | | | | | |
|--------------|--------|------|-------|------|--------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 15DON | 99,69 | 2,00 | 4,00 | 5.65 | 0,9941 | 79,40 ± 3,80 | 83,00 ± 4,50 | 82,90 ± 6,70 | 78,50 ± 9,00 |
| NIV | 100,33 | 0,50 | 1,00 | 6.04 | 0,9837 | 85,90 ± 8,30 | 83,60 ± 9,40 | 82,90 ± 3,20 | 83,40 ± 4,40 |
| NEO | 88,62 | 2,00 | 4,00 | 5.42 | 0,9957 | 111,70 ± 5,70 | 108,60 ± 6,60 | 99,40 ± 4,10 | 101,00 ± 11,30 |
| HT-2 | 99,68 | 2,00 | 4,00 | 6.29 | 0,9978 | 84,50 ± 5,30 | 84,90 ± 6,80 | 83,90 ± 6,70 | 77,80 ± 6,30 |
| T-2 | 98,07 | 4,00 | 8,00 | 6.51 | 0,9992 | 81,30 ± 10,10 | 89,10 ± 11,70 | 92,00 ± 12,10 | 85,90 ± 10,60 |
| BEA | 102,19 | 3,00 | 10,00 | 8.08 | 0,9724 | 85,00 ± 11,50 | 93,00 ± 11,90 | 93,50 ± 6,80 | 96,00 ± 7,70 |

Nota: EM: efeito matriz; SAS: supressão/aprimoramento de sinal; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; MeOH: metanol; min: minuto; DPR: desvio padrão relativo; AFB₁: aflatoxina B₁; AFB₂: aflatoxina B₂; AFG₁: aflatoxina G₁; AFG₂: aflatoxina G₂; FB₁: fumonisina B₁; FB₂: fumonisina B₂; FB₃: fumonisina B₃; ENA A: eniatina A; ENA A₁: eniatina A₁; ENA B: eniatina B; ENA B₁: eniatina B₁; ZEA: zearalenona; OTA: ocratoxina A; DON: deoxinivalenol; 3DON: 3-ácido deoxinivalenol; 15DON: 15-ácido deoxinivalenol; NIV: nivalenol; NEO: neosolaniol; HT-2: toxina HT-2; T-2: toxina T-2; BEA: beauvericina (BEA).

3.2 Ocorrência de micotoxina em amostras de pescado

Dentre todas as 21 micotoxinas pesquisadas, somente EN B foi encontrada. Sua presença foi evidenciada em 86,88% das amostras (n=139), sendo que suas concentrações mínima e máxima foram respectivamente 0,012 e 0,124 µg/kg, e sua concentração média foi de 0,039 µg/kg.

Nenhuma das demais micotoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, FB₁, FB₂, FB₃, ENA A, ENA A₁, ENA B₁, ZEA, OTA, DON, 3DON, 15DON, NIV, NEO, HT-2, T-2 e BEA) foi detectada. A Tabela 2 demonstra as quantidades totais de amostras positivas para presença das micotoxinas, bem como as suas respectivas prevalências e concentrações (µg/kg de pescado).

A bioacumulação de micotoxinas nos tecidos animais geralmente ocorre através da ingestão das mesmas via ração, na toxicologia esse efeito é chamado de *carry-over effect*. Para animais terrestres, esse efeito parece ser pequeno, entretanto o fator de transferência (proporção do ingerido que é acumulado nos tecidos) para peixes pode ser bastante diferente, levando a uma subestimação dos riscos a que esses animais estão expostos (Gonçalves et al., 2020).

Na sequência serão descritos alguns trabalhos que demonstram essa bioacumulação em estudos com níveis controlados de micotoxinas nas rações, sendo que a AFB₁ é a principal micotoxina estudada, com um maior número de publicações que avaliam o efeito *carry-over*.

Deng et al. (2010) encontraram resíduos de AFB₁ no fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e tilápias azuis (*Oreochromis aureus*) após alimentá-las com diferentes níveis de AFB₁ (19, 85, 245, 638, 793 e 1.641 µg/kg). As concentrações variavam de 10,20 a 24,00 µg/kg após 15 semanas, enquanto que na 20^a semana de fornecimento encontraram uma concentração máxima de 47,40 µg/kg, ou seja, a deposição dessa micotoxina parece ser gradativa, aumentando de acordo com um maior tempo de exposição.

Em outro estudo realizado com robalos (*Dicentrarchus labrax L.*), alimentados com uma dieta contendo AFB₁ durante 42 dias, foi detectada a presença AFB₁ nos músculos dos animais através do método AflastestTm[®], as concentrações de AFB₁ nos músculos variaram de 800 µg/kg no 14^o dia para 2.500 µg/kg no 42^o dia de exposição (El-Sayed e Khalil, 2009).

Tabela 2. Resultados das análises de pescado para as diferentes micotoxinas encontradas nas amostras.

| Micotoxinas | Amostras Positivas | Prevalência (%) | Concentração (µg/kg) | | |
|--------------------|--------------------|-----------------|----------------------|--------|--------------|
| | | | Mínimo | Máximo | Média ± DP |
| AFB ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| AFB ₂ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| AFG ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| AFG ₂ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| FB ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| FB ₂ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| FB ₃ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| ENA A | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| ENA A ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| ENA B | 139/160 | 86,88 | 0,012 | 0,124 | 0,039 ± 0,01 |
| ENA B ₁ | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| ZEA | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| OTA | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| DON | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| 3DON | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| 15DON | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| NIV | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| NEO | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| HT-2 | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| T-2 | 0/160 | ND | ND | ND | ND |
| BEA | 0/160 | ND | ND | ND | ND |

Nota: DP: desvio padrão; AFB₁: aflatoxina B₁; AFB₂: aflatoxina B₂; AFG₁: aflatoxina G₁; AFG₂: aflatoxina G₂; FB₁: fumonisina B₁; FB₂: fumonisina B₂; FB₃: fumonisina B₃; ENA A: eniatina A; ENA A₁: eniatina A₁; ENA B: eniatina B; ENA B₁: eniatina B₁; ZEA: zearalenona; OTA: ocratoxina A; DON: deoxinivalenol; 3DON: 3-ácido deoxinivalenol; 15DON: 15-ácido deoxinivalenol; NIV: nivalenol; NEO: neosolaniol; HT-2: toxina HT-2; T-2: toxina T-2; BEA: beauvericina (BEA); ND: não detectado.

Michelin et al. (2017) ao estudar lambaris (*Astyanax altiparanae*) alimentados com dietas contendo três concentrações diferentes de AFB₁ (10, 20 e 50 µg/kg) durante um período de 120 dias, detectaram a presença de AFB₁ em músculo a partir de 90 dias de exposição. As concentrações

encontradas aos 90 dias foram de 6,64, 16,17 e 58,47 µg/kg para as dietas contendo 10, 20 e 50 µg/kg de AFB₁, respectivamente. Aos 120 dias de intoxicação, essas concentrações foram ainda maiores, sendo de 18,76, 19,69 e 49,92 µg/kg de AFB₁, respectivamente.

Além de AFB₁ há trabalhos demonstrando o efeito *carry-over* de outras micotoxinas em peixes. Bernhoft et al. (2017) ao fornecerem dietas contendo DON e OTA para salmão do atlântico (*Salmo salar*), encontraram níveis crescentes de DON em músculo, os quais foram correlacionados positivamente com a dose (maior dose = maior resíduo), entretanto, o mesmo não ocorreu para OTA, em que os níveis encontrados nos músculos ficaram abaixo do LOQ para esse estudo. A OTA parece ter uma rápida eliminação em organismos aquáticos e mesmo com trabalhos demonstrando sua presença em pescado, o período de jejum pré-abate parece ser suficiente para a sua depuração (Gonçalves et al., 2020), diminuindo assim o risco para humanos.

Assim como o presente estudo, há também trabalhos que avaliaram somente a presença de micotoxinas no pescado, não controlando a contaminação dos alimentos que os peixes ingeriram, é o caso de Massocco (2016), que ao avaliar amostras de pescado das espécies lambari (*Astana altiparanae*), matrinxã (*Brycon cephalus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), provenientes de criação em cativeiro, não encontrou resíduos de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁.

Tolosa et al. (2014) avaliaram a presença de micotoxinas emergentes (eniáticas [ENs] e BEA) em amostras de pescado de robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Sparus aurata*) criados em cativeiro e todas as amostras (n=20) foram adquiridas em supermercados da cidade de Valência, na Espanha. BEA e EN A não foram encontradas em quaisquer amostras de pescado, enquanto EN A₁, EN B e EN B₁ foram encontradas em ambos os pescados, com prevalências de 40,00%, 65,00% e 50,00% das amostras, respectivamente. As maiores concentrações foram encontradas para EN B, com 13,50 µg/kg. No presente estudo o nível médio de EN B encontrado foi de 0,039 ± 0,01 µg/kg de pescado, valores inferiores ao descritos por Tolosa et al. (2014).

Além da adição das micotoxinas à ração, um dos possíveis fatores pelo qual o efeito *carry-over* é encontrado em experimentos controlados é a não

utilização de aditivos alimentares que atuam contra micotoxinas, justamente pelo objetivo dos trabalhos ser avaliar os efeitos/resíduos dessas toxinas. Uma das classes de aditivos mais eficaz e conseqüentemente mais utilizada para minimizar os efeitos de dessas substâncias na alimentação animal, é a classe dos adsorventes, onde especificamente as bentonitas interagem com as cargas elétricas de aflatoxinas por exemplo, minimizando ou impedindo sua absorção intestinal (Carraro et al., 2014). Há inclusive trabalhos demonstrando que quando utilizados, os adsorventes impedem a bioacumulação de aflatoxinas (Ayyat et al., 2018).

Essa utilização de adsorventes na ração dos animais pode explicar a ausência, ou mesmo os baixos níveis de resíduos encontrados em trabalhos os quais as amostras de pescado são adquiridas aleatoriamente (sem controle da ingestão das micotoxinas), além de serem provenientes de criatórios comerciais que fazem uso preventivo desses aditivos visando principalmente um melhor desempenho animal.

Quanto à avaliação de risco aos humanos, a IDE calculada de EN B foi de $1,35 \times 10^{-2}$ ng/kg PC/dia, entretanto não possível realizar a comparação com a IDT para essa micotoxina, pois níveis seguros de EN B não foram definidos na publicação da JEFCA (2001). Isso sugere que mais pesquisas sejam realizadas buscando definir esses níveis, já que nos últimos anos têm-se demonstrado uma incidência importante de micotoxinas emergentes nos alimentos (Tolosa et al., 2014).

Mesmo que não haja uma definição de níveis seguros para ENs, elas parecem não ser um problema grave para o consumo humano desde que os alimentos passem por processamento térmico. É o que demonstra os resultados encontrados por Tolosa et al. (2017), que observaram reduções significativas (mínimo 42,00% e máximo 100%) de ENs após o cozimento de pescado de robalo e dourada em diferentes maneiras.

Outro fator que contribui para minimizar o risco de ingestão de micotoxinas através de pescado por humanos, pelo menos no Brasil, é a baixa ingestão de pescado produzido em cativeiro. Enquanto o cálculo da IDE foi realizado levando em consideração um consumo *per capita* médio de 9,04 kg/ano, o consumo *per capita* de peixes produzidos em cativeiro é de cerca de 3,95 kg/ano no Brasil (FAO, 2018).

4 CONCLUSÃO

Aparentemente, com base nos resultados apresentados, a contaminação por micotoxinas em pescado de tilápia oriundo de produção industrial é baixa ou mesmo inexistente, com as principais micotoxinas não sendo encontradas em amostras adquiridas no comércio de Curitiba. A única micotoxina encontrada (EN B) apresentou níveis bastante baixos, e mesmo que não haja regulamentação para seus níveis tóxicos, parece não ser um contaminante importante nesse tipo de alimento.

Esse baixo nível de resíduos no pescado pode estar correlacionado a medidas tomadas pela indústria de produção animal no que diz respeito à alimentação dos animais, entre elas a seleção de matérias primas com baixo ou nenhum nível de contaminação e também do uso de adsorventes de micotoxinas, garantindo assim o desempenho animal e consequentemente evitando e/ou diminuindo os resíduos de micotoxinas no produto final.

Sob o ponto de vista do risco de exposição aos humanos, não foi possível realizar a comparação dos níveis estimados com os níveis toleráveis, pois ainda não há definições dos níveis seguros da única micotoxina encontrada no pescado. Somente há definição dos níveis toleráveis de ingestão por humanos de aflatoxinas M₁, fumonisinas, ocratoxina A e de tricotecenos, ou seja, há uma desatualização nesses aspectos, principalmente no que se refere às micotoxinas emergentes, como o caso da EN B. Sugere-se, portanto, a realização de novas investigações para definição de níveis seguros, visto que as recomendações atuais parecem ser insuficientes para a gama de compostos tóxicos investigados nos alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e ao Programa de Pesquisa e Inovação “*European Union’s Horizon 2018*” (MycoKey – nº 678781) pela ajuda financeira e profissional.

REFERÊNCIAS

- Abd-Elghany SM, Sallam KI. Rapid determination of total aflatoxins and ochratoxins A in meat products by immuno-affinity fluorimetry. *Food Chem* 2015;15:253-256.
- ABP – Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário PeixeBR da Piscicultura – Produção cresce 4,9% e atinge em 2019 758.006 t. 2020.
- Anater A, Manyes L, Meca G, Ferrer E, Luciano FB, Pimpão CT, Font G. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. *Aquaculture* 2016;451:1-10.
- Andrade DR, Yasui GS. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Rev Bras Reprod Anim* 2003;27(2):166-172.
- Ayyat MS, Ayyat AMN, Al-Sagheer AA, El-Hais AEM. Effect of some safe feed additives on growth performance, blood biochemistry and bioaccumulation of aflatoxin residues of Nile tilapia fed aflatoxin-B₁ contaminated diet. *Aquaculture* 2018;495:27-34.
- Bernhoft A, Høgåsen HR, Rosenlund G, Ivanova L, Berntssen MHG, Alexander J, Eriksen GS, Fæste CK. Tissue distribution and elimination of deoxynivalenol and ochratoxin A in dietary-exposed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Addit Contam A* 2017;34(7):1211-1224.
- Carraro A, Giacomo A, Giannossi ML, Medici L, Muscarella M, Palazzo L, Quaranta V, Summa V, Tateo F. Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M₁ from contaminated milk and effects on milk quality. *Appl Clay Sci* 2014;88-89:92-99.
- Deng S, Tian L, Jin S, Liang G, Yang H, Du Z, Liu Y. Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture* 2010;233-240.
- EC – European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 2006; L 364, 5-24.
- El-Sayed YS, Khalil RH. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B₁ in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labras* L.). *Food Chem Toxicol* 2009;47:1606-1609.

- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fishery and Aquaculture Country Profiles. The Federative Republic of Brazil. Rome – Italy, 2019.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Agriculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome – Italy, 2018.
- Gonçalves RA, Schatzmayr D, Albalat A, Mackenzie S. Mycotoxins in aquaculture: Feed and food. Rev Aquacult 2020;12:145-175.
- Google, 2018. Disponível em: <<https://www.google.com.br>>. Acesso em: 19 de maio de 2019.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Pesquisa nacional de saúde 2013 – Ciclos de vida: Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro, Brasil. 2015;1-95. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 10 de março de 2020.
- Ikutegbe V, Sikoki F. Microbiological and biochemical spoilage of smoke-dried fishes sold in West African open markets. Food Chem 2014;161:332-336.
- JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives. WHO Food additives series 47: Safety Evaluation of certain mycotoxins in foods. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. 2001. 701pp.
- Kolpin DW, Schenzel J, Meyer MT, Phillips PJ, Hubbard LE, Scott TM, Bucheli TD. Mycotoxins: Diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. Sci Total Environ 2014;470-471:669-676.
- Massocco MM. Ocorrência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em pisciculturas do Estado de São Paulo: Rações e espécies comerciais de pescado de cultivo (Dissertação de Mestrado). Pirassununga, SP. Universidade de São Paulo, 2016.
- Michelin EC, Massocco MM, Godoy SHS, Baldin JC, Yasui GS, Lima CG, Rottinghaus GE, Sousa RLM Fernandes AM. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. Food Addit Contam A 2017;34:265-272.
- Microsoft® Excel® for Mac 2011. Versão 14.7.2. Microsoft Corporation, 2010.

- Montanha FP, Anater A, Burchard JF, Luciano FB, Meca G, Manyes L, Pimpão CT. Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food Chem Toxicol* 2018;111:494-502.
- Moutinho FFB, Nascimento ER, Paixão RL. Percepção da sociedade sobre a qualidade de vida e o controle populacional de cães não domiciliados. *Ciênc Anim Bras* 2015;16(4):574-588.
- Pietsch C. Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. *Mycotoxin Res* 2020;36:41-62.
- Pleadin J, Staver MM, Vahčić N, Kovačević D, Milone S, Saftić L, Scortichini G. Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food control* 2015;52:71-77.
- Rocha CMC, Resende EK, Routledge EAB, Lundstedt LM. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. *Pesq Agropec Bras* 2013;48(8):4-6.
- Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins in feed and fish from aquaculture. *J Agric Food Chem* 2014;62(51):12462-12470.
- Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins in feed and fish from aquaculture. *J Agric Food Chem* 2014;62(51):12462-12470.
- Wu F. Mycotoxin reduction in Bt corn: Potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Res* 2006;15:277-289.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese contribui para um melhor entendimento do possível risco de exposição às micotoxinas, às quais animais e humanos estão sujeitos, seja via ingestão de ração ou de pescado, respectivamente.

Com base nos resultados da pesquisa com consumidores, conclui-se que a tilápia é o peixe mais adquirido e consumido na região de Curitiba. Essa preferência se deve ao fato da maior oferta e facilidade para aquisição e preparo. Entretanto, foi encontrado em certo nível de desconhecimento por parte da população no que diz respeito sobre o que são e quais os efeitos as micotoxinas podem causar. De certa forma, isso é compreensível devido à pouca disseminação desse tema fora das áreas acadêmica e técnica.

A coocorrência de micotoxinas parece ser comum em rações para peixes, além disso, a concentração de algumas delas como a zearalenona extrapolam os níveis considerados seguros para os peixes. Isso pode levar a um maior risco de exposição e conseqüentemente piora do desempenho animal. Devido à limitação de dados sobre doses toleráveis para peixes, sugerem-se mais estudos visando recomendações de LOEL para diferentes espécies, visto que muitas vezes a extrapolação para interespecies pode superestimar os efeitos deletérios das micotoxinas.

Outro possível impacto dessa contaminação aparentemente excessiva é a bioacumulação nos tecidos do peixe, já que o efeito *carry-over* é comprovado para diversas micotoxinas. Mais trabalhos são necessários para avaliar a origem desses contaminantes, se adentram a cadeia ainda da alimentação animal ainda nas matérias primas, ou se a contaminação ocorre durante a armazenagem da ração já pronta.

Sob o aspecto de exposição da população às micotoxinas, o pescado de tilápias criadas em cativeiro parece não oferecer riscos importantes. Entretanto, a definição de níveis seguros para o consumo humano é necessária para que se tenha maior segurança nessa avaliação. Além disso, o monitoramento constante e efetivo é importante para a garantia da qualidade do produto final.

REFERÊNCIAS

- Adejumo TO, Adejoro DO. Incidence of aflatoxins, fumonisins, trichothecenes and ochratoxins in Nigerian foods and possible intervention strategies. *Food Sci Qual Manag* 2014;31:127-146.
- Adeyeye SAO. Fungal mycotoxins in foods: A review. *Food Sci Technol* 2016; 2:1213127.
- Ah-Seo J, Won Lee Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:1331-1334.
- Ahangarkani F, Rouhi S, Azizi IG. A review on incidence and toxicity of fumonisins. *Toxin Rev* 2014;33(3):95-100.
- Anater A, Manyes L, Meca G, Ferrer E, Luciano FB, Pimpão CT, Font G. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. *Aquaculture* 2016;451:1-10.
- Anukul N, Vangnai K, Mahakarnchanakul W. Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level. *J Food Drug Anal* 2013;21(3) 227-241.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 18/02/2011. *Diário Oficial da União* nº 37, de 22/02/2011. Seção I, p. 72.
- Ashiq S. Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Compr Rev Food Sci F* 2015;14:159-175.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(3):497-516.
- Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Pública* 2002;36:319-323.
- Castillo JMS. *Micotoxinas en alimentos*. 1 ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2007. 424 p.
- Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 2010;21:370-380.
- DOU – Diário Oficial da União, 1988. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/88. *Diário Oficial da União*, de 09/11/88. Seção I, p. 21968.
- EC – European Commission. Commission Regulation (EC) No 1152/2009 of 27 November 2009 imposing special conditions governing the import of certain foodstuffs from certain third countries due to contamination risk by

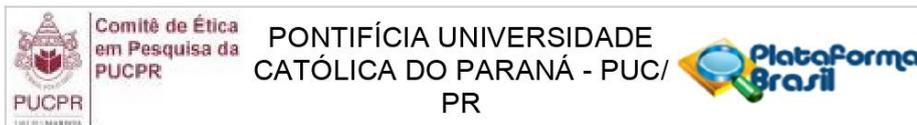
- aflatoxins and repealing Decision 2006/504/EC. Official Journal of the European Communities 2009; L 313, 1-10.
- EC – European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006; L 364, 5-24.
- EC – European Commission. Commission Regulation (EC) No 792/2002 of 7 May 2002 amending temporarily Regulation (EEC) No 218/92 on administrative cooperation in the field of indirect taxation (VAT) as regards additional measures regarding electronic commerce. Official Journal of the European Communities 2002; L 128, 1-3.
- EC – European Commission. Commission Regulation (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. Official Journal of the European Communities 2014; L 147, 1-15.
- Escrivá L, Font G, Manyes L, Berrada H. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: An overview. *Toxins* 2017;9(251):1-33.
- Escrivá L, Font G, Manyes L. In vivo toxicity studies of *Fusarium* mycotoxins in the last decade: A review. *Food Chem Toxicol* 2015;78:185-206.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Economic analysis of supply and demand for food up to 2030 – Special focus on fish and fishery products. Audun Lem, Trond Bjorndal, Alena Lappo: 2014. Rome.
- Ferrão J, Bell V, Chabite IT, Fernandes TH. Mycotoxins, food and health mycotoxins, food and health. *J Nutr Health Food Sci* 2017;5(7):1-10.
- Fonseca H. Legislação sobre micotoxinas. Piracicaba, 2010. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 12 maio 2020.
- Freire FCO, Vieira IGP, Guedes MIF, Mendes FNP. *Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p.
- Gajecka M, Stopa E, Tarasiuk M, Zielonka Ł, Gajecki M. The expression of type-1 and type-2 nitric oxide synthase in selected tissues of the gastrointestinal tract during mixed mycotoxicosis. *Toxins* 2013;5:2281-2292.

- Gomes STA. Micotoxinas do *Fusarium* sp. – Uma questão sanitária. Brasília. Monografia [Especialização em qualidade de alimentos] – Universidade de Brasília; 2003.
- Gonçalves B, Santana L, Pelegrini P. Micotoxinas: Uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. Rev Saúde Púb 2017;4(1):1-12.
- Guerre P. Fusariotoxins in avian species: Toxicokinetics, metabolism and persistence in tissues. Toxins 2015;7:2289-2305.
- Hesseltine CW. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. In: Rodricks JV, editor. Mycotoxins and other fungal related food problems. Washington DC: American Chemical Society; 1976. p. 1-22.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. Chemical agents and related occupations: A review of human carcinogens. 2012; 100F. Lyon, France.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 1993; 56F. Lyon, France.
- JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives. WHO Food additives series 47: Safety Evaluation of certain mycotoxins in foods. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. 2001. 701pp.
- Jeswal P, Kumar D. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. Int J Microbiol 2015;242486:1-8
- Khazaeli P, Najafi ML, Bahaabadi GA, Shakeri F, Tahami AN. Evaluation of aflatoxin contamination in raw and roasted nuts in consumed Kerman and effect of roasting, packaging and storage conditions. Life Sci J 2014;10:578-583.
- Leggieri MC, Decontardi S, Bertuzzi T, Pietri A, Battilani P. Modeling growth and toxin production of toxigenic fungi signaled in cheese under different temperature and water activity regimes. Toxins 2017;9(4):1-17.
- Liew WPP, Mohd-Redzwan S. Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota. Front Cell Infect Microbiol 2018;8(60):1-17.
- Liuzzi VC, Fanelli F, Tristezza M, Haidukowski M, Picardi E, Manzari C, Lionetti C, Grieco F, Logrieco AF, Thon MR, Pesole G, Mulè G. Transcriptional

- analysis of *Acinetobacter* sp. neg1 capable of degrading ochratoxin A. *Front Microbiol* 2017;7(2162):1-9.
- Matejova I, Svobodova Z, Vakula J, Mares J, Modra H. Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. *J World Aquacult Soc* 2017;48(2):186-200.
- Minami L, Meirelles PG, Hirooka EY, Ono EYS. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. *Semin Cienc Agrar* 2004;25(3):207-224.
- Montanha FP, Anater A, Burchard JF, Luciano FB, Meca G, Manyes L, Pimpão CT. Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food Chem Toxicol* 2018;111:494-502.
- Nathanail AV, Varga E, Meng-Reiterer J, Bueschl C, Michlmayr H, Malachova A, Fruhmann P, Jestoi M, Peltonen K, Adam G, Lemmens M, Schuhmacher R, Berthiller F. Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins T-2 toxin and HT-2 toxin in wheat. *J Agric Food Chem* 2015;63:7862-7872.
- Nones J, Savi GD, Pereira LF, Frozza R, Riella HG, Nones J. Procedimentos para colheita de amostras e análises laboratoriais de micotoxinas presentes em dietas humanas e animais. *Pubvet* 2017;11(3):229-242.
- Oliveira MS, Prado G, Abrantes FM, Santos LG, Veloso T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades de Minas Gerais no período de 1998-2000. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002;61(1):1-6.
- Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Veloso T, Souza LAF, Ribeiro JMM. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. *Ciênc agrotec* 2005;29:106-112.
- Piacentini KC, Rocha LO, Fontes LC, Carnielli L, Reis TA, Corrêa B. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B₁ and deoxynivalenol in beer quality. *Food Chem* 2017;218:64-69.
- Pietsch C. Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. *Mycotoxin Res* 2020;36:41-62.
- Pinton P, Oswald IP. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: A review. *Toxins* 2014;6:1615-1643.

- Pitt JI. Mycotoxins. In: Riemann HP, Cliver DO. Foodborne infections and intoxications. 3. ed. Amsterdã: Elsevier Inc.; 2013. p. 409-418.
- Prencipe S, Siciliano I, Gatti C, Garibaldi A, Gullino ML, Botta R, Spadaro D. Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins. Food Microbiol 2018;76:396-404.
- Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. 2007. Int J Food Microbiol 2007;119(1-2):3-10.
- Rocha MEB, Freire FCO, Maia FEF, Guedes MIF, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control 2014;36:159-165.
- Udomkun P, Wiredu AN, Nagle M, Müller J, Vanlauw B, Bandyopadhyay R. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – A review. Food Control 2017;76:127-138.
- Xie L, Chen M, Ying Y. Development of methods for determination of aflatoxins. Crit Rev Food Sci Nutr 2016;56:2642-2664.
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food Chem Toxicol 2007;45:1-18.

ANEXO 1 – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do Nível do Consumo do Pescado de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da Conscientização dos Consumidores Quanto à Possível Contaminação por Micotoxinas em Curitiba-PR

Pesquisador: FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 74862817.5.0000.0100

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.310.264

Apresentação do Projeto:

Conforme descrito pelo pesquisador: "Tilápia do nilo representa um dos pescados mais consumidos, atualmente, no Brasil. 25% de todos os alimentos consumidos estão contaminados por micotoxinas, sendo que estas muitas vezes passam pelos consumidores de forma imperceptível. As micotoxinas representam um problema global e de saúde pública para seres humanos e animais." A pesquisa então será por meio de: "Aplicação de questionário a população representativa da cidade de Curitiba, estado do Paraná, para avaliar o nível do consumo do pescado de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e da conscientização dos consumidores quanto à possível contaminação por micotoxinas em Curitiba-PR"

Objetivo da Pesquisa:

O pesquisador apresentou o seguinte objetivo da pesquisa: "Objetivo Primário: Este projeto tem como objetivo avaliar o nível do consumo do pescado de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e da conscientização dos consumidores quanto à possível contaminação do pescado por micotoxinas na cidade de Curitiba, Paraná."

Endereço: Rua Imaculada Conceição - 1155 - 3º andar
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 2.310.264

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No projeto, o pesquisador descreveu o seguinte:

- 1) Riscos: "Os riscos que podem acontecer aos participantes da pesquisa está relacionado ao constrangimento que estes podem sofrer ao serem questionados sobre a temática."
- 2) Benefícios: "Os benefícios que podem acontecer aos participantes será a explanação sobre o tema da pesquisa, esclarecendo, dessa forma, aos participantes que tiverem dúvidas sobre o que são micotoxinas, como podem ocorrer as contaminações do pescado, como identificar se há ou não micotoxinas nos alimentos, quais os sinais de exposição dos consumidores às micotoxinas, entre outros questionamentos que poderão surgir da parte dos indivíduos que responderão à pesquisa."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância acadêmico-científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os termos obrigatórios, em conformidade com as Resoluções nºs 466/12 e 510/16.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado, pois em consonância com os ditames éticos e legais das Resoluções nºs 466/12 e 510/16.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê.

Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|----------------|---------|----------|-------|----------|
|----------------|---------|----------|-------|----------|

Endereço: Rua Imaculada Conceição - 1155 - 3º andar
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 2.310.264

| | | | | |
|--|--|------------------------|------------------------------------|--------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_980137.pdf | 18/09/2017 14:43:45 | | Aceito |
| Outros | QUESTIONARIO.doc | 18/09/2017 14:42:04 | FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA | Aceito |
| Outros | Autorizacao_mercado.doc | 18/09/2017 14:39:46 | FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 28/08/2017 11:40:44 | FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO.doc | 16/08/2017 12:19:01 | FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | CEP.docx | 16/08/2017 12:17:28 | FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA | Aceito |
| Cronograma | CRONOGRAMA.docx | 16/08/2017 12:10:18 | FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA | Aceito |
| Brochura Pesquisa | PROJETO_PIBIC.doc | 16/08/2017 12:08:14 | FRANCISCO PIZZOLATO MONTANHA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 02 de Outubro de 2017

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição - 1155 - 3º andar
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre Esclarecimento (TCLE) utilizado no estudo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pág. 1/3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do estudo Avaliação do Nível do Consumo do Pescado de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da Conscientização dos Consumidores Quanto à Possível Contaminação por Micotoxinas em Curitiba-PR e que tem como objetivo avaliar o nível do consumo deste pescado na cidade de Curitiba e da conscientização dos consumidores quanto à contaminação desta carne por micotoxinas. Acreditamos que esta pesquisa seja importante porque a partir desta será possível elucidar a respeito do conhecimento da população sobre contaminações por micotoxinas em pescado e o que representam as micotoxinas para a saúde dos consumidores, uma vez que a ocorrência destas toxinas nos alimentos não é rara, além de ilustrar, representativamente, o nível de consumo de tilápia do nilo em Curitiba-PR, da qual, este resultado irá fundamentar uma nova pesquisa, tema de estudo de Pós-Doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida - PUCPR.

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua participação no referido estudo será de responder ao questionário, em língua portuguesa, pertinente ao tema da pesquisa que será aplicado em mercados e/ou peixarias da cidade de Curitiba-PR.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Através deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está sendo alertado de que, da pesquisa a se realizar, pode esperar alguns benefícios, tais como: esclarecimentos sobre o assunto pertinente à pesquisa, como micotoxinas e qualidade dos pescados. Bem como, também que é possível que aconteçam os seguintes desconfortos ou riscos em sua participação, tais como constrangimento para responder ao questionário. Para minimizar tais riscos, nós pesquisadores tomaremos as seguintes medidas: o consumidor poderá se recusar a responder o questionário ou qualquer pergunta em que não se sinta a vontade com a mesma, a qualquer momento durante a aplicação do questionário.

SIGILO E PRIVACIDADE

Nós pesquisadores garantiremos a você que sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, lhe identificar, será mantido em sigilo. Nós pesquisadores nos responsabilizaremos pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

AUTONOMIA

Nós lhe asseguramos a assistência durante toda pesquisa, bem como garantiremos seu livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que você queira saber antes, durante e depois de sua participação. Também informamos que você pode se recusar a participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerá qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

Caso tenha qualquer despesa decorrente da participação nesta pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, bem como a seu acompanhante, haverá ressarcimento dos valores gastos na forma seguinte: pagamento em dinheiro no ato da pesquisa.

ASSINATURA DO SUJEITO DE PESQUISA

ASSINATURA DO PESQUISADOR

De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente de sua participação no estudo, você será devidamente indenizado, conforme determina a lei.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Bruno Machuca Thon e Francisco Pizzolato Montanha, ambos vinculados a Pontifícia Universidade Católica do Paraná e com eles você poderá manter contato pelos telefones (043) 998270528 e (041) 999000345.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CEP) pelo telefone (41) 3271-2292 entre segunda e sexta-feira das 08h00 às 17h30 ou pelo e-mail nep@pucpr.br.

DECLARAÇÃO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada nos pelo pesquisador responsável do estudo.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

| Dados do participante da pesquisa | |
|-----------------------------------|--|
| Nome: | |
| Telefone: | |
| e-mail: | |

Curitiba, ____ de _____ de ____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador

RUBRICA DO SUJEITO DE PESQUISA

RUBRICA DO PESQUISADOR

ANEXO 3 – Questionário aplicado aos consumidores.



PUCPR
GRUPO MARISTA

QUESTIONÁRIO

ASPECTOS DE CONSUMO DE PESCADO E DA CONSCIENTIZAÇÃO DO CONSUMIDOR SOBRE MICOTOXINAS

Região: _____

Bairro: _____

Idade: _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Profissão: _____

Escolaridade:

() Ensino fundamental incompleto

() Ensino fundamental completo

() Ensino médio incompleto

() Ensino médio completo

() Ensino superior incompleto

() Ensino superior completo

Classe social:

() A (superior ou igual a R\$ 18.740,01)

() B (de R\$ 9.370,01 a R\$ 18.740,00)

() C (de R\$ 3.748,01 a R\$ 9.370,00)

() D (1.874,01 a R\$ 3.748,00)

() E (inferior ou até R\$ 1.874,00)

01. Você é responsável pela compra de alimentos da sua casa?

() Sim

() Não

02. Você é vegetariano?

() Sim

() Não

03. Por qual motivo você consome pescado?

() Qualidade nutricional

() Custo

() Acessibilidade

() Sabor

() Outro: _____

04. Com qual frequência você consome pescado?

() Não consumo

() 1 vez por semana

() 2 a 3 vezes por semana

() Mais de 3 vezes semana

() Todos os dias

() Outro: _____

05. Com que frequência você compra peixe para consumir em casa?

() Não compro

() 1 vez por semana

() 2 a 3 vezes por semana

() Mais de 3 vezes semana

() Todos os dias

() Outro: _____

06. Onde você prefere comprar o peixe para consumir?

() Mercado

() Peixaria

() Feiras

() Pesque-pague

() Outro: _____

07. Como você prefere o peixe para consumo?

- Cru Assado Frito
 Ensopado Grelhado À milanesa

08. Por qual espécie de peixe você tem preferência em consumir?

- Caranha Tucunaré Pintado
 Tambaqui Tilápia Outro: _____

09. Qual espécie de peixe você compra para consumir?

- Caranha Tucunaré Pintado
 Tambaqui Tilápia Outro: _____

10. Como você prefere comprar o pescado?

- Congelado Fresco Salgado
 Defumado Resfriado Conserva

11. Qual a sua preferência pelas formas de apresentação do pescado para venda?

- Eviscerado Inteiro
 Filé Posta

12. Como você avalia a qualidade do pescado a ser comprado?

- Aparência Prazo de validade
 Tempo de prateleira Outro: _____

13. O que você acha do preço do pescado no mercado?

- Muito caro Caro Regular
 Barato Muito barato

14. Você acha que ao processar o peixe na cozinha, ele deixa de apresentar riscos para o consumidor, como uma contaminação, por exemplo?

- Sim Não

15. Você sabe alguma doença ou quais doenças podem ser carreadas do pescado para o consumidor?

- Sim: _____ Não

16. Você sabe o que são micotoxinas?

- Sim Não

17. Você sabe o que as micotoxinas podem causar para a saúde do consumidor?

- Sim: _____ Não

Muito obrigada pela participação!