

O PAPEL DAS FICOTOXINAS DIARREICAS NA BIOTA AQUÁTICA E NA AQUICULTURA

Vanessa de Magalhães Ferreira^{1*} & Marcos Bastos Pereira¹

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Faculdade de Oceanografia, Departamento de Oceanografia Biológica, Núcleo de Pesquisa em Aquicultura Sustentável – Tecnologia, Ecologia e Saúde Pública. Rua São Francisco Xavier, nº 524, 4º andar, Bloco E, sala 4027, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 20550-900
E-mail: vmfocnuerj@gmail.com

RESUMO

O presente artigo contextualiza o papel das ficotoxinas diarreicas em três cenários: seu papel ecológico em relação à biota marinha, seus efeitos na aquicultura e, incluindo o homem na teia trófica marinha, seus efeitos deletérios na saúde pública. Primeiramente, ficotoxinas são definidas como produtos naturais marinhos, substâncias biologicamente ativas (metabólitos secundários), sendo as diarreicas sintetizadas por dinoflagelados dos gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum*. Esses organismos integram a comunidade planctônica marinha costeira, sendo algumas espécies de *Prorocentrum* bentônicas; portanto as toxinas apresentam implicações nas teias tróficas pelágicas e bentônicas costeiras. São ditas microalgas potencialmente tóxicas, pois a produção das ficotoxinas não é constante e varia intraespecificamente dependendo do contexto ecológico em que a microalga se encontra. Moluscos bivalvos (mexilhões, ostras e vieiras) são o segundo grupo mais cultivado na aquicultura marinha. São organismos bentônicos sésseis e alimentam-se principalmente de microalgas. Quando as microalgas potencialmente tóxicas estiverem expressando sua capacidade toxigênica, os moluscos as bioacumulam, transferindo as ficotoxinas para os consumidores humanos. Dessa forma, surgem as Síndromes de Envenenamento por Moluscos, maior problema de saúde pública em nível mundial, associadas ao consumo de moluscos bivalvos contaminados por ficotoxinas. Essa revisão trata especificamente do Envenenamento Diarreico por Moluscos (EDM), intoxicação causada principalmente pela ficotoxina ácido okadaico, amplamente distribuída em águas temperadas às tropicais. Atualmente, a aquicultura corresponde a 47% do pescado produzido, com tendência a aumentar sua participação em virtude da estagnação na captura de pescado. Dessa forma, para garantir que o pescado produzido seja um alimento inócuo aos consumidores humanos, foi necessário desenvolver políticas públicas voltadas à sanidade do pescado. No cenário nacional, recentemente foi criado o Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalvos, ainda não implementado, em moldes de programas internacionais em vigor há décadas. A plena execução do programa é fundamental ao fomento seguro da aquicultura nacional.

Palavras-chave: *Dinophysis*; envenenamento diarreico por moluscos; ficotoxinas; malacocultura; *Prorocentrum*.

ABSTRACT - THE ROLE OF DIARROETHIC PHYCOTOXINS IN AQUATIC BIOTA AND AQUACULTURE

This article analyzes the role of diarrhetic phycotoxins in three scenarios: their ecological role in relation to marine biota, their effects on aquaculture - including the man in the marine trophic web – and its deleterious effects on public health. First, phycotoxins are defined as marine natural products. Biologically active (secondary metabolites) being the diarrhetic ones-synthesized by dinoflagellates from the genus *Dinophysis* and *Prorocentrum*. These dinoflagellates comprise the coastal marine plankton community, but some species of toxic *Prorocentrum* are benthic. So the toxins have implications for benthic and pelagic coastal food webs. These microalgae are regarded as potentially toxic because the phycotoxins production is not constant and varies intra specifically depending on the ecological context in which microalgae live. Bivalve molluscs (mussels, oysters and scallops) are the second most cultivated group in marine aquaculture. They are sessile benthic organisms that feed mainly on microalgae. When potentially toxic microalgae are expressing their toxicity, toxins accumulate in the molluscs, transferring its phycotoxins to human consumers. Shellfish Poisoning Syndrome is the largest public health problem worldwide associated with the consumption of bivalve mollusks. This review specifically addresses Diarrhetic Shellfish Poisoning, mainly caused by okadaic acid intoxication, widely distributed in temperate to tropical waters. Currently aquaculture corresponds to 47% of fish produced, with a tendency to increase its stake due to the stagnation in capture fisheries. Thus to ensure that the produced fish is harmless food for human consumers was necessary to develop focused on fish health policies. On the national scenario, recently the National Program of Sanitary Control of Shellfish Bivalve, not yet implemented, has emerged inspired in international programs established for decades. The full implementation of this program is critical to fostering national aquaculture insurance.

Keywords: *Dinophysis*; malacocultura; phycotoxins; *Prorocentrum*; poisoning.

INTRODUÇÃO

Moluscos bivalvos alimentam-se de organismos planctônicos: microalgas (Ogilvie *et al.* 2000), bactérias, mesozooplâncton (Zeldis *et al.* 2004); mas também de matéria orgânica particulada (MOP). Podem filtrar vários litros de água do mar por hora dependendo de fatores bióticos (espécie de molusco, tamanho, estado fisiológico, quantidade de alimento disponível, presença de toxinas) e abióticos (principalmente temperatura e salinidade) (Resgalla-Jr. *et al.* 2007). Seu hábito filtrador faz com que sejam eficientes bioindicadores, ou organismos sentinelas, para detecção da presença de patógenos ou de substâncias tóxicas (em fase dissolvida ou adsorvida em partículas orgânicas) presentes na coluna d'água (Duchemin *et al.* 2008). Ficotoxinas são substâncias naturais bioativas produzidas por determinadas espécies de microalgas e que podem se bioacumular em bivalvos, tornando-os vetores para as Síndromes de Envenenamento por Moluscos (Lawrence *et al.* 2011). Sob outro enfoque a forma de alimentação dos moluscos os torna organismos amplamente cultivados em todo o mundo, pois não necessitam uso de ração e oferecem baixo impacto ambiental (Byron *et al.* 2011). Ocupam a segunda posição no *ranking* mundial aquícola em volume de produção (23,6% correspondendo a 14,2 milhões de toneladas) precedido apenas por peixes de água doce, principalmente ciprinídeos (FAO 2012a). O Brasil ocupa a 14ª posição no *ranking* mundial de produção aquícola, com peixes de água doce, camarões e moluscos bivalvos (FAO 2013). O principal molusco cultivado no litoral brasileiro é o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) com produção de 13.723 t, seguido pela ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (1.908 t) e a vieira *Nodipecten nodosus* (5,2 t) (MPA 2012a). As ficotoxinas diarreicas já foram detectadas em locais destinados à produção de moluscos bivalvos nos litorais de Santa Catarina, principal produtor nacional de moluscos, Rio de Janeiro e Pernambuco. Em julho de 2012 foi sancionada a portaria que dá diretrizes para a execução do monitoramento de ficotoxinas no litoral brasileiro (MPA 2012b), em funcionamento apenas no estado de Santa Catarina.

O presente artigo tem por objetivo contextualizar o papel das ficotoxinas diarreicas

em três cenários: seu papel ecológico em relação à biota marinha, seus efeitos na aquicultura e, incluindo o homem na teia trófica marinha, seus efeitos deletérios na saúde pública.

FICOTOXINAS

Produtos naturais marinhos

Das cerca de 5000 espécies de microalgas marinhas, aproximadamente 300 são capazes de produzir florações (Daranas *et al.* 2001), mas apenas 94 são consideradas potencialmente nocivas (Moestrup 2013): 14 espécies de diatomáceas e 80 de dinoflagelados. Dentre os dinoflagelados, 11 espécies pertencem ao gênero *Prorocentrum* (Elbrächter & Faust 2013) e 12 ao gênero *Dinophysis* (Zingone 2013), envolvidos na produção de toxinas diarreicas (Tabela 1).

O principal efeito nocivo apresentado por estes dinoflagelados é o seu potencial para a produção de substâncias biologicamente ativas: ficotoxinas, quando o efeito tóxico dá-se em humanos, e ictiotoxinas quando o efeito atua sobre peixes e invertebrados marinhos (Manfrin *et al.* 2012, Moestrup 2013). Portanto, tais toxinas são consideradas como produtos naturais marinhos (Blunden 2001).

Ficotoxinas não são vitais ao metabolismo das microalgas que as produzem. São moléculas complexas, de alto peso molecular. Sua síntese requer gasto energético e ocorre através de um desvio de rota metabólica primária ou via relíquia (metabólito secundário). Legrand *et al.* (2003) consideraram ficotoxinas como alelopatia. No ambiente marinho, a alelopatia tem sido considerada como uma adaptação evolucionária, um mecanismo para obtenção de vantagens na competição por recursos entre organismos fitoplanctônicos. Foram citadas como principais consequências da ação de alelopáticos na comunidade fitoplanctônica a inibição da fotossíntese ou redução nas taxas de crescimento de espécies competidoras, inibição da herbivoria e indução da formação de cistos de resistência.

Por exemplo, a ficotoxina diarreica ácido okadaico apresentou a capacidade de inibir o crescimento da diatomácea *Thalassiosira weissflogii* (competidora por nutrientes), em

Tabela 1. Lista das microalgas potencialmente tóxicas envolvidas no Envenenamento Diarreico por Moluscos (EDM) e suas ficotoxinas. AO: ácido okadaico; DTX's: dinophysistoxinas; PTX's: pectenotoxinas.

Table 1. List of potentially toxic microalgae involved in Diarrhetic Shellfish Poisoning (EDM) and theirs phycotoxins. AO: okadaic acid, DTX's: dinophysistoxins; PTX: pectenotoxins.

Microalga	Efeito nocivo	Toxina diarreica
Gênero <i>Prorocentrum</i>		
<i>P. belizeanum</i>	EDM	AO ¹ ; DTX-5c ⁴
<i>P. borbonicum</i>	Provavelmente neurotoxinas ^{1,3,6}	-
<i>P. cassubicum</i>	EDM?	AO, DTX-1, DTX-2 ¹
<i>P. concavum</i>	? ¹	? ¹
<i>P. cordatum</i>	? ¹	? ¹
<i>P. emarginatum</i>	Hemolisina ¹	-
<i>P. faustiae</i>	EDM	AO e DTX-1 ¹
<i>P. hoffmannianum</i>	EDM e toxinas de ação rápida ¹	AO ¹
<i>P. lima</i>	EDM e Ciguatera, toxinas de ação rápida ¹	AO e DTX-1 ³ ; DTX-1 ⁵ ; AO, DTX-1 e DTX-2 ⁷ ; DTX-4 ⁸
<i>P. maculosum</i>	EDM e Toxina de ação rápida ¹	AO ¹ ; DTX-4 ⁸
<i>P. rhathymum</i>	EDM	AO ²⁰
Gênero <i>Dinophysis</i>		
<i>D. acuminata</i>	EDM	AO ¹ ; DTX-1, PTX-2 ^{9, 10, 16}
<i>D. acuta</i>	EDM	AO, DTX-1 e DTX-2 ¹ ; PTX-2 ⁹
<i>D. caudata</i>	EDM	AO e PTX-2 ¹ ; AO e DTX-1 ¹¹
<i>D. fortii</i>	EDM	AO, DTX-1 e DTX-2 ¹ ; PTX-2 ¹⁴
<i>D. infundibula</i>	EDM	PTX-2
<i>D. miles</i>	EDM	AO e DTX-1 ^{1, 11}
<i>D. norvegica</i>	EDM	AO e DTX-1 ¹ ; PTX-1 e PTX-12 ¹⁷
<i>D. ovum</i>	EDM	AO ²
<i>D. sacculus</i>	EDM	AO ¹ ; DTX-2 e PTX-2 ¹⁹
<i>D. tripos</i>	EDM	DTX-1 ¹ ; PTX-2 ¹⁸
<i>Phalacroma mitra</i>	EDM	DTX-1 ¹
<i>P. rotundatum</i>	EDM	DTX-1 ¹

¹Moestrup *et al.* 2013; ²Raho *et al.* 2008; ³Aligizaki *et al.* 2009; ⁴Paz *et al.* 2007; ⁵Nascimento *et al.* 2005; ⁶Ten-Hage *et al.* 2002; ⁷Bravo *et al.* 2001; ⁸Moroño *et al.* 2003; ⁹Mackenzie *et al.* 2005; ¹⁰Blanco *et al.* 2007; ¹¹Marasigan *et al.* 2001; ¹²Denardou-Queneherve *et al.* 1999; ¹³Ten-Hage *et al.* 2000; ¹⁴Draisci *et al.* 1996; ¹⁵Naves *et al.* 2006; ¹⁶Kamiyama & Suzuki 2009; ¹⁷Miles *et al.* 2004; ¹⁸Rodríguez *et al.* 2012; ¹⁹Riobó *et al.* 2013; ²⁰An *et al.* 2010.

situação experimental (Hay & Kubanek 2002). Assim como o AO a dinophysistoxina-1 também apresentou a capacidade de inibir o crescimento de *T. weissflogii*, *Dunalliella salina*, *D. tertiolecta* e *Amphydinium carterae* (Windust *et al.* 1996).

O perfil de produção de ficotoxinas é espécie específico (Moroño *et al.* 2003). A mesma toxina pode ser produzida por diferentes espécies

e uma mesma espécie pode produzir diferentes ficotoxinas (Tabela 1). Embora essa variabilidade possa ocorrer temporal e espacialmente, a proporção entre as toxinas produzidas por uma espécie em um mesmo local parece permanecer constante (Mackenzie *et al.* 2005). Por exemplo, na costa portuguesa *Dinophysis acuta* produz AO e DTX-2 na proporção de 60:40 (Vale 2006), porém

na Nova Zelândia *D. acuta* produz apenas PTX-2 (Puente *et al.* 2004).

Portanto, para avaliar o risco da ocorrência de intoxicações diarreicas além de identificar as espécies potencialmente tóxicas presentes e quantificá-las também é fundamental conhecer o perfil toxígeno de cada espécie de microalga: toxinas produzidas, sua proporção, bem como variabilidade espacial e temporal. Lindahl *et al.* (2007) analisaram perfis tóxicos para *D. acuta* e *D. acuminata* na costa da Suécia e verificaram que mexilhões apresentaram concentrações suficientes para produzir casos de intoxicação tanto quando consumiram 1500 células de baixo potencial toxígeno, quanto com apenas 100 células com altas concentrações intracelulares de toxinas.

Por exemplo, na baía de Sepetiba a ficotoxina diarreica ácido okadaico foi detectada em baixas concentrações em diferentes situações sugerindo um perfil baixo e constante de produção dessa ficotoxina ao longo do tempo (Oliveira *et al.* 2005, Ferreira *et al.* 2010). No entanto, em um ambiente adjacente, na baía de Ilha Grande, a mesma ficotoxina apresentou grande variabilidade: da ordem de nanogramas de AO no outono de 2004 à microgramas na primavera e verão de 2006/2007 (Lourenço *et al.* 2007, Mariné *et al.* 2010). Nas duas situações associou-se a produção da ficotoxina AO à mesma espécie: *Dinophysis acuminata*, que apresenta o ácido okadaico como sua principal toxina em várias partes de mundo, embora também possa produzir outras toxinas diarreicas.

A expressão do potencial toxígeno pode ser afetada por fatores bióticos e/ou abióticos resultando em uma grande variabilidade intraespecífica. Por exemplo, Johansson *et al.* (1996) encontraram para *D. acuminata* aumento na produção de ácido okadaico, em condições de limitação de nutrientes. Em situação limitante por nitrogênio, o aumento da produção pode ser até seis vezes maior que em condições normais, onde a relação nitrogênio:fósforo esteja balanceada (16:1). Comportamento similar apresenta *Prorocentrum lima*, indicando maior potencial para produção de toxinas em resposta ao estresse ambiental (Granéli *et al.* 1998).

Muito se tem discutido acerca do aumento na frequência e na intensidade de episódios associados às microalgas nocivas. Vários fatores

já foram apontados como hipóteses ao incremento: aumento no esforço de pesquisa, disseminação das microalgas ou seus cistos via maricultura ou água de lastro (hipóteses de emigração), favorecimento das espécies toxígenas devido à eutrofização cultural e às mudanças climáticas globais (hipótese da mudança ambiental) (Hallegraef 1993, Smayda 2002). Smayda (2007) discute o paradigma da introdução de microalgas nocivas via água de lastro (também por organismos utilizados na maricultura): ciclos naturais de expansão das microalgas, ritmos de florações, problemas metodológicos de amostragem, mudanças ambientais que favoreçam o estabelecimento da microalga e posterior floração, entre outros. O autor cita diversos exemplos, como o da introdução de dinoflagelados tóxicos associados à entrada de ostras perliíferas na Europa, e a introdução de cistos de *Gymnodinium catenatum* na Tasmânia via água de lastro. Por outro lado salienta a importância de utilizar determinados critérios para verificar se uma espécie realmente foi introduzida acidentalmente ou se era uma espécie críptica na comunidade fitoplanctônica local.

Denomina-se eutrofização cultural a alteração no balanço de nutrientes em águas costeiras mediado por ação antrópica. Esse desequilíbrio inicialmente leva à alterações na composição da comunidade fitoplanctônica, e suas consequências nocivas estendem-se ao longo de toda a teia trófica marinha. Atualmente há um consenso na comunidade científica acerca de seu papel na promoção e manutenção de florações de algas nocivas, ao atuar como agente de desequilíbrio no ambiente natural e levado ao favorecimento das microalgas mais rústicas e/ou mais aptas a sobreviverem nestas condições de degradação da qualidade da água do mar (Heisler *et al.* 2008). Além disso, Granéli *et al.* (2008) reiteraram que o fenômeno da eutrofização cultural favorece a produção de substâncias alelopáticas como mecanismo para obtenção de vantagens competitivas em um ambiente em desequilíbrio. Na última década, observou-se, ao longo de regiões costeiras em todo o mundo, eventos de Florações de Algas Nocivas (FAN) mais intensos, duradouros, com maior número de espécies tóxicas envolvidas levando a expressivos prejuízos ecológicos e econômicos, principalmente para a aquicultura (Anderson *et al.* 2012).

TOXINAS DIARREICAS

A ficotoxina diarreica mais amplamente distribuída é o ácido okadaico, principal promotor do Envenenamento Diarreico por Moluscos (EDM). É um poliéter de cadeia linear (Figura 1), com peso molecular de 804,4661Da e fórmula $C_{44}H_{71}O_{13}$ (Quilliam 2004). As toxinas lipofílicas associadas ao EDM compreendem a família dos okadaiatos (ácido okadaico e dinophysistoxinas), as pectenotoxinas e as yessotoxinas. Em comum possuem os organismos produtores (principalmente *Dinophysis* spp.) e a composição bioquímica de poliéteres. No entanto, os modos de ação destas ficotoxinas são díspares: okadaiatos apresentam sintomatologia estritamente diarreica enquanto pectenotoxinas e yessotoxinas atuam sobre a fisiologia hepática (Manfrin *et al.* 2012).

Variando-se os três radicais encontrados na molécula do AO (com hidrogênio e metil) obtêm-se as toxinas derivadas: as dinophysistoxinas 1 e 2, que diferem em propriedades químicas (peso molecular, tempo de retenção), mas não no modo de ação tóxico. Para obter-se o derivado DTX-3 a

molécula do AO sofre adição de um radical acyl no sítio 1 (Vale & Sampayo 2002a).

Todos os okadaiatos são termoestáveis, ácido-base resistentes (não são inativados pelo pH ácido da barreira estomacal, nem alcalino intestinal). O cozimento de moluscos apenas concentra as toxinas presentes, devido à perda de água que a carne do molusco sofre durante a cocção. Outro efeito do cozimento é a redistribuição das toxinas nos tecidos do animal: na carne fresca a toxina concentra-se na glândula digestiva e na carne cozida é redistribuída nos demais tecidos, permanecendo apenas 9% de toxina na glândula digestiva do mexilhão *M. edulis*. As toxinas somente são inativadas em altas temperaturas, acima de 130°C, significando que este tipo de processamento não é viável como depuração para toxinas diarreicas, pois moluscos submetidos a essas temperaturas tornam-se impalatáveis e perdem seu valor nutricional (McCarron *et al.* 2008).

Toxinas homólogas ao ácido okadaico (DTX-1,2) podem ser biotransformadas em DTX-3, por ação enzimática na glândula digestiva de algumas espécies de moluscos. A conversão dá-se por acilação e esses compostos acumulam-se

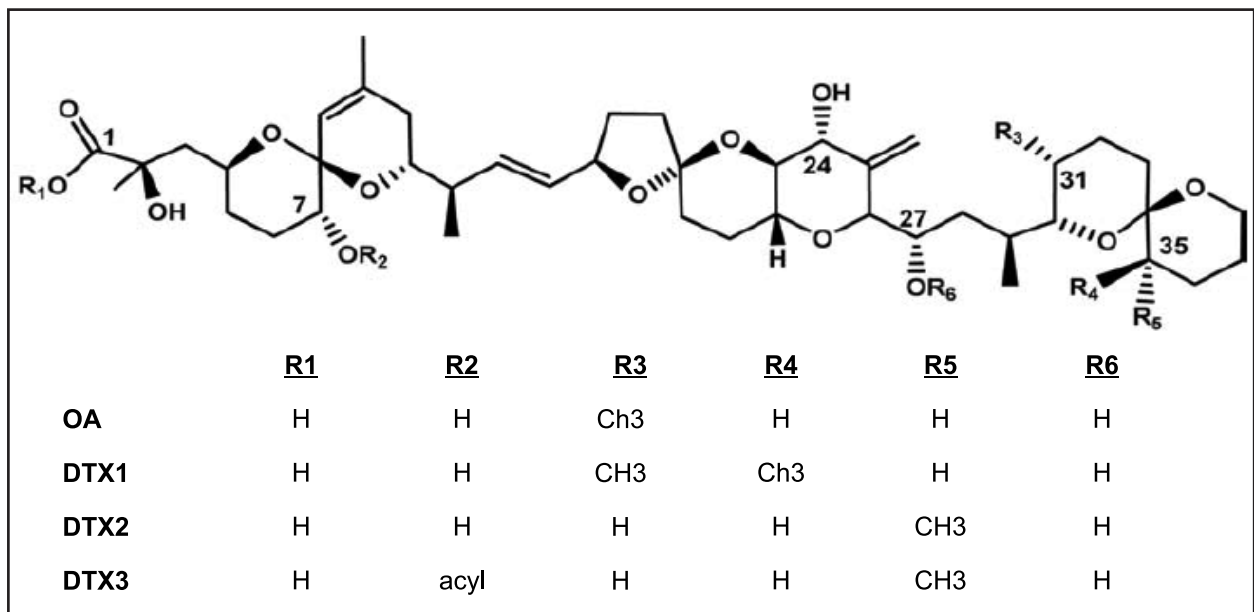


Figura 1. Estrutura química da ficotoxina diarreica ácido okadaico (OA) e seus principais derivados dinophysistoxina 1 (DTX1), dinophysistoxina 2 (DTX2) e dinophysistoxina 3 (DTX3). Figura adaptada de Larsen *et al.* (2007).

Figure 1. Chemical structure of diarrhoeic phycotoxin okadaic acid (OA) and its main derivatives dinophysistoxin-1 (DTX1), dinophysistoxin-2 (DTX2) and dinophysistoxin-3 (DTX3). Figure adapted from Larsen *et al.* (2007).

preferencialmente em vieiras. Esse tipo de toxina diarreica metabolizada (DTX-3) predomina no Japão, derivada da ficotoxina DTX-1 produzida por *Dinophysis fortii* (Vale & Sampayo 2002a).

Em mexilhões, há predominância da presença de okadaiatos em sua forma livre (Morono *et al.* 2003). Há relatos demonstrando que a vieira *Patinopecten yessoensis* (Suzuki *et al.* 2005), o bivalvo *Solen marginatus* (Vale & Sampayo 2002b) e caranguejos (Torgersen *et al.* 2005) apresentam a capacidade de realizar a biotransformação de AO e DTX-1,2 em DTX-3. Não há informações à respeito de biotransformação para as espécies de moluscos nativos da costa brasileira.

A ficotoxina diarreica ácido okadaico encontra-se disseminada amplamente nos mares de todo o planeta (Vale & Sampayo 2002a). Geralmente DTX-1 ocorre em baixas concentrações na Europa, onde o ácido okadaico é a toxina diarreica predominante, exceto na Noruega (Carmody *et al.* 1996). Na Irlanda, a toxina predominante é a DTX-2, com *D. acuta* produzindo também AO em menores concentrações (James *et al.* 1997). Na Galícia (Espanha) Bravo *et al.* (2001), relataram *Prorocentrum lima* produzindo DTX-1 nas mesmas proporções que o AO (razão AO:DTX-1 de 12,9 pg.célula⁻¹ e 12,4 pg.célula⁻¹, respectivamente), porém os eventos de EDM são produzidos por *Dinophysis* spp. com predomínio das toxinas AO (com *D. acuminata*) e DTX-2. No mar Adriático AO e DTX-1 são as principais toxinas diarreicas causadoras de EDM (Pavela-Vrancic *et al.* 2002).

No Canadá DTX-1 é a toxina predominante produzida por *P. lima*, capaz de sintetizar também AO nas mesmas proporções (Bravo *et al.* 2001). Na costa oeste dos Estados Unidos o ácido okadaico é a principal toxina diarreica produzida em baixas concentrações, associada a dinoflagelados epibentônicos, principalmente *P. lima* (Maranda *et al.* 2007). Para o cone sulamericano encontramos o AO como principal toxina, acompanhado por DTX-1,2,3 no Chile (García *et al.* 2004). Recentemente também há o relato da ocorrência de PTX-2 no Chile produzida por *D. acuminata* (Blanco *et al.* 2007). Na China, o ácido okadaico também é a toxina diarreica mais importante ao longo de todo o ano (Mak *et al.* 2005), sendo que na Austrália o AO é acompanhado, em menor escala,

pela PTX-2 (Madigan *et al.* 2006). O primeiro relato da presença de ficotoxinas na Rússia revelou a predominância de AO, e em menores proporções a presença de DTX-1, PTX's e YTX's (Vershinin *et al.* 2006).

Em águas brasileiras, até o presente momento há relatos de ocorrência do ácido okadaico em Santa Catarina (Schmitt & Proença 2000), no litoral do Rio de Janeiro (Oliveira *et al.* 2005, Lourenço *et al.* 2007, Mariné *et al.* 2010, Ferreira *et al.* 2010) e em Recife (Souza *et al.* 2007). Ferreira *et al.* (2010) salienta a necessidade de maiores investigações da presença de outras toxinas lipofílicas no litoral sul fluminense, principalmente DTX-1 e PTX-2 devido a ocorrência de microalgas potencialmente produtoras na região.

Ainda não há estudos sobre o perfil toxígeno expresso pelas espécies de *Dinophysis* que ocorrem no litoral brasileiro. Em nosso litoral, a pesquisa na linha de ficotoxinas ainda permanece em uma etapa puramente descritiva, que necessita ser urgentemente fomentada e ampliada a toda costa principalmente onde há parques aquícolas.

A ação tóxica dos okadaiatos, verificada em ensaios biológicos e citológicos, é classificada em: genotóxica (Silva *et al.* 2001), carcinogênica (Feng *et al.* 2006), neurotóxica (Kamat *et al.* 2013) e citotóxica (Huynh-Delerme *et al.* 2003).

O principal sintoma do EDM, a diarreia, pode ser explicado pela hiperfosforilação das proteínas que controlam a secreção de íons de sódio pelas células intestinais ou pelo aumento da fosforilação do citoesqueleto das células do epitélio intestinal resultando, ambas, em alterações na permeabilidade intestinal, que por sua vez leva à perda passiva de fluidos (FAO 2004).

As toxinas diarreicas ligam-se a uma classe particular de receptores celulares, as proteínas fosfatases (PP1 e PP2A), presentes no estômago, cólon e intestino delgado. Logo, a presença destes receptores para o AO indica os possíveis locais para o desenvolvimento de tumores. A ligação do AO às proteínas fosfatases resulta em uma rápida construção de proteínas fosforiladas, atuando o AO como potente inibidor da atividade normal dessas proteínas fosfatases. Ensaio realizados com cobaias sugerem que o efeito crônico dos okadaiatos seja a promoção de tumores no estômago e intestino (FAO 2004). Informações

acerca da toxicidade dos okadaiatos são fornecidas na Tabela 2.

Toxinas diarreicas são lipossolúveis e acumulam-se na glândula digestiva dos moluscos. Assim que o animal tem acesso ao alimento (microalgas) livre de toxinas inicia-se o processo de depuração. Svensson & Förlin (2004) verificaram que a floração sazonal de diatomáceas foi fundamental para a depuração natural de *M. edulis* nas costas da Suécia e Noruega. Dentre os fatores abióticos que influenciam na capacidade de depuração a temperatura foi o mais importante, pois atuou diretamente ditando o ritmo metabólico. Em situação experimental controlada, Svensson (2003) observou a capacidade de depuração do mexilhão azul em 32 dias, contaminado naturalmente durante uma floração de *Dinophysis* spp. e alimentado em laboratório com microalgas não tóxicas.

A principal via de eliminação de substâncias lipídicas em animais é fecal, conforme pode ser comprovado em experimentos com copépodos (microcrustáceos) onde suas pelotas fecais continham grande quantidade de células tóxicas de *Dinophysis*. Essa é uma significativa forma de exportação de toxinas diarreicas para o domínio bentônico, contribuindo para a toxidez de espécies coprófagas (Maneiro *et al.* 2002).

Outro aspecto importante para a depuração de toxinas diarreicas é sua afinidade pela espécie de molusco. Por exemplo, para o mexilhão *M. galloprovincialis* o ácido okadaico apresenta

velocidade de depuração superior à DTX-2. Dessa forma a dinophysistoxina-2 acumula-se gradualmente nos mexilhões (mas sofre toxicocinética e migra da glândula digestiva para os demais tecidos) ao longo do final do verão e início do outono no litoral português. Já para o bivalvo *Cerastoderma edulis* as duas toxinas apresentaram o mesmo percentual de depuração (Vale 2004).

Moluscos que estejam contaminados com mais que 2 µg AO.g⁻¹ glândula digestiva de molusco ou 1,8 µg DTX-1.g⁻¹ glândula digestiva de molusco são considerados impróprios ao consumo humano (Hallegraeff 2004). O nível regulatório utilizado na maioria dos países é de 16 mg AO equivalente.kg⁻¹ de carne de molusco (Toyofuku 2006). Esses limites foram estabelecidos com base em dados epidemiológicos e toxicológicos com objetivo de garantir que os moluscos estejam adequados ao consumo humano. A ferramenta empregada na vigilância destes limites é o monitoramento tanto das ficotoxinas nos moluscos e nas microalgas tóxicas, quanto do acompanhamento da identificação destas microalgas potencialmente tóxicas e de sua variabilidade espacial e temporal (Reguera 2002).

Países onde a malacocultura é exercida em escala industrial contam com programas de monitoramento que abrangem análises de ficotoxinas, metais tóxicos, bactérias e pesticidas há décadas. Exemplos são alguns países da União Europeia, Estados Unidos, Japão, Nova

Tabela 2. Dados toxicológicos de okadaiatos envolvidos no Envenenamento Diarreico por Moluscos: ácido okadaico (AO); dinophysistoxina 1 (DTX1), dinophysistoxina 2 (DTX2) e dinophysistoxina 3 (DTX3).

Table 2. Toxicological data okadaiatos involved in Diarroethic Shellfish Poisoning: okadaic acid; DTX's: dinophysistoxins 1, 2 and 3.

Dados toxicológicos	AO	DTX-1; DTX-2	DTX-3
DL ₅₀ (µg.kg ⁻¹) ²¹	200	166	500
Impróprio para consumo moluscos (por grama de glândula digestiva) ²²	>2µg	>1,8µg	Não informado
Ingestão para desencadear efeitos agudos em humanos ²³	48 µg	38,4 µg	Não informado
LOAEL ²³	0,8 µg AOeq.kg ⁻¹ de peso corpóreo		
Nível regulatório ²¹	0,16mg.AOeq.Kg ⁻¹ de carne de molusco		

²¹Lawrence *et al.* (2011), ²²Hallegraeff *et al.* (1995), ²³Toyofuku (2006); DL50: Dose necessária para que 50% das cobaias injetadas intraperitonealmente com a toxina cheguem a óbito. LOAEL: Menor nível em que se observam efeitos adversos.

Zelândia e Chile (Reguera 2002). A FAO aponta como principal entrave ao desenvolvimento da aquicultura brasileira a ausência de controle sanitário do pescado produzido (FAO 2012b). Recentemente foi expedida portaria do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA 2012b) que dispõe sobre níveis regulatórios e métodos de detecção para ficotoxinas, necessários à implementação do Programa Nacional de Sanidade de Moluscos Aquáticos (MAPA 2003), ainda não em vigor devido a falta de laboratórios credenciados que atendam ao programa. Apenas os estados de Santa Catarina e Minas Gerais possuem laboratórios aptos. Em consonância ao utilizado pelos países da União Europeia os ensaios químicos foram eleitos como metodologias normativas à execução do programa de monitoramento de ficotoxinas paralisantes, diarreicas e amnésicas. Embora os bioensaios também possam ser utilizados.

Bioensaios apresentam baixa especificidade e alta sensibilidade. Isso significa que a presença de outras toxinas lipofílicas pode causar interferências e gerar falsos resultados, além de não discernir entre as toxinas diarreicas presentes. Além disso, a DTX-3 não é detectada através desta metodologia. Por exemplo, em um surto de EDM ocorrido em Portugal produzido pela dinophysistoxina-3, os bioensaios foram negativos; a presença dessa toxina somente foi confirmada com o uso de cromatografia líquida de alta eficiência (Vale & Sampayo 1999). Outra desvantagem ao bioensaio é pertinente ao limite de detecção: concentrações na ordem de dezenas ou centenas de nanogramas não são detectáveis. Dessa forma, os consumidores poderiam ser expostos ao efeito crônico, sem que houvesse nenhuma suspeita desse perigo ou forma de avaliar seu risco. A utilização de animais nestes ensaios, onde um dos critérios a ser avaliado é observar tempo necessário até o óbito, também abarca aspectos éticos; o que vem despertando muita discussão entre os órgãos protetores dos animais, comissões de ética e grupos de pesquisa (FAO 2004).

Os métodos de ensaio analíticos fornecem alternativa com maior sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e menor limite de detecção. Um dos mais recomendados, embora mais caros e dependentes de pessoal altamente qualificado, é a cromatografia líquida de alta eficiência. A

metodologia consiste na extração da(s) toxina(s) da matriz orgânica (glândula digestiva do molusco ou citoplasma da microalga), com solventes orgânicos, etapa de clarificação para remoção de sujidades, corrida cromatográfica e uso sensor de Espectometria de Massa (LC-MS/MS) como sensor de detecção (Lawrence *et al.* 2011).

Microalgas pertencentes ao gênero *Prorocentrum* geralmente produzem toxinas em situação de floração enquanto que *Dinophysis* spp. podem produzi-las mesmo em baixas densidades celulares. Quando a contagem total de *Dinophysis* atinge o patamar de 400 células por litro de água do mar configura-se uma situação de alerta, com perigo da presença de toxinas diarreicas em concentrações suficientes para causar EDM (Reguera 2002). Foi o ocorrido no litoral de Florianópolis, possibilitando a tomada de decisão de suspender temporariamente a venda de moluscos. Mesmo assim, após a população de *Dinophysis* ter diminuído ocorreu repentinamente a primeira floração deste gênero relatada para a costa brasileira. Apesar das medidas tomadas, cerca de 150 pessoas foram acometidas de EDM. As vítimas consumiram moluscos extraídos de bancos naturais, pois a comercialização de moluscos cultivados encontrava-se suspensa (Proença *et al.* 2007).

Implicações na saúde pública: envenenamento diarreico por moluscos

O primeiro relato de problemas gastrintestinais associados ao consumo de moluscos ocorreu na Holanda, na década de 60, com a implicação equivocada de *Prorocentrum micans*, espécie mais abundante, posteriormente comprovada atóxica (Kat 1983). Não houve suspeitas de que *Dinophysis acuta*, presente em densidades celulares baixas, pudesse ser o real causador do evento. No Chile, foram observadas intoxicações diarreicas, entre 1970-1971, pioneiramente associadas à floração de *Dinophysis* spp. (Guzmán & Campodonico 1975). Porém, somente em 1976, no Japão, o EDM foi definido como uma doença, sendo identificados seus sintomas, toxinas envolvidas, agente etiológico e vetores para humanos. Nesse episódio foram acometidas mais de mil de pessoas que haviam comido mexilhões e vieiras. Isolou-se pela primeira vez a ficotoxina DTX-1, cuja

produção por *Dinophysis fortii* foi comprovada inequivocamente (Yasumoto *et al.* 1980).

Há relatos de EDM em escala global associada às diversas espécies de *Dinophysis*, ocorrendo principalmente onde há maior consumo de moluscos e constituindo portanto um grande desafio ao desenvolvimento do cultivo de moluscos nos litorais da Europa, Japão, Chile e Nova Zelândia (Reguera *et al.* 2012).

Os sintomas clínicos podem ser confundidos com os de uma gastroenterite de origem bacteriana. Não causam óbitos. Em eventos agudos os sintomas são náuseas, dores abdominais, vômitos e diarreia. Surgem no intervalo entre 30 minutos até poucas horas após o consumo de moluscos contaminados. Raramente o quadro clínico manifesta-se passadas mais de 12 horas. Os sintomas cessam após três dias, com ou sem tratamento médico. Recomenda-se apenas, como suporte, a reposição de líquidos e eletrólitos para compensar a intensa perda de água (Lawrence *et al.* 2011).

Mesmo com um programa de monitoramento que abrange toda a costa europeia continuaram surgindo casos de EDM em consumidores de moluscos, além dos 10% de susceptíveis previamente estimados. Segundo Alexander *et al.* (2008), o banco de dados toxicológico dos okadaiatos é limitado e compreende principalmente estudos de toxicidade aguda. Esses autores afirmam que os dados crônicos dos efeitos do AO e equivalentes (em animais e em humanos) são insuficientes para o cálculo seguro da DDI (Dose Diária de Ingestão). Foi calculado o LOAEL (Lowest Observed Adverse Effects Level – Menor nível em que se observam efeitos adversos) de 50 µgAO equivalente por pessoa, ou seja, 0,8 µgAOeq.kg massa corpórea⁻¹ para adultos. Utilizou-se fator de segurança 3 para a extrapolação ao calcular-se o NOAEL (No Observed Adverse Effects Level – nível em que não se observam efeitos adversos) que resultou em 0,3 µgAOeq.kg massa corpórea⁻¹. O painel EFSA considerou a ingestão de uma porção de 400g de molusco para o cálculo do LOAEL.

Consumidores regulares de moluscos, contaminados com concentrações de toxinas diarreicas abaixo do limite necessário ao desencadeamento dos sintomas clássicos, encontram-se expostos ao efeito crônico destas toxinas. A principal toxina diarreica, o ácido

okadaico, é um potente promotor de tumores no trato gastrointestinal, assim como também o é a dinofisistoxina-1 (Feng *et al.* 2006). Na França, um estudo epidemiológico pioneiro (estudo ecológico) encontrou uma correlação significativa entre câncer e consumo de moluscos contaminados com a ficotoxina ácido okadaico (Cordier *et al.* 2000).

Os principais veículos de toxinas diarreicas para humanos são os moluscos bivalvos. Na Europa, principalmente *Mytilus edulis* e *M. galloprovincialis* segundo Moroño *et al.* (2003). No entanto, há relato de surto de EDM em Portugal associado ao consumo de *Solen marginatus* e caranguejos (*Carcinus maenas*) relatado por Vale & Sampayo (2002b). Centenas de pessoas foram acometidas pela síndrome diarreica na Noruega ao comer caranguejos (*Cancer pagurus*) que haviam se alimentado de mexilhões durante uma floração de *Dinophysis acuta* (Torgersen *et al.* 2005). Pouco AO livre foi detectado, sendo sua forma esterificada (DTX-3) a principal toxina envolvida neste surto.

Toyofuku (2006) aponta como principal problema para o levantamento de mais dados toxicológicos a falta de quantidades suficientes de toxinas diarreicas purificadas. E salienta a necessidade de realização de mais testes toxicológicos, para conseqüentemente gerar avaliações de risco mais precisas.

Efeitos adversos na sanidade de moluscos

Via de regra, considerava-se que não havia efeitos adversos significativos das ficotoxinas sobre a sanidade de bivalvos. Em humanos e mamíferos marinhos em geral, as ficotoxinas atuam sobre canais de sódio (toxinas paralisantes, amnésicas, ciguatéricas, neurotóxicas) ou em proteínas fosfatases (okadaiatos). Moluscos possuem em suas membranas celulares canais de cálcio, carecendo assim de sítios de ligação onde as ficotoxinas possam exercer plenamente sua ação tóxica (FAO 2004). Porém sua sanidade pode ser afetada negativamente e há relatos acerca de várias espécies de moluscos que apresentam alterações comportamentais como retração de seus sífões, fechamento de suas valvas e parada da alimentação na presença de microalgas nocivas (Hégaret *et al.* 2007).

Na última década, intensificaram-se os trabalhos experimentais sobre os efeitos das microalgas nocivas, e suas substâncias bioativas, na saúde dos moluscos. Revelando que, embora não causem uma patologia *stricto sensu*, podem gerar alterações de ordem fisiológica ou histológica, ou até mesmo levar à mortalidade por toxicidade aguda determinados estádios de desenvolvimento de moluscos. Os trabalhos realizados têm revelado que a relação entre microalgas tóxicas e os moluscos é espécie-específica (Galimany *et al.* 2008).

Carvalho Pinto-Silva *et al.* (2003) demonstraram experimentalmente o efeito genotóxico do ácido okadaico em mexilhões *Perna perna*. Animais adultos foram expostos à ficotoxina (0,3 µg AO diluído em 10 µl água ultrapura: metanol, 1:1 v/v; injetada diretamente em seus sifões inalantes) e tiveram a hemolinfa coletada em diferentes períodos (24, 48 e 72 horas). Os animais apresentaram percentual significativamente mais alto na formação de micronúcleo nos hemócitos da hemolinfa do tratamento de 24h. Tal fato sugere que o ácido okadaico seja rapidamente metabolizado em uma forma altamente reativa causando dano ao DNA do núcleo dos hemócitos que se encontravam em processo de divisão celular naquele momento. Dessa forma, a genotoxicidade da ficotoxina ácido okadaico em mexilhões sugere um efeito adverso na diversidade genética para as populações de animais desta espécie. O dano ao DNA poderá ser traduzido na criação de mutações letais, bem como na expressão de genes que afetem o crescimento e a reprodução desta espécie de bivalvo importante econômica e ecologicamente.

Auriemma & Battistella (2004) verificaram a produção de uma proteína de 30 kDa na glândula digestiva de *M. edulis* mediada pela presença do ácido okadaico. Tal proteína foi associada ao funcionamento do sistema imune do animal, atuando como um mecanismo natural de detoxificação. No grupo controle não foi observada a presença da proteína. Durante o mesmo experimento, no grupo dos animais tratados com AO foi observada alteração histológica na glândula digestiva, na forma de intensa formação de vesículas lipídicas. Não houve relato de alteração na função digestiva da glândula. Animais do grupo controle não apresentaram a alteração histológica.

Outro efeito adverso observado em hemócitos do mexilhão *M. galloprovincialis* foi o aumento da taxa de fagocitose mediado pelo ácido okadaico em temperatura de 25°C, indicando uma possível alteração nos caminhos de sinalização e transdução do imunócito. Como a ficotoxina bioacumula em bivalvos seu efeito a longo prazo permanece desconhecido (Malagoli *et al.* 2008).

Galimany *et al.* (2008) observaram várias respostas do sistema imune do mexilhão *M. edulis* na presença da microalga *Prorocentrum minimum*: diapedese dos hemócitos no intestino (associado à tentativa de encapsulamento de *P. minimum*), aumento da migração dos hemócitos para a glândula digestiva e intestino na tentativa de proteger os órgãos da ação tóxica. Também foi observada uma progressiva degranulação dos hemócitos interpretada como uma resposta imune.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção aquícola brasileira experimenta nas últimas décadas um crescimento gradual e constante, apesar das flutuações devido aos problemas sanitários ou climáticos (MPA 2012a). Essa atividade segue a mesma tendência do mercado internacional de pescado onde a aquicultura consolida-se como importante fonte de proteína para a alimentação humana (47% do total de pescado produzido no mundo vem da aquicultura) e geração de postos de trabalho (FAO 2012a). Nesse contexto, a problemática das ficotoxinas alerta à necessidade urgente da implementação e plena execução do Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário em Moluscos Bivalvos para assegurar o desenvolvimento da malacocultura brasileira com sustentabilidade e segurança. Visto que, a segurança alimentar contempla tanto aspectos ligados à acessibilidade ao alimento produzido quanto à sua inocuidade, atendendo aos padrões sanitários adequados. Dessa forma, poder-se-á estimular o consumo interno de moluscos e também almejar a inserção em mercados internacionais. Com isso será possível ultrapassar o paradigma da malacocultura como complementação da atividade pesqueira (estagnada ou em declínio) para consolidá-la como atividade em escala industrial gerando renda e melhoria na condição social dos maricultores salvaguardando a saúde pública dos consumidores finais.

REFERÊNCIAS

- Alexander, J., Audunsson, G. A., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J. P., Dogliotti, E., Domenico, A., Fernández-Cruz, M. L., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Galli, C., Grandjean, P., Gzyl, J., Heinemeyer, G., Johansson, N., Mutti, A., Schlatter, J., Van Leeuwen, R., Van Peteghem, C., & Verger, P. 2008. Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065A). The European Food Safety Authority Journal, 589, 1-62. Aligizaki, K., Nikolaidis, G., Katikou, P., Baxevanis, A. D., & Abatzopoulos, T. J. 2009. Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal Waters. Harmful Algae, 8(2), 299-311.
- An, T., Winshell, J., Scorzetti, G., Fell, J. W., & Rein, K. S. 2010. Identification of okadaic acid production in the marine dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum* from Florida Bay. Toxicon, 55(2-3), 653-658.
- Anderson, D. M., Cembella, A. D., & Hallegraeff, G. M. 2012. Progress in Understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management. Annual Review Marine Science, 4(1), 143-176.
- Auriemma, R., & Battistella, S. 2004. Biochemical and histological alterations of *Mytilus galloprovincialis* digestive gland after exposure to okadaic acid and derivatives. Invertebrate Survival Journal, 1(1), 66-71.
- Blanco, J., Alvarez, G., & Uribe, E. 2007. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. Toxicon, 49(5), 710-716.
- Blunden, G. 2001. Biologically Active Compounds from Marine Organisms - review. Phytotherapy Research, 15(2), 89-94.
- Bravo, I., Fernández, M. L., Ramilo, I., & Martinez, A. 2001. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). Toxicon, 39(10), 1537-1545.
- Byron, C., Link, J., Costa-Pierce, B., & Bengtson, D. 2011. Calculating ecological carrying capacity of shellfish aquaculture using mass-balance modeling: Narragansett Bay, Rhode Island. Ecological Modelling, 222(10), 1743-1755.
- Carmody, E. P., James, K. J., & Kelly, S. S. 1996. Dinophysistoxin-2: The Predominant Diarrhoeic Shellfish Toxin in Ireland. Toxicon, 34(3), 351-359.
- Carvalho Pinto-Silva, C. R., Ferreira, J. F., Costa, R. H. R., Belli Filho, P., Creppy, E. E., & Matias, W. G. 2003. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. Toxicon, 41(1), 93-97.
- Cordier, S., Monfort, M., Miossec, L., Richardson, S., & Belin, C. 2000. Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. Environmental Research Section A, 84(2), 145-150.
- Daranas, A. H., Norte, M., & Fernández, J. J. 2001. Toxic marine microalgae. Toxicon, 39(8), 1101-1132.
- Denardou-Queneherve, A., Grzebyk, D., Pouchus, Y. F., Sauviat, M. P., Alliot, E., Biard, J. F., Berland, B., & Verbist, J. F. 1999. Toxicity of French strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* experimental and natural contaminations of mussels. Toxicon, 37(12), 1711-1719.
- Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Bori, P., & Polett, R. 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. Toxicon, 34(8), 923-935.
- Duchemin, M. B., Wessel, N., Fournier, M., & Auffret, M. 2008. Flow cytometric measurement of the clearance rate in the blue mussel *Mytilus edulis* and the development of a new individual exposure system for aquatic immunotoxicological studies. Environmental Pollution, 153(2), 492-496.
- Elbrächter, M., & Faust, M. A. 2013. Dinoflagellates – Ordem Prorocentrales. In: Ø. Moestrup (Ed.), 2013 IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Retirado de <http://www.marinespecies.org/HAB>
- FAO. 2004. Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper No. 80; p. 294. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retirado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e00.HTM>
- FAO. 2012a. The state of world fisheries and aquaculture. Relatório Técnico. Fisheries and Aquaculture Department - UNESCO, Rome. p. 230
- FAO. 2012b. Perfis sobre la pesca y la acuicultura por países – Brasil. Retirado 12 de Novembro, 2013, de http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_BR/es
- Feng, G., Yoshihiro Ohmori, Y., & Chang, P. 2006. Production of chemokine CXCL1/KC by okadaic acid through the nuclear factor-kB pathway. Carcinogenesis, 27(1), 43-52.
- Ferreira, V. M., Oliveira, G. M., Pereira, M. M. D., Silva, P. P. O., Borba, H. R., Lourenço, A. J., & Silva, P. F. 2010. Produção da ficotoxina diarréica ácido okadaico associada à microalga *Dinophysis acuminata* (Ehrenberg 1839) na baía de Sepetiba, RJ e sua implicação para a saúde pública. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, 17(2) 87-90.
- García, C., González, V., Cornejo, C., Fleming, H. P., & Lagos, N. 2004. First evidence of Dinophysistoxin-I ester and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bivalves collected in the Patagonia fjords. Toxicon, 43(2), 121-131.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., & Wikfors, G. H. 2008. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Harmful Algae, 7(5), 630-638.
- Granéli, E., Johansson, N., & Panosso, R. 1998. Cellular toxin contents in relation to nutrient condition for different groups of phycotoxins. In: B. Reguera,

- J. Blanco, M. L. Fernández & T. Wyatt (Eds.), Harmful Algae. pp. 321-324. Vigo: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO and Xunta de Galicia Publishers.
- Granéli, E., Weberg, M., & Salomon, P. S. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of Eutrophication. *Harmful Algae*, 8(1), 94–102.
- Guzmán, L., & Campodonico, I. 1975. Marea roja em la región de Magallanes. Punta Arenas, CL: Publicaciones Instituto de la Patagonia, Serie Monografias: p. 44.
- Hallegraeff, G. M. 2004. Harmful algal blooms: a global overview. In: G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson & A. D. Cembella (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. pp. 25-49. Paris: Unesco Publishing.
- Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99.
- Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., & Cembella, A. D. (Eds.). 1995. *Manual on harmful marine microalgae*. Paris: IOC Manuals and Guides No. 33– UNESCO: p. 551.
- Hay, M. E., & Kubanek, J. 2002. Community and ecosystem level consequences of chemical cues in the plankton. *Journal of Chemical Ecology*, 28(10), 2001-2016.
- Hégaret, H., Wikfors, G. H., & Shumway, S. E. 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research*, 26(2), 549–559.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H. G., Sellner, K., Stockwell, D. A., Stoecker, D. K., & Suddleson, M. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3–13.
- Huynh-Delerme, C., Fessard, V., Kiefer-Biasizzo, H., & Puiseus-Dao, S. 2003. Characteristics of Okadaic Acid—Induced Cytotoxic Effects in CHO K1 Cells. *Environmental Toxicology*, 18(6), 383–394.
- James, K. J., Carmody, E. P., Gillman, M., Kelly, S. S., Drasci, R., Lucentini, L., & Giannetti, L. 1997. Identification of a new diarrhetic toxin in shellfish using liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometric detection. *Toxicon*, 35(6), 937-978.
- Johansson, N., Granéli, E., Yassumoto, T., Carlsson, P., & Legrand, C. 1996. Toxin Production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells Growth Under Nutrient Sufficient and Defficient Conditions. In: T. Yassumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. pp. 277-280. Sendai: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Kamat, P. K., Rai, S., & Nath, C. 2013. Okadaic acid induced neurotoxicity: An emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *NeuroToxicology*, 37(1), 163–172.
- Kamiyama, T., & Suzuki, T. 2009. Production of dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-2 by a culture of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 8(2), 312–317.
- Kat, M. 1983. Diarrhetic mussels poisoning in the Neatherlands related to dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(4-5), 417-427.
- Larsen, K., Petersen, D., Wilkins, A. L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Rundberget, T., Goldstone, D., Aarcus, V., Hovgaard, P., Rise, F., Rehmann, N., Hess, P., & Miles, C. O. 2007. Clarification of the C-35 stereochemistries of Dinophysistoxin-1 and Dinophysistoxin-2, and its consequences for binding to protein phosphatase. *Chemical Research Toxicology*, 20(6), 868–875.
- Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hass, P., Iddya, K., & Ababouch, L. 2011. Assessment and management of biotoxin risks in bivalve mollusks. *FAO Technical Paper No. 551*; p. 358. UNESCO: Fisheries and Aquaculture. Retirado de <http://www.fao.org/docrep/015/i2356e/i2356e.pdf>
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., & Granéli, E. 2003. Allelopathy in phytoplankton – biochemical, biological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4), 406-419.
- Lindahl, O., Lundve, B., & Johansen, M. 2007. Toxicity of *Dinophysis* spp. in relation to population density and environmental conditions on the Swedish west coast. *Harmful Algae*, 6(2), 218–231.
- Lourenço, A. J., Ferreira, V. M., Silva, P. P. O., Rosa, C. A. R., Direito, G. M., & Oliveira, G. M. 2007. Evidência de depuração natural da toxina diarreica ácido okadaico em mexilhões *Perna perna* (LINNÉ, 1758) cultivados em fazenda de maricultura na baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 14(2), 91-94.
- McCarron, P., Kilcoyne, J., & Hess, P. 2008. Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*, 51(6), 1081–1089.
- Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., & Selwood, A. 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae*, 4(1), 75–85.
- Madigan, T. L., Lee, K. G., Padula, D. J., McNabb, P., & Pointon, A. M. 2006. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish. *Harmful Algae*, 5(2), 119–123.
- Mak, K. C. Y., Yu, H., Choi, M. C., Shen, X. Y., Lam, M. H. W., Martin, M., Wu, R. S. S., Wong, P. S., Richardson, B. J., & Lam, P. K. S. 2005. Okadaic acid, a causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning, in green-lipped mussels *Perna viridis* from Hong Kong fish culture zones: Method development and monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8-12), 1010–1017.
- Malagoli, D., Casarini, L., & Ottaviani, E. 2008. Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(2), 180-186.
- Maneiro, I., Guisande, C., Frangópulos, M., & Riveiro, I. 2002. Importance of copepod faecal pellets to the fate

- of the DSP toxins produced by *Dinophysis* spp. Harmful Algae, 1(4), 333–341.
- Manfrin, C., Moro, G., Torboli, V., Venier, P., Pallavicini, A., & Gerdol, M. 2012. Physiological and molecular responses of bivalves to toxic dinoflagellates. Invertebrate Survival Journal, 9(2), 184–199.
- Maranda, L., Corwin, S., Dover, S., & Morton, S. L. 2007. *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in northeastern USA coastal waters II: Toxin load in the epibiota and in shellfish. Harmful Algae, 6(5), 632–641.
- Marasigan, A. N., Sato, S., Fukuyo, Y., & Kodama, M. 2001. Accumulation of a high level of diarrhetic shellfish toxins in the green mussel *Perna viridis* during a bloom of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis miles* in Sapijan Bay, Panay Island, the Philippines. Fisheries Science, 67(5), 994–996.
- Mariné, G. F., Silva, P. P. O., Oliveira, G. M., & Ferreira, V. M. 2010. Detecção de ácido ocadaico em cultivo de mexilhões *Perna perna*, Angra dos Reis, RJ. Ciência Rural, 40(1), 193–196.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2003. Instrução Normativa nº 53, de 2 de julho de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Petersen, D., Quilliam, M. A., Naustvoll, L. J., Rundberget, T., Torgersen, T., Hovgaard, P., Jensen, D. J., & Cooney, J. M. 2004. A Novel Pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and Shellfish from Norway. Chemical Research in Toxicology, 17(11), 1423–1433.
- MPA. 2012a. Boletim Estatístico da Pesca e aquicultura – Brasil 2010. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura: p. 129.
- MPA. 2012b. Portaria nº 204, de 28 de junho de 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.
- Moestrup, Ø., Akselman, R., Cronberg, G., Elbraechter, M., Fraga, S., Halim, Y., Hansen, G., Hoppenrath, M., Larsen, J., Lundholm, N., Nguyen, L. N., & Zingone, A. (Eds.). 2013. In: IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Retirado de <http://www.marinespecies.org/HAB>
- Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M. L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C., & Blanco, J. 2003. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. Aquatic Toxicology, 62(4), 269–280.
- Nascimento, S. M., Purdiea, D. A., & Morris, S. 2005. Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK. Toxicon, 45(5), 633–649.
- Naves, J. L., Prado, M. P., Rangel, M., De Sanctis, B., Machado-Santelli, G., & Freitas, J. C. 2006. Cytotoxicity in the marine dinoflagellate *Prorocentrum mexicanum* from Brazil. Comparative Biochemistry and Physiology, 143(1): 73–77.
- Ogilvie, S. C., Ross, A. H., & Schie, D. R. 2000. Phytoplankton biomass associated with mussel farms in Beatrix Bay, New Zealand. Aquaculture, 181(1-2), 71–80.
- Oliveira, G. M., Silva, P. P. O., Rosa, C. A. R., Bastos, R. A., Ferreira, V. M., & Rodrigues, E. S. 2005. Detecção del ácido okadaico por cromatografía líquida de alta eficiencia en mariscos (*Perna perna*) capturados en la bahia de Sepetiba. Alimentaria (Madrid), 366, 56–61.
- Pavela-Vrancic, M., Mestrovic, V., Marasovic, I., Gillman, M., Furey, A., & James, K. J. 2002. DSP Toxin Profile in the Coastal Waters of the Central Adriatic Sea. Toxicon, 40(11), 1601–1607.
- Paz, B., Daranas, A. H., Cruz, P. G., Franco, J. M., Napolitano, J. G., Norte, M., & Fernández, J. J. 2007. Identification and characterization of DTX-5c and 7-hidroxi-methyl-2-methylene-octa-4,7-dienyl okadaate from *Prorocentrum belizeanum* cultures by LC–MS. Toxicon, 50(4), 470–478.
- Proença, L. A. O., Schramm, M. A., Tamanaha, M. S., & Alves, T. P. 2007. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. Harmful Algae News, 33, 19–20.
- Puente, P. F., Sáez, M. J. F., Hamilton, B., Furey, A., & James, K. J. 2004. Studies of polyether toxins in the marine phytoplankton, *Dinophysis acuta*, in Ireland using multiple tandem mass spectrometry. Toxicon, 44(8), 919–926.
- Quilliam, M. A. 2004. Chemical methods for lipophilic shellfish toxins. In: G. M. Hallegraef, D. M. Anderson & A. D. Cembella (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. pp. 211–245. Paris: UNESCO Publishing.
- Raho, N., Pizarro, G., Escalera, L., Reguera, B., & Marín, I. 2008. Morphology, toxin composition and molecular analysis of *Dinophysis ovum* Schütt, a dinoflagellate of the “*Dinophysis acuminata* complex”. Harmful Algae, 7(6), 839–848.
- Reguera, B. 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. In: E. A. Sar, M. E. Ferrario & B. Reguera (Eds.), Floraciones algales nocivas en el Cone Sur Americano. pp. 21–54. Vigo: Instituto Español de Oceanografía.
- Reguera, B., Velo-Suárez, L., Raine, R., & Park, M. G. 2012. Harmful *Dinophysis* species – a review. Harmful Algae, 14, 87–106.
- Resgalla-Jr., C., Brasil, E. S., Laitano, K. S. & Reis Filho, R. W. 2007. Physioecology of the mussel *Perna perna* (Mytilidae) in Southern Brazil. Aquaculture, 270(1-4), 464–474.
- Riobó, P., Reguera, B., Franco, J. M., & Rodríguez, F. 2013. First report of the toxin profile of *Dinophysis sacculus* Stein from LC–MS analysis of laboratory cultures. Toxicon, 76, 221–224.
- Rodríguez, F., Escalera, L., Reguera, B., Rial, P., Riobó, P., & Silva, T. J. 2012. Morphological variability, toxinology and genetics of the dinoflagellate *Dinophysis tripos* (Dinophysiaceae, Dinophysiales). Harmful Algae, 13, 26–33.

- Schmitt, F., & Proença, L. A. O. 2000. Ocorrência de Dinoflagelados do Gênero *Dinophysis* (ENRENBURG, 1839) na Enseada de Cabeçudas (Verão e Outono de 1999). *Notas Técnicas Facimar*, 4, 49-59.
- Silva, C. R., Lemieszec, M. B., Ferreira, J. F., Ribeiro, R. H. C., Creppy, E., & Matias, W. G. 2001. Genotoxicidade do Ácido Okadaico. *Biotecnologia e Desenvolvimento*, 20, 56-59.
- Smayda, T. J. 2002. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *Journal of Oceanography*, 58(2), 281-294.
- Smayda, T. J. 2007. Reflections on the ballast water dispersal—harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae*, 6(4), 601-622.
- Souza, J. C. R., Barros, G. C., Silva, P. P. O., Ferreira, V. M., & Oliveira, G. M. 2007. Primeira detecção de ácido okadaico em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas no canal de Santa Cruz, Itapissuma, Pernambuco. *Revista Higiene Alimentar*, 21(149), 17-21.
- Suzuki, T., Igarashi, T., Ichimi, K., Watai, M., Suzuki, M., Ogiso, E., & Yasumoto, T. 2005. Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science*, 71(4), 948-95.
- Svensson, S. 2003. Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture*, 218(1-4), 277-291.
- Svensson, S., & Förlin, L. 2004. Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology*, 66(4), 405-418.
- Ten-Hage, L., Robillot, C., Turquet, J., Gall, F., Caer, J. P., Bultel, V., Guyot, M., & Molgó, J. 2002. Effects of toxic extracts and purified borbotoxins from *Prorocentrum borbonicum* (Dinophyceae) on vertebrated muscular junctions. *Toxicon*, 40(2), 137-148.
- Ten-Hage, L., Delaunay, N., Pichon, V., Coute, A., Puiseux-Dao, S., & Turquet, J. 2000. Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (Dinophyceae) isolated from Europa Island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean). *Toxicon*, 38(8), 104-1054.
- Torgersen, T., Aasen, J., & Aune, T. 2005. Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (*Cancer pagurus*) in Norway. *Toxicon*, 46(5), 572-578.
- Toyofuku, H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin*, 52(12), 1735-1745.
- Vale, P. 2006. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins, part II: Offshore bivalve species. *Toxicon*, 47(2), 163-173.
- Vale, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon*, 44(2), 123-134.
- Vale, P., & Sampayo, M. A. M. 2002a. Esterification of DSP Toxins by Portuguese Bivalves from the Northwest Coast Determined by LC-MS – a Widespread Phenomenon. *Toxicon*, 40(1), 33-42.
- Vale, P., & Sampayo, M. A. M. 2002b. First confirmation of human diarrhoeic poisonings of okadaic acid esters after ingestion of razor clam (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon*, 40(7), 989-996.
- Vale, P., & Sampayo, M. A. M. 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37(8), 1109-1121.
- Vershinin, A., Moruchkov, A., Morton, S. L., Leighfield, T. A., Quilliam, M. A., & Ramsdell, J. S. 2006. Phytoplankton composition of the Kandalaksha Gulf, Russian White Sea: *Dinophysis* and lipophilic toxins in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Harmful algae*, 5(5), 558-564.
- Windust, A. J., Wright, J. L. C., & McLachlan, J. L. 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. *Marine Biology*, 126(1), 19-25.
- 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. *Bulletim of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46(11), 1405-1411.
- Zeldis, J., Robinson, K., Ross, A., & Hayden, B. 2004. First observations of predation by New Zealand Greenshell mussels (*Perna canaliculus*) on zooplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311(2), 287-299.
- Zingone, A. 2013. Dinoflagellates - Ordem Dinophysiales. In: Ø. Moestrup (Ed.), 2013. IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Retirado de <http://www.marinespecies.org/HAB>.

Submetido em: 03/06/2014

Aceito em: 07/08/2014