

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

Detecção de Ácido Ocadaico em Cultivo de Mexilhão
***Perna perna* (Linnaeu, 1758) e Identificação do**
Fitoplâncton Potencialmente Produtor, em Maciéis,
Angra dos Reis, RJ.

Geisi Ferreira Mariné

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO DE ÁCIDO OCADAICO EM CULTIVO DE MEXILHÃO
PERNA PERNA (LINNAEU, 1758) E IDENTIFICAÇÃO DO
FITOPLÂNCTON POTENCIALMENTE PRODUTOR, EM MACIÉIS,
ANGRA DOS REIS, RJ.**

Geisi Ferreira Mariné

Sob a Orientação do Professor Doutor
Pedro Paulo Oliveira Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Microbiologia Veterinária.

**Seropédica, RJ.
Maio de 2007.**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

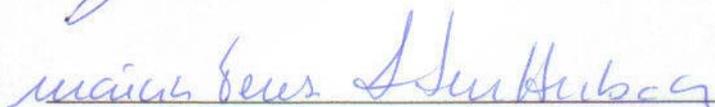
GEISI FERREIRA MARINÉ

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/06/07


Pedro Paulo de Oliveira Silva. Dr. IT-UFRRJ
(Orientador)


Glória Maria Direito. Dra. IV-UFRRJ


Márcia Teresa Soares Lutterbach. Dra. INT

DEDICATÓRIA

À Deus, ao muito mais que marido Murilo A. Oliveira, ao meu pai Aloysio Mariné e aos grandes amigos que ganhei nesta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo cuidado em todo o tempo, por mais uma dentre tantas realizações concedidas. “Eis que Deus é o meu ajudador, o Senhor é quem me sustenta a vida” (Salmos 54:4).

Ao meu amado marido Murilo A. Oliveira, por acreditar e me incentivar sempre, além de ser meu alicerce.

Aos meus pais e irmãos, pela torcida. A minha segunda família, Igreja Batista do Conforto em Volta Redonda, pelas orações e pelo carinho, mesmo distantes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Paulo Oliveira Silva, pelo apoio e confiança no trabalho.

À prof. Dra. Glória Maria Direito, pelo conhecimento em cromatografia e operação do equipamento.

Aos Professores Carlos Wilsom e Walter Flausino por terem disponibilizado seu laboratório sempre que precisei.

Ao maricultor Sr. Valdemar J. de Souza que gentilmente nos recebeu em todas as coletas, não mediu esforços para nos ajudar e fornecer material.

Ao querido Luizão, nosso anjo de plantão, pelas inúmeras prestações e ao motorista Robertinho, por ter nos guiado, literalmente!

Aos grandes amigos do Toxmar: Gesilene, Elisa, Vanessa, Milena, Elizete, Ana e Aderbson. Muito obrigada mesmo, sem vocês nada disso aconteceria...

À mais nova amizade que fui presenteada nesta fase, querida Jeanete, pela força e auxílio técnico.

Às companheiras de turma Verônica Cardoso e Lidiane de Castro, por dividirmos inclusive os momentos difíceis.

À República das Divas “Raquéis” e Vanessa Raia, pelas inúmeras acolhidas. Valeu galera, já me sinto oficial. Raquelzinha muito obrigada por tudo e, por favor, faça a minha reserva para o doutorado!

À CAPES pelo financiamento.

BIOGRAFIA

Geisi Ferreira Mariné, filha de Aloysio Mariné e Geny Garcia Ferreira, nascida em 24 de Abril de 1978, no município de Barra do Piraí, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário, o ensino fundamental e os dois primeiros anos do ensino médio em Escola Pública e o terceiro ano no Centro de Estudos Integrados em Barra do Piraí, RJ.

Em 1998 ingressou no curso de Medicina Veterinária nesta Universidade, diplomando-se em outubro de 2002.

Foi estagiária do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária quando desenvolveu a pesquisa “Epidemiologia e controle da mosca do berne (*Dermatobia hominis*) em bovinos de produção leiteira – Piraí-RJ”, sendo Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq-UFRRJ) em 2000.

Participou do Estágio interdisciplinar no projeto Ipiabas cidadã – município de Barra do Piraí – RJ em 2001.

Pôde obter experiência no setor público como estagiária na Prefeitura Municipal de Japeri-RJ, setor de zoonoses e Vigilância Sanitária, através do Centro de Integração Empresa Escola (CIEE) em 2002.

Coordenou campanhas anuais de vacinação contra raiva canina e felina no município de Japeri, assim como, realizou palestras para a população.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária desta Instituição, em 2005, sob a orientação do Prof. Dr. Pedro Paulo de Oliveira Silva. Foi bolsista de pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Mariné, Geisi Ferreira. **Detecção de ácido ocadaico em cultivo de mexilhões *Perna perna* (Linnè, 1758) e identificação do fitoplâncton potencialmente produtor, em Maciéis, Angra dos Reis, RJ.** Seropédica, UFRRJ, 2007. 49p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

A ficotoxina ácido ocadaico (AO) é produzida por um grupo de microalgas conhecidas como dinoflagelados. Os mexilhões ao se alimentarem destas microalgas acumulam em seu hepatopâncreas, esta toxina, desencadeando no ser humano a Síndrome ou Envenenamento Diarréico por Moluscos - EDM. Os sintomas se apresentam em torno de 30 minutos após o consumo do molusco contaminado; variando entre náuseas, dores abdominais, vômitos e diarreia. Quando a ingestão da toxina acontece em quantidades inferiores a 48 µg.g⁻¹, os sintomas acima descritos não se desenvolvem, porém, seu consumo continuado favorece o surgimento de tumores no trato gastrointestinal devido ao poder carcinogênico do AO. Este estudo pretendeu detectar e quantificar a toxina diarréica AO em mexilhões *Perna perna* coletados entre os meses de maio e dezembro de 2006, e a verificação da presença de microalgas potencialmente tóxicas, nas estações primavera/verão (setembro a dezembro de 2006). De maio a dezembro de 2006, mexilhões (*Perna perna*) foram coletados e analisados quanto à presença da ficotoxina AO. As microalgas foram coletadas entre setembro e dezembro de 2006, com auxílio de uma rede de plâncton (de 20µm de malha) e Bomba Rule 2000. A identificação dos dinoflagelados foi realizada em microscópio biológico invertido. A detecção do AO nos mexilhões foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Fluorimétrica (CLAE-DF). Os resultados cromatográficos indicaram a presença da toxina AO em todas as amostras obtidas de mexilhões, de maio a outubro de 2006, em baixas concentrações. Nas análises do fitoplâncton, as diatomáceas foram o grupo mais representativo comparado aos dinoflagelados. As espécies *Prorocentrum micans* e *P. gracile* observadas não foram apontadas como produtoras de toxinas até o momento. Dentre os dinoflagelados potencialmente tóxicos foram encontradas as espécies: *Dinophysis acuminata*, *D. tripos*, *D. rotundata* e *D. fortii*. Os resultados indicam a necessidade da elaboração e aplicação efetiva de um programa de controle higiênico-sanitário dos moluscos assim como monitoramento do ambiente, objetivando acima de tudo a segurança à saúde pública.

Palavras chave: Ácido ocadaico, Envenenamento diarréico por Moluscos, *Dinophysis* spp.

ABSTRACT

Mariné, Geisi Ferreira. **Okadaic acid detection in mussel cultivation, *Perna perna* (Linnè, 1758), and the fitoplankton identification potentially producer in the coast area of Maciéis, Angra dos Reis, RJ.** Seropédica, UFRRJ, 2007. 49p. (Dissertation, Master Degree in Veterinary Microbiology).

The okadaic acid phycotoxin AO is produced by a group of micro seaweed known as Dinoflagellated. The mussels when feeding themselves from this micro seaweed accumulate in their hepatopancreas, this toxin, triggering in the human being the Syndrome or Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP). The symptoms appear at around 30 minutes after the consumption of the contaminated clam; the symptoms vary among abdominal nauseas, pains, vomits and diarrhea. When the toxin ingestion happens in amounts lower than 48 µg.g⁻¹, the above described symptoms do not develop, however, its continued consumption favors the appearing of tumors in the gastrointestinal tract due to the high carcinogenic power of AO. This study intended to detect and quantify the diarrhetic toxin AO in *Perna perna* mussels collected between the months of May and December of the 2006 and verification of the potentially toxic micro seaweed presence, in the seasons Spring/Summer (from September until December of 2006). Since May until december of 2006, mussels (*Perna perna*) were collected and analyzed regarding to the presence of the Phycotoxin Ao. In order to collect the micro seaweed were used a plankton net (20µm of mesh) and Bomb Rule 2000. The identification of the dinoflagellates ones was carried through in inverted biological microscope. The detection of AO in the mussels was carried through by High Efficiency of Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection (HPLC-FC). The chromatographic results had indicated the presence of AO toxin in all the gotten mussel samples from May until October of 2006 in low concentrations. In the analyses of phytoplankton, the diatoms were the most representative group compared with the Dinoflagellated. The species *Prorocentrum micans* and *P. gracile* examined were not pointed as toxin producers until the moment. Among the Dino-flagellated potentially toxic were found the species : *Dinophysis acuminata*, *D. tripos*, *D. rotundata* and *D. fortii*. The results indicate the necessity of elaboration and effective application of a hygienic-sanitary controlling program of the clams as well as monitoring the environment, aiming above everything the public health Safety.

Key words: Okadaic acid, Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), *Dinophysis* spp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Concentrações de AO das amostras de mexilhão coletadas de maio a outubro de 2006, na enseada de Maciéis, utilizando coluna C18 e fase móvel acetonitrila: água ultra pura, na proporção 75:25 (v/v).	30
Tabela 02 – Análise de variância para número de dinoflagelados em três diferentes profundidades (superfície, meio e fundo) em relação aos meses de setembro e outubro/2006.	36
Tabela 03 – Número médio de dinoflagelados em diferentes profundidades nos meses de setembro e outubro.	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Condições cromatográficas para detecção do ácido ocadaico em CLAE-DF. 26

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Classificação da produção mundial de aqüicultura em 2004. Fonte: FAO, 2006, p. 11.	4
Figura 02- Aspecto Geral da Organização Interna do Mexilhão. Fonte: Manual de Mitilicultura, 1998, p. 37.	7
Figura 03- <i>Dinophysis acuminata</i> (Fotomicroscopia eletrônica). Fonte: Disponível em www.kitasato-u.ac.jp/.../lab/123/bisei/07.html (Acesso em Abril de 2007)	9
Figura 04- <i>D. tripos</i> (Fotomicroscopia eletrônica). Fonte: Disponível em www.kitasato-u.ac.jp/.../lab/123/bisei/07.html (Acesso em Abril de 2007).	9
Figura 05- <i>Prorocentrum lima</i> (Fotomicroscopia eletrônica). Fonte: Disponível em www.kitasato-u.ac.jp/.../lab/123/bisei/07.html (Acesso em Abril de 2007)	9
Figura 06- Cadeia trófica marinha a partir de floração de algas tóxicas. Fonte: Lourenço, A. J, 2004, p. 15.	12
Figura 07- Ácido Ocadaico (Fórmula estrutural da molécula - polieter lipofílico)	13
Figura 08- Brasil (Rio de Janeiro); 2) Rio de Janeiro (Angra dos Reis); 3)Angra dos Reis (Baía da Ilha Grande). Escala 1:100.000	20
Figura 09- Curva de calibração do padrão do ácido ocadáico, utilizando cinco volumes diferentes derivados.	27
Figura 10- Validação do método cromatográfico CLAE-DF para detecção da ficotoxina AO. Retas de regressão para o padrão AO. Concentração da toxina em ng.g ⁻¹ de hepatopâncreas de molusco.	28
Figura 11- Cromatograma do padrão do AO (tempo de retenção: 16.492 minutos).	28
Figura 12- Cromatograma da amostra C01 – coleta dia 20/05/2006.	29
Figura 13- Gráfico das médias das concentrações da toxina AO.	31
Figura 14- Análise estatística demonstrada em Box-plot . Época (meses de coleta): 1 = maio; 2 e 3 = junho; 4 e 5 = julho; 6 = agosto; 7 = setembro e 8 = outubro. Onde  representa as médias das concentrações da toxina AO.	33
Figura 15- <i>Dinophysis fortii</i> e <i>Prorocentrum micans</i> (Fotomicrografia – objetiva de 25x)	34
Figura 16- <i>Dinophysis acuminata</i> (Fotomicrografia – microscópio biológico invertido/objetiva de 25x)	34
Figura 17- <i>Dinophysis tripos</i> (Fotomicrografia – objetiva de 25x)	34

Figura 18- Gráfico da ocorrência de espécies do gênero *Prorocentrum*, entre os meses de setembro e outubro de 2006. 35

Figura 19- Gráfico da ocorrência de espécies do gênero *Dinophysis*, entre os meses de setembro e outubro de 2006. 35

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1-Aquicultura: Importância econômica	04
2.2-Mexilhão Perna perna (Linnaeu, 1758)	05
2.2.1-Classificação e distribuição dos mexilhões	05
2.2.2-Biologia dos mexilhões	06
2.2.3-Cultivo dos mexilhões	08
2.3-Fitoplâncton	08
2.3.1-Floração de Algas Nocivas (FANs)	10
2.3.2-Ficotoxinas	13
2.3.3-Efeitos das ficotoxinas no homem	15
2.3.4-Ficotoxinas envolvidas com o EDM	16
2.3.5-Envenenamento Diarréico por Moluscos (EDM)	17
2.4-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	18
3-METODOLOGIA	20
3.1-Área de Estudo	20
3.2-Local de Coleta	21
3.3-Amostragem	22
3.3.1-Fitoplâncton	22
3.3.2-Mexilhões	22
3.3.3-Estocagem e transporte das amostras	23
3.4-Identificação do fitoplâncton	23
3.5-Deteção do ácido ocadaico	23
3.5.1-Reagentes	23
3.5.2-Extração de ácido ocadaico dos mexilhões <i>Perna perna</i>	24
3.5.3-Derivação e análise cromatográfica	25
3.5.4-As condições cromatográficas	26
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Identificação e quantificação do padrão da toxina AO.	27
4.2-Cromatografia das amostras	29
4.3-Fitoplâncton: Dinoflagelados potencialmente tóxicos	33
4.3.1 Análise estatística do fitoplâncton (dinoflagelados)	36
4.4-Produção de ácido ocadaico	37
5-CONCLUSÕES	39
6-RECOMENDAÇÕES	40
7-BIBLIOGRAFIA	41

1 INTRODUÇÃO

A importância que a aquicultura tem para o homem fundamenta-se no fato desta servir a milhares de anos, através da pesca direta ou mesmo através das criações controladas, como forma de obtenção de alimento e renda. Dentro da aquicultura, a malacocultura aborda especificamente o cultivo de moluscos, como mexilhões, ostras e coquiles.

O processo do desenvolvimento, inclusive o tecnológico, contribui cada vez mais para se atingir o limite máximo sustentável dos recursos naturais. Em regiões altamente industrializadas e urbanizadas, nos últimos anos, ocorreu um aumento significativo da produção de elementos tóxicos e acúmulo, tanto no meio aquático, quanto nos meios terrestre e aéreo; gerando desta forma problemas sociais, econômicos e ambientais em grande escala.

Quantidades crescentes de substâncias tóxicas (químicas, sintéticas ou naturais), suas interações e efeitos adversos, refletem tanto sobre o ambiente, como sobre os seres vivos; gerando a necessidade de esclarecimento através de investigações científicas.

A poluição dos recursos hídricos, além de ser um fator limitante para a pesca, é também limitante para a malacocultura. Este tipo de atividade comercial requer ambiente que contenha águas isentas de organismos patogênicos e de elementos químicos capazes de afetar a saúde dos moluscos e de seus consumidores.

Em virtude de fatores como, quantidade e tipos de poluentes, de nutrientes (matéria orgânica) e variações da temperatura, há um aumento da densidade populacional das microalgas, levando à alteração na coloração da água do mar que pode variar de acordo com seu pigmento. Um exemplo clássico é conhecido vulgarmente por “maré vermelha”, ao qual o termo usado corretamente é florações de algas nocivas (FANs). Algumas espécies de microalgas mesmo em baixa abundância, não colorindo a água, são nocivas e produzem toxinas que causam impactos negativos ao ambiente aquático e à saúde pública, configurando um evento tóxico.

Ostras, mexilhões e coquiles são moluscos filtradores e utilizam o fitoplâncton como alimento. As toxinas produzidas por estas microalgas, aparentemente não afetam estes moluscos, porém, se acumulam em sua glândula digestiva (hepatopâncreas) tornando estes animais, dependendo da concentração destas toxinas, impróprios para o consumo humano.

Seis graves patologias clínicas foram descritas e classificadas em síndromes ou envenenamentos causados por moluscos de acordo com os principais sintomas observados: Envenenamento Diarréico por Moluscos (EDM) ou DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*); Envenenamento ou Síndrome Amnésica ou ASP (*Aminesic Shellfish Poisoning*); Síndrome

Neurotóxica ou NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*); Síndrome Paralizante ou PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*); Síndrome Ciguatérica (*Ciguatera Poisoning*) e Síndrome Azaspirácida ou AZP (*Azaspyracid Poisoning*).

O EDM começou a ser estudado por Yasumoto e sua equipe na Universidade de Tóquio, em 1976. Nesse ano, uma floração de microalgas identificada como sendo do dinoflagelado *Dinophysis fortii*, foi responsável pela contaminação dos moluscos, que consumidos, intoxicaram aproximadamente 1300 pessoas no período entre 1976-1982, no Japão.

As toxinas do EDM são produzidas por alguns dinoflagelados pertencentes aos gêneros *Dinophysis* spp. e *Prorocentrum* spp. e são acumuladas nos tecidos dos moluscos durante o processo de filtração. Estas ficotoxinas são poliéteres de cadeia linear ou policíclica, denominadas ácido ocadaico (AO) e dinofisistoxinas (DTX-s).

A ingestão de moluscos contaminados com AO produz distúrbios gastrointestinais severos (vômitos, náuseas, dor abdominal e diarreia), desencadeados após poucas horas do consumo. Além disso, ao AO tem sido atribuída ação carcinogênica, no trato digestivo, se ingerido em baixas concentrações e de forma contínua.

Para garantir que os moluscos bivalvos cultivados e comercializados em uma localidade, não ofereçam perigo à saúde da população consumidora, entende-se que há a necessidade de um rígido controle higiênico sanitário.

Atualmente, devido ao potencial carcinogênico do AO e DTX-1, há uma tendência de adotar-se a total ausência de toxinas diarreicas nos moluscos comercializados.

No Brasil, embora existam muitos estudos sobre a ecologia e distribuição do fitoplâncton, pouco se sabe sobre microrganismos produtores de toxinas e seus efeitos no nosso litoral. Pesquisas anteriores confirmaram a presença da ficotoxina diarreica no litoral de Santa Catarina, em regiões de cultivos de mexilhão e no litoral do Rio de Janeiro; na baía de Sepetiba, baía de Ilha Grande e Cabo Frio.

Em Angra dos Reis-RJ, a baía de Ilha Grande abriga várias fazendas de malacocultura incentivadas pelo Governo Municipal, auxiliadas pelo suporte técnico e científico de Universidades.

Pesquisas desta Universidade mostraram a contaminação de mexilhões por AO, na baía de Sepetiba e baía de Ilha Grande – Maciéis. Fato que pode ser justificado por existir troca de águas entre as duas baías, portanto, microalgas potencialmente produtoras de toxinas presentes na baía de Sepetiba, podem ser constantemente deslocadas, pela ação de correntes marinhas, e atingir a baía de Ilha Grande.

O presente estudo objetivou:

- a detecção e a quantificação da toxina diarréica AO, em mexilhões *Perna perna* coletados entre os meses de maio e dezembro de 2006, e a comparação entre os níveis de contaminação encontrados e os limites internacionais aceitáveis para o consumo humano;
- a verificação da presença de microalgas potencialmente tóxicas, nas estações primavera/verão (setembro a dezembro de 2006) em amostras de água do mar, em três profundidades, na enseada de Maciéis, localizada na baía de Ilha Grande - Angra dos Reis/RJ.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aqüicultura: Importância Econômica

A aqüicultura mundial obteve um crescimento significativo durante os últimos cinquenta anos, passando de 1 milhão de toneladas na década de 1950 para 59,4 milhões de toneladas em 2004. Na América latina e Caribe a atividade foi quase inexistente por volta dos anos 50, após os anos 70 se fortaleceu, concentrando-se principalmente no Equador, Chile e Brasil (FAO, 2006).

Dentre os principais grupos comercializados na aqüicultura, o grupo superior é o dos peixes (Figura 01). As plantas aquáticas estão em segundo lugar em quantidade e em quarto lugar em valor; visto que os crustáceos estão em quarto lugar em quantidade e em segundo lugar em valor. Os moluscos são o terceiro maior grupo em importância, tanto pela quantidade quanto pelo valor, em 22.3% e 14.2 %, respectivamente (FAO, 2006).

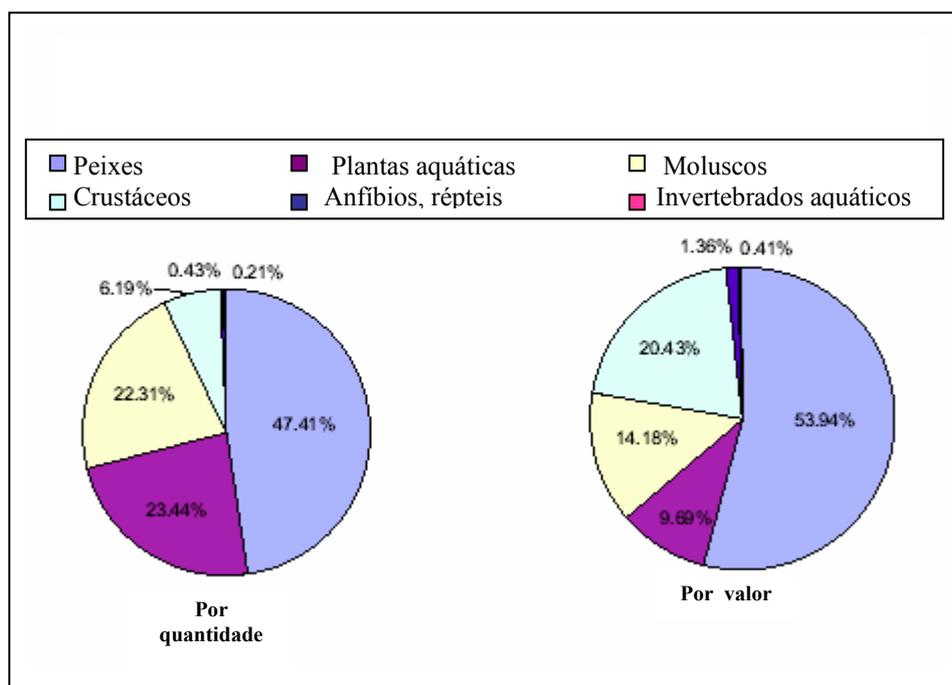


Figura 01: Classificação da produção mundial de aqüicultura em 2004

Fonte: FAO, 2006, p. 11.

No Brasil, segundo as estatísticas pesqueiras da SEAP(2005), do Ministério da República, a produção estimada de moluscos foi de 13.452,5 toneladas/ano.

Durante a década de 90 houve um aumento significativo no cultivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), atingindo a produção da ordem de 12.500 toneladas em 2000, o que colocou o país no segundo lugar na América Latina. Com destaque para o Estado de Santa Catarina que responde por aproximadamente 95% da produção nacional (CARVALHO FILHO, 2001).

Em 1996, a malacocultura teve seu desenvolvimento na região da Baía da Ilha Grande, em Angra dos Reis, através de incentivo pela Prefeitura municipal, quando houve a implantação de 23 parques de cultivo de mexilhão *Perna perna* para moradores de baixa renda. Atualmente estão implantadas 38 fazendas marinhas com a produção de 10 toneladas de mexilhão *Perna perna* e 15 mil dúzias de coquile (*Nodipecten nodosus*) (AMBIG, 2006).

2.2 Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

Na língua portuguesa, mexilhão ou mariscos são termos usados para denominar diversas espécies da família Mytilidae. São organismos que suportam grandes variações ambientais (ANDREU, 1976b), possuem grande importância ecológica, sendo muito utilizados como indicadores biológicos no controle da qualidade da água (WINDDWS *et al*, 1995). São facilmente adaptáveis ao cultivo e representam uma importante fonte de alimento em vários países (FERNANDES, 1985). Eles possuem uma alta capacidade de retenção de nitrogênio, sendo do ponto de vista nutricional, uma fonte protéica de excelente qualidade (ANDREU, 1976a), o que demonstra sua grande importância econômica.

No mundo, existem várias espécies de mexilhões de importância econômica, sendo *Mytilus edulis* a espécie mais estudada. Neste trabalho, a espécie escolhida foi *Perna perna*, pelo fato de ser a mais comum em nosso litoral e cultivada em fazendas de malacocultura na baía de Ilha Grande.

2.2.1 Classificação e distribuição dos mexilhões

Pertencentes ao filo mollusca, os mexilhões apresentam a concha dividida em duas peças chamada valvas (Bivalvos), conhecidos também por Lamelibrânquios por apresentarem brânquias em forma de lamelas ou ainda chamados de Pelecípodes por terem geralmente pés em forma de machado. Ostras e coquiles também fazem parte desta classificação.

Sistematicamente, o mexilhão é classificado como:

Domínio: Eucária

Filo: Mollusca,

Classe: Bivalvia Linnè, 1758

Ordem: Mytiloida Férursac, 1822

Família : Mytilidae Rafinesque, 1815,

Gênero: *Perna* Retzius, 1788,

Espécie: *Perna perna* Linnè, 1758

Os mexilhões são organismos cosmopolitas, dominantes em muitos ecossistemas costeiros (FERNANDES, 1985). A espécie *Perna perna* geograficamente é encontrada nas regiões tropicais e subtropicais dos Oceanos Atlântico e Índico, como também em alguns pontos do mar mediterrâneo. Na América Central, estão presentes no Caribe. Na América do Sul são encontrados na Venezuela, Brasil e Uruguai (AVELAR, 1998).

2.2.2 Biologia dos mexilhões

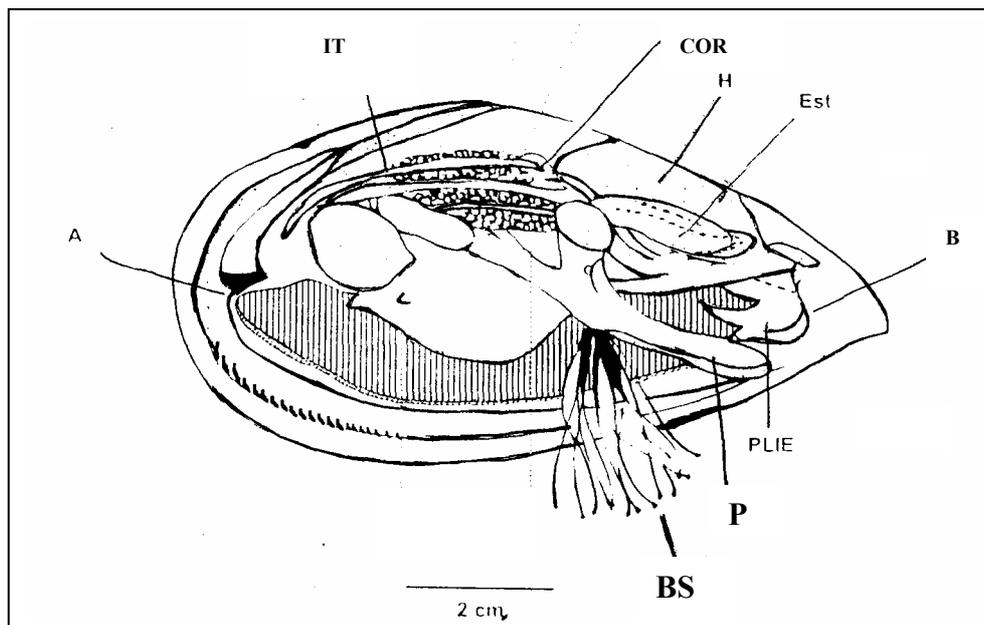
A espécie *Perna perna*, como todos os mitilídeos, apresenta o corpo com profundas modificações de simetria, sendo a parte posterior desproporcionalmente maior que a anterior (SALAYA et al., 1973). Seu corpo mole, se comprime lateralmente em uma concha rígida, de duas partes (valvas), que se mantêm unidas por um ligamento situado na região dorsal da concha e pelos músculos adutores (anterior e posterior). O ligamento permite a abertura das valvas e os músculos são responsáveis por seu fechamento. Nestes organismos a cabeça e os órgãos dos sentidos associados a ela, não estão presentes, com exceção da boca e dos palpos labiais. O pé, em forma de machado, é frequentemente usado para cavar. Nesta espécie, uma parte do pé, secreta filamentos (bisso) que o prende ao substrato (BARNES, 1990).

As trocas gasosas dos bivalvos, acontecem através das brânquias, que possuem numerosos e finíssimos vasos sanguíneos. A água traz o oxigênio dissolvido, banha as brânquias e o oxigênio passa por difusão para o interior dos vasos sanguíneos (BERTULLO, 1975).

Apresenta um regime alimentar exclusivamente filtrador, com uma capacidade de bombeamento que pode variar de 0,5 a 5 litros/hora, dependendo das condições ambientais e do tamanho do indivíduo. Além da função respiratória, suas brânquias retêm os alimentos, constituídos basicamente de fitoplâncton, bactérias e detritos orgânicos (AVELAR, 1998).

Os mexilhões não possuem capacidade seletiva na filtração dos alimentos, sendo a ingestão de partículas limitada pelo tamanho, variando de 1 µm até larvas de poliquetas de 4,2 mm de comprimento (FERNANDES et al., 1978). As partículas de alimentos são envolvidas por um muco, produzido nas brânquias, e são transportadas até os palpos labiais, que selecionam e regulam a quantidade de alimento que passa para a boca. Nos mexilhões as bordas do manto se fundem, formando um sifão inalante (por onde entra uma corrente de água com alimento e oxigênio) e um sifão exalante (por onde sai a água com gás carbônico e excretas) (RUPPERT & BARNES, 1996).

Estes moluscos são dotados de um estômago, uma glândula digestiva (hepatopâncreas) e o intestino, que se abre pelo ânus (Figura 02). A maior parte da digestão é intracelular e ocorre dentro da glândula digestiva. Outra parte, extracelular, acontece dentro do estômago. A principal função do intestino é a eliminação das fezes (STORER & USINGER, 1976).



Legenda: (A) ânus; (B) boca; (BS) bisso; (COR) coração; (Est) estômago; (H) hepatopâncreas; (IT) intestino terminal; (P) Pé; (PLIE) palpo labial.

Figura 02: Aspecto Geral da Organização Interna do Mexilhão

Fonte: Manual de Mitilicultura, 1998, p. 37.

2.2.3 Cultivo de mexilhões

Desde a pré-história, os mexilhões são usados como alimento, fato evidenciado pela presença de sambaquis (aglomerado de concha) em várias regiões do mundo (EPAGRI, 1994).

No Brasil, as pesquisas sobre a mitilicultura iniciaram na década de sessenta, pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Em 1972, no antigo Instituto de Pesquisa em Arraial do Cabo – RJ, foram realizadas pesquisas, buscando uma tecnologia básica para a mitilicultura. O Instituto de Pesca de Ubatuba/SP vem desenvolvendo pesquisas desde 1976 sobre mexilhões, na região de Ubatuba (GOMES, 1996).

Segundo Marenzi (2005), a densidade ideal para o cultivo constituiu-se por poucas redes e fixadas dentro do primeiro metro da coluna d'água, onde o desenvolvimento foi maior. Para Armação do Itapocoroy em Santa Catarina, foi recomendado um período de 8 meses de cultivo, onde o tamanho médio obtido foi 7 cm, sendo colhidos no final da primavera com o melhor rendimento.

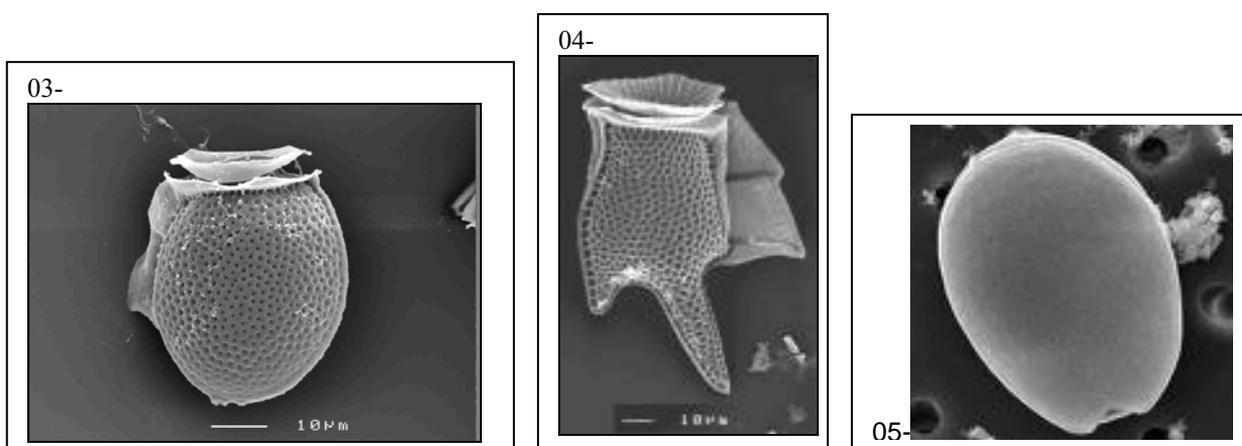
2.3 Fitoplâncton

O Fitoplâncton é composto por microorganismos aquáticos unicelulares, em sua maioria fotoautotróficos, que se deslocam passivamente com os movimentos de correntes e de massas d'água (BONEY, 1975). Por serem fotossintetizantes, estes organismos, também conhecidos como microalgas, estão na base da cadeia alimentar marinha. Assim, alterações na sua composição específica e abundância podem ter conseqüências na produção primária e na transferência de energia para os demais níveis tróficos, podendo afetar espécies de importância econômica (TENENBAUM, 2002). Além disso, algumas espécies podem ser indicadoras de áreas impactadas, de zonas biogeográficas (FERNÁNDEZ, L. F. & BRANDINI, 1999), de períodos geológicos (SOURNIA, 1986) e também podem causar florações nocivas com conseqüências danosas à pesca, à aquicultura e à saúde humana (HALLEGRAEFF, 1995).

No Brasil, já foram identificadas aproximadamente 1364 espécies, pertencentes a 12 classes taxonômicas. A classe Bacillariophyceae (diatomáceas) destaca-se com 57% das espécies identificadas, seguida da classe Dinophyceae (dinoflagelados) com 27% das espécies (TENENBAUM, 2002).

Algumas espécies dos gêneros *Prorocentrum* e *Dinophysis* (Figuras 03, 04 e 05) pertencentes à classe Dinophyceae, produzem toxinas diarréicas responsáveis pelo Envenenamento Diarréico por Moluscos (YASUMOTO & MURATA, 1993).

Proença (1999) confirmou a não produção das toxinas AO e DTX-1 por *Prorocentrum micans* e *P. obtusum*, porém, a toxina AO foi detectada em moluscos oriundos de cultivo do litoral de Santa Catarina. Foram encontradas outras espécies de dinoflagelados potencialmente tóxicos: *D. acuta*, *D. acuminata*, *D. rotundata*, *D. tripos*, *D. caudata* e *Prorocentrum lima*; entretanto, a produção de AO se deu somente por *D. acuminata*.



Figuras: Fotomicroscopia eletrônica de 03-*Dinophysis acuminata*, 04- *Dinophysis tripos* e 05- *Prorocentrum lima*.

Fonte: Disponível em www.kitasato-u.ac.jp/.../lab/123/bisei/07.html (Acesso em Abril de 2007)

Os dinoflagelados são organismos microscópicos biflagelados pertencentes ao domínio Eucaria. São microalgas pertencentes ao Filo *Dinophyta* (do grego Dino = rodopiar e phyto = planta) ou *Pyrrophyta* (do grego Pyrrho = vermelho, flamejante e phyto = planta) que possui aproximadamente 2000 espécies distribuídas em 31 Gêneros (DODGE, 1985).

Apresentam uma célula que possui dois flagelos, com inserção apical, células tipo desmoconte ou com inserção ventral e ortogonais, células tipo dinoconte (STEIDINGER & TANGEN, 1997). São caracterizados pela posição dos flagelos, que se localizam dentro de dois sulcos: um rodeia a célula como um cinto, e o outro é perpendicular ao primeiro (AVARIA, 1992). O batimento dos flagelos em seus respectivos sulcos faz o dinoflagelado rodopiar como um pião.

Os dinoflagelados são necessariamente aquáticos, encontrados em ambientes continentais dulcícolas, mas principalmente no mar (SOURNIA et al., 1991), constituindo com outras microalgas, o fitoplâncton marinho. Distribuem-se latitudinalmente nos mares dos

pólos Ártico e Antártico, de águas temperadas até tropicais. Podem ser encontrados em forma livre natante no domínio planctônico, ou como epibiontes, principalmente associados à macroalgas e detritos, no domínio bentônico (TAYLOR et al., 1995). Segundo DODGE op cit também existem formas que vivem em simbiose com invertebrados marinhos (Zooxantelas) ou como parasitas durante certa fase de seu ciclo de vida, por exemplo, *Pfiesteria piscida*. Eles também ocorrem como simbiontes em muitos outros tipos de organismos, incluindo esponjas, águas vivas, anêmonas do mar, corais, polvos, lulas, gastrópodes, tubelários e certos tipos de protistas. Em mariscos gigantes, a superfície do manto possui cor castanho-chocolate devido à presença de dinoflagelados simbióticos. (AVARIA, 1992).

Os dinoflagelados (DODGE op. cit.) possuem características estruturais que torna possível classificá-los como algas ou como protozoários. Como microalga, os dinoflagelados possuem cloroplastos que os capacitam a realizar fotossíntese, sendo assim denominados organismos autotróficos, com é o caso de mais de 50% das espécies. Como protozoários, embora não haja perda dos cloroplastos, estes permanecem aparentemente inativos e o organismo alimenta-se heterotrófica ou mixotroficamente, como algumas espécies de *Dinophysis*.

A maioria dos dinoflagelados possui forma aproximadamente esférica, com leve achatamento lateral, variando em tamanho de poucos micrômetros ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$) à poucos milímetros ($1 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ m}$) (SOURNIA, 1986), sendo as formas tropicais as de maior tamanho e de formatos mais exuberantes (DODGE, 1985). No entanto a maioria das espécies tem tamanho médio variando em torno de 10 a 100 μm . Os dinoflagelados apresentam envelope celular, observado em nível ultra-estrutural como uma série de membranas, denominado teca (STEIDINGER & TANGEN, 1997). A reprodução desses organismos pode acontecer da forma assexuada, por simples divisão celular, ou também por reprodução sexuada através da formação de gametas (HOEK et al., 1995).

2.3.1 Florações de algas nocivas (FAN)

O fenômeno de floração de algas pode ser entendido como um aumento na densidade celular de uma determinada espécie fitoplanctônica que pode chegar até bilhões de células por litro (CARRETO, 1991). Em determinadas regiões e estações do ano essa proliferação exagerada, torna-se concentrada o suficiente para que haja a modificação da cor das águas formando grandes manchas no mar (YENTSCH, 1984). As florações podem ocorrer em mar

aberto, baías e estuários e são induzidas por alterações na salinidade e temperatura da água, excesso de nutrientes ou correntes marinhas e marés (AVARIA, 1992).

Em muitos locais ao redor do mundo, as águas marinhas costeiras estão sofrendo com a eutrofização (aumento de nutrientes). Estudos mostram que a super produção da biomassa fitoplanctônica pode ser estimulada pelo enriquecimento das águas por nutrientes, através de despejos de esgotos ou lixiviamento de solos agrários, que sofrendo decomposição orgânica, podem causar redução da qualidade da água e depleção de oxigênio (anoxia). Dessa forma o enriquecimento de nutrientes em águas litorâneas pode ser o gatilho para florações recorrentes de fitoplâncton nocivo (SMAYDA, 1990).

As altas densidades de microalgas podem diminuir a concentração de oxigênio na água e causar a morte de peixes e aves marinhos. Os moluscos bivalvos conseguem filtrar esses organismos e acabam concentrando as toxinas produzidas por eles em seus tecidos. No entanto, enquanto a toxina produzida pelos mesmos afeta muitos seres marinhos e o homem, os moluscos bivalvos são imunes aos seus efeitos diretos (SCHANTZ, 1984).

Nos últimos 200 anos, as florações de microalgas marinhas têm sido estudadas. Tornaram-se um grande problema ambiental, econômico e de saúde pública, pois muitas dessas florações estão ligadas a microalgas produtoras de toxinas que causam graves intoxicações em humanos (MATIAS, 1999).

As florações são comumente denominadas Maré vermelha, fenômeno este, que causa a alteração na cor da água, produzida por algumas espécies de organismos fitoplanctônicos. Há limitações quanto ao uso do termo "maré vermelha", pois algumas espécies que produzem toxinas não colorem a água, podendo ser nocivas mesmo em baixa concentração, portanto, a expressão correta é "Floração de Algas Nocivas (FAN)" (IOC-UNESCO, 1985).

Entre o extenso número de espécies de fitoplâncton, cerca de 5000, aproximadamente 300 podem desenvolver floração alterando a cor da superfície da água; enquanto somente 80 espécies são potencialmente tóxicas, causando graves patologias ao homem, através da alimentação de peixes e moluscos contaminados (HALLEGRAEFF, 2003).

Diferentes grupos taxonômicos, como diatomáceas, dinoflagelados e cianobactérias apresentam espécies que produzem toxinas (HALLEGRAEFF et al., 1995). Embora existam muitos estudos sobre a ecologia e distribuição do fitoplâncton, no Brasil, pouco se conhece sobre os produtores de toxinas e os efeitos dessas toxinas nos consumidores de moluscos contaminados (PROENÇA et al., 1998).

Steidinger (1993) afirma que os efeitos nocivos causados por FANs ao homem e ao ambiente, são gerados por espécies produtoras de ficotoxinas, as quais podem chegar ao homem via cadeia trófica (Figura 06) e os gerados por outras espécies de fitoplâncton não tóxicos, que têm sido associadas à mortalidade de animais marinhos, por causas físicas (obstrução das brânquias em peixes) ou químicas (consumo exagerado do oxigênio da água).

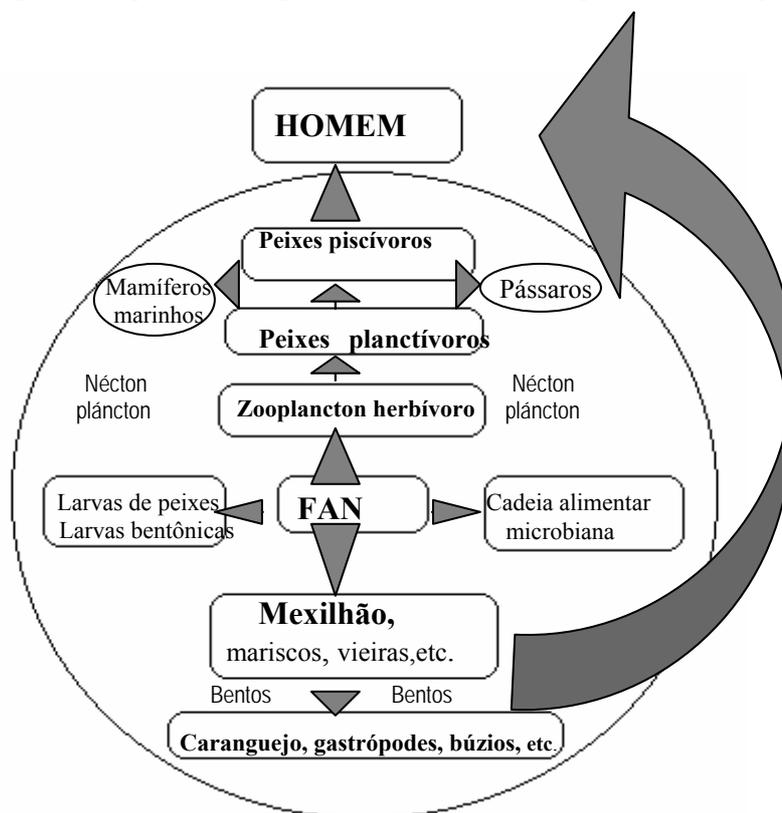


Figura 06 - Cadeia trófica marinha a partir de floração de algas tóxicas.

Fonte: Lourenço, A. J, 2004, p. 15

A identificação de espécies tóxicas é utilizada como uma ferramenta complementar no monitoramento em cultivos de moluscos, em alguns países onde existe a ocorrência de EDM. O controle da qualidade do alimento é feito com base na abundância de espécies produtoras de toxinas na água, adotando-se a contagem de 100 células de *Dinophysis* spp. por litro de água do mar, como limite para o consumo de mexilhões na área de cultivo (ANDERSEN, 1996).

No mar Adriático (Noroeste da Costa da Itália), eventos de EDM têm sido relatados desde 1989 e quase sempre associados à baixa abundância de células das espécies de dinoflagelados tóxicos. Esporadicamente têm ocorrido florações ao longo da Costa Noroeste. Em 2002, a maior ocorrência de células potencialmente tóxicas foi evidenciada no período da

primavera / verão e outono, quando *Dinophysis* spp. foi encontrada em altos níveis (PENNA, 2006).

Copépodes marinhos estão sendo cada vez mais pesquisados como possíveis controladores dos níveis de densidade celular de espécies nocivas de microalgas. No mar Báltico, Oresund (entre a Suécia e a Dinamarca), em experimento controlado entre 2001 e 2002, espécies de copépodos se alimentaram de *Dinophysis* spp e sobreviveram. O impacto da supressão de FANs através da alimentação dos zooplânctons, pode ser representativo mas não considerado um grande fator de altas perdas e redução na densidade celular, mas sim uma remoção significativa de cerca de 25% da população (KOZLOWSKY-SUZUKI, 2006).

2.3.2 Ficotoxinas

As ficotoxinas são toxinas produzidas por microalgas, como diatomáceas e dinoflagelados (EPSTEIN et al., 1993; HALLEGRAEFF, 1993; ANDERSON, 1994; YASUMOTO et al., 1995). São exemplos de ficotoxinas, o ácido ocadaico (AO) (Figura 07), as dinofisistoxinas 1, 2 e 3 (DTX1, DTX2 e DTX3), pectenotoxinas (PTXs), yessotoxinas (YTXs) e brevetoxinas.

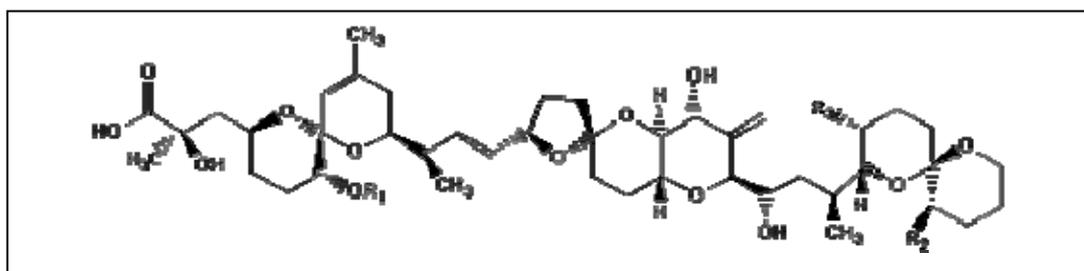


Figura 07: Ácido Ocadaico (Fórmula estrutural da molécula - poliéter lipofílico)

Fonte: Disponível em www.aims.gov.au/arnat/arnat-0007.htm (Acesso em setembro de 2006).

O AO e as DTXs são moléculas de ácidos graxos poliéteres lipofílicos. Essas toxinas são definidas como metabólitos secundários produzidos por dinoflagelados (SHIMIZU, 1993 apud CEMBELLA & WRIGHT, 1996).

Segundo CEMBELLA & WRIGHT op cit., metabólitos secundários são compostos naturais, biologicamente ativos, produzidos por vias metabólicas secundárias não usuais ou por desvio do metabolismo primário. Mesmo não desempenhando, aparentemente para os organismos produtores, função vital, para muitos pesquisadores as sínteses de compostos tão

complexos poderiam funcionar como alelopáticos (defesa química), reserva intracelular de nutrientes, ativador de reprodução sexuada e proteção contra herbivoria (GEOHAB, 1998).

As toxinas produzidas por algumas espécies de dinoflagelados, são bioativas, com atividades que variam dependendo da sua estrutura química, do estado de conversão, da concentração e da susceptibilidade do consumidor. Algumas toxinas, produzidas por dinoflagelados, são as substâncias letais mais potentes que se conhece (TAYLOR, 1988; AVARIA, 1992).

Para assegurar a qualidade do alimento, programas de monitoramento da toxicidade dos moluscos e da ocorrência de espécies de fitoplâncton potencialmente tóxicas são desenvolvidos em diversas localidades (ANDERSEN, 1996). Da mesma forma, estudos são feitos para se conhecer a biologia das espécies e os fatores que controlam a produção das toxinas.

Incidentes de EDM foram confirmados na Europa, na Oceania, na América do Norte e América do Sul, onde ocorreram no Chile, Argentina e Uruguai, havendo inclusive atualmente investigações (HALLEGRAEFF, 1998; AVARIA, 1989; MÉNDEZ et al., 1993).

No Brasil, o AO foi detectado em amostras de hepatopâncreas de moluscos *Perna perna*, cultivados no litoral de Santa Catarina, associando a sua toxicidade à presença de *Dinophysis acuminata* (PROENÇA et. al., 1998).

No litoral sul do Rio de Janeiro, Oliveira (2001), detectou a toxina AO, pela primeira vez, como contaminante natural de mexilhões da espécie *Perna perna* nas praias de Sepetiba e Mangaratiba, e Ferreira (2004), detectou o AO em baixas concentrações em mexilhões de bancos naturais, nas ilhas Guaíba e Madeira, baía de Sepetiba.

Lourenço (2004) encontrou a toxina AO em mexilhões *Perna-perna*, em Maciéis, uma amostra das três coletadas, apresentou a ficotoxina AO na concentração de 2,65 ng.g⁻¹ de hepatopâncreas. Segundo a União Européia (2002), Dec./225/EC, o nível máximo permitido de AO em moluscos (em todo o corpo ou alguma parte específica) foi estipulado em 160 µg.kg⁻¹ ou 0,16 µg.g⁻¹.

Ramirez, (2003) detectou AO em mexilhões de Pontevedra, em Vigo – Espanha. Todas as amostras de mexilhões foram positivas nas três profundidades avaliadas (2, 7 e 15m) em concentrações variadas. Estas variações possivelmente ocorreram devido ao aumento e redução das populações das espécies de *Dinophysis* dominantes: *D. acuminata* e *D. acuta*.

Os perfis das toxinas, detectados na Nova Zelândia em 2002, produzidos por espécies de *Dinophysis*, mostraram que a concentração nas células pode variar substancialmente de acordo com as condições do meio aquático (como teor de nutrientes) e alterações climáticas

(como temperatura). Podendo haver ainda variações no conteúdo de toxinas por célula dentro de uma mesma população. Nesta pesquisa observou-se a predominância das PTXs isoladas de *D. acuta* em relação ao AO, na proporção de 5:1. Em *D. acuminata* estavam os mais baixos níveis de PTX e os mais altos de AO (MACKENZIE, 2005).

Embora não haja dúvida quanto ao envolvimento do AO em danos a saúde pública, ainda não há dados que certifiquem a relação de PTXs no envolvimento da contaminação de moluscos levando ao mesmo risco. Foi observado que os moluscos são capazes de hidrolisar rapidamente, combinações de PTXs, em derivados ácidos não tóxicos (MACKENZIE, 2002).

Altos níveis de PTX2 encontrados em amostras de mexilhões e microalgas, em 1997, na Austrália, foram considerados a causa de intoxicação tipo Envenenamento diarréico por moluscos em humanos (EDM) após a ingestão de moluscos contaminados. Estudos posteriores mostraram que as amostras analisadas estavam contaminadas com AO e através de bioensaio com ratos observaram os sintomas gastrointestinais característicos do EDM (BURGUESS E SHAW, 2003).

Miles *et al.* (2004) confirmou a toxicidade de PTX2 em ratos, através de injeção intraperitoneal, mas não houve confirmação da toxicidade após a administração oral. Os mesmos autores sugeriram que, os resultados refletiram uma baixa absorção de PTX2 no trato gastrointestinal, ou houve a conversão em uma combinação menos tóxica, como PTX2SA, nos intestinos. A diarreia severa em ratos, atribuída anteriormente a PTX2, foi resultado de contaminação das amostras com derivados do AO.

2.3.3 Efeitos das ficotoxinas no homem

As ficotoxinas contaminam peixes e moluscos, que quando consumidos por humanos, provocam nestes, diversos sintomas gastrointestinais e/ou neurológicos denominados envenenamento por moluscos. Estas doenças de acordo com a sua ação ou sintomas são divididas em grupos: Envenenamento Neurotóxico por Moluscos (ENM) ou (Neurologic Shellfish Poisoning - NSP); Envenenamento Paralisante por Moluscos (EPM) ou (Paralytic Shellfish Poisoning - PSP); Envenenamento Amnésico por Moluscos (EAM) ou (Amnesic Shellfish Poisoning - ASP); Envenenamento Diarréico por Moluscos (EDM) ou (Diarrhetic Shellfish Poisoning - DSP) e Envenenamento por Ciguatera (EC). (YASUMOTO & MURATA, 1993).

O mecanismo de ação do AO e demais toxinas relacionadas ao EDM, não está completamente elucidado. Em nível molecular sabe-se que as proteínas fosfatase 1 e 2A são

inibidas pelo AO (BIALOJAM & TAKAI, 1988). Elas são fundamentais a várias vias metabólicas intracelulares, como a produção de enzimas e proteínas regulatórias. Em células eucariotas, estas fosfatases são mediadores químicos, que regulam uma série de processos envolvidos no metabolismo, tais como, balanço de íons, neurotransmissão, regulação do ciclo celular e de algumas funções celulares, como biossíntese de ácidos graxos e síntese protéica (COHEN, 1990).

A inibição das proteínas fosfatase 1 e 2A, também tem sido relacionada com a inflamação do intestino e a produção de diarreia (HAMANO et al., 1986; TERAO et al., 1986; COHEN et al., 1990). Existem evidências de que o AO pode ser responsável pelo aumento da permeabilidade intracelular em células epiteliais humanas, em cultivo (TRIPURANENI et al., 1997). Sugere-se que os sintomas primários, observados no EDM, sejam causados pela hiperfosforilação das proteínas que controlam a secreção do sódio (Na^+) pelas células do epitélio intestinal, resultando no desequilíbrio hidroeletrolítico celular, com perda de fluídos pelas células (COHEN et al., 1990).

Estudos têm demonstrado que o AO e a DTX1, além de causar distúrbios gastrointestinais, apresentam uma potente capacidade de promover tumores no sistema digestivo, quando ingeridos regularmente em baixas concentrações (SUGANUMA et al., 1988; ITO & TERAO, 1994; FIORENTINI et al., 1996; MATIAS & CREPPY, 1996; TRIPURANENI et al., 1997; OTERI et al., 1998; DARANAS et al., 2001).

2.3.4 Ficotoxinas envolvidas com o EDM

O professor T. Yasumoto da Universidade de Tóquio foi quem realizou os primeiros estudos sobre as toxinas diarreicas em moluscos. Ele e sua equipe identificaram estas toxinas como as responsáveis pela intoxicação maciça, ocorrida em 1976 no noroeste do Japão, causada pelo consumo de bivalvos contaminados (YASUMOTO et al., 1979, 1980). Havia informações sobre intoxicações similares ocorridas na Holanda em 1960 (KAT, 1979), porém, somente a partir das intoxicações ocorridas no Japão, puderam ser associadas florações de *Dinophysis* spp ao EDM.

A primeira toxina diarreica conhecida, recebeu o nome de dinofisistoxina (DTX), pois foi isolada a partir do dinoflagelado *Dinophysis fortii*, causador do primeiro surto relatado de EDM (HALLEGRAEFF, 1993).

Em 1982, também no Japão, foi isolada a principal toxina diarréica, o ácido ocadaico, a partir da esponja negra *Halichondria okadai*, por Tachibana e colaboradores (LARSEN et al., 1989). Além de isolada, a toxina também teve sua estrutura química elucidada, o que possibilitou conhecer a estrutura de todas as outras toxinas diarréicas.

As toxinas AO, DTXs, PTXs, YTXs e brevetoxinas, quando ingeridas provocam sintomas de intoxicação alimentar. Estas toxinas são responsáveis pelo envenenamento diarréico por molusco (EDM) (YASUMOTO, 1990).

Em relação à intoxicação gastrointestinal que caracteriza o EDM, as toxinas mais freqüentemente envolvidas são o AO e a DTX-1. As YTXs e as PTXs, embora sejam causadoras de sintomatologia gastrointestinal, diferem do AO e das DTX's em estrutura química e nas propriedades toxicológicas (pois não inibem a atividade das fosfatases) (YASUMOTO, & MURATA, 1993).

As DTX's possuem cinco toxinas derivadas, das quais DTX4 e 5 podem ser convertidas em AO através da ação de enzimas digestivas de moluscos ou de enzimas autolíticas de dinoflagelados (HOLMES et al., 2001). DTX-3 não foi detectada no fitoplâncton, apenas em moluscos, e LEE et al. (1988) sugerem que a transformação de DTX-1 em DTX-3 somente ocorra no hepatopâncreas dos moluscos.

Estas toxinas constituem uma ameaça para a saúde, pois consumidas em nível moderado, que escape aos limites de detecção pelas técnicas conhecidas, podem se acumular no tecido hepático levando ao surgimento de tumores. Consumidores regulares de moluscos, contaminados com concentrações de toxinas diarréicas abaixo do limite necessário ao desencadeamento dos sintomas clássicos, encontram-se expostos ao efeito crônico destas toxinas (SUEOKA & FUJIKI, 1997).

2.3.5 Envenenamento diarréico por moluscos (EDM)

Os sintomas clínicos de EDM assemelham-se com os de uma gastroenterite de origem bacteriana. Em eventos agudos, com ingestão de doses acima de $48 \mu\text{g AO.g}^{-1}$ de hepatopâncreas (VAN EGMOND et al., 1992 apud VIEYTES et al., 1997), os sintomas são náuseas, dores abdominais, vômitos e diarréia. Surgem no intervalo entre 30 minutos até poucas horas após o consumo de moluscos contaminados. Raramente o quadro clínico manifesta-se passadas mais de 12 horas. Os sintomas cessam após três dias, com ou sem tratamento médico (YASUMOTO et al., 1980).

Devido ao fato de não ocorrerem frequentemente casos de óbitos, de os sintomas do envenenamento serem facilmente confundidos com uma gastroenterite e terminarem em três dias, se torna difícil o registro epidemiológico do EDM (HALLEGRAEFF, 1993). Talvez isto justifique o fato de haverem escassos dados epidemiológicos de EDM, apesar das espécies de microalgas potencialmente tóxicas estarem presentes em amostras de plâncton marinho e de apresentarem uma distribuição ampla, em todo o Cone Sul Americano (PROENÇA et al., 1998).

Na Europa, Japão, Austrália, Nova Zelândia e Chile o problema das intoxicações provocam freqüentemente, perdas econômicas na malacocultura e estão relacionadas com FANs. Alguns casos de intoxicação relatados em Santa Catarina, no Brasil, podem estar associados às toxinas causadoras do EDM (ZENEBO & PREGNOLATTO, 1992; PROENÇA et al., 1995). Segundo SCHMITT & PROENÇA (2000), o único caso confirmado de EDM, ocorreu em Florianópolis em 1991 onde várias pessoas apresentaram distúrbios gastrointestinais após o consumo do molusco contaminado com AO.

Na Grécia, o primeiro episódio de EDM ocorreu em 2000, quando várias pessoas apresentaram sintomas gastrointestinais após o consumo de mexilhões originários do golfo Termaikos (Mar Egeu). Em 2002 foi relatado um surto de EDM durante 4 meses na mesma região (MOURATIDOU *et al.*, 2006).

2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise de referência recomendada pela União Européia para a confirmação em casos suspeitos de EDM é o ensaio biológico com ratos, observando-se os sintomas característicos e o tempo envolvidos tipicamente em cada síndrome (Dec.2002/225/EC). Entretanto, com o crescimento do conceito ético sobre o uso de mamíferos, para uma rotina de controle de qualidade de moluscos, métodos alternativos têm sido desenvolvidos (QUILLIAM, 1995).

O procedimento padrão para a detecção de toxinas, o bioensaio com ratos, tem sido avaliado como pouco específico, já que não se consegue identificar exatamente qual toxina está envolvida no evento tóxico. Há necessidade de se complementar este método ou até mesmo o substituir, se possível, para se distinguir de maneira segura, os grupos das diferentes toxinas que têm efeitos bastante deletérios a saúde humana (FERNÁNDEZ M. L. et al., 2006).

A Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica analítica de alta tecnologia, alta sensibilidade e precisão, de fácil reprodutibilidade em curto tempo. É usada como modelo alternativo aos bioensaios, na identificação e quantificação das ficotoxinas. A toxina AO não fluoresce sob luz ultravioleta, mas após ser submetida à derivação química torna-se detectável. Dessa forma seu “perfil” pode ser traçado em uma análise cromatográfica que dura aproximadamente 20 minutos (SILVA, 2001).

MOURATIDOU et al. (2006) analisou material oriundo de um evento de EDM comparando três métodos de determinação da toxina AO: método químico (CLAE), biológico (Bioensaio com ratos) e imunológico (ELISA). Concluiu que os três apresentaram bons resultados, no entanto, a CLAE permitiu a obtenção de informação mais acurada qualitativa e quantitativa em detrimento aos outros métodos.

3 METODOLOGIA

3.1 Área de Estudo

A Baía da Ilha Grande é um corpo de água salgada semi-confinada, com aproximadamente 800 km² de superfície (SEMADS, 2001), localizada na costa sul do Estado do Rio de Janeiro entre as coordenadas: latitudes 22° 55' S e 23° 15' S e longitudes 44° 00' e 44° 43' W.



Figura 08: Brasil (Rio de Janeiro); 2) Rio de Janeiro (Angra dos Reis); 3) Angra dos Reis (Baía da Ilha Grande). Escala 1:100.000

Fonte: MIRANDA et al. **Brasil Visto do Espaço**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2004.

No estado do Rio de Janeiro, a região da baía da Ilha Grande abriga dois municípios, Angra dos Reis e Parati. Estes municípios apresentam aproximadamente o perímetro de 353 Km, em contato com as águas da baía e ao longo desta linha da costa se concentram dois grandes núcleos urbanos que coincidem com as sedes municipais, isto é, Angra dos Reis e Parati (SEMA, 1998).

Dos grandes empreendimentos no município de Angra dos Reis, destacam-se: a Usina Nuclear Almirante Álvaro Alberto (UNAAA), o Porto de Angra dos Reis, o Estaleiro BRASFELS (Indústria VEROLME) e o Terminal Petrolífero da baía de Ilha Grande – TEBIG. Estes empreendimentos, apesar de alavancarem o progresso econômico da região, são as principais fontes industriais poluidoras da baía. O primeiro pode causar dano ao meio ambiente na medida em que se utiliza das águas da baía para o resfriamento de seus reatores,

podendo ser assim uma fonte significativa e possível de poluição térmica. Os outros podem contaminar as águas marinhas com óleo, além do desmatamento e assoreamento das encostas para construção de suas instalações. Sinais de contaminação por óleo são relatados com frequência pelos habitantes, que observam frequentemente sinais deste produto na água e nos sedimentos de diversas praias (FONSECA, 1999).

O continente se encontra separado da Ilha Grande por uma constrição (um canal de cerca de 2 Km de largura e 20 metros de profundidade média) (SIGNORINI, 1980). Em situação de maré enchente, a água da plataforma continental mais densa penetra na baía, junto ao fundo, principalmente através dos extremos oeste da Ilha Grande (Ponta da Joatinga e a Ponta dos Meros) e em menor escala ao leste forçada pela maré (SEMA, 1998). As águas menos densas, oriundas da baía de Sepetiba, fluem superficialmente, na direção norte da Ilha Grande, havendo nesta constrição o encontro e a mistura dessa água com as águas da plataforma. Em situação de maré vazante o fluxo das águas tem seu caminho invertido (SEMA, 1998).

3.2 Local de Coleta

As coletas foram realizadas na Fazenda de Maricultura Boa Vista que encontra-se localizada na baía da Ilha Grande, praia de Maciéis. Esta praia localiza-se no continente (coordenadas 23° 03' 03" S / 44° 13' 33,9" W) na constrição, canal de 2 km, que separa a Ilha Grande do continente, próximo ao terminal TEBIG.

Esta área foi escolhida por vários fatores relevantes a este estudo: a região sofre influência da convergência das águas oceânicas, que entram pelo lado oeste da Ilha Grande, com as águas vindas, do leste, da baía de Sepetiba (SIGNORINI, 1980) possibilitando a contaminação dos mexilhões por microalgas nocivas já encontradas na baía de Sepetiba (FERREIRA, 2004). Outro fator foi a constatação que, nos últimos anos, o fluxo de navios se intensificou nas baías da Ilha Grande e de Sepetiba (Porto de Angra dos Reis, o Terminal Petrolífero da Baía da Ilha Grande - TEBIG, o terminal para embarque de minério das Minerações Brasileiras Reunidas S.A.- MBR e a expansão do Porto de Sepetiba), aumentando o risco de introdução de espécies nocivas de microalgas via água de lastros de navios transoceânicos (NEHRING, 1998; RUIZ et al., 2000). E ainda, devido ao fato de Lourenço (2004) ter detectado a toxina ácido ocadaico em mexilhões oriundos desta localidade, em apenas um dos três meses pesquisados, demonstrando a necessidade de um conhecimento mais abrangente, desde a detecção da toxina até a identificação do fitoplâncton produtor.

3.3 Amostragem

3.3.1 Fitoplâncton

Para coletar e concentrar os organismos, foi utilizada uma rede com 20 µm de malha e uma bomba de porão Rule 2000 GPH/12 volts – 8,4 Amps; 5400 L/h – USA. A água bombeada foi filtrada através de uma rede planctônica durante 1 minuto (volume de 90 L/min) e acondicionada em frascos plásticos de capacidade de 250 ml contendo 5% de solução aquosa de formaldeído a 40%. Este método se baseou em RAMÍRES (2003).

As amostras de rede, concentradas, foram observadas para verificação da presença das espécies de interesse.

Para análise qualitativa e quantitativa foram realizadas quatro coletas, uma por mês, em diferentes profundidades (superfície = 0,5 m, meio = 1,0m e fundo = 1,5 m) da água do mar, durante os meses de setembro a dezembro de 2006. As amostras de fitoplâncton não foram realizadas entre os meses de maio e agosto de 2006, por não haver equipamento adequado para a metodologia escolhida.

3.3.2 Mexilhões

Durante os meses de Maio a Agosto de 2006 foram realizadas seis coletas; sendo uma no mês de maio, duas em junho, duas em julho e uma em Agosto. Foram retiradas cordas de mexilhões do cultivo (uma corda por coleta) contendo em média 150 indivíduos adultos (média de 6cm de comprimento da valva, cada indivíduo) em tamanho de abate segundo AVELAR, 1998.

Nos meses de setembro a dezembro de 2006, foram realizadas coletas mensais quando os mexilhões foram retirados em cordas de cultivo (1 corda por coleta), divididas por profundidade em três níveis (0,5m; 1,0m e 1,5m), na proporção de aproximadamente 50 indivíduos adultos por nível, na faixa de tamanho utilizada para comercialização.

Desta forma, no total foram realizadas dez coletas, seis entre os meses de maio e agosto de 2006, somadas a quatro coletas realizadas entre os meses de setembro e dezembro do mesmo ano.

3.3.3 Estocagem e transporte das amostras

Os mexilhões foram transportados em caixas isotérmicas contendo gelo e transferidos para freezer (-18°C) imediatamente ao chegar no laboratório.

3.4 Identificação do Fitoplâncton

Com o auxílio de um microaquário, um volume de 3 ml de água do mar, coberto com lamínula, foi levado ao Microscópio Biológico Invertido Trinocular Opton (TNB-05T-PL) para a identificação e contagem das microalgas.

As microalgas foram identificadas em grandes grupos morfológicos, exceto os dinoflagelados dos gêneros *Prorocentrum* e *Dinophysis*. Como estes dois gêneros apresentam organismos produtores de AO, buscou-se chegar à identificação até o nível de espécie. Quando não foi possível, o organismo foi tipado com o nome do gênero. Utilizou-se para a identificação material bibliográfico de STEIDINGER & TANGEM (1997), TAYLOR et al. (1995) e BALECH (2002), para dinoflagelados, e de HASLE & SYVERTSEN (1997) para diatomáceas.

Visando a confirmação das espécies encontradas e ainda a identificação até o nível de espécies daqueles organismos que foram tipados, foi realizado, junto ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), o preparo para a microscopia eletrônica deste material em 2007.

3.5 Detecção do ácido ocadaico

3.5.1 Reagentes

a) Solventes: Foram utilizados acetonitrila (grau HPLC), metanol, éter de petróleo (PA) e clorofórmio, grau Lichrosolv (Merck – Quimitra - Rio de Janeiro). A água utilizada foi obtida por sistema de purificação Millipore-Q (Milli-Q) para obtenção de um grau de qualidade ultrapura.

b) Reagentes e soluções para a derivação: Foi utilizado o padrão comercial do ácido ocadaico (Sigma) assim como demais reagentes necessários para o preparo das soluções do padrão e derivações.

⇒ **Ácido Ocadaico (C₄₄H₆₈O₁₃) - 25µg (Biochemika)**

⇒ **1-(bromoacetil)pireno – (B-6157)**

⇒ Trietilamina 30%

c) Preparo do padrão e dos reagentes de derivação:

⇒ O 1-(bromoacetil)pireno foi dissolvido em acetonitrila – 20mg para 20ml de acetonitrila com concentração final de 1mg.ml⁻¹.

⇒ O ácido ocadaico foi dissolvido em acetonitrila - 25µg para 25ml de acetonitrila, com concentração final de final de 1µg.ml⁻¹.

⇒ O Trietilamina foi usado a 30% em acetonitrila.

Estes reagentes foram preparados e estocados em freezer e utilizados a temperatura ambiente.

3.5.2 Extração de ácido ocadaico das amostras de mexilhões *Perna perna*

A toxina foi extraída segundo o procedimento descrito por SIGMA Cullture Company (1993) modificada por SILVA (2001). Basicamente esta metodologia é composta por extração, derivação e determinação dos ésteres da toxina ácido ocadaico (AO). A análise química do AO foi realizada seguida da determinação fluorimétrica dos ésteres derivados depois de separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na garantia de uma amostragem estatisticamente representativa, para cada coleta, foram extraídas amostras de 20 gramas da glândula digestiva (hepatopâncreas) dos mexilhões. As amostras foram homogeneizadas e destas, um grama foi pesado e utilizado para extração (QUILLIAM, 1995). Para cada extração foi feita uma réplica.

Um grama de hepatopâncreas de mexilhão foi submetido durante dez minutos ao banho ultra-sônico (BUS) com 4ml de metanol aquoso (MeOH-H₂O) na proporção de 80:20 v/v, a temperatura ambiente. O homogeneizado foi centrifugado a 2000 rpm/15 minutos. Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante (fase metanólica) para um tubo de vidro (15 cm comprimento e capacidade 20 ml) com tampa de rosca.

A fase metanólica foi então submetida a etapas de limpeza com adição de 2,5ml de éter de petróleo, homogeneizado por inversão durante 1 minuto. Depois de separadas as fases, a camada superior com éter de petróleo foi descartada. A limpeza com éter de petróleo é realizada duas vezes para remover ao máximo os lipídios e as impurezas. Em seguida, para

isolar a toxina, foram adicionados 1,0 ml de água e 4,0 ml de clorofórmio e agitado por inversão durante 1 minuto para a separação das fases. Após inversão a camada inferior (clorofórmio), foi transferida para balões de rotavapor. Durante essa transferência foi realizada a filtração da amostra, com filtros GVWP01300 Millipore. Esta etapa é realizada duas vezes para se extrair ao máximo a toxina, quando estiver presente. A fração do extrato dissolvida no clorofórmio foi evaporada em evaporador rotatório, na temperatura de 60°C, até a redução do volume (1 a 2 ml). Em seguida as alíquotas restantes foram transferidas para tubos tipo eppendorf e a secagem foi concluída com nitrogênio líquido. Os resíduos foram redissolvidos com 0,5 ml de acetonitrila (solução extrato).

3.5.3 Derivação e análise cromatográfica

Como o ácido ocaidaico não absorve os comprimentos de onda dos espectros de luz visível e nem no ultravioleta, os métodos desenvolvidos para sua quantificação utilizam-se da técnica de derivação, onde um cromóforo fluorescente é ligado a sua função carboxila, fazendo-o fluorescer. Neste trabalho a metodologia usada para a detecção e quantificação da toxina AO foi a desenvolvida por SIGMA (1993), otimizada por SILVA (2001) que usa como cromóforo o 1-(bromoacetil)pireno (BAP) tendo como catalizador a trietilamina 30% em acetonitrila.

Em 0,5ml de solução do extrato adicionou-se 0,5ml de 1-(bromoacetil)pireno (BAP) e 0,015ml (15µL) de trietilamina (TEA) (30% em acetonitrila) (SILVA, 2001). Os tubos permaneceram em banho ultra-sônico (BUS) por 10 minutos e, em seguida aquecidos em banho-maria a 75°C ± 1°C por 20 minutos. Posteriormente, a solução de reação foi evaporada e seca sob N₂. O resíduo foi então resuspenso em 0,25ml de acetonitrila e 20µl da solução derivada foi injetada no sistema CLAE-DF. Uma mistura de acetonitrila e água (75:25 v/v) foi usada como fase móvel em um fluxo de 0,8 ml/minuto. A amostra foi separada em uma coluna Microsorb C18 10µm (4,6 X 15 mm) (Varian-USA), a temperatura ambiente.

Para a análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com uma bomba Waters, modelo 510, detector de fluorescência Agilent, modelo 1100 Series, injetor de loop fixo de 20 µL (Rheodyne).

3.5.4 As condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para o presente trabalho encontram-se descritas no Quadro 01. As amostras foram injetadas em duplicata e a identidade da toxina foi confirmada pelo uso de padrão externo. A toxina foi quantificada através de cálculo de comparação entre a área produzida pelo padrão injetado com a área produzida pelo AO presente naturalmente na amostra.

Quadro 01 – Condições cromatográficas para detecção do ácido ocadaico em CLAE-DF.

<i>Fase móvel</i>	acetonitrila:água ultra-pura (75:25)
Fluxo	0,8 ml/min ⁻¹
Injeção	20 µl
Emissão	440 nm
Excitação	335 nm

4.1 Identificação e quantificação do padrão da toxina AO.

Foram realizadas injeções dos reagentes separadamente, 1-(bromoacetil)pireno (BAP) puro, da acetonitrila (ACN) pura e do BAP derivado com trietilamina 30 %, no sistema CLAE, para diferenciar os resultados cromatográficos daqueles gerados pelas injeções do padrão do AO. O comportamento destas injeções foi o esperado, ou seja, não apresentaram em nenhum momento picos com perfis próximos ao padrão, tanto no quesito tempo de retenção como a área gerada.

Para o cálculo da curva de calibração, foram realizadas injeções do padrão, derivados em cinco volumes diferentes (1,00 ml; 0,50 ml, 0,25 ml, 0,15 ml e 0,05 ml). Assim, verificou-se que houve aumento nos picos, ou seja, aumento nas áreas geradas correspondendo ao aumento das concentrações da toxina (Figura 09).

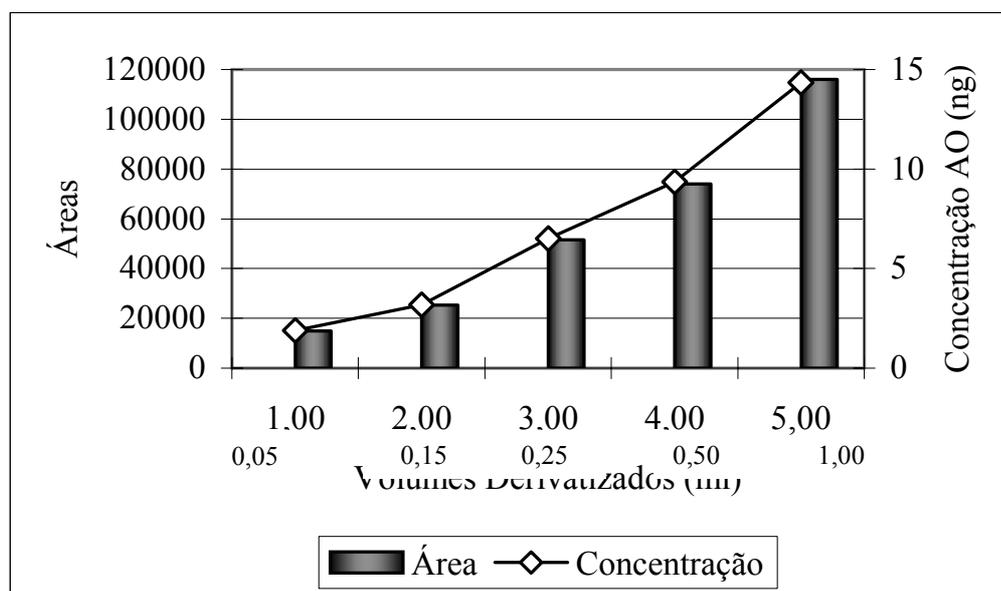


Figura 09 - Curva de calibração do padrão do ácido ocadaico, utilizando cinco volumes diferentes derivados.

Correlacionando os valores das áreas obtidas foi verificado que a detecção correspondeu linearmente, apresentando coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9998 (Figura 10).

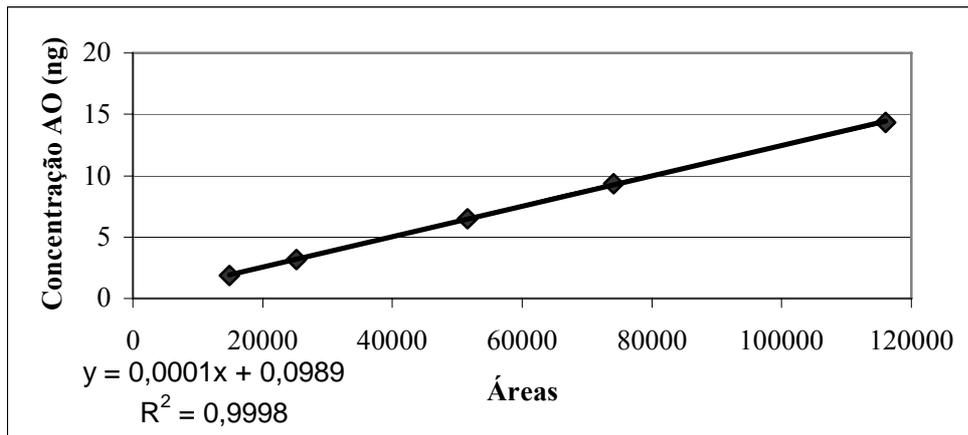


Figura 10 – Validação do método cromatográfico CLAE-DF para detecção da ficotoxina AO. Reta de regressão para o padrão AO. Concentração da toxina em $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de hepatopâncreas de molusco.

Foram realizadas sucessivas injeções do padrão do AO no intuito de avaliar a repetibilidade. Os resultados encontrados foram satisfatórios, apresentando perfis cromatográficos idênticos.

A injeção de 20 μl do padrão do AO ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), utilizada para os cálculos de quantificação, gerou pico aos 16.492 minutos de retenção, com uma área de 276.465 (figura 11), correspondendo a 20 ng de AO detectado.

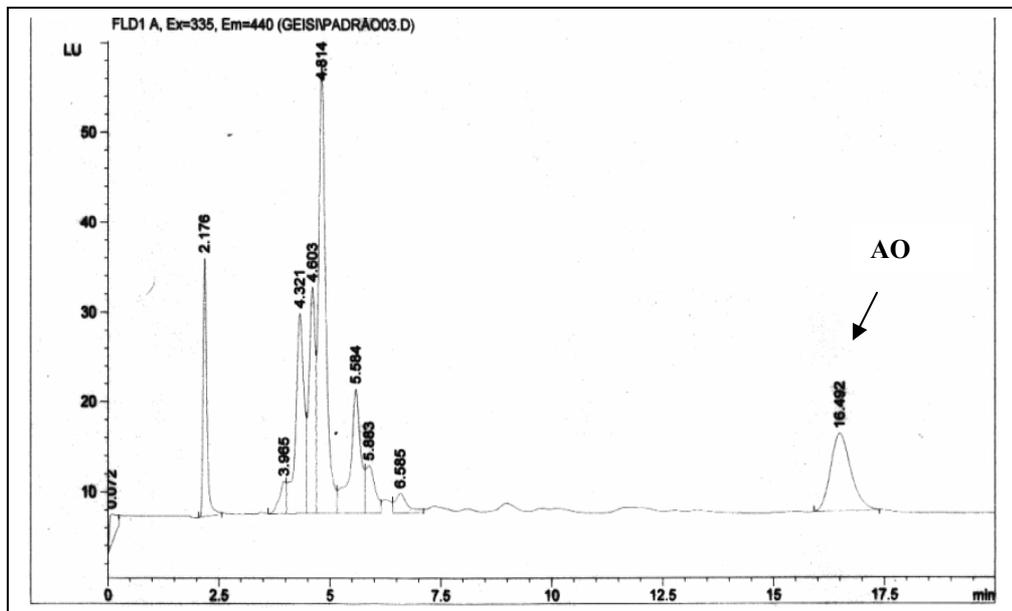


Figura 11: Cromatograma do padrão do AO (tempo de retenção: 16,492 minutos)

4.2 Cromatografia das amostras

Todas as análises das amostras apresentaram picos com tempo de retenção semelhante ao do padrão, demonstrando desta forma, a contaminação pela toxina AO, dos mexilhões coletados entre maio de outubro de 2006 (figuras 12).

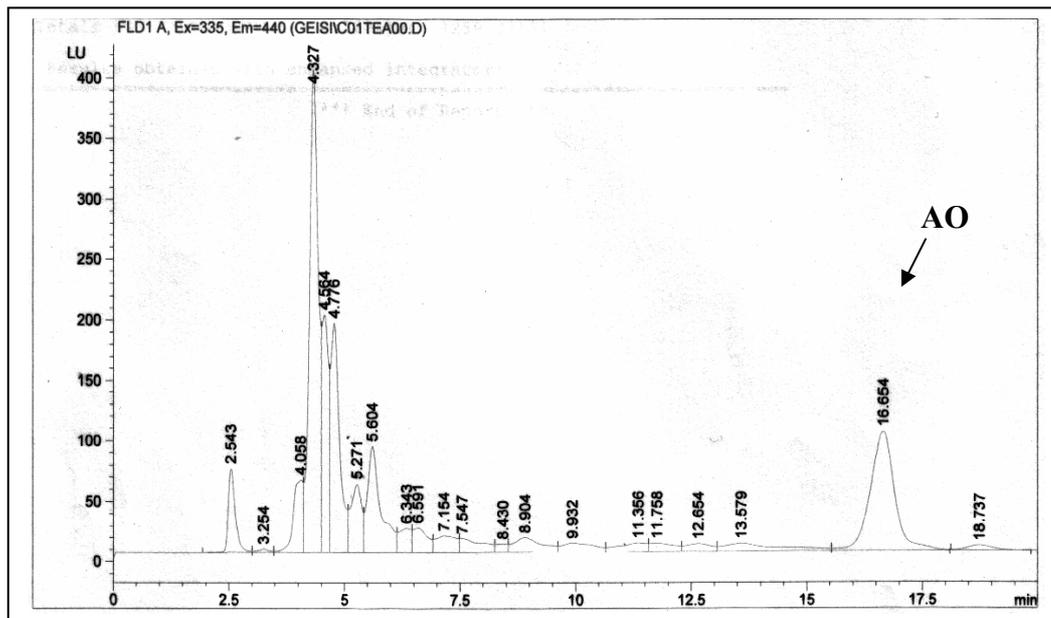


Figura 12: Cromatograma da amostra C01 – coleta dia 20/05/2006.

De cada coleta foram realizadas duas análises das amostras extraídas dos hepatopâncreas dos mexilhões, perfazendo um total de 24 análises, como demonstrado na tabela 01.

Tabela 01 – Concentrações de AO das amostras de mexilhão coletadas de maio a outubro de 2006, na enseada de Maciéis, utilizando coluna C18 e fase móvel acetonitrila: água ultra pura 70:30 (v/v).

Coleta	Amostra	Concentração AO ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
20 MAIO	*C 01	3,28
	*rep	0,57
06 JUNHO	C 02	0,56
	rep	0,21
16 JUNHO	C03	1,16
	rep	1,49
18 JULHO	C04	0,20
	rep	1,50
27 JULHO	C05	2,31
	rep	2,59
15 AGOSTO	C06	2,27
	rep	2,10
13 SETEMBRO	C 07- S*	0,60
	rep	2,80
	C 07 –	
	M*	4,04
	rep	0,45
	C 07 – F*	8,54
rep	3,00	
26 OUTUBRO	C 08 – S	2,83
	rep	3,46
	C 08 –	
	M	1,80
	rep	4,10
	C08 – F	3,81
rep	2,23	

*C01 – primeira coleta em maio, sucessivamente até a última coleta, (C 10) coleta 10 em dezembro.
 *rep – réplica; *S - superfície (0,5m), M – Meio(1,0m), F-fundo (1,5m) de profundidades da corda mexilhoneira na coluna d'água.

As réplicas apresentaram concentrações muito divergentes (tabela 01), o que impossibilitou a aplicação de testes de inferência estatística. Possivelmente este comportamento se deveu ao fato de; a segunda alíquota de 1g (réplica) retirada de 20g de hepatopâncreas homogeneizados, conter partes de hepatopâncreas com concentrações diferentes da primeira, visto que; para se atingir os 20g, foram necessários em média 50

mexilhões, retirados aleatoriamente da corda de cultivo. Portanto, os resultados foram demonstrados em médias durante os meses (figura 13).

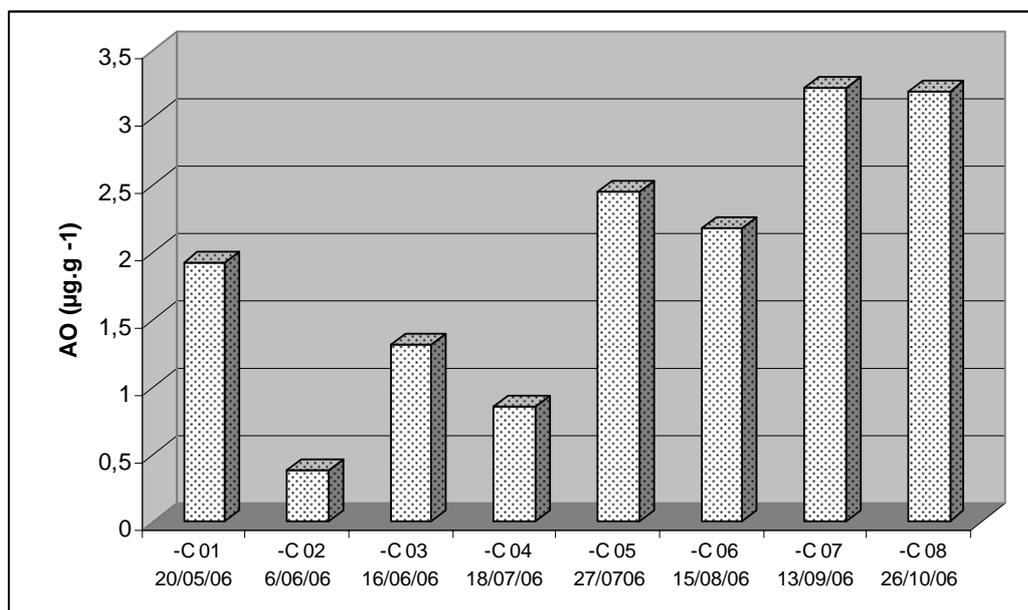


Figura 13: Gráfico das médias das concentrações da toxina AO.

Entre os meses de maio e agosto de 2006 não houve separação entre as profundidades (superfície = 0,5 m, meio = 1,0m e fundo = 1,5 m), porque não foram realizadas coletas de fitoplâncton. O objetivo seria comparar a quantidade de toxina encontrada, com o número de microrganismos potencialmente produtores, por nível de profundidade.

Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação pela toxina AO em concentrações que variaram entre 0,20 µg.g⁻¹ e 8,54 µg.g⁻¹ de hepatopâncreas. Estando acima do limite permitido para comercialização e consumo, segundo a União Européia, que estipulou o nível máximo em 0,16 µg.g⁻¹ (do corpo todo ou alguma parte específica do molusco separadamente) (Decisão 2002/225/EC).

Apesar das concentrações estarem abaixo do necessário para o desenvolvimento do Envenenamento Diarréico por Moluscos, cerca de 48 µg.g⁻¹ de hepatopâncreas, há o risco eminente da ocorrência de um evento tóxico. Além disso, outro fator relevante é o potencial carcinogênico associado à ingestão em baixas concentrações durante longo período, caracterizando assim o efeito crônico da toxina no trato gastrointestinal e em tecido hepático, como afirmam Daranas et al. (2001) e Sueoka & Fujiki (1997).

Como observado na figura 14, os meses de setembro e outubro apresentaram as maiores concentrações da toxina AO, sendo na estação da primavera. Estes resultados confirmam os anteriormente encontrados por Mouratidou *et al.* (2006), quando detectaram por

CLAE, os maiores níveis da toxina AO durante os meses de primavera, contaminando mexilhões do Golfo Thermaikos – Grécia. A espécie de fitoplâncton envolvida na floração foi *Dinophysis acuminata*.

Pesquisas realizadas no litoral sul do Rio de Janeiro também encontraram a toxina AO em baixas concentrações, em mexilhões *Perna-perna* na baía de Sepetiba, não sendo suficientes para desencadear o Envenenamento Diarréico por Moluscos (OLIVEIRA, 2001 e FERREIRA, 2004). Associados aos resultados encontrados, observam-se a presença constante da toxina AO durante as épocas analisadas.

Lourenço (2004) também encontrou a toxina AO em mexilhões *Perna-perna* coletados em Maciéis – baía de Ilha Grande. No outono de 2004, apenas uma amostra contaminada, na concentração de 2,65 ng de AO.g⁻¹ de hepatopâncreas. Nesta pesquisa as menores concentrações de toxina também foram encontradas no outono, o que demonstra um comportamento fitoplanctônico dependente de variações ambientais, como por exemplo, a temperatura.

Ramirez, (2003) detectou AO nos mexilhões de Pontevedra, Vigo – Espanha em 1999, quando as maiores concentrações observadas estavam nos meses mais quentes (primavera/verão) em concordância com os resultados demonstrados no gráfico box-plot (figura 14).

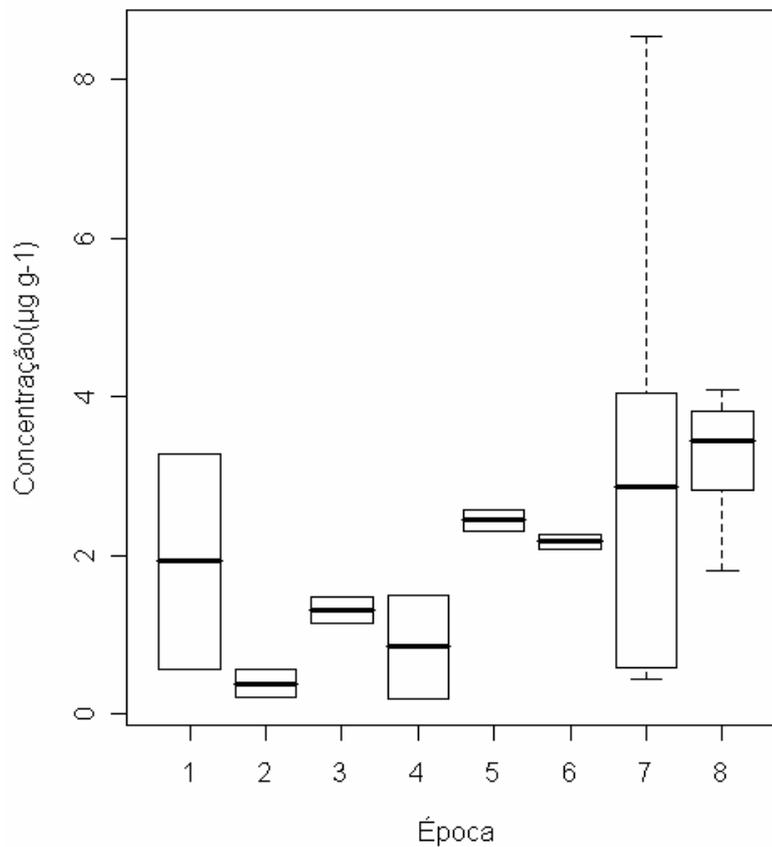


Figura 14: Análise estatística demonstrada em Box-plot .

Época (meses de coleta): 1 = maio; 2 e 3 = junho; 4 e 5 = julho; 6 = agosto; 7 = setembro e 8 = outubro.

Onde **—** representa as médias das concentrações da toxina AO.

4.3 Fitoplâncton: Dinoflagelados potencialmente tóxicos

Os gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum* foram os de maior representatividade dentre os dinoflagelados. As espécies *Prorocentrum micans* (figura 15) e *Prorocentrum gracile* foram encontradas em todas as amostras analisadas até o momento e ainda não foram apontadas como produtoras de toxina diarréica (figura 18). Proença (1999) confirmou que *P. micans* não foi capaz de produzir as toxinas diarréicas AO ou DTX, porém, *D. acuminata* (figura 16) foi capaz de produzir a toxina AO. Contudo, Fukuyo *et al.* (1990) relaciona *Prorocentrum micans* como potentes formadores de florações.



Figura 15: Fotomicrografia das espécies de fitoplâncton identificadas com auxílio de microscópio biológico invertido (objetiva 25x). 1-*Dinophysis fortii* e 2-*Prorocentrum micans*.



**Figura 16: Fotomicrografia (objetiva 25x)
*Dinophysis acuminata***



**Figura 17: Fotomicrografia (objetiva 25x)
*Dinophysis tripos***

Foram tipados em *Prorocentrum sp 1* e *Prorocentrum sp 2* devido à dificuldade de se chegar até espécies segundo metodologia de identificação utilizada.

Para a confirmação das espécies identificadas assim como a correta classificação daqueles que foram somente tipados, está sendo realizada a microscopia eletrônica no Instituto de Biociências, Departamento de fisiologia da Universidade de São Paulo.

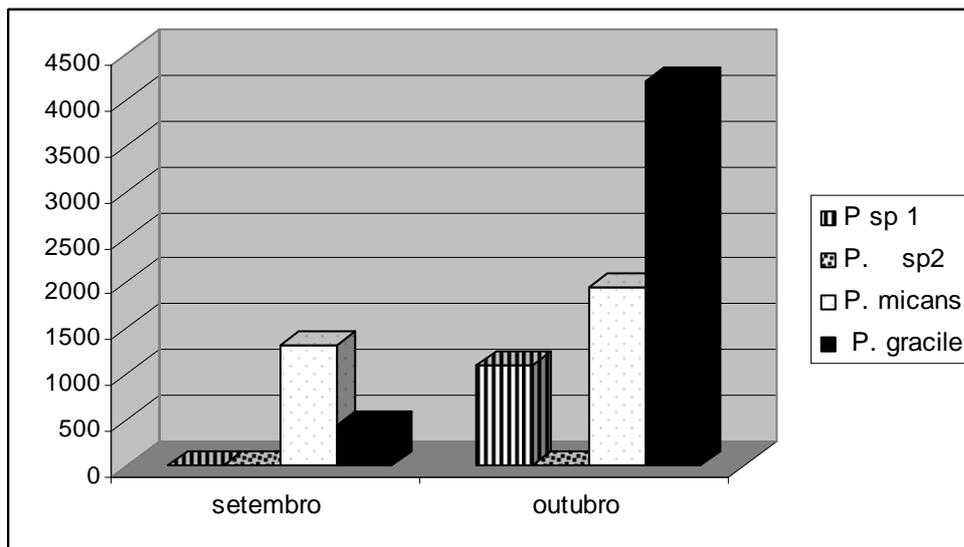


Figura 18: Gráfico da ocorrência de espécies do gênero *Prorocentrum*, entre os meses de setembro e outubro de 2006.

Foram encontradas *Dinophysis fortii*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis tripos* (figuras 15, 16 e 17) e *D. rotundata*, durante os meses de setembro e outubro, em baixa abundância (menos de 10 cél.l⁻¹), como demonstrado na figura 19, sendo todas, em algum momento, capazes de produzir a toxina AO causadora do Envenenamento Diarréico por Moluscos segundo o IOC- UNESCO, 2000.

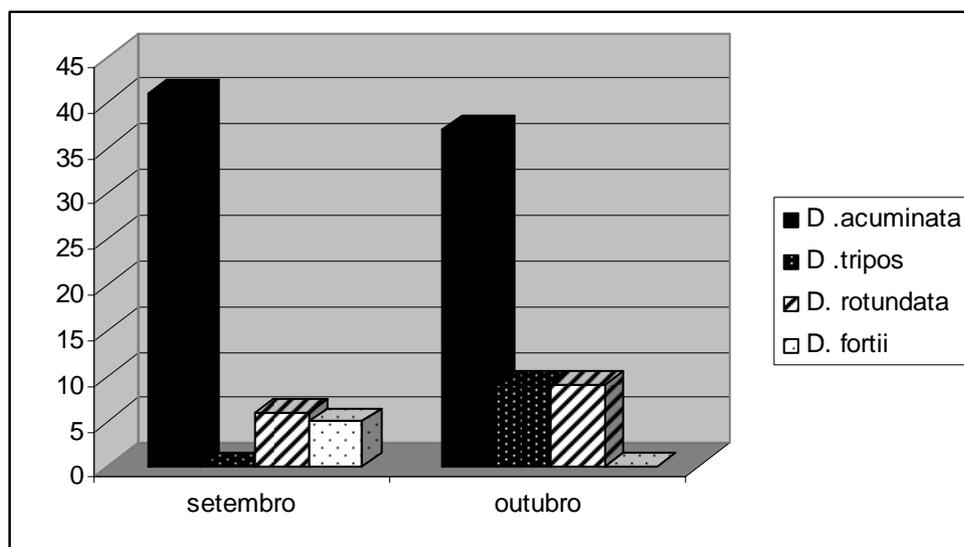


Figura 19: Gráfico da ocorrência de espécies do gênero *Dinophysis*, entre os meses de setembro e outubro de 2006 (em 90L de água do mar).

4.3.1 Análise estatística do fitoplâncton (dinoflagelados)

Como demonstrado na tabela 02 de análise de variância, concluiu-se que houve diferença significativa entre as profundidades de coleta do fitoplâncton. Observou-se também que os meses de coleta, diferiram significativamente entre si.

Tabela 02 – Análise de variância para número de dinoflagelados em três diferentes profundidades (superfície, meio e fundo) em relação aos meses de setembro e outubro.

	GL	Quadrado médio	Fcalc.
Profundidade	2	4,7505	50,47757*
Erro(a)	18	0,0941	
Mês	1	39,95	649,0072*
Erro(b)	9	0,0615	
Prof x Mês	2	2,6795	64,7396*
Resíduo	18	0,0413	

* significativo a < 0,001%. ** Os dados foram transformados em $\log(x+1)$

O delineamento experimental foi de parcela subdividida no tempo.

Erro (a) = erro associado às profundidades

Erro (b) = erro associado aos meses analisados.

A partir da tabela 03, verificou-se que a análise realizada no fundo apresentou um maior número de microrganismos. Este resultado foi independente do mês analisado. Contudo, o mês de outubro apresentou um número maior de microrganismos, quando comparado ao mês de setembro.

Tabela 03 – Número médio de dinoflagelados em diferentes profundidades, nos meses de setembro e outubro de 2006.

Profundidade	Mês	
	Setembro	Outubro
Superfície	27	213
Meio	31	244
Fundo	125	275
C.V. (%)	0,13	

4.4 Produção de ácido ocadaico

A ocorrência da toxina AO nos meses de setembro e outubro, estação da primavera, possivelmente foi produzida pela espécie *D. acuminata* que foi a predominante dentre as demais identificadas como também associou Ramírez (2003). A autora afirma que, as concentrações de AO em mexilhões associadas à proliferação de *D. acuminata* em Pontevedra, Vigo – Espanha, alcançou níveis acima do dobro do máximo detectado durante as proliferações de *D. acuta*.

Estes resultados também vão de encontro àqueles publicados por Mackenzie (2005), quando confirmou a produção da toxina AO por células de *D. acuta* e *D. acuminata*, na Nova Zelândia em 2002, estando os níveis mais altos da toxina em células de *D. acuminata*. Os perfis das toxinas produzidos por espécies de *Dinophysis*, mostraram que a concentração nas células pode variar substancialmente de acordo com condições do meio (teor de nutrientes) e climáticas (temperatura), havendo variações ainda no conteúdo de toxinas por célula dentro de uma mesma população.

Ainda no mar Adriático (Noroeste da Costa da Itália), eventos de EDM têm sido relatados desde 1989 e quase sempre associados à baixa abundância de células das espécies de dinoflagelados tóxicos. Esporadicamente têm ocorrido florações ao longo da Costa Noroeste. Em 2002, a maior ocorrência de células potencialmente tóxicas foi evidenciada no período da primavera / verão, quando *Dinophysis* spp. foi encontrada em altos níveis (PENNA, 2006).

Mouratidou et al. (2006), detectou os maiores níveis da toxina AO durante os meses de primavera, contaminando mexilhões do Golfo Thermaikos – Grécia e a espécie de fitoplâncton envolvida na floração foi *Dinophysis acuminata* e provavelmente responsável pela produção da toxina encontrada.

Ferreira (2004) e Lourenço (2004) associaram aos níveis da toxina AO encontrados em mexilhões *Perna perna*, na baía de Sepetiba e baía de Ilha Grande - RJ respectivamente, as espécies de *Dinophysis* encontradas como prováveis produtoras. Ferreira (2004) encontrou células de *D. acuminata*, *D. tripos*, *D. fortii*, *D. rotundata* e *D. acuta* em baixa abundância (2 cel.l⁻¹). Segundo o autor, o AO encontrado possivelmente foi produzido durante eventos anteriores de florações por estas espécies, quando os mexilhões acumularam a toxina AO, estando em processo de depuração natural no período em que foram coletados.

Dinophysis acuminata esteve presente em densidade muito baixa. Smayda (1990) demonstrou que uma floração nociva não pode ser caracterizada apenas em função do

parâmetro biomassa, pois espécies pertencentes ao gênero *Dinophysis* produzem toxinas diarréicas em densidades celulares da ordem de 10^2 células/litro de água do mar. BALECH (2002), recomenda mesmo em região onde a quantidade de exemplares de algas tóxica seja baixa, medidas preventivas como monitoramento destas algas e dos moluscos. Segundo este autor, as algas tornam-se perigosas, em um tempo relativamente curto, aumentando sua concentração e densidade, se as condições nestes ambientes se tornarem favoráveis.

Em estudos feitos por Poletti et al. (1996) no mar Adriático, foi mostrado que mexilhões contaminados naturalmente com uma grande concentração de AO ($4.25\mu\text{g AO.g}^{-1}$ de hepatopâncreas), quando transferidos para áreas livres desta toxina, em seis dias o nível de contaminação em seus hepatopâncreas, havia baixado 83% e em 21 dias a toxina havia desaparecido dos tecidos destes moluscos.

Esta pesquisa demonstra que, possivelmente os mexilhões se contaminaram por eventos tóxicos pontuais de fitoplâncton que não foram detectados durante as coletas, por apresentar uma frequência espacial e temporal de curta duração, que permitiram a exposição dos bivalvos à concentrações elevadas de células tóxicas. Ou ainda pode haver outra espécie envolvida na produção da toxina AO, visto que não houve coleta de organismos bentônicos, característicos de fundo, demonstrando a necessidade de uma investigação neste aspecto.

Segundo Ramírez (2002), eventos de microalgas tóxicas se tornaram, do ponto de vista sanitário e pesqueiro, o problema mais grave relacionado com as ficotoxinas, no Cone Sul Américo. Durante estes episódios, sem alcançar necessariamente concentrações que colorem a água, estas microalgas, têm causado graves intoxicações ao homem e levado a proibição na extração e comercialização dos mexilhões.

5 CONCLUSÕES

Todas as amostras contaminadas apresentaram concentrações da ficotoxina AO abaixo do limite necessário ao desenvolvimento do EDM. Porém, há o risco em potencial para o evento ocorrer a partir do aumento da concentração de AO, quer seja pela multiplicação de células fitoplanctônicas ou pelo aumento da produção da toxina por célula destes organismos.

A contaminação de todas as amostras, em baixas concentrações, demonstra o alto risco da ação carcinogênica nos consumidores regulares, principalmente nos próprios maricultores que consomem o excedente da produção.

As baixas densidades celulares de dinoflagelados encontradas indicaram não estar ocorrendo florações durante as coletas.

Todas as espécies de *Dinophysis* identificadas são potencialmente produtoras da toxina AO.

A presença do maior número de dinoflagelados, no fundo, indica o deslocamento fitoplanctônico na coluna d'água, possivelmente, por haver nesta profundidade, maior teor de nutrientes.

6 RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA

A detecção da ficotoxina AO, mesmo em baixas concentrações nos moluscos, e a presença de *Dinophysis* spp na baía de Ilha Grande, reafirmam a necessidade da elaboração e da realização efetiva de um programa de controle higiênico-sanitário dos moluscos assim como o monitoramento ambiental na região.

Diante da escassez de dados sobre a incidência do EDM e do potencial carcinogênico da toxina AO, recomenda-se um estudo epidemiológico aprofundado na região e a continuação das pesquisas no litoral do Rio de Janeiro.

Além disso, deve haver a informação em forma de educação, aos pequenos produtores locais, que desconhecem o perigo das ficotoxinas e toda a problemática envolvida neste assunto.

7 BIBLIOGRAFIA

ANDERSEN, P. Design and Implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems. **IOC Technical Series**. UNESCO, n. 44, p. 112-119, 1996.

ANDERSON, D.M. Red Tides. **Scientific American**. p.52 – 58, August 1994.

ANDREU, B. (a) El cultivo Del mejillón en Europa. (II) Metodos e tecnicas utilizadas. **Anais, Acad. Bras. Cienc.** v.47, p. 11-22, 1976.

ANDREU, B. (b) El cultivo Del mejillón en Europa. (I) Aspectos biológicos y Ecológicos: Enemigos y parasitos. **Anais, Acad. Bras. Cienc.** v.47, p.23-46, 1976.

ASSOCIAÇÃO DOS [MARICULTORES DA BAÍA DA ILHA GRANDE. Boletim informativo sobre o cultivo de Moluscos Bivalves da Baía da Ilha Grande, 2006. Angra dos Reis-RJ, 2006.

AUSTRALIAN RESEARCH NETWORK FOR ALGAL TOXINS. **Australian Institute Of Marine Science, 2005**. Ácido Ocadaico (Fórmula estrutural da molécula - polieter lipofílico) Disponível em: www.aims.gov.au/arnat/arnat-0007.htm, acesso em setembro de 2006.

AVARIA, P. S. Implicancias del fenómeno de marea roja en la salud humana. **Revista Médica de Valparaíso**. v. 42, n.1/4, p. 57-69, 1989.

AVARIA, P. S. Marea roja: perspectiva científica. **Rev. Sanid. Def. Nasc.** Santiago do Chile, v.9, n.2, p. 92-99, 1992.

AVELAR, J. C. L. **Manual de Miticultura**, Ministério do Meio Ambiente/Plano Nacional de Meio Ambiente/Plano de Execução Descentralizada. 1ª Edição. Brasília, p.164, 1998.

BALECH, E. Dinoflagelados Tecados Tóxicos del Cono Sur Americano In: SAR, E. A.; FERRARIO, M. E.; REGUERA, B. (eds) **Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano**. Instituto Español de Oceanografía, Vigo, p.123-144, 2002.

BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 4ª ed. São Paulo, Editora Livraria Roca Ltda., p. 419-463, 1990.

BERTULLO, V. Tecnologia de los productos y Subproductos de Pescados, Moluscos y Crustáceos. **Ed. Hemisferio Sur**. 1ª edición. Buenos Aires-Argentina, p.538, 1975.

BIALOJAN, C.; TAKAI, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. **Specificity and kinetics Biochem. J.** v.256, p. 283-290, 1988.

BONEY, A. D. Phytoplankton. **Inst. Biol./Stud. Biol. Edward Arnold.** London, v.52, p. 116, 1975.

BURGESS, V.; SHAW, G. Investigations into the toxicology of pectenotoxin-2-seco acid and 7-epi pectenotoxin 2-seco acid to aid in a health risk assessment for the consumption of shellfish contaminated with these shellfish toxins in Australia. **Report of Project No. 2001/258. National Research Centre for Environmental Toxicology.** Archerfield, Queensland, Australia, p.50, 2003.

CARRETO, J. L. Marés vermelhas. **Ciência Hoje.** V.13, p. 51-60, 1991.

CARVALHO FILHO, J. Panorama da malacocultura brasileira. **Panorama da Aqüicultura.** São Paulo, v.64, p. 25-31, 2001.

CEMBELLA, A. D.; WRIGHT J. L. C. Ecophysiology and Biosynthesis of Polyether Marine Biotoxins. In: ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. & HALLEGRAEFF, G. M. (eds) Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. **Ecological Sciences**, v.41, p.35-39, 1996.

COHEN, P.; HOLMES, C. F. B.; TSUKITANI, Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. **Trends Biochem. Sci.** v.15, p.98-102, 1990.

DARANAS, A. H.; NORTE, M.; FERNANDEZ, J. J. Toxic Marine Microalgae. **Toxicon.** v.39, p.1101-1132, 2001.

DODGE, J. D. A Scanning Electron Microscope Survey. **Atlas of Dinoflagellates.** London, v.12, p. 29-33, 1985.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUARIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA S. A. **Manual de Cultivo do mexilhão *Perna perna* Florianópolis.** Santa Catarina, p.139, 1994.

EPSTEIN, P. R.; FORD, T. E.; COLWELL, A. Marine ecosystems. **Lancet.** v.342, p.1216-1219, 1993.

FERNANDES, F. C. **Manual de maricultura.** Ministério da Marinha, Instituto Nacional de estudos do Mar. p.1-24, 1985.

FERNANDES, F. C.; TENENBAUM, D.R.; SAIDAH, F. E. M. Conteúdo estomacal e considerações gerais sobre a alimentação do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) Mollusca – Bivalvia. V **Simp. Latino Americano sobre oceanografia biológica**. Resumo, p.326, 1978.

FERNÁNDEZ, L. F.; BRANDINI, F. P. Comunidades Microplanctônicas no Oceano Atlântico Sul ocidental: biomassa e distribuição em novembro de 1992. **Rev. Bras. Oceanografia**. v. 47, n. 2, p.189- 205, 1999.

FERNÁNDEZ, M. L.; REGUERA, B.; GIL, S. G.; MÍGUEZ, A. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain) **Toxicon**. [v. 48, n. 5](#), p. 477-490, Outubro 2006.

FERREIRA, V. M. **Detecção de ácido ocadaico produzidos por *Dinophysis* spp. (EHREMBERG, 1839), em Mexilhões *Perna perna*, (LINNÉ, 1758), em situação de Primavera e Verão, nas Ilhas Guaíba e Madeira, Baía de Sepetiba**. 2004. 54p. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

FIORENTINI, C.; MATARRESE, P.; FATTOROSSO, A.; DONELLI, G. Okadaic acid induces changes in the organization of F-Actin in intestinal cells. **Toxicon**. v. 34, n. 8, p. 937-945, 1996.

FONSECA, E. M. **Qualidade da água no litoral norte da Ilha Grande, RJ: subsídeos para a instalação de novos cultivos do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**. 1999. 52p. Monografia de Bacharelado. Departamento de Oceanografia e Hidrologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS **Fisheries Technical Paper**. Part 1: World review of fisheries and aquaculture. The state of world fisheries and aquaculture. Editorial Group, p. 5-11, 2006.

Fotomicroscopia eletrônica de *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis tripos* e *Prorocentrum lima*. Disponível em www.kitasato-u.ac.jp/.../lab/l23/bisei/07.html. Acesso em Abril de 2007.

GLOBAL ECOLOGY AND OCEANOGRAPHY OF HARMFUL ALGAL BLOOMS, Report from a Joint IOC/SCOR Workshop, Denmark, 1998.

GOMES, M. P. **Crescimento do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca; Bivalvia) em sistema de cultivo “long-line” na enseada de Sítio Forte - Ilha Grande, Angra dos**

Reis- RJ. 1996. 36p. Monografia de Bacharelado. Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

HALLEGRAEFF, G. M. Harmful algal blooms: global overview. **Manual on Marine Microalgae. UNESCO Publishing.** Paris, p.25-49, 2003.

HALLEGRAEFF, G. M. A review of harmful algal bloom and their apparent global increase. **Phycologia.** v.32, n. 2, p. 79-99, 1993.

HALLEGRAEFF, G. M. Algal toxins in Australian and New Zealand seafood products: Review of their occurrence, analytical detection and public health implications. **Consultancy report for the Australia New Zealand Food Authority (ANZFA).** Canberra, Australia, Julho 1998.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D.; ENEVOLDSEN, H. O. Harmful algal blooms: a global review. **Manual on Harmful Marine Microalgae.** UNESCO. Paris, v. 33, p. 1-22, 1995.

HAMANO, Y.; Y. KINOSHITA, T. Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. **J. Food Hyg. Soc. Jpn.** v.27, p. 375-379, 1986.

HASLE, G. R.; SYVERTSEN, E. E. Marine diatoms. **Identifying marine phytoplankton** Tomas. C. R. Academic Press. San diego, p. 5- 385, 1997.

HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. Algae An Introduction to Phycology. **Cambridge University Press.** USA, 1995.

HOLMES, M. J.; LEE, F. C.; KHOO, H. W. Production of 7-Deoxy-Okadaic Acid by a New Caledonian Strait of *Prorocentrum lima* (Dinophyceae). **J. of Phycol.** v.37, p.280-288, 2001.

INTERGOVERNAMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION OF UNESCO (IOC-UNESCO) Taxonomic Reference List of Toxic Plankton Algae. 2000. Disponível em <http://www.ioc.unesco.org/hab/>. Acesso em novembro de 2006.

INTERGOVERNAMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION OF UNESCO (IOC-UNESCO). **Manual on harmful marine microalgae.** 1995.

ITO, E.; TERAOKA, K. Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds. **Natural Toxins.** v.2, p. 371-377, 1994.

KAT, M. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In: **TAYLOR, D.; SELIGER, H.H. (eds), Toxic Dinoflagellate Blooms**, Elsevier. Amsterdam, p. 215-220, 1979.

KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; CARLSSON, P.; RÜH, A.; GRANÉLI, E. Food selectivity and grazing impact on toxic *Dinophysis* spp. by copepods feeding on natural plankton assemblages. **Harmful Algae**. [v. 5, n. 1](#), p. 57-68, Janeiro 2006.

LARSEN, J.; MOESTRUP, O. Guide to toxic and potentially toxic marine algae. **The fish Inspection Service**. University of Copenhagen. Ministry of Fisheries, Dinamarca, 1989.

LEE J. S.; YANAGI, T.; KENMA R.; YASSUMOTO, T. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. **Agri. Biol. Chem.** v.51, n. 3, p. 877-881, 1988.

LOURENÇO, A. J. **Detecção de ácido ocadaico em cultivo de mexilhões, *Perna perna* (Linnè, 1758), no outono de 2004 na enseada de Maciéis, baía de Ilha Grande, Angra dos Reis - RJ**. 2004. 54 p. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

MACKENZIE, L.; BEUZENBERG, V.; HOLLAND, P.; MCNABB, P.; SUZUKI, T. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from NewZealand. **Harmful Algae**. v. 4, p. 75-85, Janeiro 2005.

MACKENZIE, L.; MCNABB, P.; HOLLAND, P.; BEUZENBERG, V.; SELWOOD, A.; SUZUKI, T. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. **Toxicon**. v.40, p. 1321-1330, 2002.

MARENZI, A. W. C.; BRANCO, J. O. O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (Bivalvia, Mytilidae) em cultivo na Armação do Itapocoroy, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. de Zool.** v. 22, n.2, p. 394-399, Junho 2005.

MATIAS, G. W.; CREPPY, E. E. Lipoperoxidação induzida pelo ácido ocadaico uma toxina marinha. **Revista Biotecnologia e Desenvolvimento**. n.4, p.30, 1996.

MATIAS, W.G. A problemática das eflorescências de algas marinhas nocivas. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**. n.8, p. 16- 18, Maio/junho 1999.

MÉNDEZ, S.; BRAZEIRO, A.; FERRARI, G.; MEDINA, D.; INOCENTE, G. Mareas Rojas em el Uruguay. Programa de Control y Actualización de Resultados. **Informe Técnico INAPE**. n.46, 1993.

MILES, C. O. et al. Towers, Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. **Toxicon**. v. 43, n. 1, p. 1-9, 2004.

MIRANDA, E. E. de; COUTINHO, A. C. **Brasil Visto do Espaço**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2004. Disponível em: <http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br>. Acesso em: 23 abr. 2007.

MOURATIDOU, T.; GRIGORIADOU, I. K.; SAMARA, C. Detections of the marine toxin acid in mussels during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Thermaikos gulf, Greece, using biological, chemical and immunological methods. **Science of the total environment**. v. 366, n. 2, p. 894-904, agosto 2006.

NEHRING, S. Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea. Supposed regions of origin and possible transport vector. **Arch. Fish. Mar. Res.** v.46, n. 181-194, 1998.

OLIVEIRA, G. M. **Deteção do ácido okadaico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Mariscos (*Perna perna*) Capturados na Baía de Sepetiba. 2001.** 85p. (Dissertação de mestrado). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

OTERI, G.; STAMMATI, A.; ZAMPAGLIONI, F.; ZUCCO, F. Evaluation of the use of two human cell lines for okadaic acid and DTX-1 determination by cytotoxicity assays and damage characterization. **Natural Toxins**. V.6, n. 5, p. 197 – 209, 1998.

PENNA, A.; INGARAO, C.; ERCOLESSI, M. Potentially harmful microalgal distribution in an área of the NW Adriatic coastline: Sampling procedure and correlations with environmental factors. **Estuarine coastal and shelf science**. V.70, p. 307-316, Julho 2006.

PROENÇA, L. A.; RORIG, L. Mussel production and toxic algae bloom in Santa Catarina State, Southern Brazil. **IOC/UNESCO. Harmful Algae News**. V.5, p. 12-13, 1995.

PROENÇA, L. A.; SCHIMITT, F.; COSTA, T.; RÖRIG, L. R. Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**. V. 50, n.6, p. 458- 462, Novembro/Dezembro 1998.

PROENÇA, L. A.; SCHIMITT, F.; GUIMARÃES, S. P.; RÖRIG, L. R. Análise de Toxinas Diarréica em Duas Espécies de *Prorocentrum* (*Dinophyceae*) Isoladas em área de Cultivo de Moluscos. **Notas Técnicas, FACIMAR**, n.3, p. 41- 45, 1999.

QUILLIAM, M. A. Analysis of DSP in Shellfish for Liquid Chromatography with Fluorimetric and Detection Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**. V.78, n.2, p. 555-570, 1995.

RAMIRÉZ, B. R. Capítulo 1: Establecimiento de un Programa de Seguimiento de Microalgas Tóxicas. In: Floraciones Algales Nocivas en el Cone Sur Americano. SAR, E. A., FERRARIO, M. E. REGUERA, B. (Eds.) **Instituto Español de Oceanografía**, Vigo, 2002.

RAMIRÉZ, B. R. **Biología, Autoecología Y Toxicología De Las Principales Especies Del Género *Dinophysis* Asociadas A Episodios De Intoxicación Diarreogénica Por Bivalvos (DSP)**. 2003. 298 p (Tese de Doutorado). Departamento de Ecología, Universidad de Barcelona, Vigo, 2003.

RUIZ, G. M. et al. Global spread of microorganisms by ships. **Nature**. V.408, p. 49-50, 2000.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª ed. São Paulo, Editora Livraria Roca Ltda. p. 412- 451, 1996.

SALAYA, J. J.; BEAUPERTHUY, I.; MARTINEZ, J. Estudos sobre a la biologia, pesqueira y cultivo del mejillon, *Perna perna* en Venezuela. **Minist. Agric. Y Cria. In Inf. Tec.** n.62, p. 50, Venezuela, 1973.

SCHANTZ, E. J. Historical Perspective on Paralytic Shellfish poison. **Reagilis**. p. 99, 1984.

SCHMITT, F.; PROENÇA, L. A. Ocorrência de dinoflagelados do gênero *Dinophysis* (ENRENBURG, 1839) na Enseada de Cabeçadas (verão e outono de 1999). **Notas Técnicas Facimar**. n.4, p.49-59, 2000.

SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (SEMA) **Uma Avaliação da Qualidade das Águas Costeiras do Estado do Rio de Janeiro**. Projeto Planagua SEMA/GTZ de cooperação técnica Brasil-Alemanha, Fundação Estudos do Mar 1998.

SEMADS – Secretaria do Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Estado do Rio de Janeiro **Macroplano de Gestão e Saneamento Ambiental**. Bacias Hidrográficas e Recursos Hídricos da Macroregião 2, 4- Bacia de Sepetiba, Projeto Planagua SEMADS/GTZ. 2001.

SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA - SEAP. Presidência da República - Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil 2005.

Disponível em http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/estatistica/, acesso em fevereiro de 2007.

SIGMA - SIGMA CELL CULTURE COMPANY – **Okadaic Acid Detection Kit**. USA – Canada, p.7, 1993.

SIGNORINI, L.C. A Study of the Circulation in Bay of Ilha Grande and of Sepetiba. Part I. A Survey of the Circulation based on Experimental Field Data. **Inst. Oceanogr.** Universidade de São Paulo, 1980.

SILVA, P. P. O. **Otimização de metodologia para detecção de ácido ocadaico por cromatografia líquida de alta eficiência em moluscos bivalvos**. 2001. 63p. (Tese de doutorado). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

SMAYDA, T. J. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. **Toxic marine phytoplankton: Proc. 4th Int. Conf. Elsevier**. p.29-40, 1990.

SOURNIA, A. Atlas du Phytoplancton Marin Volume 1: Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées, **Editions du Centre National de la Recherche Scientifique**. Paris, 1986.

SOURNIA, A.; CHRÉTIENNOT-DINET, M. J.; RICARD, M. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? **Journal of Plankton research**. v. 13, n.5, p. 1093-1999, 1991.

STEIDINGER, K.A.; TANGEN, K. Dinoflagellates. **Identifying marine phytoplankton** Tomas, C. R. (ed). **Academic Press**. San Diego, p. 397-583, 1997.

STEIDINGER, K. A. Some Taxonomic and Biological Aspects of Toxic Dinoflagellates. **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**. **Academic Press**. Ltd. p. 1-139, 1993.

STORER, T. L.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 2ªed. São Paulo, Companhia Editora Nacional. p.418- 425, 1976.

SUEOKA, E.; FUJIKI, H. Carcinogenesis of Okadaic Acid Class Tumor Promoters Deriver from Marine Natural Products. **Harmful Algal VIII International Conference**. p. 573-576, 1997.

SUGANUMA, M. et al. Okadaic acid: an additional non- phorbol - 12 – tetradecanoate 13- acetate-type tumor promoter. **Proc Natl Acad Sci. USA**, n. 85, p. 1768- 1771, 1988.

TAYLOR, F. J. R.; FUKUYO, Y.; LARSEN, J. Taxonomy of Harmful Dinoflagellates. **Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides**. UNESCO. n. 33, 1995.

TAYLOR, L. S. Marine Toxins of Microbial Origin. **Food Technology**. p. 94-98, 1988.

TENENBAUM, D. R. O que sabemos sobre o fitoplâncton do litoral brasileiro? In: Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil. Araújo, E. L., Moura, A. N., Sampaio, E. V. S. B., Gestinari, L. M. S., Carneiro, J. M. T. (eds). **Imprensa Universitária – UFRPE**. Recife, p.109-115, 2002.

TERAO, K.; ITO, E.; OHKUSU, M.; YASUMOTO, T. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin 1 and pectenotoxin 1. **Toxicon** n.24, p. 1141-1151, 1986.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Official Journal of the European Communities. COMMISSION DECISION (2002/225/EC)**, março, 2002.

TRIPURANENI, J. et al. The toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning, Okadaic Acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. **Gastroenterology**. V.112, n.1, p. 100-108, Janeiro 1997.

VIEYTES, M. R. et al. A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. **Analytical Biochemistry**. n.248, p. 258-264, 1997.

WINDDWS, J. et al. Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mitilus edulis*. **Marine Ecology- progress series**. n.127, p. 131-148, 1995.

YASUMOTO, T. Marine microorganisms toxins – an overview. **Toxic marine phytoplankton: Proc. 4th Int. Conf. Elsevier**. p.3-8, 1990.

YASUMOTO, T.; MURATA, M. Marine toxins. **Chem. Rev.** n.93, p. 1897-1909, 1993.

YASUMOTO, T. et al. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning.. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.** n.46, p.1405-1411, 1980.

YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; YAMAGUCHI, M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Japan and chemical properties of the toxin. **TAYLOR, D.; SELIGER, H.H. (eds), Toxic Dinoflagellate Blooms Elsevier.** Amsterdam, p. 495-502, 1979.

YASUNOTO, T. et al. Determination of Marine Toxins in Foods. **Journal of AOAC International.** v. 78, n. 2, p. 574-587, 1995.

YENTSCH, C. M. Paralytic shellfish poisoning: An emerging perspective. **Reagilis.** p. 9, 1984.

ZENEON, O.; PREGNOLATTO, N. P. **Memórias técnico-científicas da divisão de bromatologia e química. 100 anos de Saúde Pública – Secretaria de Estado da Saúde. JLF Antunes ed. Instituto Adolfo Lutz.** p. 173-198, 1992.