BRUNO GARCIA STRANGHETTI

Monitoração toxinológica do pescado comercializado
nos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba, SP

São Paulo
2007

Bruno Garcia Stranghetti

Monitoração toxinológica do pescado comercializado
nos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba, SP

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos
de Freitas.

São Paulo

2007

Ficha Catalográfica

S 896m

Stranghetti, Bruno Garcia

Monitoração toxinológica do pescado comercializado nos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba, SP. / Bruno Garcia Stranghetti. – São Paulo: B. G. Stranghetti, 2007.

86 páginas.

Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Toxinologia marinha 2. PSP
3. DSP 4. Toxicidade aguda em camundongo I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

LC: QP 632.M37

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a) Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a) Dr(a).

Prof. Dr. José Carlos de Freitas
Orientador

**Aos meus pais, Vera e Humberto,
e meus irmãos, Letícia e Lucas,
com transbordante amor.**

O rio

Ouve o barulho do rio, meu filho

Deixa esse som te embalar

As folhas que caem no rio, meu filho

Terminam nas águas do mar

Quando amanhã por acaso faltar

Uma alegria no seu coração

Lembra do som dessas águas de lá

Faz desse rio a sua oração

Lembra, meu filho, passou, passará

Essa certeza, a ciência nos dá

Que vai chover quando o sol se cansar

Para que flores não falem

Para que flores não falem jamais

(Seu Jorge, Carlinhos Brwon,
Arnaldo Antunes e Marisa Monte)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que auxiliaram na realização deste projeto:

Ao Prof. Dr. José Carlos de Freitas, pela orientação, amizade, conhecimentos transmitidos e postura em todos os acontecimentos comuns ou não que compartilhamos nesses cinco anos de nossa convivência.

À Dra. Luciana Retz de Carvalho, pesquisadora da seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, pela amizade, pelas dicas, pelo grande apoio e por sua intensa dedicação em ajudar-me nas análises cromatográficas em seu laboratório; à sua família pelo entendimento de sua permanência no laboratório após o horário normal de trabalho para que terminássemos as análises a tempo.

Ao Instituto de Biociências, nas pessoas de seus diretores Prof. Dr. João Stenghel Morgante e Prof. Dr. Alberto Augusto G. de F. C. Ribeiro.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, nas pessoas das suas chefes Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter e Profa. Dra. Regina Pekelmann Markus.

Ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier, coordenador de pós-graduação do departamento de Fisiologia Geral e presidente da CPG, pelas facilidades concedidas.

À Secretaria do Departamento de Fisiologia do IB, na pessoa de Roseli Silva Santos, por sua eficiência e por sua ajuda em todos os momentos.

À Secretaria de Pós-Graduação do IB, nas pessoas de Érika Hamuri Takamoto de Camargo, Helder Rossi Santos Souza, Maria Tereza Auriemi da Silva.

À também funcionária da Secretaria de Pós-Graduação do IB, Vera Lúcia Barboza Lima, um particular agradecimento pelo conselho e pela grande assistência concedida em um momento crucial no curso do mestrado, meu muito obrigado!

Ao nosso técnico de laboratório e amigo, Wagner Alberto, pelos auxílios concedidos.

Ao técnico Manoel Ferreira Brito, pela ajuda com os animais empregados nos experimentos deste trabalho.

Ao senhor Beto Carlota, por ter colaborado com as doações dos mexilhões para os estudos realizados.

Aos colegas e amigos de laboratório, André Zaharenko, Andréa Natali, Cynthia Delboni, Enrique Rozas, Jeanete Naves, Lucília Miranda e Wilson Ferreira.

Aos amigos e colegas de profissão, professores e diretores, em especial os de Caraguatatuba, que me deram apoio nos momentos necessários de minha vida acadêmica.

Ao Dr. Joacir Storlaz de Oliveira, pela disposição no esclarecimento de dúvidas relativas às técnicas empregadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Valéria Stranghetti, minha tia, pelo incentivo e pelo exemplo de sucesso na carreira de biólogo.

A todos os meus amigos e familiares que não citei, mas que foram de grande importância e que me ajudaram a chegar, por enquanto, até aqui.

Aos meus pais e meus irmãos, meus especiais agradecimentos pela compreensão nas horas de turbulência, em que estava arrufado com os percalços cotidianos, pela confiança, pelas orações e por toda força e apoio que me foram dados.

Ao Senhor Deus, por ter me abençoado e por ajudar-me nos caminhos que escolhi trilhar.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIACÕES

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Considerações gerais.....	01
1.2. Aspectos históricos em relação às florações de algas nocivas no Brasil.....	06
1.3. <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i> (PSP).....	09
1.3.1. Características físico-químicas das toxinas paralisantes de moluscos.....	10
1.3.2. Produção de STX por bactérias.....	11
1.3.3. Moluscos e concentração de STX.....	13
1.3.4. Mecanismo de ação da saxitoxina.....	14
1.3.5. Sintomatologia	16
1.3.6. Tratamento.....	17
1.3.7. Canal de sódio dependente de voltagem e toxinas paralisantes.....	18
1.4. <i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i> (DSP).....	22
1.4.1. Aspectos gerais e físico-químicos.....	22
1.4.2. Etiologia.....	22
1.4.3. Mecanismo de ação das toxinas diarréicas.....	23
1.4.4. Sintomatologia.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais para os bioensaios de toxicidade aguda.....	27
3.2. Extração.....	28
3.2.1. Extração de toxinas paralisantes (PSP) (AOAC, 1990)	28
3.2.2. Extração de toxinas paralisantes através de concentração (SATO <i>et al.</i> , 1990).....	28
3.2.3. Extração de toxinas diarréicas (DSP).....	28
3.3. Bioensaios.....	30
3.3.1. Bioensaio de toxicidade aguda para <i>Paralytic Shellfish Toxins</i> (WILLIAMS, 1984).....	30
3.3.1.1. Cálculo para obtenção do número de Unidades Camundongo (MU) por grama de tecido.....	33
3.3.2. Bioensaio de toxicidade aguda para <i>Diarrhetic Shellfish Toxins</i>	33
3.3.3. Bioensaio em banda ventricular de coração de anuro (FREITAS & MARSIGLIO, 1986).....	34
3.4. Análises químicas.....	35
3.4.1. Pré-purificação.....	36
3.4.2. Derivatização.....	36
3.4.3. Pré-cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.....	37
3.5. Fluxograma do processamento das amostras.....	38
3.5.1. Fluxograma do processamento das amostras para PSP (AOAC, 1990).....	38
3.5.2. Fluxograma do processamento das amostras para PSP (SATO <i>et al.</i> , 1990).....	39
3.5.3. Fluxograma do processamento das amostras para DSP.....	40

4. RESULTADOS.....	41
4.1. Bioensaios.....	41
4.1.1. Bioensaios de toxicidade aguda para toxinas paralisantes.....	41
4.1.2. Bioensaio de Toxicidade Aguda para <i>Paralytic Shellfish Toxins</i>	41
4.1.3. Bioensaio de Toxicidade Aguda para <i>Paralytic Shellfish Toxins</i> – Método de SATO e col. (1990).....	41
4.1.4. Bioensaio de Toxicidade Aguda para <i>Diarrhetic Shellfish Toxins</i>	42
4.2. Bioensaios em banda ventricular de coração de anuro.....	45
4.3. Relação interespecífica <i>versus</i> toxicidade.....	47
4.4. Sazonalidade e localização geográfica <i>versus</i> toxicidade.....	47
4.5. Análises químicas.....	50
5. DISCUSSÃO.....	58
5.1. Bioensaio de Toxicidade Aguda para <i>Paralytic Shellfish Toxins</i>	58
5.2. Bioensaio de Toxicidade Aguda para <i>Paralytic Shellfish Toxins</i> – Método de SATO e col. (1990).....	60
5.3. Bioensaio de Toxicidade Aguda para <i>Diarrhetic Shellfish Toxins</i>	62
5.4 Bioensaio em banda ventricular de coração de anuro.....	63
5.5. Análises químicas.....	64
5.6. Considerações Finais.....	66
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

As toxinas do envenenamento paralisante por moluscos (*Paralytic Shellfish Poisoning* – PSP) são compostos naturais bioativos conhecidos devido ao consumo accidental de frutos do mar contaminados. Estas moléculas, das quais a mais potente é a saxitoxina (STX), são uma classe de alcalóides neurotóxicos que possuem diferentes análogos e diferentes toxicidades, e são produzidas por algumas cianobactérias e algumas espécies de dinoflagelados do gênero *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*. As toxinas paralisantes são neurotoxinas solúveis em água que agem sobre células nervosas e musculares através do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, desta maneira, impedindo a condução do sinal no neurônio o que leva a uma paralisia muscular. Em casos graves, pode ocorrer morte por insuficiência respiratória. O envenenamento diarréico por moluscos (*Diarrhetic Shelfish Poisoning* – DSP) é caracterizado por problemas gastrointestinais com sintomas como diarréia, náusea, vômito, dor de cabeça, calafrios e dores abdominais. DSP é consequência do consumo de mariscos contaminados que ingeriram dinoflagelados do gênero *Dynophysis* e *Prorocentrum* através de sua alimentação por filtração da água. Contaminação de frutos do mar por toxinas PSP ou DSP coloca-se como sério problema para a indústria pesqueira e para a saúde pública.

Neste estudo, estabeleceu-se um programa de monitoração para mexilhões (*Perna perna*) e para peixes (*Sardinella brasiliensis*, *Anchoiella lepidentostole* e *Brevoortia aurea*) coletados em peixarias e entrepostos de pesca no municípios de Caraguatatuba e São Sebastião, São Paulo. Os extratos para PSP foram preparados de duas maneiras: de acordo com a AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), através do aquecimento por 5 min de uma mistura de 100 g de tecidos homogeneizados com ácido acético 0,1 N; ou a partir da concentração de extratos etanólicos de músculo + pele dos peixes. Os bioensaios com camundongos para PSP consistem na injeção intraperitonal de 1 mL do extrato ácido em cada um dos três camundongos (~ 20 g). O animal é observado quanto aos sintomas clássicos de PSP e o tempo de morte é anotado e então a toxicidade é determinada (em *mouse units*, MU) pela tabela de Sommer. Para as toxinas causadoras de DSP, os extratos foram preparados pela extração com acetona do homogeneizado das glândulas digestivas, e a determinação da presença destas toxinas é feita através da injeção intraperitonal em camundongos.

Nos bioensaios com os extratos preparados segundo o método da AOAC, não houve casos positivos. Para o bioensaio realizado com extratos etanólicos obtiveram-se resultados positivos para 77,8% dos extratos testados. A média de MU de todas as amostras, neste caso, foi de 0,147 MU/g. Nos bioensaios para DSP, três amostras resultaram em sinais que evidenciam a presença destas toxinas, pois os camundongos injetados apresentaram quadro diarréico. Os extratos etanólicos, com positividade para as toxinas de PSP, foram fracionados usando-se colunas Sep-Pak C₁₈. A primeira eluição, com ácido acético 0,1 M, foi analisada usando-se o método de pré-derivatização e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. As análises em CLAE indicaram a presença de compostos semelhantes às toxinas paralisantes de PSP, confirmando os bioensaios.

Portanto, pela primeira vez no Brasil demonstrou-se que as espécies *S. brasiliensis*, *A. lepidentostole* e *B. aurea* são portadoras de toxinas paralisantes, semelhantes às PSP, em pequenas concentrações e que um programa de monitoração é necessário em nosso país para verificação da presença dessas toxinas em organismos que são usados como alimento pela população.

ABSTRACT

The Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins are well-known natural bioactive compounds due to their accidental consumption in contaminated seafood. These molecules, of which the most potent representative is saxitoxin (STX), are a class of neurotoxic alkaloids, having different isoforms and varied toxicities, that are produced by some cyanobacteria and some species of dinoflagellates from the genus *Alexandrium*, *Gymnodinium* and *Pyrodinium*. PSP toxins are water-soluble neurotoxins that act on nerve and muscle cells by blocking sodium channels voltage-dependent, thus preventing the conductance of neuron signal leading to muscular paralysis. In severe cases, death may result due to respiratory failure. Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) is a gastrointestinal illness with symptoms such as diarrhea, nausea, vomiting, headache, chills and moderate to severe abdominal pain. DSP is usually a consequence of consuming contaminated shellfish that have ingested dinoflagellates of the genera *Dinophysis* and *Prorocentrum* through their filter feeding activities. Contamination of seafood by PSP and DSP toxins has posed serious problems to the fisheries industry as well to public health.

In this study, was stabilized a monitoring program to shellfish (*Perna perna*) and finfish (*Sardinella brasiliensis*, *Anchoviella lepidentostole* and *Brevoortia aurea*) collected in fish markets in Caraguatatuba and São Sebastião cities, São Paulo state. The extracts for PSP were prepared by two ways: according to AOAC (Association of Official Analytical Chemists), through the heating for 5 min of blend of 100 g of well mixed sample with 0.1 N HCl; or through of the concentration of ethanolic extracts from finfish's muscle + skin. The PSP mouse bioassay for PSP toxins involves intraperitoneal injection (i.p.) of 1 mL of the acid extract into each of three mice (~ 20 g). The mice were observed for classical PSP symptoms and the time to mouse death was recorded and the toxicity was determinate (in mouse units, MU) from the Sommer's table. To DSP toxins, the extracts was prepared trough the extraction of digestive glands with acetone, and i.p injection in mice was used to determine the presence of theses toxins.

In the mouse bioassay for the extracts prepared by AOAC method no positive results was obtained. For the mouse bioassay with ehtanolic extracts was obtained positive results to 77.8 % of the tested extracts. The media of MU of all samples, in this

case, was 0,147 MU/g. To the mouse bioassay for the DSP toxins, three samples gives evidence of presence of the diarrhetic toxins, because the mice showed signal like diarrhea. The ethanolic extracts, that was positive to the PSP toxins, was fractionated by a Sep-Pak C₁₈ cartridge. The first elution, with 0.1 M acetic acid, was analyzed by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. The HPLC analysis indicated the presence of the PSP toxins, confirming the bioassays.

Therefore, in the first time in Brazil was demonstrated that the species *S. brasiliensis*, *A. lepidentostole* and *B. aurea* are carriers of toxins like PSP in little concentrations and that a monitoring program is necessary in our country to verify the presence of these toxins in organisms that are used as food by the population.

ABREVIACES

AO – cido ocadáico

CLAE – Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC, em ingls)

DSP – *Diarrhetic Shellfish Poisoning*

DST – *Diarrhetic Shellfish Toxins*

DTX - Dinofisistoxina

FAN – Floraes de Algas Nocivas

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA – *U.S. Food and Drug Administration*

GD – Glndula digestiva

MU – *Mouse Units*

ODS – Octadecil silanizada

PSP – *Paralytic Shellfish Poisoning*

PST – *Paralytic Shellfish Toxins*

SOFIA - *The State of World Fisheries and Aquaculture* (O Estado da Pesca e da
Aqüicultura Mundial)

STX - Saxitoxina

TTX - Tetrodotoxina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Há, atualmente, uma tendência mundial no que se refere ao aumento na procura e no consumo de produtos de origem aquática. No Brasil, a situação não é diferente. Vários produtos de origem marinha são comercializados em nosso território e têm movimentado economias regionais, promovendo mudanças de hábitos em comunidades tradicionalmente pesqueiras que se voltam ao cultivo de algas, peixes, crustáceos e moluscos.

A FAO, departamento da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação lança a cada dois anos relatórios sobre “O Estado da Pesca e da Aquicultura Mundial” (*The State of World Fisheries and Aquaculture – SOFIA*), onde são registradas as tendências de produção pesqueira, do comércio e do aproveitamento nesta área. Além disso, relatam-se as estatísticas quanto ao cultivo e a captura de espécies de interesse comercial. Baseando-se nos dados destes relatórios, temos um quadro que nos mostra esse aumento no consumo e na produção, principalmente na aquicultura, de produtos de origem aquática.

De acordo com o último relatório SOFIA, o comércio mundial de pescado e de produtos do ramo pesqueiro atingiu o valor de US\$ 71,5 bilhões nas exportações em 2004, representando 23% de crescimento em relação a 2000 (SOFIA-2006, 2007).

O relatório também destaca que as taxas de captura de espécies, principalmente marinhas, estão no, ou acima do nível máximo de sustentabilidade, dado evidenciado nas taxas de captura que se mantêm praticamente no mesmo nível desde 2002, com uma notável queda, em porcentagem média, desde 1974 (SOFIA-2004, 2004). Há estimativas que em 2005 cerca de um quarto dos estoques pesqueiros monitorados pela FAO estavam subexplorados ou explorados moderadamente (3% e 20%, respectivamente) e talvez pudessem produzir mais. Em torno de metade dos estoques (52%) eram explorados ao máximo e portanto a captura estava próxima dos limites máximos de sustentabilidade, sem espaço para expansão. O um quarto restante estava sobreexplorado, esgotado ou em

recuperação de sua redução (17%, 7% e 1%, respectivamente) e assim, rendendo menos do que seu potencial máximo devido à pressão excessiva de pesca exercida no passado, com nenhuma possibilidade, em curto ou médio prazo, de outras expansões de pesca e com grande risco de declínio e necessidade de tempo para recrutamento populacional (SOFIA-2006, 2007).

Este panorama contrasta-se com o quadro que pode ser observado em relação à produção provinda da aquicultura, que vêm registrando taxas com aumentos anuais (tabela 1) (SOFIA-2004, 2004; SOFIA-2006, 2007). Para se ter uma idéia da importância deste setor, de acordo com as estatísticas da FAO, a contribuição da aquicultura às fontes globais de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais continua a crescer, aumentando de 3,9% da produção total, em peso, em 1970 para 32,4% em 2004 (SOFIA-2006, 2007).

A produção da aquicultura registrada em 2004 foi de 45,5 milhões de toneladas, com um valor de US\$63,3 bilhões ou, se as plantas aquáticas forem incluídas, 59,4 milhões de toneladas, com um valor de US\$70,3 bilhões. A maricultura contribuiu com 36% desta produção e com 33,6% dos valores totais. Todas as regiões demonstraram crescimento na produção de 2002 para 2004, e regiões do Leste e Norte da África e a América Latina lideraram este crescimento (SOFIA-2006, 2007).

Quando comparada a outras áreas de fornecimento de produtos de origem animal vê-se que a aquicultura é o setor que mais cresce, com taxa de crescimento anual de 8,8% desde 1970, contra um crescimento anual de 1,2% do setor de pesca de captura e 2,8% no setor de produção de carne em fazendas, no mesmo período (SOFIA-2004, 2004; SOFIA-2006, 2007).

Os países do extremo oriente são os maiores produtores de pescado, com a China lidera o mercado. O Brasil encontra-se ocupando o quarto lugar, entre os países que mais cresceram no setor da aquicultura, passando de 176,5 mil toneladas, em 2000, para 246,2 mil, em 2002, com um crescimento de 18,1%. Este crescimento foi ligeiramente maior que o do Chile (18%) que teve uma produção, em 2002, de 545,7 mil toneladas. O Brasil

coloca-se, assim, como o segundo maior em produção na aquicultura do continente Sul Americano (SOFIA-2004, 2004).

Há uma projeção para 2030 em que o Brasil e o Chile liderarão o crescimento no ramo pesqueiro, chegando a uma participação no mercado mundial de, aproximadamente, 16% (figura 1), que hoje não passa de 5% (FAO-SOFIA, 2004). Porém, estas projeções só realizar-se-ão com a adoção de medidas governamentais que incentivem e promovam o setor, dando suporte ao crescimento.

Figura 1. Estudo da contribuição futura de grupos de países para a aquicultura mundial, baseado nos planos nacionais de desenvolvimento nesta área. (Figura retirada na íntegra do relatório SOFIA-2004, (2004) da FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação).

Diante desse cenário promissor e sabendo-se que animais filtradores, detritívoros, carnívoros e herbívoros podem ser, através das relações alimentares, portadores de toxinas de gravidade variável para o homem (FREITAS, 1993), tais como as toxinas paralisantes e as toxinas diarréicas, há que se estabelecerem políticas que visem o monitoramento do pescado e dos frutos do mar produzidos em nosso país, não só a fim de se evitar contaminações por bactérias, fungos ou vírus, mas também para que se previna que estes animais sejam comercializados caso portem toxinas destes tipos, o que poderia causar graves danos à saúde das pessoas, além de grandes perdas econômicas para os aqüicultores.

Em vários países, como Austrália, Canadá, Japão, Coreia, Nova Zelândia, Noruega, Estados Unidos, Chile e países da União Européia (SHUMWAY *et al.*, 1995), já existem programas de monitoramento para diversas toxinas das espécies comercializadas, tais como as PST (*Paralytic Shellfish Toxins*) e DST (*Diarrhetic Shellfish Toxins*), que ocorrem principalmente em certas espécies de moluscos filtradores que possuem uma grande capacidade de acumulação destas toxinas. No Brasil, ainda não há nenhuma legislação, em vigor que regulamente esse setor e que exija esse tipo de monitoramento. Entretanto, em 19 de Outubro de 2005, foi publicado no Diário Oficial da União o Decreto 5.564 que instituiu o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (CNCMB), que é a primeira tentativa de se instituir um controle abrangente sobre a produção de moluscos.

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor de bivalves que, segundo PROENÇA (2000), produz 10 mil toneladas/ano do molusco bivalve *Perna perna* e 200 mil dúzias de ostra japonesa *Crassostrea gigas*, com uma estimativa de que a produção possa chegar a 50 mil toneladas anuais em alguns anos.

Assim, considera-se importante a monitoração do fitoplâncton das águas onde são cultivados animais marinhos para a alimentação humana e animal, sobretudo dos bivalves utilizados.

Tabela 1. Produção da pesca e da aquicultura mundiais, e as diferentes utilizações desta produção entre os anos de 2000 e 2004, com uma previsão para o ano de 2005. (Tabela retirada na íntegra do relatório SOFIA-2006, (2007) da FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005 ¹
	(Million tonnes)					
PRODUCTION						
INLAND						
Capture	8.8	8.9	8.8	9.0	9.2	9.6
Aquaculture	21.2	22.5	23.9	25.4	27.2	28.9
Total inland	30.0	31.4	32.7	34.4	36.4	38.5
MARINE						
Capture	86.8	84.2	84.5	81.5	85.8	84.2
Aquaculture	14.3	15.4	16.5	17.3	18.3	18.9
Total marine	101.1	99.6	101.0	98.8	104.1	103.1
TOTAL CAPTURE	95.6	93.1	93.3	90.5	95.0	93.8
TOTAL AQUACULTURE	35.5	37.9	40.4	42.7	45.5	47.8
TOTAL WORLD FISHERIES	131.1	131.0	133.7	133.2	140.5	141.6
UTILIZATION						
Human consumption	96.9	99.7	100.2	102.7	105.6	107.2
Non-food uses	34.2	31.3	33.5	30.5	34.8	34.4
Population (billions)	6.1	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5
Per capita food fish supply (kg)	16.0	16.2	16.1	16.3	16.6	16.6

Note: Excluding aquatic plants.

¹Preliminary estimate.

1.2. Aspectos históricos em relação às florações de algas nocivas no Brasil

Poucos são os registros, em nosso país, que se referem às florações nocivas de fitoplâncton e casos de envenenamentos com ficotoxinas marinhas, o que dificulta a construção de um panorama que sirva de base para um programa nacional de monitoramento desses eventos.

GARCIA e col. (1995), em um relatório publicado nos anais de um *Workshop* da UNESCO sobre Florações de Algas Nocivas (FAN) na continente Sul-Americano, fazem uma revisão das ocorrências registradas na literatura científica sobre FAN na costa brasileira trazendo casos esparsos, mas que abrangem a costa como um todo - do litoral do nordeste até o extremo sul. PROENÇA (2000), também em relatório sobre FAN da UNESCO, complementa os registros desses eventos no país, porém ambos os relatórios deixam claro que a escassez de documentação científica desses eventos pode ser atribuída à carência de coletas regulares e programas de monitoração. Além disso, PROENÇA (2000) trata sobre a ausência de um centro de convergência de informações pertinentes ao assunto, o que deixa as informações dispersa entre as diferentes disciplinas que abordam o tema, além da falta de uma legislação específica que controle e responsabilize setores da sociedade sobre estes acontecimentos.

Um recente evento de FAN, causado por cianobactérias do gênero *Microcystis*, ocorreu na cidade do Rio de Janeiro, RJ, na praia da Barra da Tijuca, em 24 de Janeiro de 2007, segundo publicação do Jornal O Globo. A faixa de praia atingida pela floração foi interditada e não se registraram intoxicações em humanos.

Se registros de eventos tóxicos referentes a florações de fitoplâncton são escassos, mais ainda são os registros sobre intoxicações humanas por ficotoxinas. O mais conhecido em nosso país foi o caso da clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru (PE), em 1996, onde 54 pacientes foram a óbito devido à contaminação da água de hemodiálise por cianobactérias de águas doces (AZEVEDO, 1998 *apud* PROENÇA, 2000; FREITAS, comunicação pessoal).

Em relação ao ambiente marinho, os trabalhos sobre algas nocivas são também restritos e seus impactos difíceis de serem avaliados, já que uma extensa área de nosso litoral não está coberta por amostragens. Os danos ao ecossistema marinho estão, geralmente, associados à mortandade de peixes e moluscos. Embora as intoxicações em humanos sejam bastante comuns em todo o globo, há muitos anos são poucos os registros destes incidentes em nosso país (PROENÇA, 2000).

SATÔ e col. (1963/64) descrevem casos de intoxicação de pessoas, associadas a florações de *Trichodesmium erythraeum* em Recife, em 1963 e 1964, conhecidos como febre de Tamandaré. Por ingestão de ficotoxinas há um registro, talvez o único caso confirmado por consumo de moluscos na Ilha de Santa Catarina, em 1990, associado à toxina diarréica (ZENEBON & PREGNOLATTO, 1992).

Diante desse quadro, mesmo com registros que subamostram o que ocorre em nosso litoral em relação à presença de toxinas paralisantes ou diarréicas, está claro que tanto os organismos produtores quanto àqueles que acumulam estas toxinas já foram identificados (FREITAS & JACOBS, 1983; FREITAS *et al.*, 1992; FREITAS, 1995a; ODEBRECHT *et al.*, 1997; PERSICH *et al.*, 1998; PROENÇA *et al.*, 1998; PROENÇA *et al.*, 1999; PROENÇA *et al.*, 2000; UMMUS & FREITAS, 2000; PENHA, 2001) e que existe um problema bastante sério em relação a estas ficotoxinas no litoral brasileiro, que é recorrente e tem sido subavaliado.

Reforça-se ainda a necessidade de monitoramentos periódicos sobre a ocorrência de FAN e de casos de síndromes que podem vir associadas a elas, tais como *Paralytic Shellfish Poisoning*, *Diarrhetic Shellfish Poisoning*, *Neurotoxic Shellfish Poisoning*, *Amnesic Shellfish Poisoning* e Ciguatera. Há evidências de uma expansão global da ocorrência dessas síndromes tóxicas (HALLEGRAEFF, 1995; MASÓ & GARCÉS, 2006), devido a fatores, tais como o aumento do uso de águas costeiras para aquicultura, estimulação das florações de fitoplâncton causadas pela eutrofização, condições climatológicas, transporte de cistos de algas em águas de lastro de navios e também no desenvolvimento e melhoramento de técnicas e métodos de detecção e divulgação dos

resultados (BRICELJ & SHUMWAY, 1998; PROENÇA, 1999; MASÓ & GARCÉS, 2006).

Nenhuma área geográfica é imune a possíveis florações de algas e seus efeitos no ecossistema local e em incidentes com humanos (SHUMWAY, 1992). Desta maneira não há sentido em dizer que uma área que nunca teve registro de florações de algas, sejam tóxicas ou não, está livre desse tipo de acontecimento.

Crustáceos, moluscos e peixes que se alimentam do fitoplâncton podem acumular as toxinas produzidas por eles e transmiti-las aos homens através da cadeia alimentar (HALLEGRAEFF, 1993), sendo os moluscos bivalves e certos peixes filtradores, que se alimentam capturando organismos em suspensão na água, os principais vetores de transferência da maioria dos grupos de ficotoxinas que causam prejuízos para os humanos. Aqui, incluem-se as toxinas responsáveis por envenenamentos como o *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP) e o *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP), objetivos deste estudo.

A contaminação dos bivalves é facilitada por fatores como: a posição que ocupam na cadeia trófica por serem consumidores primários, mobilidade limitada e habilidade para concentrar o fitoplâncton por bombear grandes volumes de água por unidade de tempo (aproximadamente 60 litros em 1 hora) (BRICELJ & SHUMWAY, 1998) e por isso, estes animais são considerados bons indicadores para serem usados em programas de monitoramento (BATORÉU, 2005).

Apesar de casos de PSP em humanos por consumo de peixes serem raros, pois a literatura os descreve como sendo muito sensíveis à PST (WHITE, 1984), já houve registros de casos de intoxicações de pessoas que ingeriram peixes, inclusive um caso, nas Filipinas, onde quatro pessoas morreram após o consumo de sardinhas (MACLEAN, 1979; HALSTEAD & SCHANTZ, 1984; KAO, 1993).

1.3. *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP)

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) é, provavelmente, o mais conhecido dos envenenamentos causados por moluscos e possui um significativo interesse dentro da saúde pública e segurança alimentar. É uma síndrome com graves efeitos, com predominantes sintomas neurológicos e, em casos severos, paralisia respiratória e morte (KAO, 1993). Está associada, geralmente, a ingestão de moluscos bivalves que possuem um hábito alimentar filtrante, consumindo espécies de algas unicelulares, os dinoflagelados (SCHANTZ, 1984).

Desde o início do século 19 já há registros científicos sobre casos de PSP (COMBE, 1828 *apud* GESSNER *et al.*, 1997; PERMEWAN, 1888) que se constitui um sério problema toxinológico afetando a indústria de moluscos bivalves em muitas partes do mundo (WHITE, 1984).

As toxinas responsáveis por causar esse tipo de envenenamento são a saxitoxina e seus mais de 20 análogos (OSHIMA, 1995a), compondo a PST, ou Toxinas Paralisantes de Moluscos, produzidas por dinoflagelados tais como *Alexandrium catenella*, *A. minutum*, *A. tamarense*, *Gymnodinium catenatum*, e *Pyrodinium bahamense* (HALL *et al.*, 1990; HALLEGRAEFF, 1995), das quais espécies do gênero *Alexandrium* e *Gymnodinium* já foram encontradas no litoral do Brasil (FREITAS *et al.*, 1988; ODEBRECHT *et al.*, 1997; PERSICH *et al.*, 1998; PROENÇA, 2000; PROENÇA *et al.*, 2000; VILLAC *et al.*, 2006).

Concentrações tão pequenas de dinoflagelados tóxicos como 400 ou 500 células por mL, que não são visíveis a olho nu no mar, já são suficientes para fazer com que mexilhões se tornem tóxicos para o consumo humano (SCHANTZ, 1984).

No final dos anos 50, a saxitoxina, que foi a primeira toxina paralisante de molusco purificada, era considerada como um agente ativo isolado. Seu nome é derivado do “Butter clam”, do Alasca (molusco manteiga), *Saxidomus giganteus*, do qual a toxina purificada foi obtida e identificada (SCHANTZ *et al.*, 1957). Depois dos anos 70, com o desenvolvimento de técnicas químicas de separação desenvolvidas no Japão, pode-se

verificar que havia compostos relacionados à saxitoxina com potencialidades diferentes (KAO & WALKER, 1982; KAO, 1993).

1.3.1. Características físico-químicas das toxinas paralisantes de moluscos

A Saxitoxina é um sólido branco e higroscópico, muito solúvel em água, de caráter polar e facilmente extraído em água ácida. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{17}N_7O_4$ como base livre, com peso molecular de 299 (SCHANTZ *et al.*, 1957; SCHANTZ, 1984). O trabalho de Schantz e seus colegas sobre a purificação e caracterização da STX foi publicado no *Journal of the American Chemical Society*, em 1957 (SCHANTZ, 1984).

EVANS (1965) e KAO & NISHIYAMA (1965) descobriram que o envenenamento causava morte por bloquear de forma específica o influxo de íons sódio (Na^+) em membranas celulares de músculos e nervos, o mesmo que acontece com a tetrodotoxina (TTX), freqüentemente encontrada nos baiacus.

A estrutura básica da saxitoxina (figura 2) é um esqueleto de tetra-hidropurina com dois grupos guanidínicos¹. Cada grupamento guanidínico (figura 3) é carregado eletricamente com uma carga positiva. Estas cargas positivas possuem uma influência significativa no comportamento cromatográfico e toxicológico das toxinas paralisantes de moluscos (KAO & WALKER, 1982; HALL *et al.*, 1990).

PST é um grupo de compostos alcalóides que podem ser dividido em três classes de acordo com seu grau de sulfatação (tabela 2). A classe dos compostos não-sulfatados inclui as mais potentes toxinas, como a saxitoxina (STX) e a neo-saxitoxina. As que possuem somente um grupo sulfato, como as goniatoxinas (GTX1-GTX6) apresentam de moderada a alta toxicidade e o grupo que contém dois grupos sulfatos constituem a classe das menos tóxicas, as C1-C4 (OSHIMA, 1995b).

¹A molécula de guanidina é composta por um átomo de carbono cercado por três átomos de nitrogênio, sendo considerada uma das mais fortes bases já conhecidas ($pK_a=13,5$) (BERLINCK, 1995).

Essas toxinas, além de serem hidrossolúveis, também não apresentam cor, cheiro ou gosto e são ainda termoestáveis, não sendo degradadas com a fervura do pescado ou fruto do mar, daí o grande perigo para os consumidores (SCHANTZ, 1986).

PSP possui a maior taxa de mortalidade (13%) de todas as toxinas marinhas já estudadas (LAGOS, 1998). São amplamente distribuídas em áreas costeiras através do globo, incluindo tanto ambientes temperados quando tropicais (SHUMWAY *et al.*, 1995).

1.3.2. Produção de STX por bactérias

Há algum tempo, sabe-se que há uma ligação entre a toxicidade das cepas de dinoflagelados conhecidos como produtores de toxinas paralisantes, e a presença de bactérias (SILVA, 1982). Apesar deste tema ainda ser motivo de discussão, em trabalhos recentes já foi demonstrado que bactérias pertencentes ao gênero *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Vibrio* isoladas da água do mar e de dinoflagelados, peixes e mariscos podem produzir substâncias tóxicas similares à PST (FREITAS *et al.*, 1992; FREITAS, 1995b; CROCI *et al.*, 2006).

A presença de bactérias nas células dos dinoflagelados, em simbiose ou outro tipo de relação, e o fato de algumas espécies de dinoflagelados serem consideradas tóxicas ou não tóxicas dependendo do local onde são encontradas, corrobora a hipótese de que há um importante papel das bactérias na produção de toxinas pelos dinoflagelados (SILVA & SOUSA, 1988; KODAMA, 1990; DOUCETTE & TRICK, 1995; GONZÁLEZ *et al.*, 1995).

Figura 2. Estrutura molecular da saxitoxina (OSHIMA, 1995b).

Figura 3. Estrutura molecular plana da guanidina pertencente à estrutura química da saxitoxina.

Tabela 2. Toxicidade específica de cada toxina paralisante de molusco (PSP) e os ligantes de seus diferentes radicais (adaptado de OSHIMA, 1995b).

Toxina	R1	R2	R3	R4	Toxicidade específica (MU µ/mol)
STX	H	H	H	CONH ₂	2483
NeoSTX	OH	H	H	CONH ₂	2295
dcSTX	H	H	H	H	1220
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	2468
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	892
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	1584
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	1803
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	160
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	180
C1	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	15
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	239
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	33
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	143

1.3.3. Moluscos e concentração de STX

A saxitoxina permanece nos moluscos por períodos variáveis, dependendo da espécie de molusco e dos tecidos envolvidos. SHUMWAY (1990) apresenta extensivas tabelas com os tempos aproximados de retenção das toxinas para várias espécies de moluscos bivalves. Alguns se tornam altamente tóxicos em horas e outros em alguns dias após o princípio de uma floração de algas nocivas, porém podem excretar rapidamente estas toxinas dependendo da espécie de bivalve envolvida e da duração da floração. Por exemplo, o mencionado marisco manteiga do Alasca (*S. giganteus*), geralmente, nunca é seguro para o consumo, uma vez que ele pode reter PST por anos (SCHANTZ, 1973, 1984; SHUMWAY, 1990); bivalves da espécie *Placopecten magellanicus* são animais bentônicos que ingerem cistos de dinoflagelados e podem tornar-se extremamente tóxicos, mesmo em períodos onde não há florações evidentes (HSU *et al.*, 1979).

Em geral, o hepatopâncreas de algumas espécies de moluscos (um tecido escuro) tende a acumular uma maior quantidade de toxinas em comparação aos tecidos musculares, portanto, os tecidos brancos são, às vezes, considerados seguros para o consumo enquanto as vísceras, escuras, são perigosas (SCHANTZ, 1984; TAYLOR, 1988).

A maioria dos moluscos contém uma mistura de saxitoxinas e essas combinações variam conforme a região geográfica, de um organismo para outro e de acordo com o estágio do ciclo de vida do dinoflagelado (TAYLOR, 1988).

1.3.4. Mecanismo de ação da saxitoxina

A STX é um potente agente paralisante, que bloqueia o influxo Na^+ através de membranas excitáveis, efetivamente interrompendo a formação de potenciais de ação. Quando presente em alimentos de origem marinha em concentrações suficientes, ela causa um quadro de severa enfermidade, paralisia e morte em humanos e animais domésticos que ingerem estes alimentos.

Como a STX raramente é o único componente tóxico, e a toxicidade específica de cada toxina difere conforme sua estrutura, a toxicidade é geralmente comparada à STX pura, com toxicidade conhecida, e expressa em termos de equivalentes de STX (SHIMIZU, 1987). Isso é também usado, pois os derivados de saxitoxina podem converter-se a outros compostos de toxicidade variável pertencentes às PST em certas condições (ARNOTT, 1998).

A forma de se mensurar a letalidade da saxitoxina e seus derivados em camundongos, sobre condições padronizadas, é expressa em *Mouse Units* (MU), ou unidades camundongo. Uma MU (aproximadamente 0,18 µg de saxitoxina) é definida como a mínima quantidade de toxina que mata um camundongo de 20g em 15 minutos quando 1 mL do extrato de molusco é injetado intraperitonealmente no animal (SCHANTZ, 1984, 1986).

As cargas positivas dos grupos guanidínicos ligam-se às cargas negativas dos grupos carboxilas na abertura do poro do canal de sódio no lado extracelular da membrana plasmática de células musculares e nervosas bloqueando o influxo de Na⁺ através do canal (figura 4).

Como a entrada de sódio Na⁺ através da membrana nervosa é essencial para a transmissão do impulso elétrico, o bloqueio interfere na transmissão do sinal e resulta em paralisias (EVANS, 1965; KAO *et al.*, 1967). Os músculos respiratórios de mamíferos, especialmente o diafragma, são particularmente vulneráveis à ação paralisante da toxina, que provoca a morte por parada respiratória. A paralisia da respiração é periférica, o centro respiratório continua mandando impulsos para os nervos frênicos e intercostais por algum tempo depois dos movimentos respiratórios terem cessado. Ainda que a parada respiratória seja a primeira causa de morte, a toxina também causa uma grave ação vasodepressora (KAO *et al.*, 1971; NAGASAWA *et al.*, 1971; LEHANE, 2000).

Após a ingestão do alimento contendo toxinas paralisantes, essas são prontamente absorvidas através da mucosa gastrointestinal. Uma vez que a toxina foi absorvida, a

severidade dos sintomas e a progressão da intoxicação dependem muito da quantidade de toxina ingerida e da sua taxa de eliminação do organismo humano (KAO, 1993).

Em um experimento com cão anestesiado, 2 horas depois de injeção intravenosa de 100 MU de veneno paralisante de molusco, 40 MU foram recuperados da urina excretada (PRINZMETAL *et al.*, 1932), mostrando que essa é a principal rota de excreção, inclusive em humanos (GESSNER *et al.*, 1997).

Figura 4. Modelo esquemático da ação bloqueadora da Saxitoxina em canais de sódio dependentes de voltagem.

1.3.5. Sintomatologia

Os primeiros sinais da intoxicação por veneno paralisante de molusco são a parestesia e a dormência dos lábios e ao redor da boca, possivelmente aparecendo após a mastigação. Estes efeitos são claramente devidos à absorção local das toxinas paralisantes através da mucosa bucal. Estas sensações, então, difundem-se para partes da face e da nuca. Sensação de agulhadas nas pontas dos dedos, tanto das mãos quanto dos pés, é freqüente, assim como moderada dor de cabeça e vertigem. Esses sintomas precedem à fraqueza muscular, pois os nervos sensoriais são afetados primeiramente por qualquer agente que bloqueia a condução axonal por serem mais delgados e possuírem pequenos nodos de Ranvier, em comparação aos nervos motores. Em alguns casos, náusea e vômitos ocorrem nos primeiros estágios da intoxicação. Em envenenamentos moderados ou severos, a parestesia progride para os braços e pernas além de apresentar uma descordenação motora. Fala incoerente também pode acontecer. A sensação de leveza e de estar flutuando é freqüente, sendo a base para estes sintomas ainda não totalmente esclarecida, mas ocorrendo provavelmente por alguma interferência nos sinais aferentes proprioceptivos, tal como a condução dos impulsos nos nervos sensoriais, especialmente naqueles ligados a mecanismos do sistema nervoso central. Manifestações cerebelares são comuns, tais como perda do controle motor e dismetria (falta de controle sobre a amplitude e intensidade dos movimentos voluntários). As dificuldades respiratórias começam a ocorrer com uma sensação de a garganta estar obstruída. Em casos severos, a paralisia muscular espalha-se e torna-se profunda. A morte geralmente ocorre pela progressiva diminuição da eficiência respiratória e gradual aumento da hipoxia, hipercapnia (excesso de dióxido de carbono no sangue) e todos os desarranjos pato-fisiológicos associados (KAO, 1993).

O coração não é diretamente afetado (MURTHA, 1960; KAO *et al.*, 1971). Os efeitos vasculares periféricos consistem de um efeito vasodilatador direto e no relaxamento do tônus vasomotor resultante do bloqueio dos nervos vasoconstritores (KAO *et al.*, 1971; NAGASAWA *et al.*, 1971).

A LD₅₀ de STX em diferentes testes com animais, tais como camundongos, ratos, coelhos e gatos, está entre 200-600 µg/kg de peso corpóreo (EVANS, 1972 *apud* LÜTHY,

1979). O valor da dose LD₅₀ de STX para camundongo em rota intravenosa, intraperitoneal e oral são 2,4 µg/kg, 10 µg/kg e 263 µg/kg, respectivamente (HALSTEAD & SCHANTZ, 1984). A partir destes dados pode-se esperar uma dose letal em humanos em torno de 60000 MU para um adulto, i.e., 10,8 mg, pois 1 MU equivale a 0,18 µg (LÜTHY, 1979). Todavia, os humanos parecem ser mais sensíveis à STX que animais de laboratório. MEYER (1953) descreveu um paciente que morreu em menos de 4 horas após a ingestão estimada de 42000 MU de veneno paralisante de molusco. SCHANTZ (1975) estimou, através de casos de envenenamentos, que a dose letal para uma pessoa está entre 3000 e 5000 MU (0,5 a 1 mg de STX). HALSTEAD e SCHANTZ (1984) reportaram que mortes ocorreram em grandes florações após o consumo de 5000 a mais de 30000 MU.

Em revisões sobre estes dados e de outros autores, SHUMWAY (1995) concluiu que doses tão pequenas quanto 120-180 µg STX podem causar morte em adultos, ainda que os níveis letais sejam provavelmente em torno de 10000 µg.

Quando em áreas afetadas os níveis de toxinas nos moluscos atingem 400 MU/100 g de tecido ou 80 µg saxitoxina/100 g de tecido, período de quarentena é estabelecido para que haja processo de detoxificação e para que se evite o consumo desses organismos (TAYLOR, 1988).

O tratamento por aquecimento dos moluscos destinados ao consumo, incluindo os que são dispensados aos produtos enlatados, destrói somente parcialmente as saxitoxinas. Congelamento e outras formas de processamento ou preservação são ineficazes na remoção e destruição das toxinas (HALSTEAD & SCHANTZ, 1984).

1.3.6. Tratamento

Não há antídoto específico para envenenamento com toxinas paralisantes de moluscos. O tratamento clínico da vítima de envenenamento é sintomático. Caso não haja vômito espontâneo, a êmese pode ser induzida ou então ministrada a lavagem gástrica com

bicarbonato de sódio, pois em pH alcalino, a degradação das moléculas de saxitoxinas é acelerada. Tratamentos com carvão ativado também são utilizados (KAO, 1993).

Em casos de moderada a intensa gravidade, o uso de ventilação mecânica deve ser feito, pois como dito anteriormente, estas toxinas paralisam os músculos e nervos respiratórios.

1.3.7. Canal de sódio dependente de voltagem e toxinas paralisantes

Nos axônios da maioria dos neurônios, em músculos esqueléticos e músculo cardíaco de mamíferos são encontrados canais de sódio, que são componentes essenciais para a geração e propagação dos potenciais de ação (STRICHARTZ, 1986).

A excitação e os sinais elétricos no sistema nervoso envolvem o movimento de íons através de canais iônicos os quais respondem especificamente a alguns estímulos como mudanças no potencial de membrana, neurotransmissores, outros estímulos químicos, deformação mecânica e etc. Estes polipeptídeos apresentam sítios de ligação específica para moléculas, como as toxinas marinhas tetrodotoxina (TTX) e saxitoxina, que modificam suas propriedades de condução de íons sódio (MOCZYDLOWSKI, 1986).

Os canais de sódio são estruturas glicopeptídicas com 200-300 quilodaltons (kD) que estão ancoradas à membrana por ligações hidrofóbicas, eletrostáticas e covalentes. As subunidades estruturais do canal de Na^+ podem variar conforme o tecido do qual foi isolado. Dessa forma, o canal de Na^+ isolado do cérebro de mamíferos é composto por um complexo de três subunidades: a subunidade α (260 kD), β_1 (36kD) e β_2 (33kD). Em músculo esquelético, a β_2 está ausente (CATTERALL, 1986). Esses dados demonstram que a grande subunidade α é o principal componente funcional do canal de sódio. A subunidade α dos canais de sódio não são somente as subunidades formadoras dos poros, mas também os locais onde estas toxinas se ligam inibindo o influxo de íons através do canal (AKOPIAN *et al.*, 1996).

Canais desse tipo são formados pela associação de quatro domínios de polipeptídeos, cada um contendo seis regiões transmembrânicas (S1-S6) (figura 5) e uma alça hidrofóbica que imerge na membrana plasmática demarcando o próprio poro (SS1-SS2). Os segmentos S4 de cada domínio funcionam como sensores de voltagem, possuindo resíduos carregados positivamente que são sugeridos como os desencadeadores da despolarização, promovendo uma mudança conformacional que abre o canal (CLARE, *et al.*, 2000; SOONG & VENKATESH, 2006).

O mecanismo de ação da STX no canal de sódio envolve grupos de íons guanidínicos presentes na toxina. Esse grupo bloqueia a abertura do canal, agindo somente no lado acessível da proteína, ou seja, do lado externo da membrana celular (HENDERSON *et al.*, 1974; KAO, 1986).

Os canais de sódio constituem uma família de canais, que em humanos e roedores, forma uma família com dez genes que já puderam ser clonados e classificados. Os nomes dos genes, que nomeiam estes canais de sódio, vão de Na_v1.1 até Na_v1.9, com o décimo sendo denominado Na_x por ter função desconhecida. Os canais Na_v1.5 (cardíaco) e Na_v1.8 e Na_v1.9 (específicos do sistema nervoso periférico) são resistentes à TTX, e conseqüentemente à STX.

Figura 5. Domínios estruturais e sítios de ligação do Canal de Sódio Dependente de Voltagem. No mesmo local indicado para TTX, também ocorre a ligação de STX. (Adaptado de CLARE *et al.*, 2000).

Os sítios de ligação destas toxinas consistem de resíduos de aminoácidos nas reentrâncias da alça (SS1-SS2), que são carregados negativamente e são responsáveis pela ligação entre os grupos guanidínicos das toxinas e a estrutura do canal, numa atração eletrostática. Quando há mudança nestes resíduos o canal se torna insensível à STX e à TTX em 10^3 vezes em comparação às concentrações normais que promoveriam o bloqueio (BAKER & RUBINSON, 1975; SPALDING, 1980; KAO & WALKER, 1982; SOONG & VENKATESH, 2006). Por exemplo, no canal de sódio cardíaco, $Na_v1.5$, de mamíferos o resíduo de cisteína na posição 374 é o responsável por conferir a característica de insensibilidade deste canal às toxinas paralisantes guanidínicas (SATIN *et al.*, 1992), tanto é que nas fibras cardíacas de Purkinje a afinidade por TTX é 500 vezes menor que em axônios e em músculo esquelético (HILLE, 1992).

Sabe-se que os íons guanidínicos são permeáveis no canal de sódio e é através deste grupo químico que as toxinas conseguem se ligar aos resíduos de aminoácidos do poro do canal promovendo sua ação bloqueadora. KAO e NISHIYAMA (1965) sugerem que esta parte da molécula da toxina entra no poro e forma o complexo bloqueador. STRICHARTZ (1986) levanta a possibilidade de haver uma mudança conformacional da estrutura do canal quando ocorre a ligação entre a toxina e os sítios receptores do canal.

O canal de sódio possui sítios de ligação onde várias toxinas com efeitos diferentes (ativadoras/inativadoras) podem se ligar (tabela 3). Atualmente são conhecidos seis diferentes sítios de ligação de substâncias que modulam o funcionamento do canal de sódio (CLARE *et al.*, 2000). O sítio 1, próximo à abertura extracelular do poro condutor de íons do canal de sódio, é o local onde as neurotoxinas guanidínicas (STX e TTX) ligam-se inibindo o transporte de íons (CATTERALL, 1984). Essas toxinas competem na proporção de 1:1 para cada sítio de ligação no canal de sódio (DOYLE *et al.*, 1982).

Tabela 3. Locais de ação de toxinas e drogas no canal de sódio (adaptado de CLARE *et al.*, 2000).

Sítio	Ligante	Efeitos Fisiológicos	Mecanismo de Ação	Local do sítio de ligação
1	- tetrodotoxina de peixes - saxitoxina de dinoflagelados - μ -conotoxina de moluscos	- bloqueio dos potenciais de ação de nervos e/ou músculos; bloqueio do influxo de sódio; inibição do transporte iônico.	- bloqueadora	- região SS1-SS2 de cada domínio
2	- veratridina de planta - batracotoxina de anuros - ervatamina de plantas - aconitina de plantas - graianotoxina de plantas	- despolarização da membrana; descargas repetitivas em nervos; redução da seletividade do canal.	- ativadora	- IS6 e IVS6
3	- toxinas α -escorpiônicas - toxinas de anêmonas do mar	- retardo na inativação; manutenção do canal no seu estado aberto.	- estabilizadora	- loop IVS3-4
4	- toxinas β -escorpiônicas - toxinas γ -escorpiônicas	- alteração dos níveis de ativação do canal para valores mais positivos.	- estabilizadora	- loop IIS3-4
5	- brevetoxinas de dinoflagelados - ciguatoxinas de dinoflagelados	- despolarização da membrana; descargas repetitivas em axônios.	- ativadora	- IS6 E IVS5
6	- toxina goniopora de corais e toxinas de <i>Conus striatus</i>	- inibição da inativação do canal.	- estabilizadora	- IVS6
	- anestésicos locais, antiarrítmicos e anticonvulsivos	- inibição da dependência de voltagem da condutância iônica e da frequência de disparos dos potenciais de ação.	- bloqueadora (inibidora)	

1.4. Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)

1.4.1. Aspectos gerais e físico-químicos

O termo *Diarrhetic Shellfish Poisoning* está associado a diferentes grupos de compostos tóxicos (YASUMOTO *et al.*, 1995). Esses grupos incluem compostos poliéteres, como o ácido ocadáico (AO), dinofisistoxina-1 (DTX-1) (MURATA *et al.*, 1982), DTX-2 (HU *et al.*, 1992), DTX-3 (YASUMOTO *et al.*, 1985) e DTX-4 (HU *et al.*, 1995a,b); as pectenotoxinas (YASUMOTO *et al.*, 1985) e as yessotoxinas (MURATA *et al.*, 1987). Essas toxinas constituem as DST que são produzidas por dinoflagelados do gênero *Dinophysis* e *Prorocentrum* (YASUMOTO *et al.*, 1985).

São toxinas lipofílicas e acumulam-se nos tecidos gordurosos dos moluscos, principalmente no hepatopâncreas (ou glândula digestiva) (YASUMOTO *et al.*, 1985).

O ácido ocadáico e as dinofisistoxinas têm sido demonstrados como potentes inibidores de fosfatases (BIALOJAN & TAKAI, 1988) e com suas propriedades ligadas à inflamação do trato intestinal e à diarreia (COHEN *et al.*, 1990). O mecanismo de ação dos outros compostos não estão ainda bem estabelecidos, mas já foram descritos como hepatotoxinas, porém não causadoras de diarreia (YASUMOTO *et al.*, 1989).

A estrutura química dessas toxinas surgiu através do isolamento de uma toxina poliéter denominada ácido ocadáico da esponja negra *Halichondria okadai* (TACHIBANA *et al.*, 1981) encontrada ao longo da costa pacífica do Japão, bem como da esponja *H. melanodocia* encontrada na Flórida, EUA (SCHMITZ *et al.*, 1981).

1.4.2. Etiologia

Espécies do gênero *Dinophysis* são consideradas como os vetores primários de toxinas diarreicas (YASUMOTO *et al.*, 1980). As espécies *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. novergica*, *D. rotundata* e *D. tripes* já tiveram sua toxicidade

confirmada. *Prorocentrum lima* também é conhecida como produtora de ácido ocadáico e compostos relacionados (LEE *et al.*, 1989 *apud* AUNE & YNDESTAD, 1993).

A toxicidade específica de espécies do gênero *Dinophysis* varia espacial e temporalmente, e o número de células por litro necessárias para a contaminação dos organismos também sofre grande variabilidade. LUCKAS (1992), afirma que 200 células por litro já seriam suficiente para tornar venenoso um marisco que filtrasse estas células para se alimentar.

Não há uma relação clara entre a produção destas toxinas por bactérias (KODAMA, 1988) assim como ocorre com as toxinas paralisantes, tais como STX e tetrodotoxina.

1.4.3. Mecanismo de ação das toxinas diarréicas

As toxinas diarréicas ligam-se numa classe particular de receptores, nesse caso proteínas fosfatases PP1 e PP2A (BIALOJAN & TAKAI, 1988), duas das mais abundantes proteínas fosfatases no citosol das células de mamíferos que desfosforilam resíduos de serina e treonina, sendo a PP2A mais sensível à toxina (COHEN *et al.*, 1990).

Quando se ligam a esses receptores há um rápido aumento da fosforilação na célula e esse fenômeno está também ligado ao fato que toxinas diarréicas são potentes promotores de tumores (FUJIKI *et al.*, 1988). Esses mesmos sítios receptores estão presentes no estômago, intestino delgado e cólon, e é sugerido que estas toxinas possam agir como promotores de tumor no estômago (SUGANUMA *et al.*, 1989).

Há pouca informação sobre a farmacocinética das toxinas diarréicas em mamíferos. Pela sua natureza química assume-se que elas são facilmente absorvidas através da membrana celular, pelo seu caráter apolar (exceto a DTX-4 que é hidrossolúvel).

O ácido ocadáico foi originalmente descrito como um agente que induz contração prolongada do músculo liso das artérias humanas (SHIBATA *et al.*, 1982). Posto que, do

mesmo modo estas contrações sejam ativadas por fosforilação da subunidade da miosina, propôs-se que o efeito do ácido ocadáico era devido à inibição da fosfatase das cadeias leves da miosina (TAKAI *et al.*, 1987). As proteínas fosfatases PP1 e PP2A pertencem a um grupo de enzimas que estão relacionadas a vários processos metabólicos na célula e, conseqüentemente, uma alteração em suas funções, como a hiperfosforilação, resulta em uma ampla variedade de efeitos secundários (COHEN, 1989), tais como funções celulares relacionadas à biossíntese de ácidos graxos, síntese de proteínas e secreção e síntese de catecolaminas (COHEN *et al.*, 1990; BLAGHEN *et al.*, 1997).

1.4.4. Sintomatologia

Os efeitos tóxicos do ácido ocadáico em camundongos têm sido descritos. Sintomas de letargia, fraqueza e diarreia começam a aparecer aproximadamente 30 minutos após a injeção intraperitoneal, e morte pode ocorrer em um espaço de tempo entre 1,5 - 48 horas dependendo da dose (YASUMOTO *et al.*, 1979).

Em humanos, a maioria dos sintomas é referente à: diarreia (92%), náusea (80%), vômito (79%) e dores abdominais (53%). Esses sintomas podem iniciar-se após 30 minutos da ingestão do molusco contaminado e persistir por aproximadamente 3 dias antes da recuperação (YASUMOTO, 1985).

Sugere-se que o sintoma primário de diarreia é causado pela hiperfosforilação das proteínas que controlam a excreção de sódio pelas células intestinais (COHEN *et al.*, 1990) ou por aumentar a fosforilação das estruturas que regulam a permeabilidade do soluto, resultando em uma perda passiva de fluídos (DHO *et al.*, 1990). O intestino delgado pode ser considerado o órgão alvo dessa toxina, causando diarreia e secreção de consideráveis quantidades de conteúdos do intestino delgado, ceco e intestino grosso (ITO *et al.*, 2002).

No Japão, a dose mínima considerada para induzir sintomas em humanos é de 48 µg de ácido ocadáico (YASUMOTO, 1985). Não há, porém, um limite aceito internacionalmente para liberação de organismos que apresentem toxinas do tipo diarréicas,

havendo divergência de valores entre diferentes países. Por exemplo, no Canadá o nível de tolerância é de 0,2 µg/g de moluscos; no Japão, em bivalves, o nível aceito é de 5 MU/100 g⁽²⁾, e na Suíça, em moluscos, se aceita entre 40-60 µg/100 g (SHUMWAY, 1995).

Não se sabe ao certo quais os efeitos crônicos da ingestão de organismos contaminados por toxinas diarreicas, contudo, a exposição contínua a elas, mesmo que a baixos níveis, pode causar sérias implicações à saúde. Casos de câncer de estômago e intestino, no Japão e França, podem estar ligados ao grande índice de consumo de moluscos (CORDIER *et al.*, 2000; BURGESS & SHAW, 2001).

Apesar de não haver registros de casos de mortes associadas ao envenenamento por ingestão de moluscos contaminados por toxinas diarreicas, As DSP possuem uma distribuição global e causam grandes prejuízos à indústria pesqueira e à saúde pública.

²1 MU corresponde a aproximadamente 3,2 µg DTX1 ou 4 µg de ácido ocadáico.

2. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivos:

A monitoração dos níveis de toxicidade no pescado comercializado nos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba, SP, a fim de diminuir os possíveis riscos da ingestão de toxinas paralisantes e diarréicas;

Determinar os níveis toxicológicos nos organismos estudados através de métodos internacionalmente reconhecidos;

Detectar a presença de compostos semelhantes às toxinas paralisantes de PSP nas amostras analisadas, através de estudos em cromatografia líquida de alta eficiência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Realizaram-se coletas quinzenais em peixarias e entrepostos de pesca nas cidades de Caraguatatuba e São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo. Também foram realizadas coletas em uma fazenda de maricultura na praia Cocanha, em Caraguatatuba, SP. Os organismos obtidos em peixarias e entrepostos de pesca foram pescados em cinco regiões do país: Litoral Norte de São Paulo, Cananéia (SP), Santos (SP), Angra dos Reis (RJ) e Itajaí (SC).

As espécies obtidas em peixarias e entrepostos foram: *Sardinella brasiliensis*, *Anchoiella lepidentostole* e *Brevoortia aurea*. Na maricultura foram coletados espécimes de mexilhões *Perna perna*.

As coletas tiveram início em Maio de 2005 e findaram em Julho de 2006, totalizando 60 amostras coletadas nos entrepostos de pesca e na maricultura.

Estas espécies foram escolhidas por serem comumente consumidas e também por possuírem hábitos alimentares filtradores, o que promove a bioacumulação de toxinas que possam estar presentes nos organismos dos quais se alimentam.

3.1. Animais para os bioensaios de toxicidade aguda

Camundongos suíços *Swiss webster* (Balb C) pesando entre 10 e 23g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Biociências foram utilizados para os testes de toxicidade aguda segundo as técnicas descritas a seguir.

3.2. Extração

3.2.1. Extração de toxinas paralisantes (PSP) (AOAC, 1990)

Para a preparação dos extratos testados quanto à toxicidade aguda em camundongos, foi utilizado o protocolo padrão reconhecido internacionalmente pela AOAC e recomendado pela UNESCO para monitoramento de PSP.

Os extratos de sardinha e savelha foram preparados a partir da pele + músculos. Já os extratos de manjubas foram preparados sem a separação das vísceras e músculos, somente com a remoção das cabeças pela secção da região opercular. Os extratos foram assim obtidos, pois é desta forma que esses pescados são geralmente consumidos.

Os mexilhões foram abertos através do corte dos músculos adutores e lavados com água doce para remoção de areia ou outros materiais eventualmente presentes. O animal foi removido da concha e colocado em uma peneira para drenagem dos líquidos provenientes de sua lavagem. Pesou-se 100 gramas de músculo que foi homogeneizado em 100 mL de HCl 0,1N, com pH ajustado entre 3,0 e 4,0. Após a homogeneização a mistura foi fervida por cinco minutos e resfriada até a temperatura ambiente. O pH foi verificado e ajustado, se necessário, a um valor entre 2,0 e 4,5, utilizando-se HCl 5N ou NaOH 0,1N. Após esta etapa, completou-se o volume para 200 mL com HCl 0,1N. O extrato, então, foi centrifugado em tubos Falcon de 50 mL por 5 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado para evitar que alguma partícula sólida entupisse a agulha hipodérmica durante a injeção intraperitonial.

3.2.2. Extração de toxinas paralisantes através de concentração (SATO *et al.*, 1990)

Para a extração de toxinas paralisantes dos músculos e vísceras dos peixes coletados neste trabalho, usou-se a técnica de SATO e col. (1990), que é originalmente usada para extração de tetrodotoxina (TTX) de baiacus. OLIVEIRA e col. (2006) utilizaram a mesma

técnica para determinação toxinológica em uma espécie de baiacu *Colomesus asellus*, portador de PSP.

Os tecidos processados segundo essa técnica foram os provenientes de sardinhas, manjubas e savelhas. As sardinhas e savelhas foram processadas como na técnica para PSP, ou seja, com extratos para músculos + pele, sendo as manjubas preparadas inteiras, após a remoção da cabeça. O material foi pesado e triturado em um liquidificador promovendo-se, dessa forma, a extração com uma solução etanólica ácida (etanol 70% contendo 1% de ácido acético glacial), na proporção de 1 mL de solvente para 1 g de tecido (m:v) com o pH ajustado entre 4,5 e 6,0. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo então o extrato centrifugado e depois seco em evaporador rotativo para remoção do etanol. Em seguida, o extrato foi submetido à partição com diclorometano, na proporção de 80%, a fim de se obter frações polares livres de lipídios, visto que se trata de uma toxina hidrossolúvel e polar. Em seguida, essas frações polares foram concentradas novamente em evaporador rotativo a uma temperatura de 50°C, pesadas, e então, diluídas em 10 mL de uma solução com 0,05 mL de ácido acético ou HCl (pH ~ 3).

3.2.3. Extração de toxinas diarreicas (DSP)

As técnicas de extração de DSP e a de bioensaio com camundongo, usadas neste trabalho, foram desenvolvidas por YASUMOTO e col. (1978) e foram escolhidas por minimizar as dificuldades técnicas na preparação dos extratos.

Os moluscos foram lavados com água doce e suas conchas foram abertas utilizando-se um bisturi para secção dos músculos adutores. As glândulas digestivas (GD) foram tiradas e colocadas sobre um papel filtro para que o excesso de umidade fosse removido.

Homogeneizou-se 20 g³ de GD, em triturador de tecidos Virtis, adicionando-se 50 mL de acetona. O material foi centrifugado a 3000 rpm durante 2-3 minutos e o sobrenadante filtrado em papel filtro e recoletado em um balão de vidro. A extração foi repetida mais duas vezes.

Após as extrações, o material foi evaporado em evaporador rotativo para separação da solução de acetona, com um banho de água a uma temperatura de aproximadamente 40 °C, mas nunca superior a 45 °C, resultando em uma substância com consistência pastosa. Quando havia resíduos aquosos, esses eram retirados com a ajuda de um pipeta Pasteur.

Após o processo de secagem, o resíduo foi pesado e diluído em 4 mL uma solução aquosa de Tween 60 a 1%, de tal forma que a concentração final seja de 5g GD/mL (m:v).

3.3. Bioensaios

3.3.1. Bioensaio de toxicidade aguda para *Paralytic Shellfish Toxins* (WILLIAMS, 1984)

Tanto os extratos preparados segundo a técnica descrita na AOAC (1990), quanto a descrita por SATO e col. (1990), foram testadas no bioensaio de toxicidade aguda em camundongos da maneira descrita a seguir.

Para cada amostra foram utilizados 3 camundongos Balb C, pesando entre 10-23 g. Injetou-se 1mL da solução preparada por via intraperitoneal. O comportamento do animal foi observado e o tempo letal determinado observando-se o último movimento respiratório. Em seguida, correlacionou-se o tempo de morte na tabela de Sommer (tabela 4) para determinação do número de Unidades Camundongo ou MU (do inglês, *mouse units*) por

³A obtenção de 20 g de glândulas digestivas nem sempre foi possível, devido ao montante de mexilhões que era disponibilizado pelo maricultor e pelo tamanho dos animais (média da concha de 8 cm). Em média, obteve-se 11,3 g de GD de todas as amostras analisadas, sendo que 16,85g foi a maior massa obtida. Desta forma, os extratos eram preparados proporcionalmente às quantidades de solução Tween 60 1%, a fim de se obter a concentração final de 5 g de GD/mL.

mL da solução injetada, em que uma unidade camundongo corresponde à quantidade de neurotoxinas guanidínicas que é capaz de provocar a morte por parada respiratória em um camundongo de 20g em 15 minutos.

Caso o peso do animal fosse diferente de 20,0 g, então um fator de correção era obtido na tabela de correção de Sommer (tabela 5), que multiplicado pelas MUs obtidas do tempo de morte obtido, conferia o valor de unidades camundongo referente ao teste daquele animal.

A determinação da MU/mL da solução é sempre dada pela média dos três animais utilizados.

O valor aceito internacionalmente para se considerar a amostra segura para o consumo é de 4 MU/g de PST (WONG & WU, 1987).

Tabela 4. Tabela de Sommer para correlação do tempo de morte do camundongo e a quantidade de MU/mL de Saxitoxina da injeção.

Letalidade									
Tempo min:s	MU	Tempo min:s	MU	Tempo min:s	MU	Tempo min:s	MU	Tempo min:s	MU
1:00	100,00	35	4,73	05	2,44	45	1,670	11:00	1,075
10	66,20	40	4,48	10	2,38	50	1,640	30	1,060
15	38,30	45	4,26	15	2,32	6:00	1,600	12:00	1,050
20	26,40	50	4,06	20	2,26	15	1,540	13:00	1,030
25	20,70	55	3,88	25	2,21	30	1,480	14:00	1,015
30	16,50	3:00	3,70	30	2,16	45	1,430	15:00	1,000
35	13,90	05	3,57	35	2,12	7:00	1,390	16:00	0,990
40	11,90	10	3,43	40	2,08	15	1,350	17:00	0,980
45	10,40	15	3,31	45	2,04	30	1,310	18:00	0,972
50	9,33	20	3,19	50	2,00	45	1,280	19:00	0,965
55	8,42	25	3,08	55	1,96	8:00	1,250	20:00	0,960
2:00	7,67	30	2,98	5:00	1,920	15	1,220	21:00	0,954
05	7,04	35	2,88	05	1,890	30	1,200	22:00	0,948
10	6,52	40	2,79	10	1,860	45	1,180	23:00	0,942
15	6,056	45	2,71	15	1,830	9:00	1,160	24:00	0,937
20	5,66	50	2,63	20	1,800	30	1,130	25:00	0,934
25	5,32	55	2,56	30	1,740	10:00	1,110	30:00	0,917
30	5,00	4:00	2,50	40	1,690	30	1,090	40:00	0,898
								60:00	0,875

Tabela 5. Fatores de correção para variação do peso dos camundongos.

Peso do camundongo (g)	Fator de Correção	Peso do camundongo	Fator de Correção
10,00	0,500	17,00	0,880
10,50	0,530	17,50	0,905
11,00	0,560	18,00	0,930
11,50	0,590	18,50	0,950
12,00	0,620	19,00	0,970
12,50	0,650	19,50	0,985
13,00	0,675	20,00	1,000
13,50	0,700	20,50	1,015
14,00	0,730	21,00	1,030
14,50	0,760	21,50	1,040
15,00	0,785	22,00	1,050
15,50	0,810	22,50	1,060
16,00	0,840	23,00	1,070
16,50	0,860		

3.3.1.1. Cálculo para obtenção do número de Unidades Camundongo (MU) por grama de tecido

Dada a importância de realizarem-se os cálculos para obtenção do número de Unidades Camundongo de cada amostra, colocou-se abaixo um exemplo do procedimento matemático seguido nos cálculos de MU/g de todas as amostras.

Exemplo: Amostra V com massa de 113,40 g de músculo + pele fresca obtido de 3 espécimes de *S. brasiliensis*.

Tomando-se 113,40 g de músculo + pele (peso úmido), foram obtidos, após o procedimento de extração por concentração, 3,810 g de material (peso seco). A diluição foi realizada adicionando-se 10 mL de uma solução de ácido acético 0,5% nestes 3,810 g de material seco. A partir disso, tem-se a concentração de 0,3810 g por mL, o que corresponde a 11,34g de músculo fresco.

Após a injeção intraperitoneal e determinação do tempo letal utilizando-se o fator de correção para o peso dos camundongos, chegou-se ao valor de MU/mL, obtido diretamente da Tabela de Sommer. O valor encontrado para o primeiro camundongo foi de 1,7201 MU/mL; para o segundo camundongo foi de 2,675 MU/mL; para o terceiro camundongo foi de 1,2903 MU/mL. Fazendo-se a média aritmética dos três camundongos chega-se ao valor de 1,8951 MU/mL, desse extrato. Então, sabendo-se que 1,8951 MU/mL corresponde a 11,34 g de músculo fresco, 1 g corresponderá a 0,167 MU, que é o valor de MU/g para esta amostra.

3.3.2. Bioensaio de toxicidade aguda para *Diarrhetic Shellfish Toxins*

Inoculou-se, por via intraperitoneal, 3 camundongos Balb C de aproximadamente 20 g com 1 mL da solução a ser testada. O tempo foi marcado após a injeção e os animais foram observados por um período mínimo de 24 horas.

O bioensaio é considerado positivo, quanto à presença de DSP, quando ocorre morte de pelo menos 2 dos 3 camundongos injetados em um período menor ou igual a 24 horas. A MU neste caso é a quantidade de toxina necessária para matar um camundongo de 20 g em 24 horas, onde uma MU corresponde a 4µg de AO e 3,2 µg de DTX1. No caso de tempos de sobrevida inferiores a 24 horas, a determinação da toxicidade em MU requer sucessivas diluições do extrato até encontrar aquela que produz morte dos camundongos em 24 horas (FERNÁNDEZ & CEMBELLA, 1995).

3.3.3. Bioensaio em banda ventricular de coração de anuro (FREITAS & MARSIGLIO, 1986)

Utilizou-se a espécie de rã touro (*Rana catesbeiana*) para esse experimento.

Após a destruição da medula (espinhalação) e do cérebro (decerebração) da rã, o animal foi colocado em decúbito dorsal e o sistema cardiovascular exposto por remoção da pele e secção do apêndice xifóide.

O coração foi removido por secção dos vasos e tecidos aderentes e colocado em uma placa de petri, com solução fisiológica de Ringer, para a separação dos ventrículos. Com a porção ventricular separada da porção atrial, retirou-se uma banda para ser usada no experimento.

O ápice da tira foi conectado a um transdutor isométrico (Narco Biosystems, F-60) que estava ligado a um polígrafo Tektronix[®] (Tektronix Inc.), onde se registravam as alterações de contração (inotropismo) ventricular. A parte basal foi fixada a um gancho de vidro entre dois eletrodos de prata cloretada lateralmente dispostos, e imersos em uma cuba contendo 10 mL de solução fisiológica de Ringer .

O estimulador promovia a contração do músculo ventricular através de estímulos gerados por um estimulador Grass[®] S8800 (Grass Instrument Co.) acoplado a uma unidade

isoladora de estímulo modelo SIU8T (Grass Instrument Co.) com pulsos elétricos de 15 volts com uma duração de 0,4 ms.

No banho farmacológico, com volume de 10 mL, foram colocados três diferentes volumes (100, 200 e 300 µl) da solução do extrato XLVII, preparado segundo a técnica descrita no item 3.2.2, para que se verificassem as alterações na amplitude de contração ventricular (inotropismo). As concentrações finais no banho do extrato testado foram de 0,17 mg/mL, 0,34 mg/mL e 0,51 mg/mL, respectivos aos volumes descritos acima.

Após a montagem do experimento, deixava-se o músculo ventricular ser estimulado por um período de cerca de uma hora para que as contrações musculares estabilizassem-se.

Foram feitos registros das alterações no inotropismo durante, aproximadamente, 20 minutos para cada concentração do extrato testado.

Os dados referentes a esse experimento, foram obtidos a partir da medição do registro da amplitude controle, antes do início do experimento de cada concentração, e das medidas de amplitude obtidas após a aplicação do extrato. Assim, era possível calcular os valores, em porcentagem, referentes à diminuição da força de contração.

3.4. Análises químicas

As amostras testadas em camundongos foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, ou HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), visando-se a detecção química da saxitoxina e seus possíveis derivados, usando-se o método de detecção por fluorescência desenvolvido por LAWRENCE & NIEDZWIADK (2001), com algumas modificações.

3.4.1. Pré-purificação

Inicialmente, os extratos de sardinha *S. brasiliensis*, savelha *B. aurea* e majuba *A. lepidentostole* foram parcialmente purificados, segundo metodologia empregada por CARVALHO e col. (2006 e 2007) mediante partição em coluna de sílica octadecil silanizada de 500 mg (Sep-Pak C₁₈, Waters, EUA), usando-se a seguinte série de eluentes: ácido acético 0,1M 100%; ácido acético/acetonitrila 80:20 (v:v); ácido acético/acetonitrila 50:50 (v:v) e ácido acético/acetonitrila 10:90 (v:v). A coluna era previamente condicionada com 6,25 mL de acetonitrila seguida por 6,25 mL de ácido acético 0,1M 100%, e para cada eluente foi passado o volume de 3,75 mL.

O volume das alíquotas usadas para esta pré-purificação era calculado a partir da concentração dos extratos em mg/mL (m:v), de modo que a massa de material passado através da coluna não ultrapassasse 5 mg.

A fração eluída com ácido acético 0,1M 100% foi liofilizada (liofilizador Genevac 50), pesada e diluída em 2 mL de ácido acético 0,1 M e, então, uma alíquota foi derivatizada para ser submetida à CLAE.

3.4.2. Derivatização

A detecção da saxitoxina e de seus análogos só é possível pela transformação de suas moléculas em compostos derivados fluorescentes. Para tanto, Saxitoxina padrão (FDA, EUA) e os extratos preparados foram derivatizados da seguinte maneira: um volume de 25 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10% foi adicionado a 250 µL de hidróxido de sódio 1M, em um tubo plástico de 1,5 mL. Um volume de 100 µL⁽⁴⁾ de solução padrão ou do extrato a ser testado, após o processo de pré-purificação, foi posteriormente adicionado, misturado e deixou-se reagir por 2 minutos, em temperatura ambiente. Após este tempo, 20 µL de ácido acético glacial foi adicionado à solução, e uma alíquota de 20 µL desta solução

⁴Este volume era modificado sempre que houvesse necessidade de se fazerem alterações na concentração dos extratos injetados no aparelho de CLAE, de modo que tivesse uma melhor resolução dos picos.

foi analisada por CLAE.

Nesse trabalho, usou-se o método de oxidação com peróxido de hidrogênio em meio alcalino, como pré-derivatização, que transforma a molécula da saxitoxina em seu derivado fluorescente, o ácido 8-amino-6-hidroximetil-2-iminopurina-3-(2H)-propionico (figura 6).

Figura 6. Estrutura molecular plana do ácido 8-amino-6-hidroximetil-2-iminopurina-3-(2H)-propionico, resultante da derivatização da molécula de saxitoxina com peróxido de hidrogênio (LAWRENCE *et al.*, 1995).

3.4.3. Pré-cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

O sistema de Cromatografia Líquida usado consistia de bomba Dionex (modelo P 680) com controlador automático de gradiente e uma válvula analítica de injeção manual (nº 5030.0605) com um *loop* de 20 µL. A coluna usada foi uma Zorbax ODS analítica (250 x 4,6 mm com partículas de 5 microns). Para monitoramento do efluente, usou-se um detector de fluorescência Dionex modelo RF200, com excitação de 340 nm e emissão de 390 nm. O programa Chromeleon® Chromatography Management System versão 6.60 (Dionex, 2004) foi usado para geração e análise dos cromatogramas.

Os produtos resultantes da oxidação foram eluídos usando-se um gradiente linear de duas fases móveis, A: formiato de amônio 0,1M e B: formiato de amônio 0,1M em

acetonitrila:água 5:95 (v:v), ambos com pH ajustado em 6 por adição de 6 mL de ácido acético 0,1M. Usou-se o gradiente da seguinte maneira: 0 a 20% de fase móvel B nos primeiros 15 min; 20 a 80% de B em 23 min; 80 a 20% de B em 27 min; 20 a 0% de B em 27,5 min. O fluxo usado foi de 1 ml/min com tempo de corrida de 40 minutos.

3.5. Fluxograma do processamento das amostras

3.5.1. Fluxograma do processamento das amostras para PSP (AOAC, 1990)

Figura 7. Fluxograma resumindo as etapas preparativas dos extratos para toxinas paralisantes, segundo método da AOAC (1990).

3.5.2. Fluxograma do processamento das amostras para PSP (SATO *et al*, 1990)

Figura 8. Fluxograma que resume as etapas desde a preparação dos extratos concentrados, descrita no item 3.3.3., até a análise em Cromatografia Líquida da F1 (fração 1), referente à primeira eluição, descrita no item 3.5.1, feita com 100% de ácido acético 0,1 M.

3.5.3. Fluxograma do processamento das amostras para DSP

Figura 9. Fluxograma resumindo as etapas preparativas dos extratos para toxinas diarréicas.

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaios

4.1.1. Bioensaios de toxicidade aguda para toxinas paralisantes

A toxicidade aguda provocada em camundongos foi verificada utilizando-se os extratos polares do músculo de exemplares de *S. brasiliensis* e *B. aurea*. No caso dos extratos polares de *A. lepidentostole*, esses foram preparados a partir do músculo + vísceras. Estes bioensaios também foram realizados com amostras de tecidos de *P. perna*.

4.1.2. Bioensaio de Toxicidade Aguda para *Paralytic Shellfish Toxins*

Das 14 amostras preparadas de *S. brasiliensis* e de *P. perna*, segundo a técnica descrita pela AOAC (1990) para monitoramento de produtos de origem marinha quanto à presença de toxinas paralisantes, não se obtiveram nenhum resultado positivo.

Durante esses experimentos, alguns dos sintomas presentes nos animais testados, como hipotonia e prostração puderam ser avaliados como níveis residuais de toxinas nos extratos, contudo não houve morte de nenhum dos animais neste bioensaio.

Todos os animais, após a injeção, tornaram-se menos agitados na gaiola, entretanto recuperaram-se totalmente dos sintomas descritos acima em torno de 30 minutos após a injeção.

4.1.3. Bioensaio de Toxicidade Aguda para *Paralytic Shellfish Toxins* – Método de SATO e col. (1990)

Das trinta e quatro amostras de peixes, que foram coletadas em postos de vendas, peixarias e entrepostos de pesca, vinte e sete foram preparadas seguindo-se a técnica de concentração das toxinas. Destas amostras, vinte e uma (77,8%) apresentaram resultados

positivos, ou seja, houve morte de pelo menos um dos três camundongos, sendo que em dezoito amostras houve morte dos três camundongos usados para o bioensaio.

Estas mortes foram causadas por parada respiratória com sinais de envenenamento por toxinas do tipo paralisantes, apresentando os sintomas típicos deste tipo de intoxicação, que são os de pouco movimento dentro da gaiola após a injeção, falta de coordenação ao andar, estiramento das patas traseiras, o ato de prostrar-se indicando hipotonia muscular, espasmos respiratórios e terminando, finalmente, em convulsão por parada respiratória, seguida de morte. Pôde-se constatar a morte por parada respiratória, seguida de parada cardíaca, pois em alguns dos animais realizaram-se necropsias, com a abertura da caixa torácica, verificando-se que ainda havia batimentos cardíacos, sintoma típico do envenenamento paralisante.

A partir da positividade neste bioensaio, com o tempo de morte dos animais, pôde-se calcular o número de MU em cada extrato. Dos dezoito extratos em que houve morte dos três camundongos, obteve-se uma média geral de 0,147 MU/g de tecido. As quantidades de MU de cada um dos 18 extratos estão na tabela 6.

4.1.4. Bioensaio de Toxicidade Aguda para *Diarrhetic Shellfish Toxins*

Prepararam-se extratos de doze amostras de glândulas digestivas (GD) que foram testadas em camundongos. Os animais testados com estes extratos de GD de mexilhões foram observados por um período de 24 horas após a injeção intraperitoneal.

Nos bioensaios com camundongos destes extratos, somente em 3 verificaram-se sintomas que permitiram inferir a presença de toxinas diarréicas de moluscos.

Nos bioensaios realizados a partir destes extratos, em torno de 3 minutos após a injeção, alguns animais já apresentavam um quadro diarréico, com a presença de fezes pastosas, liquefeitas e com grande presença de muco.

Todos se apresentaram com pouca movimentação nas gaiolas, ficando prostrados evidenciando-se dores abdominais devido ao aumento do peristaltismo causado por estas toxinas.

Entretanto, em nenhum dos experimentos realizados com extratos de GD houve morte dos animais, pois todos se recuperaram após as 18 horas iniciais de observação, mostrando-se ativos dentro das gaiolas e não mais sendo observadas eliminações de fezes pastosas ou liquefeitas, diferentemente do que pôde ser observado durante o tempo anterior a esta recuperação, em que todos os animais pouco se movimentaram e não se alimentaram ou o fizeram em raras ocasiões.

Tabela 6. Toxicidade das amostras, onde houve morte dos camundongos, expressa em MU/g de tecido.

Nº da Amostra	MU/g de tecido	Nº da Amostra	MU/g de tecido
Espécie		Espécie	
I	0,126	XXII	0,161
(<i>S. brasiliensis</i>)		(<i>B. aurea</i>)	
III	0,135	XXVII	0,077
(<i>S. brasiliensis</i>)		(<i>S. brasiliensis</i>)	
V	0,167	XXXI	0,193
(<i>S. brasiliensis</i>)		(<i>A. lepidentostole</i>)	
XII	0,168	XXXVII	0,118
(<i>B. aurea</i>)		(<i>S. brasiliensis</i>)	
XIII	0,099	XLIV	0,212
(<i>S. brasiliensis</i>)		(<i>B. aurea</i>)	
XIV	0,103	XLVI	0,258
(<i>S. brasiliensis</i>)		(<i>S. brasiliensis</i>)	
XV	0,093	XLVII	0,208
(<i>S. brasiliensis</i>)		(<i>S. brasiliensis</i>)	
XVIII	0,207	LII	0,178
(<i>S. brasiliensis</i>)		(<i>B. aurea</i>)	
XXI	0,097	LIII	0,141
(<i>B. aurea</i>)		(<i>S. brasiliensis</i>)	

4.2. Bioensaios em banda ventricular de coração de anuro

Para este experimento usou-se o extrato XLVII, de *S. brasiliensis*, que provocou morte nos animais empregados no bioensaio de toxicidade aguda.

Quando se testou o mesmo extrato na preparação com banda ventricular de coração de rã *R. catesbeiana*, ele induziu ações semelhantes às de toxinas guanidínicas do grupo da saxitoxina, ou seja, inotropismo negativo, com reduções crescentes conforme se aumentaram as concentrações aplicadas no banho farmacológico onde estava imersa a banda ventricular.

Na figura 10 vê-se os registros da força de contração muscular quando na presença de extrato de sardinha em concentrações de 0,17mg/mL, 0,34mg/mL e 0,51mg/mL, com reduções na força de contração de 11,2%, 25,9% e 41,6%, respectivamente.

Quando da lavagem, com solução fisiológica de Ringer, entre a aplicação de uma concentração e outra, houve recuperação da resposta muscular, fenômeno esperado para toxinas guanidínicas. Procurou-se sempre recuperar a força de contração muscular de acordo com o registro padrão, fazendo-se de 2 a 3 lavagens.

Figura 10. Registros representativos das ações do extrato XLVII, de músculo de sardinha *Sardinella brasiliensis*, na banda ventricular de coração de rã *Rana catesbeiana*. Os traços representam contrações musculares evocadas por estímulos no músculo. As setas indicam o momento da aplicação dos extratos nas concentrações que estão indicadas no canto superior esquerdo das figuras. Houve um registro de 20 minutos em cada aplicação. As figuras apresentam o começo e o término do registro de cada concentração do mesmo extrato; L = lavagem.

4.3. Relação interespecífica *versus* toxicidade

Com a finalidade de se verificar a existência de relação entre a toxicidade e a espécies estudadas, as 18 amostras positivas para os bioensaios realizados com extratos concentrados foram correlacionadas com as espécies a partir das quais eles eram preparados (veja tabela 8 adiante).

Nota-se que os extratos que apresentaram toxicidade nos bioensaios, são em sua maioria referentes às amostras da espécie *S. brasiliensis*, com 12 amostras positivas, seguida por *B. aurea*, com cinco amostras positivas e logo após *A. lepidentostole*, com uma amostra positiva. Apesar de a maioria ser referente à *S. brasiliensis*, com os dados obtidos nesse trabalho, não é possível estabelecer uma relação entre a toxicidade e as diferentes espécies.

A espécie *S. brasiliensis* aparece em maior número, pois durante as coletas era a mais encontrada, mesmo nas épocas de defeso desse organismo, pois as grandes peixarias mantêm estoques congelados para suprir o comércio desta espécie.

4.4. Sazonalidade e localização geográfica *versus* toxicidade

Para se verificar a relação entre a toxicidade encontrada nos bioensaios a partir dos extratos preparados com a técnica de SATO e col. (1990), e que provocaram a morte dos três camundongos testados, montou-se a tabela 7, a seguir.

Observando-se a tabela 7, pôde-se concluir que não há relação entre as diferentes épocas do ano quanto à presença de toxicidade dos extratos, já que praticamente em todos os meses, entre maio de 2005 e maio de 2006, em que se fizeram coletas nas peixarias e entrepostos, obtiveram-se extratos com toxicidade suficiente para levar à morte os camundongos empregados nos experimentos.

Tabela 7. Amostras que apresentaram resultados positivos nos bioensaios em camundongos relacionadas aos meses em que foram coletadas.

Mês	Amostras
05/05	I; III
06/05	V
07/05	XII; XIII; XIV; XV
08/05	XVIII; XXI; XXII
10/05	XXVII
11/05	XXXI; XXXII
01/06	XXXVII
03/06	XLIV; XLVI
04/06	XLVII
05/06	LII; LIII

Nos meses de setembro e dezembro de 2005 e fevereiro de 2006, não foi possível a coleta de *S. brasiliensis*, já que nos períodos de julho de 2005 à setembro de 2005 e novembro de 2005 à março de 2006, a pesca estava proibida devido ao defeso estabelecido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, o que torna difícil encontrar esse peixe congelado, já que a procura por ele continua. As outras espécies também não puderam ser coletadas, pois não foram encontradas nos locais visitados nos dias das coletas.

A figura 11 mostra as quantidades de amostras e os locais onde foram pescadas. Como o número amostral é baixo, não seria possível estabelecer a relação entre a localidade do pescado *versus* toxicidade deles. Entretanto, pode-se dizer que se verificou toxicidade positiva nas amostras oriundas das cinco regiões que supriram os locais visitados de venda de peixes.

Figura 11. Localidade de origem da pesca das 18 amostras positivas e quantidades coletadas destas regiões.

4.5. Análises químicas

Com o objetivo de se confirmar quimicamente a presença de moléculas semelhantes à saxitoxina e seus possíveis análogos nos extratos de tecidos das espécies estudadas, experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados.

Algumas modificações foram realizadas na configuração deste experimento, visto que o tipo de coluna empregada diferia do mencionado no artigo no qual se basearam estas análises. Por conta disto, diminuiu-se o fluxo dos eluentes, de 2mL/min para 1mL/min, com um conseqüente aumento no tempo das corridas. Tal mudança necessária provocou uma alteração no tempo de retenção dos compostos testados.

A detecção das moléculas pertencentes ao grupo da saxitoxina somente é possível através da sua transformação em derivados fluorescentes. A figura 12 apresenta o cromatograma da saxitoxina após o processo de derivatização, no qual foi transformada na substância ácido 8-amino-6-hidroximetil-2-iminopurina-3-(2H)-propionico, através da oxidação da STX usando-se peróxido de hidrogênio em meio alcalino. O tempo de retenção usado como referência para a saxitoxina foi de 21,7 minutos, referente ao segundo pico, com uma injeção de 20 µL de uma solução com concentração de $6,7 \times 10^{-4} \mu\text{gSTX} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Para os estudos cromatográficos, escolheram-se 10 amostras, de modo aleatório, dentre as 18 onde houve morte dos três camundongos testados. A tabela 8 sumariza os resultados encontrados a partir da análise dos cromatogramas, inferindo-se a presença de saxitoxina e de seus análogos, já que não se possuíam todos os 20 análogos para a realização dos cromatogramas que seriam usados como padrões.

Visando-se a melhor resolução possível para o registro dos picos, durante as primeiras análises, tentaram-se diversas diluições dos extratos para que se obtivessem picos sem corte, condição que acontece quando há uma saturação do registro (ultrapassagem do limite de amplitude), em mV, realizado pelo detector de fluorescência e que pode encobrir a presença de dois picos com tempos de retenção próximos. Todavia, não se encontrou uma relação entre a concentração do extrato e a área dos picos, de modo que se diluindo o

extrato em 50% ocorresse igual diminuição na área do pico, pois as concentrações das substâncias tóxicas nos extratos não eram conhecidas, já que as análises realizadas até o momento foram de caráter qualitativo. Em alguns casos, quando se realizaram diluições de 1:1 nos extratos, os picos não eram detectados. Desta maneira, optou-se por manter os registros cromatográficos, da forma como estão. Na tabela 8 colocaram-se também as concentrações dos extratos injetados no sistema de CLAE.

Os picos encontrados nos primeiros 5 minutos após as injeções das amostras na coluna referem-se a passagem dos solventes, fato que se comprovou quando se injetou somente os solventes na coluna.

Tabela 8. Resultados dos estudos cromatográficos (CLAE) para detecção de toxinas do grupo das saxitoxinas e concentração das injeções dos extratos.

Amostra	Espécie	Concentração do extrato injetado no CLAE	Localidade de origem	Presença de Saxitoxinas
V	<i>S. brasiliensis</i>	0,543 µg µL ⁻¹	Itajaí – SC	+
XIV	<i>S. brasiliensis</i>	0,608 µg µL ⁻¹	Litoral Norte de SP	+
XVIII	<i>S. brasiliensis</i>	1,126 µg µL ⁻¹	Itajaí – SC	+
XXVII	<i>S. brasiliensis</i>	1,041 µg µL ⁻¹	Litoral Norte de SP	+
XXXI	<i>A. lepidentostole</i>	0,177 µg µL ⁻¹	Cananéia – SP	+
XLIV	<i>B. aurea</i>	1,42 µg µL ⁻¹	Litoral Norte de SP	+
XLVI	<i>S. brasiliensis</i>	0,845 µg µL ⁻¹	Santos – SP	+
XLVII	<i>S. brasiliensis</i>	0,789 µg µL ⁻¹	Santos – SP	+
LII	<i>B. aurea</i>	0,409 µg µL ⁻¹	Santos – SP	+
LIII	<i>S. brasiliensis</i>	0,702 µg µL ⁻¹	Santos – SP	+

Em 4 das análises cromatográficas realizadas (figuras 13 e 14) obtiveram-se picos com tempos de retenção semelhantes ao do derivado da saxitoxina. Os outros picos obtidos nestes cromatogramas foram considerados como relativos a outros análogos desta toxina que podem estar presentes nos organismos. Estes cromatogramas referem-se, respectivamente, às amostras XLVI, LIII, e XVIII, XIV, todas preparadas a partir de *S. brasiliensis*. Destas amostras, a XLVI e a LIII são originárias da região de Santos; a XVIII é originária de Itajaí, SC; e a XIV é originária da região do Litoral Norte, SP.

Em cada cromatograma da figura 15 considerou-se um único pico que apresentou, nos 3 registros cromatográficos, tempos de retenção próximos, em torno de 18,5 minutos.

Nota-se que na figura 15c o pico registrado é mais expressivo quando comparado aos outros resultados, o que corresponde a uma maior concentração deste composto nos tecidos dos animais empregados para a preparação deste extrato.

A figura 16 contém 3 cromatogramas que possuem picos expressivos e com tempos de retenção próximos. O alargamento dos picos aconteceu, pois eles ultrapassaram o limite de amplitude, em mV, do registro, indicando a presença em grandes quantidades destes análogos de STX nas concentrações usadas para as injeções em CLAE. Há também semelhança nos perfis cromatográficos das figuras 16a, b e c, respectivamente pertencentes às amostras XXVII, XXXI e XLIV. São organismos de espécies diferentes, entretanto oriundos de regiões próximas (tabela 8).

Figura 12. Análise cromatográfica do ácido 8-amino-6-hidroximetil-2-iminopurina-3-(2H)-propionico formado a partir da STX padrão após oxidação alcalina com peróxido de hidrogênio 10% em NaOH 1 M (25°C durante 2 min) e acidificação com ácido acético glacial. O derivado da STX foi injetado em CLAE na concentração de $6,7 \times 10^{-4} \mu\text{gSTX} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Tempo de retenção de 21,7 min.

Figura 13. Análises cromatográficas do derivado formado a partir da STX padrão e de extratos de músculo + pele de *S. brasiliensis*. No cromatograma A tem-se o registro do derivado da STX, no B extrato de músculo + pele ($0,845 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra XLVI e em C extrato de músculo + pele ($0,702 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra LIII. As concentrações injetadas estão entre parênteses.

Figura 14. Análises cromatográficas do derivado formado a partir da STX padrão e de extratos de músculo + pele de *S. brasiliensis*. No cromatograma A tem-se o registro do derivado da STX, no B extrato de músculo + pele ($1,126 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra XVIII e em C extrato de músculo + pele ($0,608 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra XIV. As concentrações injetadas estão entre parênteses.

Figura 15. Análises cromatográficas dos extratos de *S. brasiliensis* (A e B) e *B. aurea* (C). No cromatograma A tem-se o registro do extrato de músculo + pele ($0,543 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra V, no B extrato de músculo + pele ($0,789 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra XLVII e em C extrato de músculo + pele ($0,409 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra LII. As concentrações injetadas estão entre parênteses.

Figura 16. Análises cromatográficas dos extratos de *S. brasiliensis* (A), *A. lepidentostole* (B) e *B. aurea* (C). No cromatograma A tem-se o registro do extrato de músculo + pele ($1,041 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra XXVII, no B extrato de músculo + pele + vísceras ($0,177 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra XXXI e em C extrato de músculo + pele ($1,42 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) da amostra XLIV. As concentrações injetadas estão entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

5.1. Bioensaio de Toxicidade Aguda para *Paralytic Shellfish Toxins*

Os resultados para toxicidade aguda em camundongos produzidos por este bioensaio foram recorrentes e repetiram-se em estudo anterior realizado por STRANGHETTI & FREITAS (2003). Naquela ocasião, e durante este trabalho, não se encontraram resultados positivos através do emprego da técnica recomendada mundialmente para monitoração deste grupo de toxinas (AOAC, 1990).

Os resultados relativos aos mexilhões (*Perna perna*) estão de acordo com outros trabalhos no litoral norte Paulista, como o de FREITAS & FREITAS (1999) no litoral de Ubatuba, que conclui que os níveis de toxicidade se mantêm abaixo do recomendado para consumo humano, que é de 4 MU/g de tecido, sendo as amostras adequadas para o consumo. Pode-se concluir, então, que os organismos são considerados seguros para o consumo humano. Entretanto, os camundongos empregados nos bioensaios apresentaram sinais como hipotonia e prostração demonstradas após as injeções e antes do tempo de recuperação (em torno de 30 minutos). Acredita-se que estes sintomas são causados devido à presença de toxinas paralisantes, em quantidades residuais, que não são suficientes para produzir morte nos animais.

Sabe-se que certos bivalves são capazes de modificar profundamente a composição das toxinas ingeridas via transformação metabólica (SULLIVAN *et al.*, 1983), que pode afetar a sua toxicidade, levando a resultados como os obtidos no presente estudo.

Os estudos da variedade da microflora dos locais de cultivo de marisco também devem ser avaliados, pois há importante influência na produção das PST por bactérias (FREITAS *et al.*, 1988; FREITAS *et al.*, 1992; GALLACHER & BIRBECK, 1995). Isso se faz importante já que o fato de espécies serem consideradas tanto tóxicas quanto não tóxicas tem a ver com uma possível relação na produção das toxinas pelas bactérias.

O tempo de retenção das toxinas nos moluscos também é um fator que pode levar a variabilidade do teor delas nos organismos. Estudos demonstraram que em determinadas

épocas do ano, moluscos são livre de toxinas PSP. SHUMWAY e col. (1995) trazem tabelas sobre os tempos de retenção das toxinas nos organismos, que podem variar de dias a anos, dependendo da espécie de molusco. Estes autores consideram também a concentração de dinoflagelados ingeridos pelos moluscos, o que pode tornar arriscado o consumo dos mesmos. São poucos os trabalhos, na literatura, sobre a eliminação das toxinas paralisantes em peixes e não há trabalhos para a espécie *P. perna*. Todavia, sabe-se que uma espécie próxima, a *Perna viridis* possui uma rápida eliminação destes compostos e que há uma alteração na composição das toxinas nos tecidos deste animal com o passar do tempo, produzindo compostos de baixa toxicidade (KWONG *et al.*, 2006), o que possivelmente ocorre também com o mexilhão *P. perna*, no Brasil.

É importante ressaltar que a prática da fervura dos mariscos, poderia evitar transmissão de doenças causadas por êntero-bactérias, mas não os problemas com as toxinas paralisantes, que são termoestáveis (FREITAS, 1993).

Apesar dos mexilhões estudados serem considerados seguros até então, não se pode afirmar que sua área de cultivo (praia da Cocanha, Caraguatatuba, SP) é livre de PSP em ocasiões futuras, uma vez que não há área geográfica imune as florações e, portanto imune à presença de PSP (SHUMWAY, 1992), e mais ainda quando se trata de organismos com hábitos filtradores que acumulam toxinas, como no caso de mexilhões, sendo que estas se concentram principalmente nas glândulas digestivas.

É importante ressaltar que a espécie de dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, sabidamente produtora de PSP, já foi identificada na praia da Cocanha (VILLAC *et al.*, 2006), o que reforça as hipóteses acima.

5.2. Bioensaio de Toxicidade Aguda para *Paralytic Shellfish Toxins* – Método de SATO e col. (1990)

A técnica de SATO e col. (1990) é usada para detecção de TTX em baiacus, mas o fato da TTX e da STX terem, praticamente, as mesmas propriedades químicas possibilitou o emprego desta técnica para a extração de PST, além de haver concentração das toxinas contidas na amostra, o que não ocorre na técnica da AOAC (1990). OLIVEIRA e col. (2006) já usaram esta técnica para determinação de PSP em uma espécie de baiacu de água doce.

Escolheu-se o uso desta outra metodologia já que não houve mortes nos bioensaios com camundongos injetados com extratos preparados segundo o método da AOAC (1990), porém os sinais, como prostração e hipotonia muscular, mostravam-se presentes nos animais testados o que levou à conclusão de que estas toxinas estariam presentes em níveis residuais.

Testaram-se somente extratos dos peixes coletados nas peixarias, pois as amostras de mexilhões eram poucas e havia ainda a necessidade de material para a remoção das glândulas digestivas para estudos com as toxinas diarréicas. Assim, não foram testados extratos preparados com amostras de mexilhões *P. perna* nestes bioensaios.

A toxicidade presente nos extratos do músculo e pele dos peixes *S. brasiliensis*, *B. aurea* e *A. lepidentostole* (nas amostras de *A. lepidentostole* empregaram-se músculo, pele e vísceras), deve ser considerada baixa, pois ficaram, na média de todos os extratos, em 0,147 MU/g de tecido, bem abaixo de 4 MU/g que é o limite considerado seguro para consumo de organismos contaminados por PSP em vários países (SHUMWAY *et al.*, 1995).

O fato do coração dos camundongos, empregados neste experimento, continuar batendo depois da constatação do cessamento da respiração é concernente com a ação da STX, uma vez que os canais de sódio presentes nestes órgãos (em mamíferos), são resistentes a ação da STX e TTX (RITCHIE, 1980; CLARE *et al.*, 2000).

PST são conhecidas por afetarem comunidades de peixes, pois são acumuladas através da cadeia alimentar. Casos de mortandades de cardumes relacionados às PST já foram registrados. WHITE (1984) e WHITE e col. (1989) afirmam nestes trabalhos que os peixes são sensíveis às toxinas paralisantes e que são incapazes de acumulá-las o bastante para causar prejuízos ao ser humano, sendo sua carne considerada isenta delas.

Apesar de estes autores afirmarem que os peixes não acumulariam PST em níveis tóxicos ao homem, tem sido demonstrado que este dado não condiz com a realidade, pois KWONG e col. (2006) demonstraram que peixes podem concentrar toxinas através da cadeia alimentar, por ingestão de presas tóxicas. Também na Argentina, em 1993, já houve registro de PST em peixes filtradores da espécie *Engraulis anchoita*, durante uma floração do dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (MONTROYA *et al.*, 1998), e na Indonésia houve um incidente envolvendo 191 vítimas e quatro mortes depois do consumo de peixes clupeídeos pertencentes ao gênero *Sardinella* e *Selaroides* (peixes filtradores) (ADNAN, 1984).

Em um estudo preliminar, não publicado, UMMUS & FREITAS (2000), encontraram neo-saxitoxina em manjubas de Ubatuba, através de técnicas de CLAE e de bioensaios neurofisiológicos.

Estes são dados importantes que corroboram os resultados desse trabalho, onde se encontraram 77,8% do extratos preparadas com peixes, de hábitos filtradores empregados nesses experimentos, provocando mortes nos camundongos testados.

A bioacumulação destas toxinas é feita através da ingestão de uma dieta que contenha organismos tóxicos (KAO, 1993; KWONG *et al.*, 2006). Sabe-se que os peixes aqui estudados não se alimentam de fitoplâncton e sim de zooplâncton. Portanto, possivelmente algumas espécies de zooplâncton servem como vetores intermediários na teia alimentar, transferindo PST dos dinoflagelados aos peixes (ADNAN, 1984; KAO, 1993).

Neste trabalho não foram realizadas análises de conteúdo estomacal das espécies de peixes estudadas, entretanto, são estudos necessários para que haja conhecimento da sua dieta alimentar de zooplâncton, que pode estar diretamente relacionada com eventuais casos de intoxicação através do consumo de sua carne, uma vez que as toxinas podem passar das vísceras para outros tecidos (KWONG *et al.*, 2006).

5.3. Bioensaio de Toxicidade Aguda para *Diarrhetic Shellfish Toxins*

Os sintomas apresentados pelos camundongos testados neste bioensaio são indicativos da presença de toxinas diarréicas nas glândulas digestivas das amostras de *P. perna* analisados.

De acordo com FERNÁNDEZ & CEMBELLA (1995), existem vários autores que consideram períodos de observação diferentes para a determinação de positividade nestes bioensaios. Segundo eles, não há um consenso para um período apropriado de observação; o critério aceitável pode variar de dois a três camundongos mortos em menos de cinco horas, a dois ou três camundongos mortos em menos de 24 horas. Este é um fato complicador para a determinação de positividade nestes bioensaios.

Nos resultados obtidos, não se registraram mortes dos camundongos empregados. Todavia, os sintomas observados durante as 18 primeiras horas foram considerados como evidências da ação de toxinas diarréicas, já que fezes pastosas, liquefeitas e com presença de muco foram percebidas já nos 3 minutos iniciais após a injeção intraperitoneal dos extratos.

Foi relatado pelo maricultor, que colaborou com as amostras de mexilhões para este trabalho, que em períodos de muitas chuvas algumas pessoas reclamam de terem diarréias após a ingestão dos mexilhões (Sr. Carlota, comunicação pessoal). Isto pode estar ligado à diminuição da salinidade da água do mar que leva, em alguns casos, ao aumento da produção de substâncias tóxicas pelos dinoflagelados como meio de defesa contra a predação em um ambiente desfavorável (BRICELJ & SHUMWAY, 1998). Este fato

adicionado à identificação de espécies do gênero *Dinophysis*, produtoras de DSP, na área de cultivo e em outros pontos da praia da Cocanha, reforçam os resultados encontrados nos ensaios com camundongos (PINTO & VILLAC, 2006; VILLAC *et al.*, 2006).

Um grave problema relacionado às DST é que pessoas que ingeriram toxinas diarréicas, através do consumo de frutos do mar contaminados, não procuram auxílio médico além de que esses profissionais falham no diagnóstico, uma vez que há uma grande quantidade de casos que envolvem gastro-enterites e que se confundem com os sintomas de DSP (VALE & SAMPAYO, 2002).

O consumo de mexilhões que contenham ácido ocadáico torna-se riscoso, posto que esta substância é conhecida como promotora de tumores e tem sido colocada como responsável por vários casos de cânceres no sistema digestório, em humanos, no Japão (FUJIKI *et al.*, 1988). Este dado constitui-se um grave problema atinente à ingestão crônica de alimentos que contenham esta toxina, mesmo em níveis residuais, como aparentaram possuir 3 dos extratos empregados nos bioensaios, já que não se sabe ao certo quais os efeitos crônicos da ingestão de organismos contaminados por toxinas diarréias. Contudo, a exposição contínua a elas, mesmo que em baixos níveis, pode causar sérias implicações à saúde (CORDIER *et al.*, 2000; BURGESS & SHAW, 2001).

Para se ter a confirmação de compostos semelhantes aos do AO ou DTX na amostras estudadas fazem-se necessárias a realização de análises em CLAE ou em espectrometria de massa.

5.4. Bioensaio em banda ventricular de coração de anuro

A indicação de presença de um composto semelhante a algum derivado da STX neste bioensaio com o extrato XLVII é confirmada pelo bioensaio de toxicidade aguda e pela análise cromatográfica realizada com a mesma amostra (figura 15b).

Os resultados deste experimento demonstraram um crescente efeito inotrópico negativo coerente com a presença de toxinas do tipo paralisantes que atuam no músculo cardíaco de anuros bloqueando canais de sódio dependentes de voltagem, muito sensíveis a estas toxinas nestes animais (DOYLE *et al.*, 1982).

O fato das lavagens com solução fisiológica de Ringer, entre as aplicações do extrato XLVII no banho farmacológico, promoverem a recuperação das contrações musculares a níveis próximos dos obtidos no início do experimento, deixam mais evidente a presença de toxinas paralisantes como a STX nessa amostra, já que ela tem efeito reversível no canal de sódio e pode ser removida com água por ser hidrófila (SCHANTZ, 1986).

5.5. Análises químicas

Os dados de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vêm comprovar a presença de compostos semelhantes às saxitoxinas nos extratos de tecidos dos peixes *S. brasiliensis*, *A. lepidontostole* e *B. aurea* comercializados nos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba.

Há duas maneiras de se analisar o material em CLAE: por derivatização pré-coluna, onde o material é derivatizado antes de passar pela coluna analítica e derivatização pós-coluna, onde o material será derivatizado após a passagem pela coluna do cromatógrafo (OSHIMA, 1995b; LAWRENCE & NIEDZWIADK, 2001).

Neste trabalho, preferiu-se utilizar o processo de derivatização pré-coluna devido aos instrumentos disponíveis para a realização das análises.

A pré-cromatografia através de processos oxidativos é um método desenvolvido para determinação de toxinas paralisantes e que vem sendo usado há mais de dez anos.

As análises através de cromatografia líquida (CL) realizaram-se de acordo com procedimentos de derivatização das saxitoxinas descritos por Lawrence e seus colaboradores em vários artigos desde a década de 1990, com demonstrações de alta eficiência no processo (LAWRENCE *et al.*, 1991; LAWRENCE & MÉNARD, 1991; LAWRENCE *et al.*, 1995; LAWRENCE *et al.*, 1996; LAWRENCE & NIEDZWIADK, 2001).

Usou-se a metodologia de derivatização das toxinas paralisantes através de oxidação com peróxido, pois segundo LAWRENCE & NIEDZWIADK (2001) é o processo que possibilita uma melhor detecção dos picos das toxinas paralisantes de moluscos não hidroxiladas (STX, dcSTX, GTX2,3, B1, C1,2), dentre as quais tínhamos material para obtenção de pico padrão de STX.

Realizaram-se análises qualitativas, já que existem mais de 20 análogos de saxitoxina (OSHIMA, 1995a) o que tornaria difícil a realização das análises quantitativas, pois não se dispunha de todos os padrões destas toxinas.

Quanto às possíveis concentrações das toxinas nos extratos, infere-se que os mesmos apresentaram concentrações baixas de compostos semelhantes às saxitoxinas. Fez-se essa inferência correlacionando-se as quantidades de MU/g obtidas nos bioensaios com camundongos e os resultados cromatográficos.

A análise dos cromatogramas resultantes da cromatografia líquida dos extratos XLVI, LIII, XVIII e XIV revela uma similaridade nos perfis dos picos e nos tempos de retenção dos mesmos. Estes cromatogramas apresentaram picos com tempo de retenção semelhantes ao da STX o que indica a possível presença desta substância nos tecidos dos peixes. Somente a análise de espectrometria de massa forneceria com certeza a presença da saxitoxina e de seus derivados, e ainda não foi realizada.

Todos os organismos referentes aos extratos acima pertencem a peixes da espécie *S. brasiliensis*, além de terem origem de pesca em áreas geográficas próximas. Isto pode ser

um indicativo da preferência ou disponibilidade de um tipo alimentar que reflete em um padrão de acumulação de análogos de saxitoxina na região de origem destes animais.

Os cromatogramas das amostras V, XLVII e LII registraram picos que não podem ser considerados semelhantes ao da STX, pois estão em torno de 3 minutos antes do tempo de retenção da STX, sendo possivelmente referentes aos seus análogos. São também amostras de pontos geográficos próximos (tabela 8), o que pode explicar a semelhança nos perfis cromatográficos.

Apesar da derivatização dos compostos ter sido feita com peróxido de hidrogênio, isto não significa que não haja compostos semelhantes às saxitoxinas hidroxiladas (neo-saxitoxina, GTX 1,4 e C 3,4). Estas outras toxinas têm picos com melhor resolução quando derivatizadas com o outro reagente, o periodato (LAWRENCE & NIEDZWIADK, 2001).

Para se ter a comprovação final da presença de STX e seus derivados nos diferentes extratos testados fazem-se necessária a realização de análises em espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear.

Sabe-se que as saxitoxinas são excretadas principalmente através da urina, com 50% de seus compostos eliminados sem modificações (GESSNER *et al.*, 1997), podendo o restante sofrer metabolização no organismo humano, o que modificaria a toxicidade dos derivados de saxitoxina ingeridos (LLEWELLYN *et al.*, 2002). Todavia, os efeitos da exposição crônica de animais e humanos a baixas doses de PST, como as concentrações inferidas neste trabalho, ainda não foram elucidados (BATORÉU *et al.*, 2005) e não há TDI (*Tolerance Daily Intake*), para a STX, definido pela Organização Mundial de Saúde (KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1999).

5.6. Considerações Finais

De acordo com ODEBRECHT e col. (1995) os casos relacionados às florações de algas nocivas no Brasil indicam um fenômeno recorrente e que pode levar à possíveis incidentes de envenenamentos de pessoas, tanto por toxinas paralisantes quanto pelas diarreicas, o que torna importante uma verificação constante das algas de ambientes como

mariculturas e, também, dos animais que podem acumular toxinas produzidas por elas através de programas de monitoração que, segundo CEMBELLA & TODD (1993), têm custos referentes a 4-5% dos valores perdidos em incidentes com grandes mortandades de peixes e mariscos contaminados por ficotoxinas em todo o mundo.

É importante ressaltar que diferenças na toxicidade de cepas de dinoflagelados podem ocorrer conforme a latitude, e isto é atribuído a existência de populações de dinoflagelados isoladas e que diferem na composição de suas toxinas. Além disso, quando toxinas são consideradas menos potentes não significa, necessariamente, que o organismo é menos tóxico, pois a toxicidade depende também da concentração em que as toxinas são encontradas (CEMBELLA & TODD, 1993).

Calcula-se que, em todo o mundo, as ficotoxinas são responsáveis por cerca de 60000 casos de intoxicação por ano, com uma taxa de mortalidade em humanos ao redor de 1,5% (VAN DOLAH, 2000). Não há conhecimento de quantos casos destes tipos de intoxicação acontecem no Brasil, e quais os impactos causados pelas florações nocivas no país sobre a saúde pública, o meio ambiente e sobre a economia, já que há falta de estudos e de divulgação de casos relacionados às PSP, DSP e outras síndromes por ingestão de frutos do mar (PROENÇA *et al.*, 1998).

Sabendo-se que a PSP tem a maior taxa de mortalidade dentre as toxinas marinhas (BATORÉU *et al.*, 2005) e do grave efeito tumorigênico das toxinas de DSP, faz-se necessário que se estabeleça um programa nacional de monitoramento do pescado para estas e outras toxinas que afetam a saúde humana e o ambiente. De acordo com BATORÉU e col. (2005) se houvesse investimentos em programas de monitoração, programas educacionais, aprimoramento do ensino médico e trocas de informações sobre as toxinas, os efeitos de PSP e DSP seriam evitados ou diminuídos.

Vale mencionar que os resultados com os bioensaios e as análises em CLAE, que detectaram possíveis isoformas de STX nos tecidos das espécies em peixes estudadas, servem como um alerta da importância de pesquisas em bioacumulação de PST nestes animais, no Brasil.

6. CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados, conclui-se que:

- 1- Os resultados obtidos com extratos de mexilhões *P. perna*, não apresentaram positividade para PSP, entretanto, a partir dos resultados dos bioensaios de extratos desses organismos, testados para DSP, infere-se que as toxinas diarréicas estão presentes em baixos níveis.
- 2 – Os peixes filtradores das espécies *Sardinella brasiliensis*, *Anchoviella lepidentostole* e *Brevoortia aurea* apresentam níveis residuais de toxinas paralisantes causadoras de PSP nos bioensaios com camundongos.
- 3 – O bioensaio em banda ventricular de anuro realizado com o extrato XLVII, de *S. brasiliensis*, confirma a presença residual de compostos paralisantes nos peixes desta amostra.
- 4 – Os picos obtidos na cromatografia líquida de alta eficiência com os extratos de peixes apresentaram tempos de retenção semelhantes ao do derivado da STX ou de suas isoformas.
- 5 – Os mexilhões *P. perna* puderam ser considerados seguros para o consumo.
- 6 – Os peixes filtradores *S. brasiliensis*, *A. lepidentostole* e *B. aurea* apresentaram o músculo e pele (e vísceras, no caso de *A. lepidentostole*) com níveis de toxicidade bem abaixo do estabelecido internacionalmente, sendo considerados seguros para o consumo.
- 7 – Apesar das espécies de pescado estudadas apresentarem níveis residuais de toxinas e poderem ser consumidas, os resultados aqui encontrados servem de alerta para a necessidade do estabelecimento, em nosso país, de um programa de monitoração do pescado com a participação dos setores públicos e das universidades.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADNAN, Q. 1984. Distribution of dinoflagellates at Jakarta Bay, Taman Jaya, Banten, and Benoa Bay, Bali: A report of an incident of fish poisoning at eastern Nusa Tenggara. In: *Toxic Red Tides and Shellfish Toxicity in Southeast Asia*. Proceedings of a consultative meeting held in Singapore, 11-14 de Setembro de 1984. Southeast Asian Fisheries Development Center and International Development Research Center (SEAFEDEC): Changi Point, Singapura.
- AOAC. 1990. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. In: HELLRICH, K. (ed.), *Official Methods of Analysis*. 15ª Edição, pp. 881-882, sec. 959.08. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, Virginia, USA.
- AKOPIAN, A.N., SIVILOTTI, L. & WOOD, J.N. 1996. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, v. 379, pp. 257-262.
- ARNOTT, G.H. 1998. Toxic marine microalgae: a worldwide problem with major implications for seafood safety. *Advancing Food Safety*, v. 1, pp. 24-34.
- AUNE, T. & YNDESTAD, M. 1993. Chapter 5. Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: FALCONER, I.R. (ed.) *Algal toxins in seafood and drinking water*, pp. 87-104. Academic Press: San Diego, CA.
- AZEVEDO, 1998 *apud* PROENÇA, 2000.
- BAKER, P.F. & RUBINSON, K.A. 1975. Chemical modification of crab nerves can make them insensitive to the local anesthetics tetrodotoxin and saxitoxin. *Nature*, v. 257, pp. 412-414.
- BATORÉU, M.C.C., DIAS, E., PEREIRA, P. & FRANCA, S. 2005. Risk of human exposure to paralytic toxins of algal origin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, pp. 401-406.

- BERLINCK, R.G. 1995. Some aspects of guanidine secondary metabolites. *Progress in the chemistry of organic natural products (Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe)*, v. 66, pp. 119-295.
- BIALOJAN, C. & TAKAI, A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxins, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. Journal*, v. 256, pp. 283-290.
- BLAGHEN, M., BOUHALLAOUI, A., TALEB, H., IDRISSE, H., TAGMOUTI, F., TALBI, M. & FELLAT-ZARROUCK, K. 1997. Okadaic acid and its interaction with sodium, potassium, magnesium and calcium ions: complex formation and transport across liquid membrane. *Toxicon*, v. 35(6), pp. 843-847.
- BRICELJ, V.M. & SHUMWAY, S.A. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science*, v. 6(4), pp. 315-383.
- BURGESS, V. & SHAW, G. 2001. Pectenotoxins – an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. *Environment International*, v. 27, pp. 275-283.
- CARVALHO, L.R., PIPOLE, F., SANT'ANNA, C.L., WERNER, V.R., LAUGHINGHOUSE IV, H.D., RANGEL, M., KONNO, K. & CAMARGO, A.C.M. 2006. Estudos Biológicos e químicos de floração de cianobactérias ocorrida na Lagoa do Violão, Torres, RS. *XI congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-Americano sobre algas nocivas*. 26 de março a 1º de abril de 2006. Itajaí, SC. p. 239.
- CARVALHO, L.R., PIPOLE, F., WERNER, V.R., LAUGHINGHOUSE IV, H.D., CAMARGO, A.C.M., RANGEL, M., KONNO, K. & SANT' ANNA, C.L. 2007. A toxic cyanobacterial mixed bloom in an urban coastal lake in Torres, Rio Grande do Sul, Brazil. (Submetido à revista *Toxicon*)

- CATTERALL, W.A. 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 55, pp. 953-985.
- CATTERALL, W.A. 1984. The molecular basis of neuronal excitability. *Science*, v. 223, pp. 653-661.
- CEMBELLA, A.D. & TODD, E. 1993. Seafood toxins of algal origin and their control in Canada. In: FALCONER, E.R. (ed.) *Algal toxins in seafood and Drinking Water*, pp. 129-144. Academic Press: San Diego, CA.
- CLARE, J.J., TATE, S.N., NOBBS, M. & ROMANOS, M.A. 2000. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drugs Discovery Today*, v. 5 (11), pp. 506-520.
- COHEN, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatase. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 58, pp. 453-508.
- COHEN, P., HOLMES, C.F.B. & TSUKITANI, Y. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.*, v. 15, pp. 98-102.
- COMBE, 1828 *apud* GESSNER *et al*, 1997.
- CORDIER, S., MONFORT, C., MIOSSEC, L., RICHARDSON, S., BELIN, C. 2000. Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by DSP toxins along the coast of France. *Environmental Research*, v. 84(2), pp. 145-150.
- CROCI, L., COZZI, L., SUFFREDINI, E., CICCAGLIONI, G., TOTI, L., MILANDRI, A., CEREDI, A., BENZI, M. & POLETTI, R. 2006. Characterization of microalgae and associated bacteria collected from shellfish harvesting areas. *Harmful Algae*, v. 5, pp. 266-274.
- DHO, S., STEWART, K., LU, D., GRINSTEIN, S., BUCHWALD, M., AUERBACH, W. & FOSKETT, J.K. 1990. Phosphatase inhibition increases tight junctional permeability in cultured intestinal epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, v. 111, p. 410A.

- DOUCETTE, G.J. & TRICK, C.G. 1995. Characterization of bacteria associated with different isolates of *Alexandrium tamarense*. In: LASSUS, P., ARZUL, G., DENN, E.E., GENTIEN, P. & BAUT, C.M. (eds.) *Harmful Marine Algal Blooms*. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. October – 1993, Nantes, França, pp. 33-38. Lavoiser, Intercept Ltda: Paris, França.
- DOYLE, D.D., WONG, M., TANAKA, J. & BARR, L. 1982. Saxitoxin binding sites in frog myocardial cytosol. *Science*. v. 215, pp. 1117-1119.
- EVANS, M.H. 1965. Cause of death in experimental paralytic shellfish poisoning (PSP). *British Journal of Experimental Pathology*, v. 46, pp. 245–53.
- FERNÁNDEZ, M.L. & CEMBELLA, A.D. 1995. Part B. Mammalian Bioassays. In: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M. & CEMBELLA, A.D.(eds.) *Manual on Harmful Marine Algae*, pp. 213-228. UNESCO: Paris, França.
- FREITAS, J.C. 1993. Toxinas de organismos marinhos: implicações ecológicas e na saúde pública. *III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, ACIESP*, pp. 256-280.
- FREITAS, J.C., 1995a. Toxinology studies in marine organisms found on the coast of São Paulo state, Brazil. *Anais do Simpósio Nipo-Brasileiro de Ciência e Tecnologia, ACIESP*, no.96, pp. 169-176.
- FREITAS, J.C. 1995b. Toxinas de algas fitoplanctônicas. In: OLIVEIRA, E.C., ALVEAL, K., FERRARIO, M. & SAR, E. (eds.) *Manual de Cultivo de Micro e Macroalgas Marinhas*, pp. 311-327. Universidad de Concepcion, Chile.
- FREITAS, J.C. & JACOBS, R.S. 1983. Biotoxins in Brachyuran decapod crustaceans. *Toxicon*, Suppl. 3, pp. 157-160.
- FREITAS, J.C. & MARSIGLIO, A.F. 1986. Pharmacological activity of extracts of some marine algae from the brazilian coast. *Bol. Fisiol. Anim. Univ. São Paulo*, v. 10, pp. 61-68.

- FREITAS, J.C., OGATA, T., SATO, S. & KODAMA, M. 1988. The occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in macroalgae from the Brazilian coast. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*: Suppl nº 1, pp. 29-30. Japanese Assoc. of Mycotoxicology: Tóquio, Japão.
- FREITAS, J.C., OGATA, M., KODAMA, M., MARTINEZ, S.C.G., LIMA, M.F. & MONTEIRO, C.K. 1992. Possible microbial source of guanidine neurotoxins found in the mussel *Perna perna* (MOLLUSCA, BIVALVIA, MYTILIDAE). In: GOPALAKRISHNAKONE, P. & TAN, P. (eds.) *Recent Advances in Toxinology Research*, vol.2, p.589-596. Publicado por National University of Singapore.
- FREITAS, C.C. & FREITAS, J.C. 1999. Efeitos toxinológicos de mexilhões (*Perna perna*) do cultivo do Instituto de Pesca de Ubatuba, SP. *XIV Simp. Biol. Marinha – Centro de Biologia Marinha*, USP, p. 38.
- FUJIKI, H., SUGANUMA, M., SUGURI, H., YOSHIZAWA, S., TAKAGI, K., UDA, N., WAKAMATSU, K., YAMADA, K. & MURATA, M. 1988. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Japon. J. Cancer Res.*, v. 79, pp. 1089-1093.
- GALLACHER, S. & BIRBECK, T.H. 1995. Isolation of marine bacteria producing sodium channel blocking toxins and the seasonal variation in their frequency in sea water. In: LASSUS, P., ARZUL, G., DENN, E.E., GENTIEN, P. & BAUT, C.M. (eds.) *Harmful Marine Algal Blooms*. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. October – 1993, Nantes, França, pp. 445-450. Lavoiser, Intercept Ltda: Paris, França.
- GARCIA, V.M.T., ODEBRECHT, C. & RÖRIG, L. 1995. Florações nocivas do plâncton na costa brasileira. UNESCO/COI Workshop Report, nº 101, pp. 9-14.
- GESSNER, B. D., BELL, P., DOUCETTE, G. J., MOCZYDLOWSKI, E., POLI, M. A., DOLAH, P. V. & HALL, S. 1997. Hypertension and Identification of Toxin in

Human Urine and Serum Following a Cluster of Mussel-associated Paralytic Shellfish Poisoning Outbreaks. *Toxicon*, v. 35 (5), pp. 711-722.

GONZÁLEZ, I., TOSTESON, C.G., HENSLEY, V. & TOSTESON, T.R. 1995. Associated bacteria and toxicity development in cultured *Ostreopsis lenticularis*. In: LASSUS, P., ARZUL, G., DENN, E.E., GENTIEN, P. & BAUT, C.M. (eds.) *Harmful Marine Algal Blooms*. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. October – 1993, Nantes, França. pp. 451-456. Lavoiser, Intercept Ltda: Paris, França.

HALL, S., STRICHARTZ, G., MOCZYDLOWSKI, E., RIVINDRAN, A., REICHARDT, P.B. 1990. Chapter 3. The saxitoxins. Sources, chemistry, and pharmacology. In: HALL, S. & STRICHARTZ, G. (eds) *Marine toxins: origin, structure and molecular pharmacology*. American Chemical Society Symposium Series, pp. 29-65. Washington, DC.

HALLEGRAEFF, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, v. 32(2), pp. 79-99.

HALLEGRAEFF, G.M. 1995. Harmful algal blooms: a global overview. p. 1-27, In: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M. & CEMBELLA, A.D.(eds.) *Manual on Harmful Marine Algae*, pp. 1-27. UNESCO: Paris, França.

HALSTEAD, B.W., SCHANTZ, E.J. 1984. Paralytic shellfish poisoning. *WHO Offset Publication* No. 79, pp. 1–60. World Health Organization: Geneva, Switzerland.

HENDERSON, R., RITCHIE, J.M. & STRICHARTZ, G.R. 1974. Evidence that TTX and STX act at a metal cation binding site in the sodium channels of nerve membranes. *Proc. Natl. Acad. Scie*, v. 71, pp. 3936-3940.

HILLE, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. 2nd edition. Sinauer Associates Inc. Publishers: Sunderland, Massachusetts, EUA. 605p.

- HSU, C.P., MARCHAND, A., SHIMIZU, Y., SIMS, G.G. 1979. Paralytic shellfish toxins in the sea scallop, *Placopectin magellanicus*, in the Bay of Fundy. *Journal of the Fish Research Board of Canada*, v. 36, pp. 32–36.
- HU, T., DOYLE, J., JACKSON, D., MARR, J., NIXON, E., PLEASANCE, S., QUILLIAM, M.A., WALTER, J.A. & WRIGHT, J.L.C. 1992. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, v. 1, pp. 39-41.
- HU, T., CURTIS, J.M., WALTER, J.A. & WRIGHT, J.L.C. 1995a. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, v. 5, pp. 597-599.
- HU, T., CURTIS, J.M., WALTER, J.A., McLACHLAN, J.L. & WRIGHT, J.L.C. 1995b. Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Letters*, v. 36(51), pp. 9273-9276.
- ITO, E., YASUMOTO, T., TAKAI, A., IMANISHI, S. & HARADA, K. 2002. Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon*, v. 40(2), pp. 159-165.
- KAO, C.Y. 1986. Structure-activity relations of TTX, STX and analogues. *Ann. NY. Acad. Sci.*, v. 479, pp. 52-67.
- KAO, C.Y. 1993. Chapter 4. Paralytic shellfish poisoning. In: FALCONER, I.R. (ed.) *Algal toxins in seafood and drinking water*, pp. 75–86. Academic Press: San Diego, CA.
- KAO, C.Y. & NISHIYAMA, A. 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. *J. Physiol.*, v. 180(1), pp. 50–66.

- KAO, C.Y., SUZUKI, C.Y., KLEINAHUS, T. & SIEGMAN, M.J. 1967. Vasomotor and respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Archives International Pharmacodynamics*, v. 165, pp. 438–450.
- KAO, C.Y., NAGASAWA, J., SPIEGELSTEIN, M.Y. & CHA, Y.N. 1971. Vasodilatory effects of tetrodotoxin in the cat. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, v. 178, pp. 110-112.
- KAO, C.Y. & WALKER, S.E. 1982. Active groups of saxitoxin and tetrodotoxin as deduced from actions of saxitoxin analogues on frog muscle and squid axon. *Journal Physiol.*, v. 323, pp. 619-637.
- KODAMA, M. 1988. Possible association of paralytic shellfish toxins-producing bacteria with bivalve toxicity. *Mycotoxins and phycotoxins*, pp. 391-398. Elsevier: Tokio, Japão.
- KODAMA, M. 1990. Possible links between bacteria and toxin production in algal blooms. In: GRANELI, E. *et al.* (eds.) *Toxic Marine Phytoplankton*, pp. 52-61. Elsevier: Amsterdam.
- KUIPER-GOODMAN, T., FALCONER, I. & FITZGERALD, J. 1999. Chapter 4. Human health aspects. In: CHORUS, I. & BARTRAM, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, pp. 113-153. E&FN Spon: Londres e Nova Iorque.
- KWONG, R.W.M., WANG, W., LAM, P.K.S. & YU, P.K.N. 2006. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquatic Toxicology*, v 80, pp. 82-91.
- LAGOS, N. 1998. Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.*, v. 31, pp. 375-386.

- LAWRENCE, MÉNARD & CHARBONNEAU, 1991. A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using prechromatographic oxidation and liquid chromatographic with florescence detection. *Journal AOAC*, v. 74(2), pp. 404-409.
- LAWRENCE, J.F. & MÉNARD, C. 1991. Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation. *Journal AOAC*, v.74(6), pp. 1006-1012.
- LAWRENCE, J.F., MÉNARD, C. & CLEROUX, C. 1995. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. *Journal of AOAC International*, v 78(2), pp. 514-520.
- LAWRENCE, J.F., WONG, B. & MÉNARD, C. 1996. Determination of decarbamoyl saxitoxin and its analogues in shellfish by prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, v. 79(5), pp. 1111-1115.
- LAWRENCE, J. F. & NIEDZWIADK, B. 2001. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with florescence detection. *Journal of AOAC International*, v. 84(4), pp. 1099-1108.
- LEE *et al.*, 1989 *apud* AUNE & YNDESTAD, 1993.
- LEHANE, L. 2000. Paralytic Shellfish Poisoning: A review. *National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry*. Australia, Canberra. 56p.
- LLEWELLYN, L.E., DODD, M.J., ROBERTSON, A., ERICSON, G., KONING, C., NEGRI, A.P. 2002. Post-mortem analysis of samples from human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. *Toxicon*, v. 40(10), pp. 1463-1469.

- LUCKAS, B. 1992. Phycotoxins in seafood – toxicological and chromatographic aspects. *Journal of Chromatography A*, v. 624(1-2), pp. 439-456.
- LÜTHY, J. 1979. Epidemic paralytic shellfish poisoning in western Europe, 1976. In: TAYLOR, D.L. & SELIGER, H.H. (eds). *Toxic dinoflagellate blooms*. Proceedings of the 2nd International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms, pp.13-22. Elsevier: Norte da Holanda e Nova Iorque.
- MACLEAN, J.L. 1979. Indo-Pacific red tides, In: TAYLOR, D.L. & SELIGER, H.H. (eds). *Toxic dinoflagellate blooms*. Proceedings of the 2nd International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms, pp. 173-178. Elsevier: Norte da Holanda e Nova Iorque.
- MASÓ, M. & GARCÉS, E. 2006. Harmful Microalgae Blooms (HAB): problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin*, v. 53(10-12), pp. 620-30.
- MEYER, K. 1953. Medical progress. Food poisoning (concluded). *New England Journal of Medicine*, v. 249(21), pp. 843-52.
- MOCZYDLOWSKI, E. 1986. Single channel enzymology. In: MILLER, C. (ed.) *Ion channel reconstitution*, pp. 75-113. Plenum Press: Nova Iorque e Londres.
- MONTOYA, N.G., REYERO, M.I., AKSELMAN, R., FRANCO, J.M. & CARRETO, J.J. 1998. Paralytic shellfish toxins in the anchovy *Engraulis anchoita* from the Argentinian coast. In: REGUERA, B., BLANCO, J. FERNÁNDEZ, M.L. & WYATT, T. (eds.) *Harmful microalgae*, pp. 72-73. IOC-UNESCO.
- MURATA, M., SHIMATANI, M., SUGITANI, H., OSHIMA, Y. & YASUMOTO, T. 1982. Isolation and structure elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Japon. Soc. Sci. Fish.*, v. 43, pp. 549-552.

- MURATA, M., KUMAGAI, M., LEE, J.S. & YASUMOTO, T. 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters*, v. 28, pp. 5869-5872.
- MURTHA, E.F. 1960. Pharmacological study of poisons from shellfish and puffer fish. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 90, pp. 820-836.
- NAGASAWA, J., SPIEGELSTEIN, M.Y. & KAO, C.Y. 1971. Cardiovascular actions of saxitoxin. *J. Pharmacology Exp. Therapeutics*, v. 178, pp. 103-109.
- ODEBRECHT, C., RÖRIG, L., GARCIA, V. T. & ABREU, P. C. 1995. Shellfish mortality and a red tide event in southern Brazil. In: LASSUS, P., ARZUL, G., DENN, E.E., GENTIEN, P. & BAUT, C.M. (eds.) *Harmful Marine Algal Blooms*. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. October – 1993, Nantes, França, pp. 213-218. Lavoiser, Intercept Ltda: Paris, França.
- ODEBRECHT, C., MÉNDEZ, S. & GARCIA, V.M.T. 1997. Oceanographic processes and harmful algae blooms in the Subtropical Southwestern Atlantic. *Proceedings of the VII International Conference on Harmful Algae*. 25-29 de junho, Vigo.
- OLIVEIRA, J.S., FERNANDES, S.C.R., SCHWARTZ, C.A., BLOCH Jr, C., MELO, J.A.T., PIRES Jr., O.R. & FREITAS, J.C. 2006. Toxicity and toxin identification in *Colomesus asellus*, an Amazonian (Brazil) freshwater puffer fish. *Toxicon*, v. 48(1), pp. 55-63.
- OSHIMA, Y. 1995a. Post-Column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons, In: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M. & CEMBELLA, A.D. (eds.) *Manual on Harmful Marine Algae*, pp. 81-94. UNESCO: Paris, França.
- OSHIMA, Y. 1995b. Post-column derivatization liquid chromatography method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC International*, v. 78, pp. 528-532.

- PENHA, J.M.S. 2001. Ocorrência de toxinas guanidínicas em *Tivella mactroides* (Born, 1780) (Mollusca, Bivalvia), Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Braz Cubas, SP. 31p.
- PERMEWAN, W. 1888. Fatal case of poisoning by mussels, with remarks on the action of the poison. *Lancet*, v. 2, pp. 568.
- PERSICH, G.R., GARCIA, V.M.T. & CALLIARI, L.J. 1998. Mapeamento de cistos do dinoflagelado *Alexandrium tamarense* na Praia do Cassino, RS. *Colóquio Brasileiro Sobre Algas Nocivas*. Itajaí, SC, 5 a 8 de outubro. pp. 67.
- PINTO, T.O. & VILLAC, M.C. 2006. O fitoplâncton em área de maricultura da praia da Cocanha, Caraguatatuba, SP: resultados preliminares. *XI congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-Americano sobre algas nocivas*. 26 de março a 1º de abril de 2006. Itajaí, SC. p. 230.
- PRINZMETAL, M., SOMMER, H. & LEAKE, C.D. 1932. The pharmacological action of mussel poison. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, v. 46, pp. 63–73.
- PROENÇA, L.A. 2000. ANEXO IV Informes Nacionales Sobre Evaluación Socio-Económica del Impacto de las Floraciones Nocivas. *UNESCO/COI Workshop Report*, nº 185, pp. 61-68.
- PROENÇA, L.A., SCHMITT, F., COSTA, T. & RÖRIG, L. 1998. Just a diarrhea? Evidences of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina – Brazil. *Ciência e Cultura*, v. 50, pp. 458-462.
- PROENÇA, L.A., LAGOS, N., RÖRIG, L., SILVA, M. & GUIMARÃES, S. 1999. Occurrence of paralytic shellfish poisoning – PSP in Southern Brazilian Waters. *Ciência e Cultura*, v. 51, pp. 16-21.

- PROENÇA, L.A., TAMANAH, M. S. & SOUZA, N.P. 2000. Paralytic toxins from *Gymnodinium catenatum* Graham isolated from southern brazilian waters, *X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, p. 93.
- RITCHIE, J.M. 1980. Tetrodotoxin and saxitoxin, and the sodium channels of excitable tissue. *TIPS*, v. June, pp. 275-279.
- SATIN, J., KYLE, J.W., CHEN, M., BELL, P., CRIBBS, L.L., FOZZARD, H.A. & ROGART, R.B. 1992. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channel with TTX-sensitive properties. *Science*. v. 256, pp. 1202-1205.
- SATÔ, S., PARANAGUÁ, M.N. & ESKINAZI, E. 1963/64. On the mechanism of red tide of *Trichodesmium* in Recife, Northeastern Brazil, with some considerations of the relation to the human disease, "Tamandaré Fever". *Trabalhos Instituto Oceanográfico, Recife*, v. (5/6), pp. 7-49.
- SATO, S., KOMARU, K. & OGATA, T. 1990. Occurrence of tetrodotoxin in cultured puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 56(7), pp. 1229-1131.
- SCHANTZ, E.J. 1973. Seafood toxicants. In: *Toxicants occurring naturally in foods*, 2nd ed. Committee on Food Protection, pp. 424-447. National Academy of Sciences: Washington, DC.
- SCHANTZ, E.J. 1975. Poisonous red tide organisms. *Environmental Letters*, v. 9(3), pp. 225-237.
- SCHANTZ, E.J. 1984. Historical Perspective on Paralytic Shellfish Poison. In: RAGELIS, E.P. (ed.). *Seafood toxins*, pp. 99-111. ACS Series 262, American Chemical Society: Washington, DC.
- SCHANTZ, E.J. 1986. Chemistry and biology of saxitoxins and related toxins. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 479, pp. 15-23.

- SCHANTZ, E.J., MOLD, J.D., STANGER, D.W., SHAVER, J., RIEL, F.J., BOWDEN, J.P., LYNCH, J.M., WYLER, R.W., RIEGEL, B. & SOMMER, H. 1957. Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissues. *J. American Chemical Society*, v. 79, p. 5230.
- SCHMITZ, F.J., PRASAD, R.S., GOPICHAND, Y., HOSSAIN, M.B., VAN DER HELM, D. & SCHMIDT, P. 1981. Acanthifolicin, a new episulfide-containing polyether carboxylic acid from extracts of the marine sponge *Pandorus acanthifolium*. *J. American Chemical Society*, v. 103, pp. 2467-2469.
- SHIBATA, S., ISHIDA, Y., KITANO, H., OHIZUMI, Y., HABON, J., TSUKITANI, Y. & KIKUCHI, H. 1982. Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of calcium deficiency. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics.*, v. 223, pp. 135-143.
- SHIMIZU, Y. 1987. Chapter 8. Dinoflagellate toxins. In: TAYLOR, J.F.R. (ed.). *Biology of dinoflagellates*, pp. 282-315. Blackwell Scientific: Oxford.
- SHUMWAY, S.E. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 21(2), pp. 65–104.
- SHUMWAY, S.E. 1992. Mussels and public health. In: GOSLING, E. (ed.) *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology and Culture*, pp. 511-542. Elsevier: Amsterdam.
- SHUMWAY, S.E. 1995. Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Reviews in Fisheries Science*, v. 3(1), pp. 1–31.
- SHUMWAY, S.E, van EGMOND, H.P., HURST, J.W. & BEAN, L.L. 1995. Management of Shellfish Resources, In: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M. & CEMBELLA, A.D.(eds.) *Manual on Harmful Marine Algae*, pp. 463-474. UNESCO: Paris, França.

- SILVA, E.S. 1982. Relationship between dinoflagellates and intracellular bacteria. *Marine Algae Pharmacology Science*, v. 2, pp. 269-288.
- SILVA, E.S. & SOUSA, I. 1988. Observations on the toxicity of some cultured dinoflagellates. In: AIBARA, K., KUMAGAI, S., OHTSUBO, K. & YOSHIZAWA, T. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, Suppl. nº 1, pp. 9-10. Japanese Assoc. of Mycotoxicology: Tóquio, Japão.
- SOMMER, H. & MEYER, K.F. 1937. Paralytic shellfish poisoning, *Archives of Pathology*, v. 24, pp. 560-598.
- SOONG, T.W. & VENKATESH, B. 2006. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals. *Trends in Genetics*, v. 22 (11), pp.621- 626.
- SPALDING, B.C. 1980. Properties of toxin-resistant sodium channels produced by chemical modification in frog skeletal muscle. *Journal Physiol.*, v 305, pp. 485-500.
- STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE 2004 (SOFIA 2004). 2004. *FAO Fisheries Department. Roma. 153 p. (on line), Disponível na World Wide Web: <<http://www.fao.org/DOCREP/007/y5600e/y5600e00.htm>> ISBN: 92-5-105177-1 (citado em 08/02/2007).*
- STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE 2006 (SOFIA 2006). 2007. *FAO Fisheries Department. Roma. 161 p. (on line), Disponível na World Wide Web: <<http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699e00.htm>> ISBN: 978-92-5-105568-7 (citado em 31/05/2007).*
- STRANGHETTI, B.G. & FREITAS, J.C. 2003. Monitoramento de toxinas do tipo paralisantes no pescado dos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba, SP. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade do Vale do Paraíba, SP. 37p.

- STRICHARTZ, G.R. 1986. The structure and physiology of toxin binding sites on voltage-gated sodium channels. In: HARRIS, J.B. (ed.) *Natural toxins: animal, plant and microbial*, pp. 265-284. Clarendon Press: Oxford.
- SUGANUMA, M., SUTTAJIT, M., SUGURI, H., OJIKA, M., YAMADA, K. & FUJIKI, H. 1989. Specific binding of okadaic acid, a new tumor promoter in mouse skin. *FEBS Letters*, v. 250, pp. 615-618.
- SULLIVAN, J.J., IWAOKA W.T. & LISTON, J. 1983. Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 114, pp. 465-472.
- TACHIBANA, K., SCHEUER, P.J., TSUKITANI, Y., KIKUCHI, H., van ENGEL, D., CLARDY, J., GOPICHAND, Y. & SCHMITZ, F.J. 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. American Chemical Soc.*, v. 103, pp. 2469-2471.
- TAKAI, A., BIALOJAN, C., TROSCKA, M. & RÜEGG, J.C. 1987. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Letters*, v. 2317(1), pp. 81-84.
- TAYLOR, S.L. 1988. Marine toxins of microbial origin. *Food Technology*, v. 42(3), pp. 94-98.
- UMMUS, R.E. & FREITAS, J.C. 2000. Identification of paralytic shellfish toxins (PSTs) in *Anchoviella lepidentostole*, XV *Simp. Biol. Marinha – Centro de Biologia Marinha*, USP, p. 70.
- VALE, P. & SAMPAYO, M.A. 2002. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon*, v. 40(7), pp. 989-996.

- VAN DOLAH, F.M. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.*, v. 108, pp. 113-141.
- VILLAC, M.C., CABRAL, V.A.P., PINTO, T.O. & SANTOS, D.B. 2006. Ocorrência de microalgas potencialmente nocivas no litoral do Estado de São Paulo. *XI congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-Americano sobre algas nocivas*. 26 de março a 1º de abril de 2006. Itajaí, SC. p. 68.
- ZENEBON, O. & PREGNOLATTO, N. P. 1992 Memória técnico-científicas da divisão de bromatologia e química. In: ANTUNES, J.L.F., NASCIMENTO, C.B., NASSI, L.C. & PREGNOLATTO, N.P., *100 Anos de Saúde Pública*, p. 173. Instituto Adolfo Lutz: São Paulo.
- WHITE, A.W. 1984. Paralytic shellfish toxins and finfish. In: RAGELIS, E. P. (ed.). *Seafood toxins*, pp. 171-180. ACS Series 262, American Chemical Society: Washington, DC.
- WHITE, A.W., FUKUHARA, O. & ANRAKU, M. 1989. Mortality of fish larvae from eating toxic dinoflagellates or zooplankton containing dinoflagellate toxins. In: OKAICHI, T., ANDERSON, D.M. & NEMOTO, T. (eds.) *Red Tides: Biology, environmental science and toxicology*, pp. 395-398. Elsevier: Nova Iorque.
- WILLIAMS, S. 1984. Paralytic shellfish poison. In: *Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.*, 14th ed., pp. 344-345. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, EUA.
- WONG, P.S. & WU, R.S.S. 1987. Red tides in Hong Kong: Problems and management strategy with special reference to the maricultura industry. *J. Shoreline Management*, v. 3, pp. 1-21.
- YASUMOTO, T., OSHIMA, Y. & YAMAGUCHI, M. 1978. Occurence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku disctrict. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, v. 44, pp. 1249-1255.

- YASUMOTO, T., OSHIMA, Y. & YAMAGUCHI, M. 1979. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Japan and chemical properties of the toxin. In: TAYLOR, D. & SELIGER, H.H. (eds.) *Toxic dinoflagellate blooms*, pp. 495-502. Elsevier: Amsterdam.
- YASUMOTO, T., OSHIMA, Y., SUGAWARA, W., FUKUYO, Y., OGURI, H., IGARASHI, T. & FUJITA, N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*, v. 46, pp. 1405-1411.
- YASUMOTO, T., MURATA, M., OSHIMA, Y., SANO, M., MATSUMOTO, G.K. & CLARDY, J. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, v. 41, pp. 1019-1025.
- YASUMOTO, T., MURATA, M., LEE, J.S. & TORIGOE, K. 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: NATORI, S., HASHIMOTO, K. & UENO, Y. (eds.) *Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 375-382. Elsevier: Amsterdam.
- YASUMOTO, T., FUKUI, M., SASAKI, K. & SUGIYAMA, K. 1995. Determinations of marine toxins in foods. *Journal AOAC*, v. 78(2), pp. 574-582.