

**MÁRCIA BONOW LEMIESZEK**

**ESTUDO DA BIOACUMULAÇÃO E ELIMINAÇÃO DO ÁCIDO  
OCADÁICO, PRODUZIDO PELO DINOFLAGELADO  
*Prorocentrum lima*, EM MEXILHÕES DA ESPÉCIE  
*Perna perna* (MOLLUSCA:BIVALVIA)**

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Engenharia Ambiental da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do título  
de Mestre em Engenharia  
Ambiental.  
Orientador: Dr. William Gerson  
Matias

**Florianópolis**  
**Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental**  
**2000**

**“ESTUDO DE BIOACUMULAÇÃO E ELIMINAÇÃO DO ÁCIDO OKADAICO,  
PRODUZIDO PELO DINOFLAGELADO *Prorocentrum lima*, MEXILHÕES DA  
ESPÉCIE *Perna perna*(MOLLUSCA: BIVALVIA)**

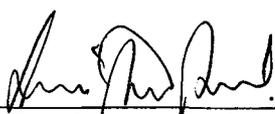
MÁRCIA BONOW LEMIESZEK

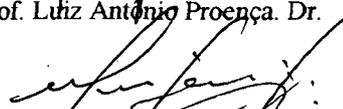
Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

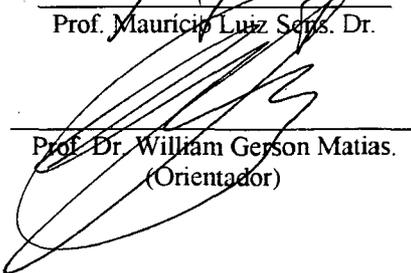
**MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL**  
na Área de Tecnologias de Saneamento Ambiental

Aprovado por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr  
(Coordenador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Luiz Antonio Proença, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Mauricio Luiz Sene, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. William Gerson Matias.  
(Orientador)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL  
MARÇO/2000

## AGRADECIMENTOS

Agradeço muito especialmente ao professor William Gerson Matias, orientador deste trabalho de Mestrado, quem com seus inestimáveis conselhos e comentários fez possível a realização do mesmo.

Ao Laboratório de Oceanografia Biológica do CTT-Mar, UNIVALI (Itajaí-SC), na pessoa do professor Luis Antonio Proença, pelas cepas de *Prorocentrum lima* e meios de cultivo cedidos, assim como pelo seu apoio, ajuda e orientação na realização das análises em CLAE.

Ao Laboratório de Cultivo de Mariscos Marinhos da UFSC, na pessoa do professor Jaime Fernando Ferreira, por sua colaboração ao ceder os exemplares de mexilhões *Perna perna* e algas *Chaetoceros* sp, utilizados nos ensaios.

Ao Dr. Joachim Knie, coordenador do Projeto FATMA- GTZ, por suas sugestões e amizade constantes.

Ao Dr. José Benedicto Albadejo, do Instituto Espanhol de Oceanografia, por suas interessantes informações.

A minha colega e amiga Cátia Regina Silva por sua ajuda, disponibilidade e colaboração permanente na realização dos ensaios.

Aos colegas e funcionários do LIMA (Laboratório Integrado do Meio Ambiente), especialmente a Nico, Márcio e Carlos, por sua disponibilidade e apoio.

Ao LIMA, Laboratório Integrado do Meio Ambiente, na pessoa do professor Maurício Sens, pelo auxílio obtido, permitindo a realização deste trabalho de Mestrado.

Aos funcionários da FATMA (Fundação do Meio Ambiente- SC), com menção especial a Esther, Anne e Beto, os quais possibilitaram a execução dos ensaios com bactérias luminescentes.

A FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental- RS) que, liberando-me de minhas obrigações profissionais, permitiu a realização deste trabalho de Mestrado.

A minha querida mãe e ao meu querido filho Rodrigo, a minhas irmãs, Lígia, Heloisa e Marisa que, junto com suas famílias, ainda que a distância, me apoiaram a todo momento.

Ao meu querido Pedro Antonio que, com seu carinho, paciência e ajuda, me auxiliou de modo tão especial na conclusão deste trabalho.

Minha gratidão sem limites e minha recordação constante ao meu querido pai, Felício Lemieszek, que, com seu exemplo, soube infundir em mim valores tão sublimes como a honradez, a dignidade e o amor pelo trabalho bem feito.

---

## SUMÁRIO

LISTA DE ANEXOS -----	vii
LISTA DE FIGURAS -----	ix
LISTA DE TABELAS -----	xi
RESUMO -----	xii
SUMMARY -----	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO -----</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----</b>	<b>4</b>
2. 1 Problemática das florações tóxicas -----	4
2. 1. 1 Os efeitos das florações tóxicas -----	9
2. 2 Os Dinoflagelados -----	11
2. 2. 1 <i>Prorocentrum lima</i> -----	13
2. 3 Síndrome Diarréica por Consumo de Mariscos (DSP) -----	16
2. 4 Ácido ocadaico (AO) -----	17
2. 4. 1 Métodos de análise do Ácido Ocadaico -----	20
2. 5 Mexilhão <i>Perna perna</i> -----	21
2. 5. 1 Bioacumulação em mexilhões -----	26
2. 6 Bactéria <i>Vibrio fischeri</i> -----	28
<b>3. OBJETIVOS -----</b>	<b>30</b>
3. 1 Objetivo Geral -----	30
3. 2 Objetivos Específicos -----	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS -----</b>	<b>31</b>
4. 1 Materiais -----	31
4. 1. 1 Produtos químicos -----	31

4. 1. 1. 1 Produtos químicos para CLAE -----	31
4. 1. 1. 2 Produtos químicos para preparação de meios de cultivo -----	31
4. 1. 2 Produtos biológicos -----	32
4. 1. 2. 1 Animais -----	32
4. 1. 2. 1. 1 Mexilhão <i>Perna perna</i> -----	32
4. 1. 2. 1. 2 Dinoflagelado <i>Prorocentrum lima</i> -----	32
4. 1. 2. 1. 3 Algas <i>Chaetoceros</i> sp -----	33
4. 1. 2. 1. 4 Bactéria <i>Vibrio fischeri</i> -----	33
4. 1. 2 Equipamentos -----	34
4. 1. 2. 1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) -----	34
4. 1. 2. 2 Lumistox® -----	34
4. 1. 2. 3 Microscópio -----	35
4. 2 Métodos biológicos -----	35
4. 2. 1 Cultivo de <i>Prorocentrum lima</i> -----	35
4. 2. 2 Coleta de mexilhões <i>Perna perna</i> -----	36
4. 2. 3 Preparação das concentrações de <i>P. lima</i> utilizadas nos ensaios -----	39
4. 2. 4 Procedimento dos ensaios -----	41
4. 2. 4.1 Teste de toxicidade aguda com mexilhão <i>P. perna</i> -----	41
4. 2. 4. 2 Teste de toxicidade aguda com fotobactérias -----	42
4. 2. 4. 3 Teste de bioacumulação do ácido ocadaico -----	43
4. 2. 4. 4 Teste de bioacumulação e eliminação do ácido ocadaico -----	44
4. 3 Métodos físico-químicos -----	46
4. 3. 1 Extração do ácido ocadaico a partir de amostras biológicas -----	46
4. 3. 1. 1 Preparação das amostras -----	49

4. 3. 1. 1. 1	Preparação das amostras dos hepatopâncreas-----	49
4. 3. 1. 1. 2	Preparação das amostras de carne -----	49
4. 3. 1. 1. 3	Preparação das amostras de fezes -----	49
4. 3. 1. 1. 4	Preparação das amostras de células de <i>Prorocentrum lima</i> -----	50
4. 3. 1. 2	Extração do ácido ocadaico em material biológico -----	50
4. 3. 1. 2. 1	Extração do ácido ocadaico nos hepatopâncreas dos mexilhões -	50
4. 3. 1. 2. 2	Extração do ácido ocadaico na carne dos mexilhões-----	51
4. 3. 1. 2. 3	Extração do ácido ocadaico em células de <i>P. lima</i> -----	51
4. 3. 1. 2. 4	Extração do ácido ocadaico nas fezes de mexilhões-----	52
4. 3. 1. 3	Derivatização das amostras -----	53
4. 3. 1. 4	Limpeza das amostras -----	53
4. 3. 1. 5	Ressuspensão das amostras-----	54
4. 3. 1. 6	Preparação das amostras para injeção em CLAE -----	54
4. 3. 1. 7	Dosagem do ácido ocadaico através de CLAE -----	54
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO -----</b>	<b>55</b>
5. 1	Teste de toxicidade aguda com <i>P. perna</i> -----	55
5. 2	Teste de toxicidade aguda com fotobactérias -----	57
5. 3	Teste de bioacumulação do ácido ocadaico -----	58
5. 4	Teste de bioacumulação e eliminação do ácido ocadaico-----	66
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES -----</b>	<b>73</b>
ANEXOS -----		76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS-----		136

---

## ANEXOS

**ANEXO 1:** Relatórios dos testes de toxicidade aguda com *Vibrio fisheri*

**ANEXO 2:** Cromatogramas das análises em CLAE

**ANEXO 3:** Limites máximos permitidos do conteúdo de toxinas de DSP em moluscos (LUCKAS, 1992).

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Evolução da produção de mexilhões do estado de Santa Catarina.(EPAGRI, 1999)-----	3
<b>Figura 2:</b> Impacto das florações tóxicas na cadeia alimentar-----	8
<b>Figura 3:</b> <i>Prorocentrum lima</i> em cultivo -----	15
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do ácido ocadaico-----	18
<b>Figura 5:</b> Derivatização do ácido ocadaico e DTX1 com ADAM -----	21
<b>Figura 6:</b> Mexilhão <i>Perna perna</i> -----	25
<b>Figura 7:</b> Manutenção de <i>Chaetoceros</i> sp em laboratório-----	33
<b>Figura 8:</b> Cultivo de <i>Prorocentrum lima</i> -----	36
<b>Figura 9:</b> Localização do ponto de coleta de mexilhões, em Sambaqui, Florianópolis, Santa Catarina -----	38
<b>Figura 10:</b> Manutenção dos mexilhões em laboratório -----	39
<b>Figura 11:</b> Soluções de <i>P. lima</i> utilizadas nos ensaios -----	40
<b>Figura 12:</b> Teste de bioacumulação do ácido ocadaico-----	44
<b>Figura 13:</b> Teste de bioacumulação e eliminação do ácido ocadaico -----	45
<b>Figura 14:</b> Esquema Geral da Extração, Esterificação e Dosagem do Ácido Ocadaico em CLAE baseado em Lee et al. 1987 -----	48
<b>Figura 15:</b> Concentração AO encontrada nos hepatopâncreas dos mexilhões nos três ensaios realizados -----	65
<b>Figura 16:</b> Média da concentração AO obtida nos três ensaios-----	66
<b>Figura 17:</b> Concentração de AO nos hepatopâncreas e fezes dos mexilhões estudados -----	6

**Figura 18:** Presença de carapaças vazias e células de *P. lima* verificada nas fezes dos mexilhões----- 70

---

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Propriedades físico-químicas do ácido ocadaico, DTX1 e DTX2 ---- 20

**Tabela 2:** Valores de mortalidade de *P. perna* em função da concentração de

*P. lima*-----56

**Tabela 3:** Média e desvio padrão dos valores de pH, OD (oxigênio dissolvido) e temperatura da água monitorizados durante o teste de toxicidade aguda ----- 57

**Tabela 4:** Valores de pH, OD e temperatura medidos durante os três ensaios realizados ----- 63

**Tabela 5:** Concentração de AO das amostras realizadas obtidas nos três testes realizados ----- 64

**Tabela 6:** Concentração de AO nos hepatopâncreas (ng/g) e nas fezes (ng/mexilhão) encontradas nos mexilhões no teste de bioacumulação e eliminação do AO ----- 67

---

## RESUMO

Nos últimos anos, o fenômeno conhecido como “maré vermelha”, caracterizado por uma massiva proliferação de organismos pertencentes ao fitoplâncton que podem ser tóxicos, tem gerado problemas ambientais, econômicos e de saúde pública.

Embora eventos de florações de algas tóxicas sejam considerados fenômenos naturais, nas últimas décadas esses eventos têm se tornado cada vez mais freqüentes. Existem algumas hipóteses que tentam explicar o aumento aparente da freqüência desses eventos, porém não existe dúvida de que as atividades humanas têm influenciado na expansão desses fenômenos.

Freqüentemente, os moluscos que se alimentam de organismos produtores de toxinas não são afetados, mas acumulam as toxinas no seu organismo. Essas toxinas podem, subseqüentemente, ser transmitidas ao homem através do consumo de frutos-do-mar contaminados, tornando-se, assim, uma ameaça à Saúde Pública.

Uma das síndromes transmitidas pelo consumo de moluscos é conhecida como “Envenenamento Diarréico por Consumo de Mariscos”, DSP, que se caracteriza por ser um grave distúrbio gastrointestinal.

O ácido ocadaico (AO), a principal toxina de DSP produzida por dinoflagelados, ao acumular-se no hepatopâncrea de mexilhões e ostras, causa a síndrome diarréica em consumidores. Além disso, ele também é conhecido como sendo um potente promotor de tumores.

O objetivo deste trabalho foi estudar, utilizando as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a bioacumulação e a

eliminação do ácido ocadaico, produzido pelo dinoflagelados da espécie *Prorocentrum lima* em mexilhões da espécie *Perna perna*, a fim de conhecer os mecanismos de acumulação e eliminação dessa toxina, visando a obter dados para diminuir os riscos de contaminação humana.

Em ensaios de laboratório, foi comprovado que o ácido ocadaico convertia em tóxicos os mexilhões *P. perna*, alimentados com o dinoflagelado.

Mediante as análises dos hepatopâncreas e das fezes dos mexilhões, objetos do estudo, foi investigada a acumulação e a eliminação do ácido ocadaico nos moluscos, verificando-se que a concentração da toxina no organismo dos mexilhões foi proporcional à quantidade de células de *P. lima* disponíveis.

Esses ensaios também demonstraram a rápida eliminação de AO. Após 48 horas da substituição da alimentação dos moluscos com o *P. lima* por *Chaetoceros* sp, o AO deixou de ser detectado nas amostras analisadas.

---

## SUMMARY

In recent years, the red tide phenomenon, consisting of a massive bloom of phytoplankton organisms, which may be toxic, has reached great importance. It has generated environmental, economic and public health problems.

Toxic algae blooms are considered natural phenomena, however, in the last decades such events have become more frequent. Many explanations have evolved trying to explain the higher number of these events, however no doubts remain about the influence of human activities on them.

Molluscs often feeding on toxin producing organisms are not affected by them, but accumulate toxins in their bodies. Such toxins, thereafter, can be transferred to humans through contaminated seafood consumption, configuring a threat to Public Health.

One of the syndromes generated through the consumption of shellfish is known as "Diarrhetic Shellfish Poisoning", DSP, which is a disease that produces a strong gastrointestinal malfunction.

Okadaic acid is the main toxin produced by dinoflagellates and accumulates in the digestive gland of oysters and shellfish. It produces diarrhetic syndromes in consumers. Besides, it is also known as a strong tumor promoter.

Under this subject, using High-Performance Liquid Chromatography techniques (HPLC), the main goal of this work was to evaluate the bioaccumulation and elimination of the okadaic acid produced by the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in mussels of the *Perna perna* species. A

better understanding of the toxic action of the toxin was investigated, in order to obtain data directed to reduce contamination risks to humans.

Through this procedure, using laboratory assays, it has been shown that okadaic acid has turned *P. perna* toxic after being fed with the dinoflagellates.

Through the analysis of the digestive glands and the feces produced by the mussels, the kinetic of accumulation and elimination of okadaic acid has been investigated. The concentration of the toxin in the body of the mussels was proportional to the amount of available *P. lima* cells.

The assays also demonstrated a rapid elimination of okadaic acid. Forty eight hours after changing shellfish diet from *P. lima* to *Chaetoceros* sp, the digestive glands have shown no more presence of okadaic acid.

---

## 1 INTRODUÇÃO

No litoral de muitos países, um fenômeno associado a microalgas plantônicas gera problemas ambientais, econômicos e de Saúde Pública. Este fenômeno se caracteriza por uma massiva proliferação ou floração periódica e inexplicável de algas produtoras de toxinas (ANDERSON, 1994).

De fato, certos organismos produzem toxinas que provocam tanto lesões ou queimaduras cutâneas como consequência de um contato com a pele dos banhistas, como perturbações digestivas ou nervosas mais ou menos graves devidas ao consumo de frutos-do-mar contaminados. Essas proliferações levam à contaminação de bivalves e constituem, portanto, um problema de Saúde Pública com importantes repercussões econômicas associadas a proibição de venda dos produtos contaminados (MATIAS, 1996)

Segundo muitos especialistas, esses "blooms" ou florações têm-se tornado cada vez mais graves e freqüentes. O número de casos devido a espécies nocivas, os danos e acidentes causados, os tipos de toxinas e de espécies tóxicas e o número de produtos contaminados aparentemente aumentaram (MARGALEF, 1998).

De fato, em 1990, na região de Florianópolis, algumas pessoas sofreram de problemas gastrointestinais e diarreia em consequência do consumo de moluscos (ZENEBO e PREGNOLATTO, 1992). As análises de plâncton e os ensaios biológicos com camundongos evidenciaram o envenenamento devido ao consumo de mexilhões. Posteriormente, o ácido ocadaico, a principal toxina do "Envenenamento diarréico por consumo de moluscos" (DSP), também

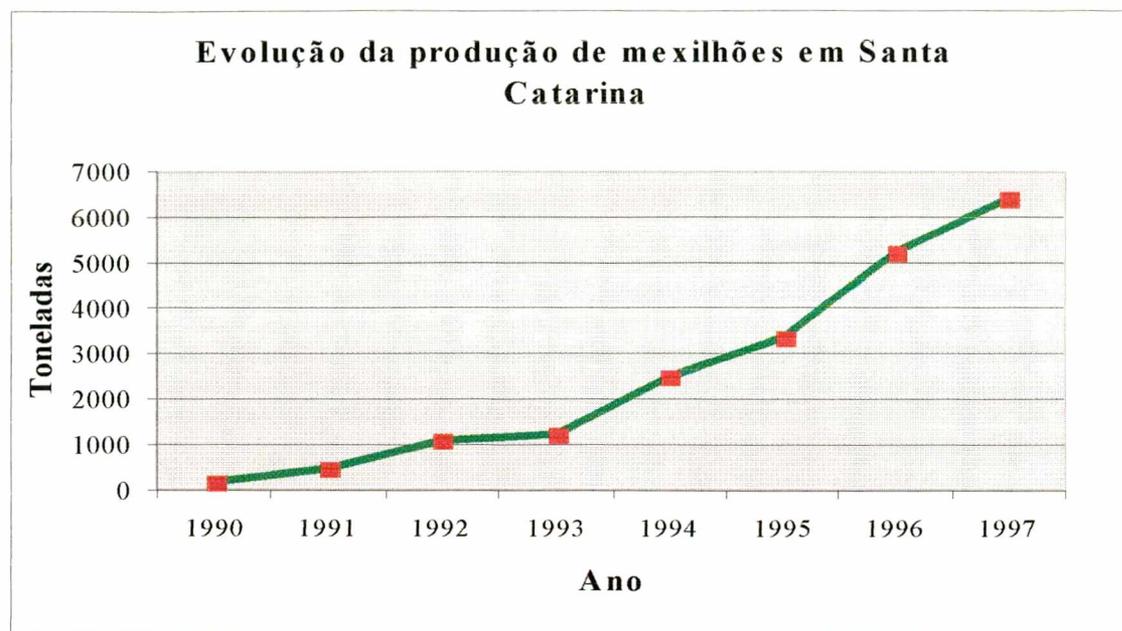
conhecida como um potente promotor de tumores, foi encontrado em moluscos de cultivo (PROENÇA e col., 1996).

Atualmente, no litoral catarinense, o risco de possíveis intoxicações devido a toxinas causadoras de DSP aumenta proporcionalmente à expansão das áreas de cultivo de moluscos bivalves associado a um aumento do consumo (MATIAS, 1999; PROENÇA e RÖRIG, 1995).

A mitilicultura em Santa Catarina foi iniciada pelos produtores no ano de 1989, sendo cultivada a espécie nativa de mexilhão *Perna perna*, habitante dos costões rochosos. Os resultados alcançados, altamente positivos, têm motivado inúmeras famílias pesqueiras e pequenos produtores a ingressar na atividade.

Atualmente, o Estado destaca-se como o maior produtor nacional de mexilhões cultivados, sendo os principais municípios produtores: Palhoça, Governador Celso Ramos, Bombinhas, Penha e Florianópolis. (EPAGRI, 1997).

A evolução da produção de mexilhões cultivados em SC "in natura" pode ser observada na Figura 1, onde se pode apreciar um aumento considerável e constante da sua produção.



**Figura 1:** Evolução da produção de mexilhões (*Perna perna*) no estado de Santa Catarina.(EPAGRI, 1997).

Este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de acumulação e eliminação do ácido ocadaico em mexilhões da espécie *P. perna*, visando à obtenção de subsídios científicos para diminuir os riscos de contaminação dos consumidores.

Esta investigação, que deve ser considerada o prelúdio de estudos mais aprofundados com vistas a confirmar e estender os resultados obtidos, foi levada a cabo sob a orientação do Professor Doutor William Gerson Matias, no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Problemática das florações tóxicas

As florações algais são um fenômeno natural conhecido há muito tempo. Alvar Nuñez Cabeza de Vaca, que parece ser quem deu o nome à Ilha Ratones (Florianópolis- Santa Catarina), na sua obra "Naufrágios", escrita entre 1537 e 1540, referindo-se a um lugar situado ao largo da costa norte do Golfo do México, fala dos costumes do povo indígena e de como relacionavam as estações e a passagem do tempo com a morte dos peixes: "entienden y saben las diferencias de los tiempos cuando las frutas vienen a madurar, y el tiempo en que muere el pescado", uma mortalidade que poderia haver sido causada, tanto antes como agora, pela ação tóxica de *Gymnodinium breve* (MARGALEF, 1998).

Em 1535, Hernán Cortés batizou o Golfo de California com o nome de "Mar Bermejo", por causa da coloração vermelha e da luminescência que em ocasiões mostravam suas águas (MARTÍNEZ e HERNÁNDEZ, 1991).

As florações algais, ou "marés vermelhas", que se caracterizam pelo aparecimento na água de uma coloração superficial, parda ou avermelhada, com formas muito variadas ainda que com muita frequência formando estrias, são produzidas por uma aglomeração de grandes quantidades de células fitoplantônicas do grupo dos dinoflagelados e, em certas circunstâncias, são originadas por organismos pertencentes a outros grupos, tais como euglenales, cianobactérias ou ciliados (CASABELLAS, 1991).

Nos eventos de florações algais, o fitoplâncton pode se multiplicar rapidamente e crescer excessivamente em número, podendo vir a somar vários milhares por litro. Em alguns casos, essas espécies proliferam de tal maneira, que passam a dominar a comunidade planctônica, alterando assim a cor da água através de seus pigmentos.

Certos dinoflagelados vermelhos, como *Mesodinium rubrum*, tornam a água vermelha, daí o nome maré vermelha. Porém, a água pode adquirir uma tonalidade esbranquiçada, se o organismo for a cianobactéria *Trichodesmium*, ou amarronzada como no caso da acumulação de diatomáceas na zona de arrebentação de certas praias (REGUERA e col., 1997). O massivo crescimento de organismos pertencentes ao fitoplâncton pode ocasionar uma absorção excessiva de nutrientes da água, principalmente o oxigênio dissolvido, podendo causar a morte da fauna e flora ali existentes (SMAYDA, 1992).

O termo “maré vermelha” é utilizado amplamente para especificar florações algais, já que espécies não tóxicas também podem se proliferar maciçamente causando alterações da cor da água, porém sem nenhum outro efeito adverso ao ecossistema. Reciprocamente existem também espécies produtoras de potentes toxinas que, mesmo ocorrendo em pequena concentração celular e não causando nenhuma alteração na água que os rodeia, podem ser responsáveis por efeitos adversos sobre outros organismos, SHUMWAY, (1990). Algumas dessas toxinas ficam retidas no fitoplâncton, podendo, assim, ser assimiladas pela cadeia trófica e, conseqüentemente, acumular-se em certos organismos (LASSUS, 1989). Algumas toxinas

produzidas por essas microalgas são consideradas entre as mais potentes toxinas conhecidas pelos homens (STEIDINGER, 1993).

Algumas espécies de dinoflagelados produzem toxinas que podem causar alterações na estrutura trófica marinha, através de efeitos adversos em larvas e em outros estágios de desenvolvimento de organismos marinhos, podendo causar também a morte de mamíferos marinhos, de aves marinhas e de outros animais (LASSUS, 1991), (Figura 2).

É de consenso geral um aparente aumento da frequência e virulência de florações de algas tóxicas (MARGALEF, 1998). Segundo HALLEGRAEF (1993), existem quatro explicações para o aumento das florações de algas tóxicas em nível mundial: 1) melhor conhecimento científico das espécies tóxicas; 2) maior utilização de águas costeiras para aquicultura; 3) florações de plâncton decorrentes da eutrofização antropogênica ou por condições climáticas extraordinárias; 4) transporte de cistos de resistência, levados por água de lastro de embarcações, associados com as translocações de mexilhões de uma área para outra, (PROENÇA e *col.*, 1999).

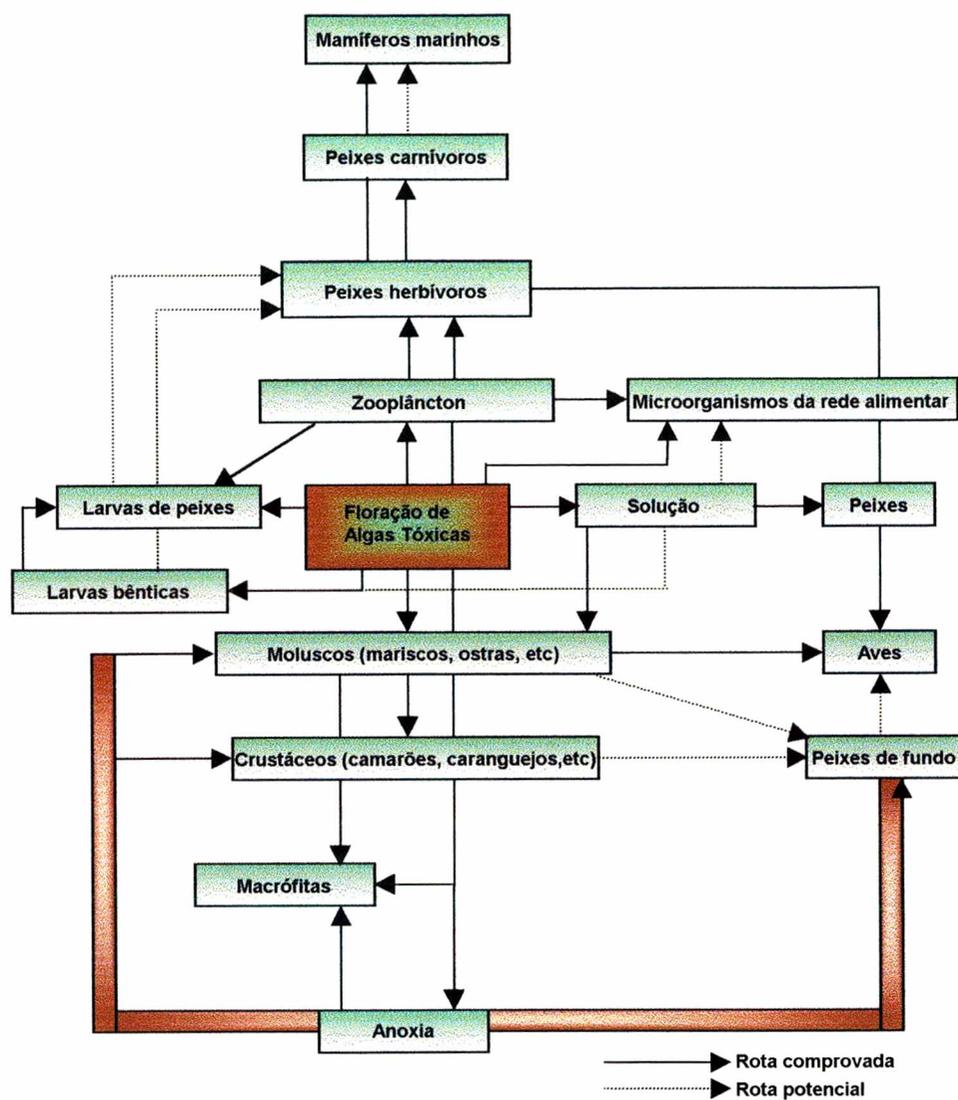
A aparição de “marés vermelhas” se deve, geralmente, a dois tipos de fenômenos: à importante multiplicação de organismos planctônicos, favorecida por fatores hidrológicos, climáticos e químicos e a uma concentração desses organismos, devida, geralmente, a fatores físicos, meteorológicos e hidrológicos (BERTHOMÉ e *col.*, 1985).

As florações de algas aparecem após um período prolongado de altas temperaturas, tanto do ar como da água, que coincide com a ausência de agitação da massa de água. Este período não corresponde necessariamente

ao período mais quente do ano, mas a um período de aumento regular e rápido da temperatura das águas (LASSUS, 1989; ANDERSON, 1994).

Outros fatores que podem contribuir para a produção do fenômeno segundo LASSUS, 1989 e BELIN e *col.*, 1989, são:

- diminuição da salinidade devido a uma forte pluviosidade;
- pouca circulação de água;
- ressurgências, que aumentam a eutrofização local;
- estratificação prolongada das águas (aquecimento da camada superficial);
- diminuição da disponibilidade de nitrogênio e fósforo no meio;
- alterações na composição do plâncton e contaminação por certos poluentes.



**Figura 2:** Modelo demonstrando o possível impacto das florações de organismos tóxicos através da transferência das toxinas nos vários compartimentos da cadeia trófica. As flechas demonstram as rotas diretas e indiretas através das quais as toxinas podem impactar os diferentes níveis tróficos (SMAYDA, 1992).

## 2.1. 1 Os efeitos das florações tóxicas

Esses eventos, caracterizados pela presença de organismos tóxicos nas águas, podem ser descritos como:

- As marés vermelhas contêm organismos dotados de locomoção que estão amplamente distribuídos ao longo das águas costeiras e mares de águas temperadas, com estágios de formação de cistos de resistência que se depositam nos sedimentos e, de tempos em tempos, aumentam de população, formando novamente um evento de maré vermelha.
- A Ciguatera, que é um problema que está ativo todo o ano, é consequência de organismos bentônicos, principalmente fixos nos sedimentos, rochas e vegetação do fundo de mares, em águas relativamente quentes e de baixas latitudes (MARGALEF, 1998).

Se as marés vermelhas podem ser consideradas como uma situação aguda, a Ciguatera pode ser descrita como uma situação crônica devido à persistência das populações bênticas, compostas de células tóxicas ativas. Essas populações vivem fixas sobre substratos, localizados em ambientes iluminados e com condições estáveis em presença de nutrientes, como ocorre em mares de águas quentes. Espécies de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum*, *Exuviaella* e *Ostreopsis*, presentes nessas condições, são altamente tóxicas. Peixes contaminados pelas toxinas produzidas por estes organismos são perigosos para o consumo humano (MARGALEF, 1998).

BRICELJ e col., 1993, sugeriram a possibilidade de que, através da constante filtração dos moluscos, os organismos tóxicos seriam transferidos, juntamente com os biodepósitos (fezes e pseudofezes), da coluna de água

para o fundo do mar. Esse processo poderia influenciar na duração e recorrência das florações algais (LAABIR *et al.*, 1999).

As florações de organismos tóxicos ocorrem em todas as partes do mundo e são comuns em locais de cultivo de mexilhões, tornando-se uma ameaça para a Saúde Pública. As toxinas associadas a essas florações são muito potentes e os mexilhões, que são organismos filtradores, podem acumular estas células produtoras de toxinas durante a sua alimentação. Isso faz com que os mexilhões se tornem vetores de enfermidades causadas por várias formas de envenenamento de mariscos, como envenenamento paralisante por consumo de mariscos (PSP – “Paralytic shellfish poisoning”), envenenamento amnésico por consumo de mariscos (ASP – “Amnesic shellfish poisoning”), envenenamento neurotóxico por consumo de mariscos (NSP – “Neurotoxic shellfish poisoning”) e envenenamento diarréico por consumo de mariscos (DSP – “Diarrhetic shellfish poisoning”) (TACHIBANA *et al.*, 1981; YASUMOTO *et al.*, 1985). De todos os moluscos consumidos, provavelmente os mexilhões sejam a maior ameaça com respeito à “Síndrome diarréica por consumo de mariscos” (SHUMWAY, 1992).

As florações tóxicas de algas marinhas tem sido ser correlacionadas com um desequilíbrio ecológico como consequência da poluição. Desde há alguns anos, no litoral de certos países, um fenômeno ligado às microalgas do plâncton, produtoras de toxinas, gera problemas ambientais, econômicos e de saúde pública (MATIAS, 1996). Certas microalgas produzem toxinas que provocam lesões ou queimaduras cutâneas como consequência do contato com a pele dos banhistas, distúrbios digestivos ou de tipo nervoso, mais ou

menos graves, devido à ingestão de moluscos contaminados (mexilhões, ostras, etc.), (MATIAS, 1999).

## 2. 2 Os Dinoflagelados

Das 3910 espécies conhecidas do fitoplâncton marinho, 999 são diatomáceas e 1772 são dinoflagelados, dos quais, em torno de 40 espécies são responsáveis por fenômenos de florações algais, tóxicas ou não (SUBBARAO e col., 1995).

Os dinoflagelados são organismos unicelulares, microscópicos, de tamanho variável (30 a 100 micras) e vivem em diversos tipos de habitats. Cerca da metade dos dinoflagelados existentes são fotossintéticos, produzem clorofilas e pigmentos acessórios, sendo organismos autotróficos ou auxotróficos (STEIDINGER, 1993).

Os dinoflagelados são organismos unicelulares primitivos e, basicamente, produtores primários. Eles estão entre os organismos mais complexos por sua organização e estilo de vida. Além disso, são especialmente hábeis em provocar uma “guerra química” (MARGALEF, 1998).

Do ponto de vista humano, o seu efeito nocivo pode apresentar-se de duas maneiras:

- De um modo crônico, correspondendo a organismos bentônicos que estão distribuídos nos mares de águas quentes (Ciguatera). O homem contrai Ciguatera ingerindo peixes que acumularam essas toxinas através da cadeia trófica.
- No aparecimento descontínuo de florações em águas temperadas.

Dada a intermitência da maioria desses eventos, a necessidade dos dinoflagelados de garantir sua sobrevivência e a capacidade de rápida propagação, alguns desses organismos desenvolveram a capacidade de produzir cistos, que podem se manter em estado de dormência, com paredes celulares de extraordinária resistência (MARGALEF, 1998).

Em geral, os organismos unicelulares, pertencentes ao fitoplâncton, proliferam e são limitados pela quantidade de luz e nutrientes que, retirados do meio, se convertem em material celular. Acredita-se que as florações de dinoflagelados são controladas por variáveis abióticas (estratificação da coluna de água, ventos, marés e correntes, luz, temperatura e outras características hidrogeográficas) e por fatores nutricionais (eutrofização, micro e macro-nutrientes) (AGUILERA *et al.*, 1998; MATIAS, 1996).

Assexuadamente, os dinoflagelados se dividem por fissão binária ao longo de linhas geneticamente determinadas. Sexualmente, eles produzem isogametas ou anisogametas que se fundem e formam o planozigoto. Depois, ao menos na maioria das espécies que têm um ciclo sexual, o planozigoto se torna o hipnozigoto. O hipnozigoto é um cisto de resistência, tipicamente imóvel, que deve passar por um período obrigatório de dormência (STEIDINGER, 1993).

Nem todos os dinoflagelados produzem cistos de resistência ou hipnozigotos, mas as espécies que mais provavelmente os geram são as que produzem florações recorrentes em estuários e águas costeiras. Cistos dispostos sobre o fundo do mar podem se dividir mitoticamente e propagar-se através da coluna de água com um grande número de células móveis,

competindo, assim, com a comunidade fitoplantônica existente. Isso se torna possível se prevalecerem as condições ambientais favoráveis, se os cistos forem viáveis, se não se encontrarem enterrados no sedimento de fundo com profundidade maior do que 10 cm e, também, se os cistos se encontram no final do seu ciclo de dormência, prontos para germinar e iniciar a fotossíntese. Se essa espécie for tóxica, esse tipo de ciclo de vida pode levar a um evento de floração tóxica (STEIDINGER, 1993).

Isolamento geográfico, condições ambientais, composição e abundância de outros componentes do fitoplâncton concorrente podem determinar variações na composição e nos níveis de concentração das toxinas em diferentes espécies de dinoflagelados. Isso não ocorre unicamente com DSP, porque similar variabilidade de toxina ocorre em PSP e Ciguatera. A variabilidade das toxinas (concentração) pode apresentar problemas nos programas de monitorização, particularmente se o fechamento de estações de cultivo se baseia no aparecimento e na abundância de espécies tóxicas suspeitas em lugar da presença de toxinas nos moluscos (SAMPAYO e col., 1990).

### **2. 2. 1 *Prorocentrum lima***

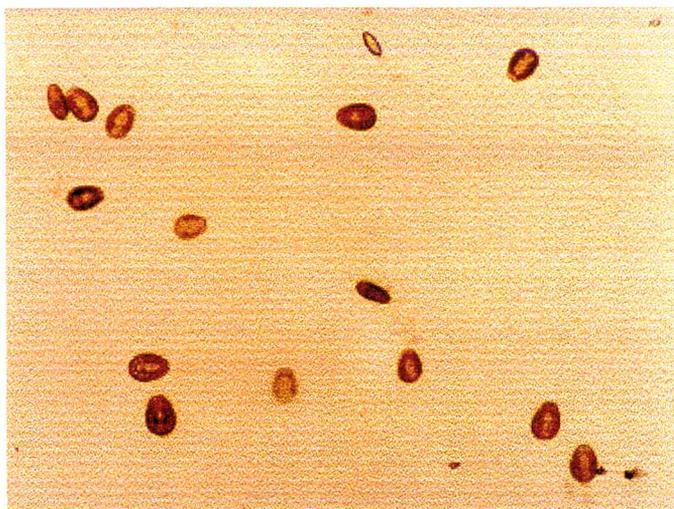
*Prorocentrum lima* (EHRENBERG) (Figura 3) é uma espécie de dinoflagelado bêntico, fotossintético, mundialmente distribuído, encontrado tanto nas regiões de águas frias como nas de águas quentes. Foi detectado em regiões tropicais e, menos freqüentemente e em menores concentrações, em regiões temperadas. Esse dinoflagelado possui uma teca celulósica espessa e lisa. Seus dois flagelos são diferentes e estão alojados perpendicularmente

(SOURNIA e col., 1991). O auxílio dos flagelos na mobilidade desses organismos é muito importante. Dessa forma, em períodos de ausência de ventos no mar, podem locomover-se ativamente na coluna d'água. Estudos com 24 horas de amostragem revelaram uma fotoatividade positiva dessa espécie (DURAND-CLEMENT e col., 1988).

Esse dinoflagelado produz o ácido ocadaico e seus derivados (DTX), os quais foram implicados no envenenamento diarréico por consumo de mariscos (DSP), (RAUSCH DE TRAUBENBERG e col., 1995; BAUDER e col., 1996). Essa espécie é amplamente utilizada para produção de padrões "in vitro". A influência das condições de cultivo na produção de toxinas tem sido pouco investigada, apesar das possíveis aplicações no aperfeiçoamento das técnicas da produção de padrões (SOHET, 1995).

Em experimentos realizados por AGUILERA e col., 1998, verificou-se que a taxa de crescimento de *P. lima*, aclimatado em cultivo axênico, em presença de AO, se triplicou, o que não ocorreu com outras espécies de dinoflagelados como o *P. minimum*, *Gyrodinium impudicum*, *Alexandrium minutum* e *Gymnodinium catenatum*.

Desde que o *P. lima* é um dinoflagelado epífito, ele precisa ser ressuspensão na coluna de água para que os moluscos possam ingerir estas células e acumular as toxinas. Isto pode acontecer tanto pela ressuspensão do bentos ou pela agitação da macroalgas fixas nas cordas de cultivo (LAWRENCE e col., 1998).



**Figura 3:** *Prorocentrum lima* em cultivo, aumento de 400 x.

Os organismos epibênticos podem ser importantes na toxicidade por DSP. Isso inclui nos programas de monitorização onde normalmente são recolhidas apenas amostras da coluna de água. Sendo assim, a comunidade bentônica, incluindo as macroalgas existentes nas redondezas, deve ser avaliada para determinar sua correspondente contribuição na toxicidade dos moluscos (LAWRENCE e *col.*, 1998; KIKUCHI e *col.*, 1996). Por isso, segundo MARR e *col.*, 1992, uma deficiente estimativa do número de dinoflagelados tóxicos associados com eventos de intoxicação por DSP pode dever-se em parte, à falta de amostragem das comunidades bênticas, onde espécies como *P. lima* podem ser abundantes.

Os dinoflagelados do gênero *Dinophysys* e *Prorocentrum* são importantes produtores das DSP. A presença do ácido ocadaico em Santa Catarina foi registrada na praia da Armação do Itapocoroy (PROENÇA e *col.* 1998b).

## 2. 3 Síndrome Diarréica por Consumo de Mariscos (DSP)

DSP é um complexo distúrbio gastrointestinal associado ao consumo de moluscos contaminados por dinoflagelados tóxicos, como certas espécies de *Dinophysis* sp e *Prorocentrum* sp (YASUMOTO e col, 1985; LAWRENCE e col 1998). Esse tipo de contaminação tem-se tornado uma ameaça à saúde pública no Japão e na Europa, desde sua descoberta no final dos anos 70. Recentemente, incidentes de DSP foram confirmados tanto na América do Norte quanto na América do Sul. As principais toxinas responsáveis pela síndrome diarréica por consumo de moluscos são o ácido ocadaico e as dinofisistoxinas (DTX1, DTX2 e DTX3) (QUILLIAM, 1995a; MORTON e TINDALL, 1996).

Os sintomas de intoxicação humana, associados com DSP, são conhecidos desde a década de 60, e os dinoflagelados do gênero *Dinophysis* e *Prorocentrum* foram suspeitos de serem os responsáveis por quase todos os eventos de DSP (KAT, 1984). Porém YASUMOTO e col., 1980, foram os primeiros a isolar e caracterizar este componente tóxico da japonesa *Dinophysis*. Desde então, componentes como ácido ocadaico e dinofisistoxina-1 (DTX1), foram identificados em *Dinophysis fortii*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica*, *D. tripos*, *D. mitra*, *D. caudata*, e *Phalacroma* (= *Dinophysis*) *rotundatum* (YASUMOTO, 1980). Toxinas polieteres de ácidos graxos, como o ácido ocadaico e seus derivados, dinofisistoxinas e derivados e pectenotoxinas e derivados causam sintomas de DSP em testes com camundongos e têm sido isoladas a partir de moluscos. Aparentemente, certos

processos metabólicos dos animais marinhos, como bivalves, podem alterar as toxinas e gerar novos derivados tóxicos (YASUMOTO, 1980).

Os sintomas clínicos da intoxicação diarréica em humanos se manifestam em torno de 3-5 horas após a ingestão dos mariscos contaminados. Trata-se de uma severa gastroenterite acompanhada de dores abdominais e, em aproximadamente 50% dos casos, de náuseas e também de vômitos (FREUDENTHAL e JIJINA, 1988). Dependendo da suscetibilidade do enfermo, podem ser observados sintomas gerais, como vertigem, febre e, em algumas ocasiões, leves problemas cardíacos. Normalmente, essa gastroenterite desaparece ao fim de, aproximadamente, três dias (MATIAS e col., 1996).

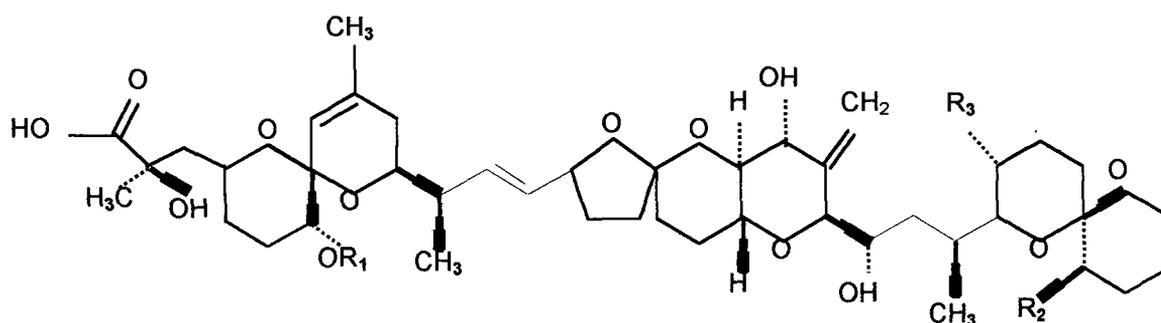
A dose mínima de AO que induz sintomas tóxicos em humanos adultos tem sido estimada entre 40 - 48  $\mu\text{g}$  (BOTANA, 1996). Dessa forma, mexilhões contendo mais que 2 $\mu\text{g}$  de AO por grama de hepatopâncreas são considerados inadequados para o consumo humano (BOTANA, 1996).

#### **2. 4 Ácido ocadaico (AO):**

O ácido ocadaico (Figura 4) foi originalmente obtido de dois tipos de esponjas, *Halichondria okadai*, uma esponja negra encontrada na costa japonesa do Pacífico (TASCHIBANA e col., 1981) e *Halichondria melanodocia*, uma esponja do Caribe encontrada na Flórida (SCHMITZ e col., 1981). A presença incomum de uma toxina em esponjas sugeriu a hipótese de que, realmente, seria um organismo simbiótico, presente dentro da esponja, o responsável pela produção dessa toxina. O dinoflagelado marinho

*Prorocentrum lima* foi determinado como sendo o organismo que produz ácido ocadaico nessas esponjas (MURAKAMI e *col.*, 1982).

O AO é a principal toxina diarréica produzida por dinoflagelados a qual, acumulada nos hepatopâncreas de mexilhões e ostras, causa a síndrome diarréica por consumo de mariscos "diarrhetic shellfish poisoning" em consumidores (MURATA e *col.*, 1982; YASUMOTO e *col.*, 1985; KUMAGAI e *col.*, 1986). Essa toxina é um potente promotor de tumores (FUJIKI e *col.*, 1987) e um específico inibidor das proteínas fosfatase 1 e 2a (BIALOJAN e TAKAI, 1988).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
H	H	CH <sub>3</sub>	Ácido Ocadaico (AO)
H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Dinophysistoxin-1 (DTX-1)
H	CH <sub>3</sub>	H	Dinophysistoxin-2 (DTX-1)

**Figura 4:** Estrutura química do ácido ocadaico, DTX-1 e DTX-2, segundo MARR e *col.*, 1994.

O ácido ocadaico é uma substância neurotóxica (CANDEO e *col.*, 1992), tendo sido comprovada sua ação como inibidor da síntese de proteínas em um sistema acelular (cell-free system) com uma CL<sub>50</sub> de  $6.3 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  (MATIAS e

*col.*, 1996c). Essa toxina marinha passa pela barreira transplacentária (MATIAS e CREPPY, 1996b) e entra no ciclo entero-hepático em camundongos (MATIAS e CREPPY, 1996a). Além disso, MATIAS e CREPPY, 1998, demonstraram que o AO altera a metilação biológica do DNA em “células vero”, induzindo a hipermetilação da 5-metildeocitosina, confirmando assim os efeitos genotóxicos desta toxina.

Recentemente, foi mostrado que o AO, quando administrado via oral em camundongos, entra no sistema circulatório e é distribuído para os principais órgãos, sem apresentar notadamente um órgão alvo (MATIAS e *col.*, 1999a). Ele induz também à formação de radicais livres oxigenados em taxas excessivas que tem, como efeito principal, o ataque aos fosfolipídios membranares, causando a lipoperoxidação (MATIAS e *col.*, 1999b).

Na Tabela 1, são especificadas as propriedades físico-químicas que caracterizam o ácido ocadaico e as dinofisistoxinas DTX1 e DTX2, segundo QUILLIAM e WRIGHT, 1995a.

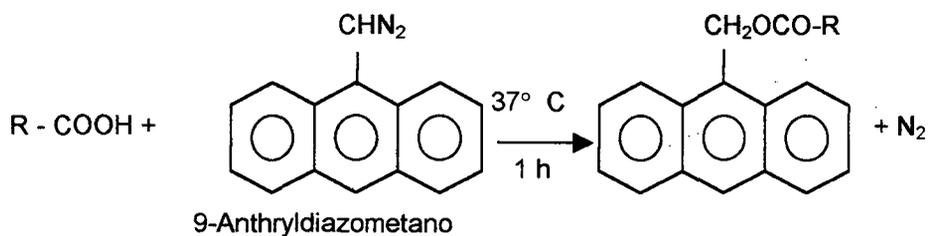
**Tabela 1:** Propriedades físico-químicas do ácido ocadaico, DTX1 e DTX2 segundo QUILLIAM e WRIGHT, 1995:

	Ácido Ocadaico	DTX1	DTX2
Ponto de Fusão	164-166° C 163-164° C	Não informado	128-130° C
Rotação Ótica	$[\alpha]_D$ + 23.0 (CHCl <sub>3</sub> ) $[\alpha]_D$ + 21.0 (CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D$ + 28.0 (CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D$ + 23.0 (CHCl <sub>3</sub> )
Peso Molecular	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub> 804,4661	C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub> 818,4817	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub> 804,4661
U. V. (CH <sub>3</sub> CN)	<220 nm	<220 nm	<220 nm
I. R	3462 (br), 2937, 1736, 1078, 1008, 999,878 cm <sup>-1</sup>	Não informado	Não informado

#### 2. 4. 1 Métodos de análise do Ácido Ocadaico

O ácido ocadaico pode ser detectado por diferentes técnicas de análise, como o bioensaio com camundongos, que foram desenvolvidas pelo Ministério Japonês de Saúde e Bem-Estar (1981). O extrato dos hepatopâncreas de mexilhões é injetado intraperitonealmente nos camundongos, e seu tempo de sobrevivência observado. O resultado obtido é expresso em "mouse unit" (MU), que significa a quantidade de toxina que é capaz de matar um camundongo num período de 24 horas. A toxicidade da amostra (MU/g de tecido) é determinada como a menor dose que mata dois ou mais ratos, de cada três, em um período de 24 horas (QUILLIAM e WRIGHT, 1995). Outro ensaio realizado é o bioensaio com ratos, onde animais são alimentados com ração

misturada com hepatopâncreas ou carne de mexilhões. São verificados sintomas de diarreia e recusa de alimento por parte dos animais, dentro de um período de 16 horas (LUCKAS, 1992). Existe um método enzimático (ELISA), que consiste em um "kit" de imunoensaio que detecta a presença do ácido ocadaico nos extratos de mexilhões (MORTON e TINDALL, 1996). LEE e *col.*, 1987, desenvolveram um método cromatográfico que envolve uma pré-derivatização das toxinas de DSP com 9-anthryldiazometano (ADAM), um agente fluorescente que se liga ao grupo carboxílico do AO e DTX1, sendo convertidas em um derivado éster fluorescente (Figura 5), que pode ser analisado pela cromatografia líquida com detecção por fluorescência (MARR e *col.*, 1994; LUCKAS, 1992).



**Figura 5:** Derivatização do ácido ocadaico e DTX1 com ADAM, (LUCKAS, 1992).

## 2. 5 Mexilhão *Perna perna*

Os Mytilidae são uma família antiga, datando de antes da era Devoniana e incluem importantes gêneros de moluscos que vivem fixos ao substrato, sendo os mais comuns o *Mytilus*, o *Perna*, o *Modiolus*, *Choromytilus* e *Aulacomya* (SEED e SUCHANEK, 1992).

O *Perna perna* (Figura 6) apresenta uma ampla distribuição geográfica, estendendo-se da costa Atlântica da América do Sul, da Venezuela até o Uruguai (RIOS, 1994), ocorrendo também na região do Caribe e nas Ilhas Canárias. Encontra-se ainda na África do Sul (RIOS, 1994), Senegal, Mauritânia e Marrocos, adentrando no Mediterrâneo, ainda no lado africano, de Gibraltar até o Golfo de Tunis (LUBET, 1973). Essa espécie de mexilhão é bastante abundante no Brasil, sendo encontrada entre os estados do Espírito Santo e de Santa Catarina.

Os mexilhões se alimentam filtrando a água circundante sem uma grande seleção de partículas. Dada sua biologia, os moluscos podem acumular em seu tecidos diferentes contaminantes, sendo muitas vezes utilizados como organismos indicadores de qualidade das águas costeiras (WIDDOWS e DONKIN, 1992).

Os mexilhões chegam a formar densas populações com até 20.000 animais por metro quadrado (FERREIRA e MAGALHÃES, 1997). Seu crescimento está relacionado às condições do ambiente, onde a temperatura e a disponibilidade de alimento, juntamente com o tempo que esses animais permanecem submersos, são fatores particularmente importantes (MAGALHÃES, 1985). São animais considerados sésseis, porém com possibilidade de deslocamento lento no substrato graças à capacidade de formação e liberação de um conjunto de filamentos protéicos, denominados bisso, com concomitante movimentação do pé, (SEED e SUCHANEK, 1992). Essa característica permite que eles mudem de posição tanto em estoques

naturais quanto em cultivo, buscando melhores condições em relação à densidade e capacidade de se alimentar (FERREIRA e MAGALHÃES, 1997).

Graças ao movimento ciliar de células das brânquias e palpos labiais, filtram e ingerem uma variedade de partículas em suspensão, as quais incluem bactérias, fitoplâncton, detritos e microzooplâncton. Quando há pouca disponibilidade de alimento, todo o material filtrado é carregado até a boca através dos palpos labiais para ingestão. O material filtrado é digerido no hepatopâncreas, e a matéria orgânica é absorvida pelo intestino e, depois, eliminada através das fezes.

Quando aumenta a disponibilidade de alimento, o material excedente é ligado com muco para formar as pseudofezes, que são destinadas a uma rejeição pré-ingestiva (HAWKINS e BAYNE, 1992). A filtração dos moluscos é virtualmente contínua, e este processo representa um aumento na sedimentação do fitoplâncton e, conseqüentemente, uma diminuição da biomassa autotrófica da coluna de água (PROENÇA e col., 1998a).

O *Perna perna* é considerado uma espécie eurihalina, ou seja, tem capacidade de resistir a uma ampla variação de salinidade, porém esses mexilhões não sobrevivem em salinidades menores do que 19% ou maiores do que 49 %, sendo considerada ideal a faixa que varia entre 34 e 36 % (FERREIRA e MAGALHÃES, 1997). A espécie *Perna perna* é considerada euritérmica, ou seja, possui a capacidade de suportar uma ampla variação de temperatura; resiste a uma variação de 5 a 30°C, sendo considerada ideal a faixa que varia entre 21 a 28°C (FERREIRA e MAGALHÃES, 1997).

Muitos trabalhos utilizam os mexilhões como bioindicadores (VIARENGO e col., 1991a), pois, como já foi mencionado, são animais filtradores e bioacumuladores, ou seja, acumulam microorganismos e compostos tóxicos em seu interior que, com o tempo, são integrados em seus tecidos (BAYNE, 1976). Além disso, são animais resistentes e apresentam facilidade de adaptação às diferentes condições ambientais, tais como temperatura, níveis de oxigênio, disponibilidade de alimento, apresentando, portanto, grande habilidade de sobreviver em ambientes poluídos por agentes tóxicos, os quais podem interferir em diferentes aspectos do seu organismo, inclusive em seu DNA (MOORE, 1986). Todas essas características fazem com que esses animais sejam muito utilizados como bioindicadores, refletindo o nível de contaminação do ambiente aquático (marinho) em programas de monitorização de curta ou longa duração (BAYNE, 1989).

Em estudos ecotoxicológicos, utilizam-se as respostas desses organismos para detectar a presença de tóxicos no ambiente e avaliar seus efeitos biológicos. As respostas desses organismos permitem uma estimativa da severidade da exposição a que estão sujeitos (LIVINGSTONE e col., 1989c, LOPEZ-BAREA, 1995).

Do ponto de vista sistemático, este molusco pertence a:

Classe Bivalvia, (Linné, 1758)

Ordem Mytloidia (Férussac, 1822)

Família Mytilidae (Rafinesque, 1815)

Gênero *Perna* (Retzius, 1788)

Espécie *Perna perna* (Linné, 1758)

Os mexilhões caracterizam-se por serem animais dióicos, com fecundação externa, mas não apresentam dimorfismo sexual externo. O sistema reprodutor é formado pelas gônadas, que, nos indivíduos sexualmente maduros, ocupam a maior parte do corpo e, em especial, o manto.

Após a abertura das conchas, a separação entre macho e fêmea é possível devido à diferença de coloração das gônadas dos animais sexualmente maduros. Nos machos, as gônadas apresentam coloração branco-leitosa e, nas fêmeas, vermelho-alaranjada (CASABELLAS, 1991).

A espécie de mexilhão *Perna perna* é muito comum na costa de Santa Catarina, sendo o molusco mais cultivado no Estado (EPAGRI, 1997). Apesar disso, no Brasil, o cultivo de moluscos é uma atividade relativamente recente. As primeiras idéias de mitilicultura surgiram na década de 70, e as tentativas de cultivo, no entanto, ficaram mais restritas à parte de pesquisa, desenvolvimento e adaptação de tecnologia. Cultivos, como atividade comercial no Brasil, só surgiram a partir de 1989, em Santa Catarina (FERREIRA e MAGALHÃES, 1995).



**Figura 6:** Mexilhão *Perna perna*

### 2. 5. 1 Bioacumulação em mexilhões

Bivalves filtradores silvestres ou de cultivo, freqüentemente, são componentes dominantes da macrofauna bêntica de águas costeiras.

Os mexilhões podem concentrar muitos químicos em seu tecidos, em fatores de 10 a  $10^5$  em relação à concentração destes na água, refletindo a magnitude da contaminação ambiental. Por causa dessa capacidade de filtração, os bivalves passaram a ser usados como organismos indicadores ou sentinelas em programas de monitorização ambiental existentes em vários países do mundo (WIDDOWS e DONKIN, 1992). Através da sua capacidade de filtrar grandes quantidades de água, eles são os vetores primários da transferência de bactérias patogênicas e biotoxinas (BRICELJ e SHUMWAY, 1998).

Contaminantes orgânicos no ambiente podem ser associados com diferentes tipos de partículas, variando de digeríveis, que são materiais biodisponíveis como as algas, até particulados de combustão (FARRINGTON, 1989) e carvão (BENDER e *col.*, 1987). A influência dos particulados na bioacumulação de contaminantes orgânicos varia amplamente, dependendo da natureza do contaminante e da partícula (WIDDOWS e DONKIN, 1992).

Compostos lipofílicos como os xenobióticos orgânicos são prontamente acumulados nos tecidos dos bivalves e concentrados a níveis acima dos encontrados na água circundante. A bioacumulação em moluscos de um grande número de compostos foi registrada tanto em estudos de campo como de laboratório. Os xenobióticos são bioacumulados a partir da coluna de água e quando associados com material abiótico particulado, ou associados com a biota, como fitoplâncton ou mesmo detritos (LIVINGSTONE e PIPE, 1992).

Os padrões qualitativos e quantitativos da bioacumulação e depuração dependem de muitas variáveis, incluindo biodisponibilidade e rota de absorção, tempo de exposição e vários outros fatores biológicos, físicos e químicos. A bioacumulação da maioria de xenobióticos orgânicos envolve uma taxa linear inicial de absorção até o alcance do nível máximo de concentração nos tecidos, onde ocorre um equilíbrio. Esses dois parâmetros aumentam com a concentração do xenobiótico (LIVINGSTONE e PIPE, 1992).

A bioacumulação aumenta geralmente com o aumento dos níveis de tecidos ricos em lipídios, resultando que no hepatopâncreas (glândula digestiva), o qual é também rico em lisossomas, ocorre a maior taxa de absorção de xenobióticos lipossolúveis. Padrões de bioacumulação também são afetados direta ou indiretamente, dependendo das condições reprodutivas ou sazonais. Acredita-se que a depuração, assim como a absorção, são processos essencialmente passivos, embora a excreção ativa também tenha sido considerada (LIVINGSTONE e PIPE, 1992).

Em um estudo com *Dinophysis* na costa portuguesa, SAMPAYO e col., 1990, concluíram que o tempo necessário para que os moluscos se tornassem tóxicos dependeu não somente da presença de organismos tóxicos, mas também da abundância das espécies não tóxicas presentes. Em regiões marinhas altamente produtivas, a presença de espécies potencialmente tóxicas em números os quais poderiam ter afetado os moluscos em áreas menos produtivas, não levam a um nível inaceitável de toxinas nos bivalves (AUNE e YNDESTAD e col., 1993).

Quando bivalves se alimentam de organismos contendo AO e dinofisistoxinas (DTX), as toxinas são, principalmente, acumuladas nos hepatopâncreas. A toxicidade de diferentes espécies de *Dinophysis* varia espacial e temporalmente, e o número de células por litro necessários para contaminar os moluscos é altamente variável. Assim, 1000 a 2000 células de *Dinophysis* spp por litro de água do mar resultam em uma significativa acumulação dessas células em *Mytilus edulis* (20.000 a 30.000 células nos hepatopâncreas) e em um alto nível de toxicidade nos moluscos da Noruega (SÉCHET e col., 1990). Por outro lado, somente florações maiores que 20.000 células por litro foram associadas com envenenamento diarréico de moluscos na costa holandesa do Mar do Norte (KAT, 1983).

## 2. 6 Bactéria *Vibrio fischeri*

*Vibrio fischeri*, antes conhecida como *Photobacterium phosphoreum*, é uma bactéria marinha, aneróbia facultativa, gran-negativa pertencente à família *Vibrionaceae*, não sendo patogênica. Pode viver em baixa concentração, livre nos oceanos (menos que  $100 \text{ cel. ml}^{-1}$ ), produzindo uma luminescência não observável, ou estabelecendo uma relação simbiótica com a lula da espécie *Euprymna scolopes*, a qual cultiva altas densidades desta bactéria no seu órgão luminoso (mais que  $1000 \text{ cel. ml}^{-1}$ ).

Essa relação simbiótica se traduz no fato de que sua luminescência protege essa espécie de lula, de hábito noturno, disfarçando a sombra que se forma pela iluminação da lua, quando vista de baixo pelos seus predadores.

Por sua vez, a lula fornece abrigo e uma fonte estável de nutrientes para as bactérias (KOLIBACHUK e GREENBERG, 1993).

As fotobactérias emitem luz como um bioproduto do seu processo metabólico. Mudanças nesse processo, resultantes do contato dos microrganismos com substâncias tóxicas, podem causar alterações na sua emissão de luz. A redução da emissão de luz é, geralmente, proporcional ao impacto biológico da amostra testada ( KOLIBACHUK e GREENBERG, 1993).

Essas bactérias são utilizadas como organismos-teste em ensaios de toxicidade aguda e crônica. Esses ensaios têm como fundamento medir, com o auxílio de um luminômetro, o decréscimo da intensidade luminosa emitida por uma cultura pura de *Vibrio fischeri* em contato com uma série de diluições da amostra – teste, após 15 e 30min, em comparação com o controle.

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3. 1 Objetivo Geral

Estudar a influência do dinoflagelado da espécie *Prorocentrum lima*, através dos mecanismos de bioacumulação e eliminação do ácido ocadaico, em mexilhões da espécie *Perna perna* (MOLLUSCA:BIVALVIA).

#### 3. 2 Objetivos Específicos

1. Verificar a toxicidade aguda do dinoflagelado *Prorocentrum lima* para mexilhões juvenis da espécie *Perna perna*.
2. Verificar a toxicidade aguda de extratos de hepatopâncreas e fezes de mexilhões *Perna perna* para as bactérias luminescentes *Vibrio fischeri*.
3. Quantificar a concentração de ácido ocadáico na carne, nos hepatopâncreas e nas fezes de mexilhões alimentados com *Prorocentrum lima*, mediante análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
4. Verificar a bioacumulação e a cinética de eliminação do ácido ocadáico em mexilhões da espécie *Perna perna*, através de análises em CLAE.

---

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4. 1 Materiais**

#### **4. 1. 1 Produtos químicos**

##### **4. 1. 1. 1 Produtos químicos para CLAE**

Acetona, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, hexano, metanol, sulfato de sódio (Merck)

9-Anthryldiazometano (ADAM) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR 97404)

Ácido deoxicólico (Sigma)

Todos os produtos químicos utilizados na preparação das amostras para análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram de qualidade “grau HPLC”.

##### **4. 1. 1. 2 Produtos químicos para preparação de meios de cultivo**

Sulfato de zinco heptahidratado, sulfato de cobalto heptahidratado, cloreto de manganês tetra hidratado, molibdato de sódio di hidratado, sulfato de cobre, nitrato de sódio, cloreto de amônio, glicerolfosfato, cloreto férrico hexahidratado, EDTA Sódico, Trizma. (Sigma).

Biotina, B-12, Tiamina. (Merck).

Todos os produtos químicos utilizados na preparação dos meios de cultivo de dinoflagelados foram de qualidade “para análise”.

## **4. 1. 2 Produtos biológicos**

### **4. 1. 2. 1 Animais**

#### **4. 1. 2. 1. 1 Mexilhão *Perna perna***

Os mexilhões da espécie *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA:BIVALVIA), foram coletados na Ilha de Ratonas Grande (27°28'30"S/48°33'40" W), localidade situada na porção norte da Baía Norte da Ilha de Florianópolis- SC, na Estação de Cultivo do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM – Barra da Lagoa) do Departamento de Aquicultura – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. As coletas foram realizadas no período de março a outubro de 1999.

#### **4. 1. 2. 1. 2 Dinoflagelado *Prorocentrum lima***

O cultivo do dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), é pertencente à cepa PL2V, proveniente do Centro Oceanográfico de Vigo, Espanha, cedida pelo Prof. Dr. Luis Antonio Proença, do Laboratório de Oceanografia Biológica do CTT-Mar da Universidade do Vale do Itajai-UNIVALI.

#### **4. 1. 2. 1. 3 Algas *Chaetoceros* sp.**

As diatomáceas do gênero *Chaetoceros* foram cedidas pelo LCMM e mantidas sob aeração e luminosidade constantes, no Laboratório de

Toxicologia Ambiental- UFSC, e utilizadas como alimentação para os mexilhões mantidos em laboratório (Figura 7).



**Figura 7:** Manutenção de *Chaetoceros* sp em laboratório

#### 4. 1. 2. 1. 4 Bactéria *Vibrio fischeri*

As fotobactérias da espécie *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*), linhagem NRRL – B – 11177, utilizadas nos testes para verificação da toxicidade aguda, foram cultivadas no Laboratório de Ecotoxicologia da FATMA-SC (Fundação de Amparo Tecnológico ao Meio Ambiente) e cedidas por esta fundação para a realização dos ensaios.

## **4. 1. 2 Equipamentos**

### **4. 1. 2. 1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu®, composto de sistema de degasificação por borbulhamento de hélio, bomba de alta pressão LC10-AD, detector de fluorescência RF-551 configurado para 365 e 415 nm de excitação e emissão, respectivamente. As amostras, diluídas na fase móvel, foram injetadas por meio de um injetor Rheodine® 7725i, equipado com um *loop* de 20 µL.

A cromatografia ocorreu em uma coluna Waters NOVAPACK C<sub>18</sub> (de 4,6 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento), empacotada com partículas de ODS de 4 µm de diâmetro, acondicionada a 40° C. A cromatografia durou 20 minutos, e a fase móvel foi composta de acetonitrila e água ultra pura (80:20 V/V). Os dados obtidos foram analisados por um microcomputador acoplado ao sistema através do software Shimadzu® LC10.

### **4. 1. 2. 2 Lumistox®**

O aparelho Lumistox®, equipado com fotomultiplicador, foi desenvolvido como um sistema para teste de bactérias luminescentes, em conformidade com a Norma DIN 38412 L34 e L341, e consiste em um luminômetro, com célula de medida mantida a 15 ± 1 °C, controle eletrônico e leitura digital (em unidades relativas). O sistema Lumistox mede o decréscimo da emissão de luz das

fotobactérias, após um determinado período de contato destas com a amostra testada.

#### **4. 1. 2. 3 Microscópio**

O aparelho utilizado foi um microscópio óptico (Olympus BX40 acoplado a um microcomputador Maxtech - Pentium 100 com um programa para análise de imagem - Image Pro Plus) a uma resolução de 10 x 100.

### **4. 2 Métodos Biológicos**

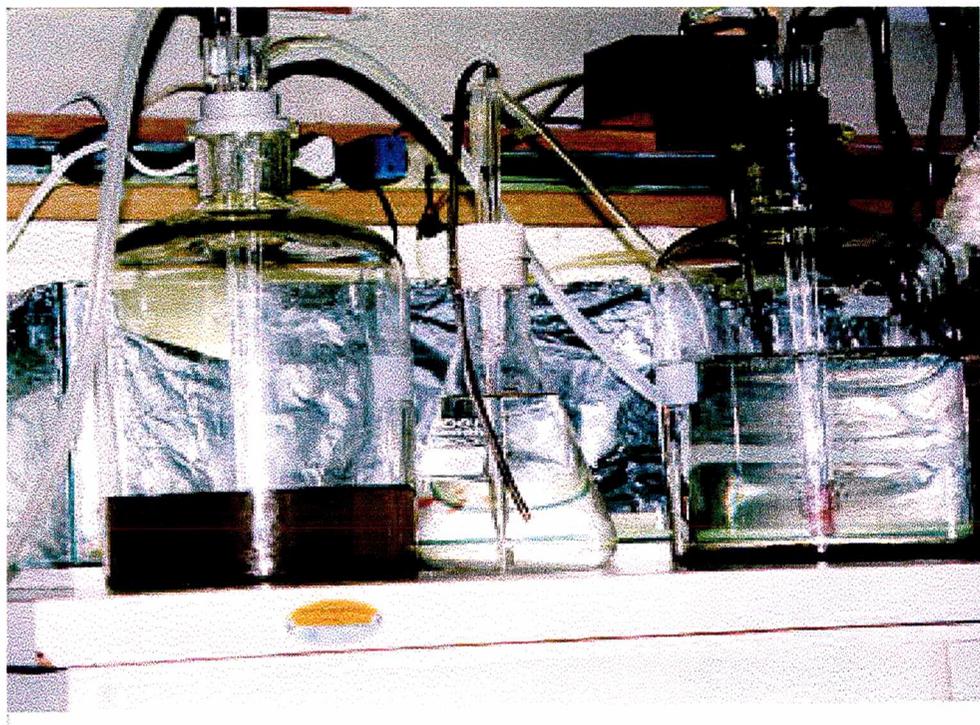
#### **4. 2. 1 Cultivo de *Prorocentrum lima***

Clones de *P. lima* foram cultivados (Figura 8) em erlenmeyers com capacidade de 2000 ml, contendo 1000 ml de meio K (KELLER e col., 1987), preparado com água do mar filtrada e esterilizada com UV, procedente do LCMM. Após a preparação e esterilização do meio K (quinze minutos a uma temperatura de 120°C), foi medida a salinidade do meio e, quando necessário, foi adicionada água destilada a fim de alcançar a concentração de 29-30 ppm, que é a salinidade exigida para o cultivo dos organismos.

A cultura dos dinoflagelados foi mantida a  $20 \pm 2^\circ$  C, com aeração fraca. A iluminação foi com luz fria, com uma intensidade luminosa de 3000 Lux.

Para garantir o suprimento de nutrientes necessário para o crescimento dos dinoflagelados, a cada 15 dias, a metade do meio de cultivo existente no frasco de cultura era substituída por um meio recém-preparado. (Fig 8).

A concentração celular dos dinoflagelados foi verificada através da contagem dos organismos em Câmara de Neubauer, com o auxílio do microscópio óptico a uma resolução de 10 x 100.



**Figura 8:** Aspecto do cultivo de *Prorocentrum lima*, mostrando, à esquerda, o frasco contendo os dinoflagelados cultivados e, à direita, o frasco com meio de cultura recém-preparado.

#### **4. 2. 2 Coleta de mexilhões *Perna perna***

O cultivo dos mexilhões realizado na estação situada em Sambaqui é do tipo espinhel, onde são colocadas sementes (organismos jovens com cerca de 2 cm de comprimento) em cordas que ficam amarradas a galões plásticos que servem como bóias. A captura dos mexilhões foi efetuada retirando-se as cordas de mexilhões afixadas nas bóias de cultivo existentes naquela praia.

Dessas cordas foram retirados os mexilhões, que foram utilizados nos diferentes ensaios. Após a separação dos mexilhões, foi realizada a lavagem e a limpeza externa dos indivíduos, com auxílio de jatos de água e de espátula, a fim de retirar outros organismos fixados na concha. Após a limpeza, os mexilhões foram transferidos ao laboratório para o período de adaptação às condições do mesmo.

No Laboratório de Toxicologia Ambiental, os mexilhões foram colocados em um aquário de vidro, com dimensão de 75 cm x 50 cm x 50 cm, com capacidade de 100L, contendo água do mar, filtrada em filtros de areia e esterilizada com UV (Figura 10 ), procedente do LCMM.

Os mexilhões permaneceram nesse recipiente durante sete dias, sob aeração constante, até o início dos testes.

Durante esse período, a alimentação dos mexilhões consistiu em um cultivo de *Chaetoceros* sp (com concentração de cerca de  $5,4 \times 10^5$  células.ml<sup>-1</sup>), cedida pelo LCMM. Essa alimentação foi efetuada três vezes ao dia, com alíquotas de 500 ml, e interrompida 24 h antes do início dos ensaios.

Estação de cultivo de  
mexilhões, LCMM  
Sambaqui.



**Figura 9:** Localização do ponto de coleta de mexilhões em Sambaqui, Florianópolis, Santa Catarina.



**Figura 10:** Manutenção dos mexilhões em laboratório

#### **4. 2. 3 Preparação das densidades de *P. lima* utilizadas nos ensaios**

Após homogeneização da cultura e separação de uma alíquota da mesma, a densidade celular do cultivo de *P. lima* foi estimada através do uso de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

Na contagem, uma gota da suspensão celular foi colocada com o auxílio de uma pipeta pasteur entre a câmara e a lamínula. Sendo assim, o número de células presente foi estimado com o uso do microscópio, com uma resolução de 10 x 100.

Para o cálculo da média do número de células do cultivo, foram realizadas doze leituras de cada amostra. Essa contagem permitiu determinar as diluições necessárias para a preparação das suspensões, com número determinado de células utilizadas nos ensaios.

Na preparação das diluições da cultura celular, foi adicionado o volume calculado de água do mar, filtrada e esterilizada com UV.

As densidades celulares foram preparadas e estocadas em balões volumétricos recobertos com papel alumínio, a fim de impedir a penetração de luz e, assim, retardar a divisão celular de *P. lima* (Figura 11). Essas suspensões com número determinado de células foram utilizadas para a alimentação dos mexilhões nos ensaios descritos a seguir.



**Figura 11:** Suspensões de *P. lima* utilizadas nos ensaios

## 4. 2. 4 Procedimento dos ensaios

### 4. 2. 4.1 Teste de toxicidade aguda com mexilhão *P. perna*

A finalidade desse ensaio foi a de verificar os efeitos sobre a sobrevivência dos mexilhões juvenis ( $3 \pm 0,3$  cm de comprimento) da espécie *P. perna*, alimentados, durante cinco dias, com um cultivo de *P. lima* com diferentes concentrações celulares.

Foram preparadas 5 concentrações de *P. lima*, conforme descrito no item 2. 2. 3, com densidades de  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  cel.ml<sup>-1</sup>, para servir de alimentação de 5 mexilhões por concentração.

Em seguida, em seis aquários com capacidade unitária de 3 L, foram colocados, respectivamente, cinco mexilhões em um volume de 1 L de água do mar filtrada e esterilizada. A temperatura foi mantida em  $20 \pm 2^\circ$  C, e a água foi aerada durante todo o período de teste. A água dos aquários foi monitorada quanto ao pH e OD (phmetro e Oxímetro marca Orion).

A alimentação dos organismos foi fornecida cinco vezes ao dia, em um volume de 40 ml, com o objetivo de evitar a sedimentação do dinoflagelado *P. lima*.

Ao final do ensaio, cada animal recebeu  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  células de *P. lima*, respectivamente.

O grupo controle, alimentado com uma concentração de  $3,6 \times 10^7$  cel.dia<sup>-1</sup>.mexilhão<sup>-1</sup> de *Chaetoceros* sp, foi mantido nas mesmas condições que o alimentado com *P. lima*.

Antes do descarte, foi autoclavada toda a água eliminada durante os ensaios, para impedir a contaminação do ambiente com possíveis células viáveis de *P. lima*.

#### 4. 2. 4. 2 Teste de toxicidade aguda com fotobactérias

Esse teste teve a finalidade de avaliar a toxicidade aguda dos extratos de hepatopâncreas e das fezes dos mexilhões do grupo controle e dos alimentados com *P. lima*, utilizando como organismo-teste *Vibrio fischeri*, bactéria marinha, anaeróbia facultativa e gram-negativa, pertencente à família *Vibrionaceae*.

Esse método (NORMA DIN 38 412 L34) tem por objetivo detectar a concentração da substância que causa inibição na produção da luz naturalmente emitida por esses microorganismos.

Para a realização do ensaio, várias diluições do agente teste foram adicionadas a suspensões com a mesma quantidade de bactérias, sendo efetuadas medidas de quantidade de luz, antes e após a adição do mesmo, em diferentes intervalos de tempo (15 e 30 minutos). A quantidade de luz perdida nas diferentes diluições do agente teste foi calculada.

Como apresentação dos resultados, que indica a extensão do efeito da substância sobre *Vibrio fischeri*, utiliza-se a concentração efetiva, expressa em valores de CE (Concentração Efetiva), calculados estatisticamente, que determinam a concentração da substância que causa efeito em um percentual (20, 50 e 80%) dos organismos testados ou  $FD_L$  (Fator de Diluição para Bactérias Luminescentes), o qual significa a primeira diluição do agente teste

na qual se observa menos de 20% de inibição sobre a luminescência das bactérias.

#### 4. 2. 4. 3 Teste de bioacumulação do ácido ocadaico

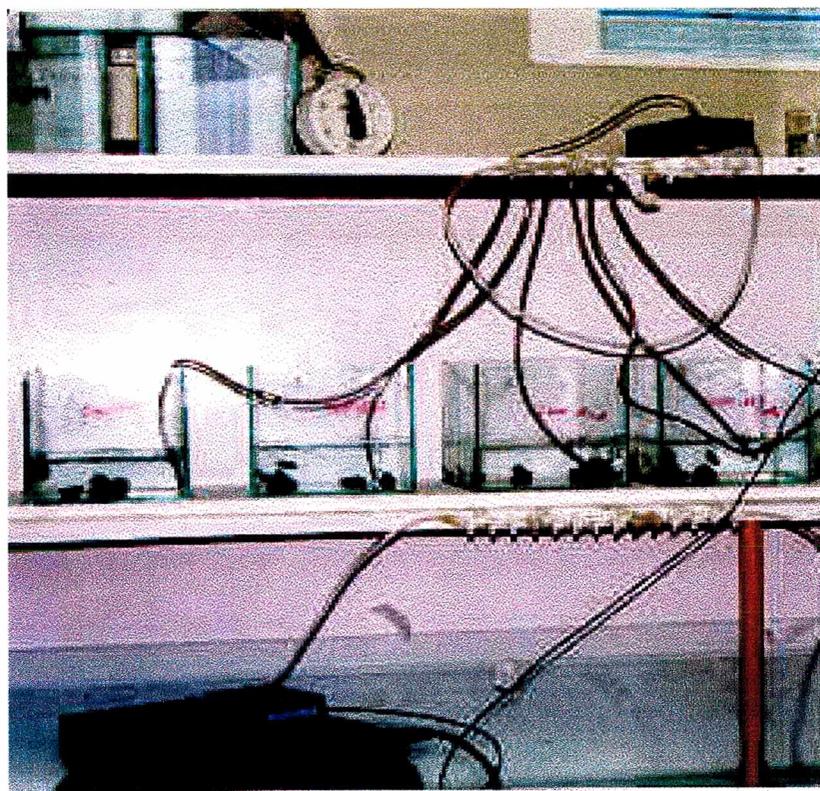
Esse ensaio teve a finalidade de avaliar a acumulação do ácido ocadaico nos tecidos e sua eliminação pelas fezes de mexilhões adultos ( $7 \pm 0,5$  cm de comprimento) da espécie *P. perna*, alimentados durante cinco dias com um cultivo de *P. lima* com diferentes concentrações celulares.

Foram preparadas três concentrações de *P. lima*, conforme descrito no item 2. 2. 3, com densidades de  $3 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$  e  $9 \times 10^3$  cel.ml<sup>-1</sup>, que serviram de alimentação a 3 mexilhões por concentração.

Foram utilizados oito aquários (figura 12) com volume de 3 L. Em cada aquário foi introduzido 1L de água do mar filtrada e esterilizada com raios UV. Após, cada aquário recebeu três mexilhões, que foram alimentados da seguinte maneira: em dois aquários (grupo controle) foi introduzido 1 L de água do mar, por unidade, com uma concentração de  $3,6 \times 10^7$  cel.dia<sup>-1</sup>.mexilhão<sup>-1</sup> de *Chaetoceros* sp e, nos aquários restantes, sempre em duplicata, os mexilhões foram alimentados com *P. lima* em concentrações de  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$  células.dia<sup>-1</sup>.mexilhão<sup>-1</sup>. Ao final do experimento, cada animal recebeu,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  e  $3 \times 10^6$  células de *P. lima*, respectivamente.

A temperatura foi mantida em  $20 \pm 2^\circ$  C, e a água foi aerada durante todo o período de teste. Com o objetivo de evitar a sedimentação de *P. lima*, a alimentação dos organismos foi fornecida cinco vezes ao dia, em alíquotas de 40 ml.

Antes do descarte, foi autoclavada toda a água eliminada durante os ensaios, para impedir a contaminação do ambiente com possíveis células viáveis de *P. lima*.



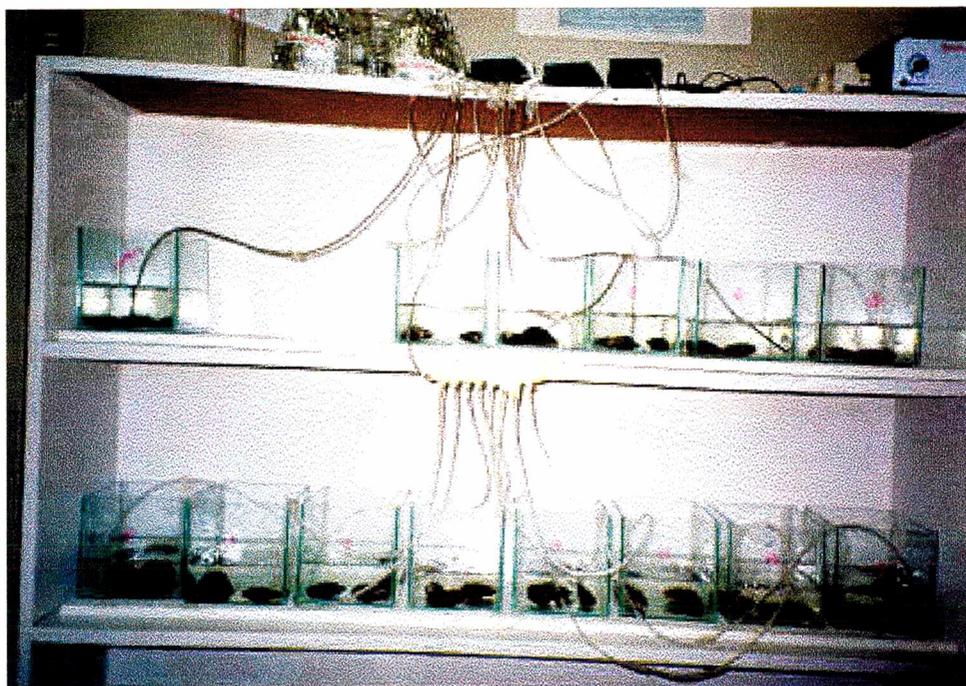
**Figura 12:** Teste de bioacumulação do ácido ocadaico

#### **4. 2. 4. 4 Teste de bioacumulação e eliminação do ácido ocadaico**

A bioacumulação e a eliminação do ácido ocadaico foram investigadas a partir dos hepatopâncreas extraídos e das fezes de mexilhões adultos ( $6 \pm 0,5$  cm de comprimento) da espécie *P. perna*, através da alimentação desses animais com *P. lima*.

O experimento teve uma duração de 10 dias e, nesse ensaio, foram utilizados 10 aquários mais um de controle. Foram distribuídos 3 mexilhões por aquário, com capacidade de 3 L, contendo 1 L de água do mar filtrada e

esterilizada,. A temperatura foi mantida em  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , e a água foi aerada durante todo o período de teste. (Figura 13)



**Figura 13:** Teste de bioacumulação e eliminação do ácido ocadaico

Os mexilhões foram alimentados por 5 dias com uma concentração de  $2 \times 10^5$  células.dia<sup>-1</sup>.mexilhão<sup>-1</sup>. A alimentação dos mexilhões foi fornecida cinco vezes ao dia, a fim de evitar a sedimentação das células de *P. lima*.

Após esse período, o fornecimento de *P. lima* foi interrompido, e os mexilhões passaram a ser alimentados com algas da espécie *Chaetoceros* sp (concentração de  $3,6 \times 10^7$  cel.dia<sup>-1</sup>.mexilhão<sup>-1</sup>) por mais 5 dias.

No aquário que serviu de controle, os organismos foram alimentados somente com algas da espécie *Chaetoceros* sp durante todo o período de teste.

No primeiro dia de teste, foram retirados e congelados a  $-15^{\circ}\text{C}$  os hepatopâncreas de três mexilhões para posterior análise em CLAE, com a finalidade de verificar a ausência de AO nos organismos utilizados no estudo.

Os grupos de mexilhões de cada aquário foram sacrificados em períodos de 24 h, eliminando-se um aquário a cada dia, e seus hepatopâncreas foram extraídos e congelados a  $-15^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. As fezes produzidas por cada grupo de mexilhões foram recolhidas em períodos de 24h e congeladas para análise ulterior. Continuou-se a sacrificar um grupo de animais por dia até o final do teste, e seus hepatopâncreas seguiram sendo extraídos para análise em CLAE.

A água dos aquários de teste foi renovada diariamente, com a finalidade de evitar a recontaminação (fezes contendo *P. lima*).

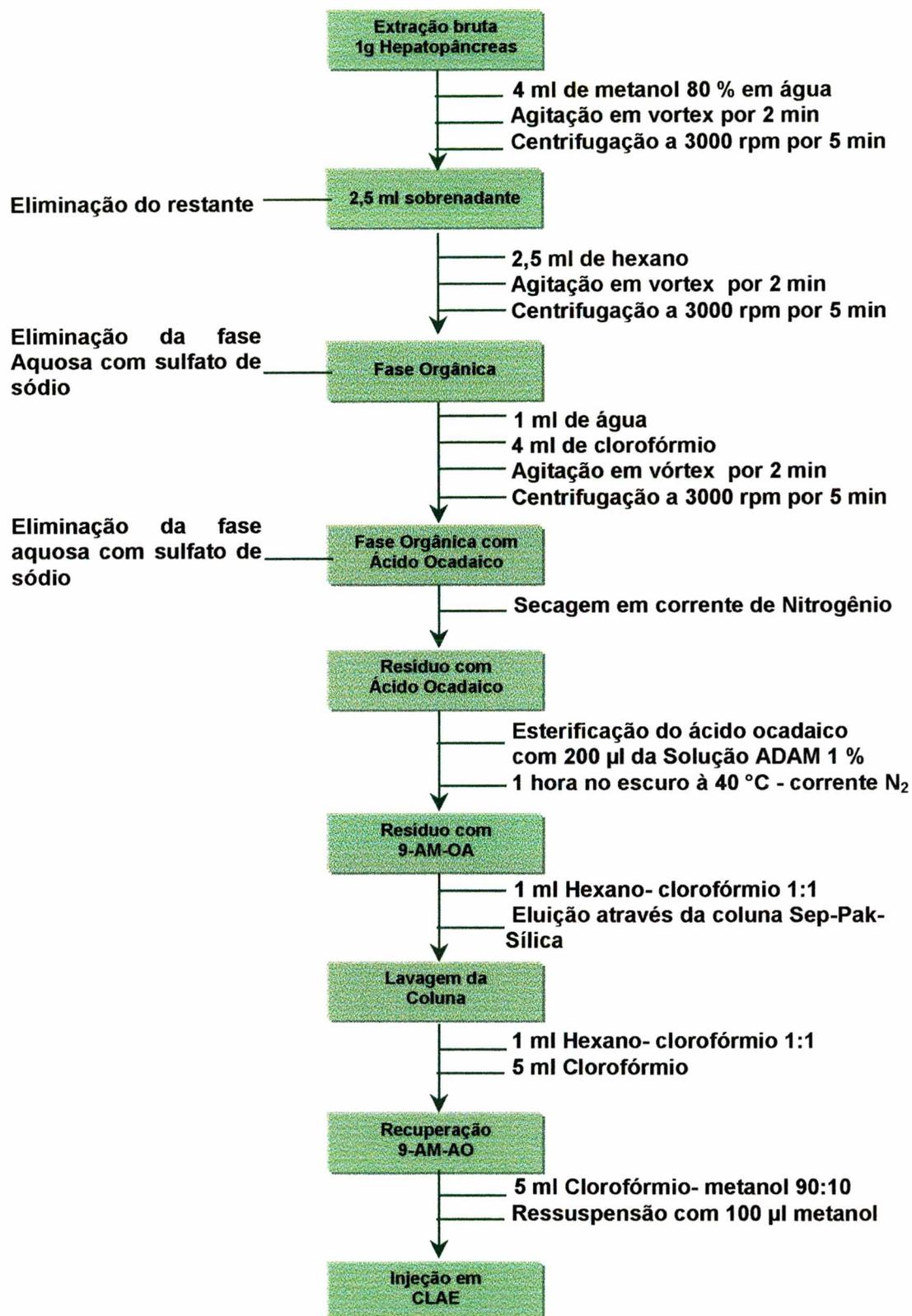
Antes do descarte, foi autoclavada toda a água eliminada durante os ensaios, para impedir a contaminação do ambiente com possíveis células viáveis de *P. lima*.

### **4. 3 Métodos Físico-Químicos**

#### **4 .3. 1 Extração do ácido ocadaico a partir de amostras biológicas, baseado em LEE e col., 1987:**

As toxinas de DSP são lipossolúveis e, por essa razão, é necessário extraí-las dos tecidos dos mexilhões com solventes orgânicos. LEE e col., 1987, desenvolveram os passos de extração na qual 1 g de hepatopâncreas é extraído com 4 ml de metanol aquoso 80%, seguido por uma primeira partição

com éter de petróleo ou hexano, para remover lipídios não-polares, e depois com clorofórmio, para extrair as toxinas de DSP (Fig. 14).



**Figura 14:** Esquema Geral modificado da Extração, Esterificação e Dosagem do Ácido Oxaláico em CLAE, baseado em LEE e *col.*, 1987.

#### **4. 3. 1. 1 Preparação das amostras:**

##### **4. 3. 1. 1. 1 Preparação das amostras dos hepatopâncreas**

Os mexilhões utilizados nos ensaios foram abertos por meio de secção dos músculos adutores, e suas glândulas digestivas, ou hepatopâncreas, foram cuidadosamente retiradas com o auxílio de tesoura cirúrgica e bisturi. Após retirados, os hepatopâncreas foram limpos com o auxílio de um bisturi, retirando-se quaisquer outros tecidos que se encontrassem aderidos a eles. Depois da limpeza, os hepatopâncreas foram secados com um papel absorvente e congelados a  $-15^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

##### **4. 3. 1. 1. 2 Preparação das amostras de carne**

Os mexilhões utilizados nos ensaios foram abertos por meio de secção dos músculos adutores, e a glândula digestiva, ou hepatopâncreas, foi separada para análise individual. O restante dos tecidos foi secado com papel absorvente e congelado a  $-15^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

##### **4. 3. 1. 1. 3 Preparação das amostras de Fezes**

As fezes foram retiradas diariamente de cada aquário, evitando-se a coleta das pseudofezes, com o auxílio de uma pipeta pasteur, e foram separadas em tubos de ensaio individuais.

A secagem das fezes foi realizada em estufa a  $50^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. O material seco foi transferido para tubos Eppendorf, que foram mantidos a  $-15^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### **4.3.1.1.4 Preparação das amostras de células de *Prorocentrum lima***

Uma alíquota de 20 ml do cultivo de *P. lima*, utilizada para a preparação das suspensões empregadas na alimentação dos mexilhões, foi estocada a  $-15^{\circ}$  até o momento da preparação da amostra.

#### **4.3.1.2 Extração do ácido ocadaico em material biológico:**

A extração e a dosagem do ácido ocadaico nas amostras foram realizadas no Laboratório de Oceanografia Biológica do CTT-Mar- UNIVALI, Itajai, SC, sob orientação do Dr. Luis Antonio Proença.

#### **4.3.1.2.1 Extração do ácido ocadaico nos hepatopâncreas dos mexilhões:**

Os hepatopâncreas utilizados para análise em CLAE foram descongelados imediatamente antes da preparação da amostra. Após o descongelamento, os hepatopâncreas foram secados em papel absorvente e homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos biológicos (Marconi). A massa assim obtida foi transferida a um tubo de centrifuga, pesada em balança, e seu valor foi anotado.

Ao homogeneizado foram adicionados 4 ml de metanol e água ultra pura (80:20 V/V). Esse material foi agitado durante 2 minutos em vortex e depois centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos.

Transferiram-se 2,5 ml do sobrenadante para um novo tubo de centrifuga, adicionando-se 2,5 ml de hexano; agitou-se em vortex e centrifugou-se por 1 minuto a 3000 rpm.

Transferiu-se o extrato metanólico (porção inferior) para um novo tubo de centrífuga.

Repetiu-se a lavagem com o hexano, e a porção metanólica foi unida ao extrato anterior.

Adicionou-se 1 ml de água destilada ao extrato metanólico e 4 ml de clorofórmio. Essa solução foi agitada em vortex e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm.

Transferiu-se a porção clorofórmica (porção inferior) para uma proveta graduada de 10 ml e repetiu-se o fracionamento com clorofórmio.

Uniram-se as duas frações clorofórmicas, e seu volume foi elevado para 10ml. Adicionou-se sulfato de sódio para retirar a água do extrato.

Transferiu-se 1 ml desse extrato para um tubo de Eppendorf, secando-o em corrente de N<sub>2</sub>.

#### **4. 3. 1. 2. 2 Extração do ácido ocadaico na carne dos mexilhões:**

O procedimento de extração do ácido ocadaico na carne é igual ao descrito para a extração dos hepatopâncreas, sendo utilizado um grama de carne para análise.

#### **4. 3. 1. 2. 3 Extração do ácido ocadaico em células de *P. lima*:**

Pegou-se uma amostra de 5 ml de uma solução com concentração celular conhecida, e esse volume foi centrifugado durante 5 min a 3000 rpm, a fim de retirar-se o excesso de água.

A esse concentrado juntaram-se 8 ml de metanol e água ultra pura (EASY pure RF. Compact Ultrapure Water System) (80:20 V/V), e a amostra assim obtida foi sonicada com sonda de ultra-som (Sonics), em banho de gelo, durante 4 minutos, a fim de romper as células e possibilitar a extração da fração lipossolúvel. A ruptura da parede celular dos dinoflagelados foi verificada com o auxílio do microscópio óptico.

Ao extrato metanólico foram adicionados 2 ml de água e 3 ml de diclorometano, e a solução resultante foi agitada com o auxílio de um vortex e centrifugada a 3000 rpm durante 1 minuto.

A fase inferior, correspondente ao diclorometano, foi transferida a uma proveta graduada de 10 ml e a superior, extraída por uma segunda vez.

As frações de diclorometano foram unidas, e o volume da solução foi completado até 10 ml com diclorometano; adicionou-se, então, uma porção de sulfato de sódio com a finalidade de retirar a água da amostra.

Dessa solução transferiu-se 1 ml a um tubo de Eppendorf, secando-o mediante corrente de N<sub>2</sub>.

#### **4. 3. 1. 2. 4 Extração do ácido ocadaico nas fezes de mexilhões:**

Uma vez secas as fezes, foram misturadas com 8 ml de metanol e água ultra pura (80:20 V/V). O procedimento de extração foi igual ao utilizado para o ácido ocadaico nas células de *P. lima*.

#### **4. 3. 1. 3 Derivatização das amostras:**

Ao extrato seco das amostras foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido deoxicólico (DEO) (250  $\mu\text{L}$  de metanol mais 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de 3,5 mg de DEO diluídos em 100 ml de metanol) mais 200  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de 9-anthryl-diazometano (ADAM) 1% (LEE e *col.*, 1987) (5 mg de ADAM dissolvidos em 100  $\mu\text{L}$  de acetona e elevados a 500  $\mu\text{L}$  com metanol).

As amostras foram então incubadas a 40° C em banho-maria durante 1 hora, no escuro, a fim de evitar a degradação do ADAM e, após, foram secadas em corrente de  $\text{N}_2$

#### **4. 3. 1. 4 Limpeza das amostras:**

Para a eliminação do excesso de ADAM e de algum possível interferente, foi utilizado um cartucho de extração de fase sólida de sílica (Waters SEPpack), seguindo o protocolo de PEREIRA e *col.*, 1995. A amostra foi solubilizada em 200  $\mu\text{L}$  em uma solução de diclorometano e hexano (1:1 V/V), injetando-se a solução diretamente no cartucho de sílica seco, repetindo-se este processo mais duas vezes.

Ao cartucho foram adicionados 3 ml da solução de diclorometano e hexano (1:1 V/V), e esta solução foi percolada com o auxílio de uma bomba peristáltica, com um fluxo de 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Antes que o cartucho secasse, foram adicionados 5 ml de uma solução de diclorometano e acetona (95:5 V/V), sendo descartado o filtrado. O extrato limpo foi eluído em um frasco âmbar com 5 ml de uma solução de diclorometano e acetonitrila (1:1 V/V). O extrato derivatizado e limpo foi secado em corrente de  $\text{N}_2$ .

#### **4. 3. 1. 5 Ressuspensão das amostras:**

A amostra seca foi ressuspensa com 1 ml de metanol. A ressuspensão é feita lavando-se o frasco, repetidas vezes, com metanol.

#### **4. 3. 1. 6 Preparação das amostras para injeção em CLAE:**

Foram retirados 100  $\mu\text{L}$  da amostra ressuspensa e passados a outro frasco Eppendorf, adicionando-se, então, 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetonitrila e água ultra pura (80:20 V/V). Essa amostra foi homogeneizada cuidadosamente em vortex e, com o auxílio de uma seringa, foram injetados 100  $\mu\text{L}$  no loop de 20  $\mu\text{L}$  do aparelho de CLAE.

#### **4. 3. 1. 7 Dosagem do ácido ocadaico através de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi usada para isolar a toxina da amostra pela separação de uma mistura de componentes, baseada nas suas diferentes propriedades químicas. Esses compostos interagem quimicamente, com uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida.

Para a quantificação da concentração da toxina presente na amostra, o perfil dessa amostra foi comparado com o perfil de um padrão que foi obtido passando a toxina pura através da coluna. Os padrões utilizados foram o AO puro (SIGMA) e um extrato de *P. lima*, que foram derivatizados do mesmo modo que as amostras descritas acima.

A concentração de AO presente nas amostras foi calculada, utilizando-se a solução padrão de ácido deoxicólico (PEREIRA e col., 1995).

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de toxicidade aguda com *P. perna*

Esse experimento nos mostrou que os mexilhões juvenis ( $3\pm 0,3$  cm de comprimento) da espécie *P. perna* alimentados com diferentes concentrações de *P. lima*, ( $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cel.mexilhão<sup>-1</sup>), não apresentaram alterações das principais funções vitais observadas, mostrando assim a resistência da espécie *P. perna* quando exposta ao dinoflagelado *P. lima*.

Esse resultado (Tabela 2) nos leva a concluir que importantes concentrações de *P. lima* não produzem efeito agudo sobre os mexilhões, contudo não possibilita a previsão de efeitos ligados à toxicidade crônica. Nesse sentido, SILVA e col., 2000, mostraram que o AO induz o aumento da formação de micronúcleos em hemócitos de mexilhões da espécie *P. perna*, reafirmando o potencial mutagênico dessa toxina, bem como o potencial da mesma em induzir efeitos tóxicos precoces em baixas concentrações.

Durante o ensaio, foram realizados controles de pH, OD e temperatura, onde se verificou que os valores de pH obtidos se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pela resolução nº 20/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que estabelece um limite de 6,5-8,5 para o pH em locais classificados como classe 5, que se referem às águas salinas que se destinam à recreação, a proteção das comunidades aquáticas e à criação natural e/ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana. (Tabela 3)

Os valores de OD se mantiveram abaixo dos limites estabelecidos pelo CONAMA, que estabelece que, em águas de classe 5, o OD deve ser maior ou

igual a 6 mg/L. Apesar da baixa concentração de oxigênio observada nos aquários-teste, não foi verificada mortalidade ou outra manifestação aguda nos mexilhões. Provavelmente a baixa concentração de oxigênio encontrada, apesar da constante aeração da água dos aquários, deve-se ao fato de que esses animais, em condições de estresse, aumentam a atividade metabólica e, conseqüentemente, consomem mais oxigênio.

A temperatura da água manteve-se a 25°C, em todos os tratamentos. Segundo FERREIRA e MAGALHÃES, 1997, essa temperatura está dentro da faixa considerada ideal para esta espécie de mexilhão (21 a 28°C).

**Tabela 2:** Valores de mortalidade de *P. perna* em função da concentração de *P. lima* na alimentação dos mesmos.

<b>Exposição</b> <b>(cel.mexilhão<sup>-1</sup>)</b>	<b>Mortalidade</b>
Controle	0
$2 \times 10^5$	0
$4 \times 10^5$	0
$6 \times 10^5$	0
$8 \times 10^5$	0
$1 \times 10^6$	0

**Tabela 3:** Média e desvio padrão dos valores de pH, OD (oxigênio dissolvido) e temperatura da água monitorizados durante o teste de toxicidade aguda.

<b>Exposição (cel.mexilhão<sup>-1</sup>)</b>	<b>PH</b>	<b>OD (mg.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Controle	7,48 (±0,17)	3,90 (±0,72)	22 (±1)
2 x 10 <sup>5</sup>	7,62 (±0,12)	3,88 (±0,75)	22 (±1)
4 x 10 <sup>5</sup>	7,76 (±0,11)	3,81 (0,89)	22 (±1)
6 x 10 <sup>5</sup>	7,69 (0,17)	3,63 (±0,79)	22 (±1)
8 x 10 <sup>5</sup>	7,68 (±0,21)	3,33 (±0,86)	22 (±1)
1 x 10 <sup>6</sup>	7,75 (±0,17)	3,46 (±0,77)	22 (±1)

## 5. 2 Teste de toxicidade aguda com fotobactérias

Para a realização dos ensaios, foram utilizados os extratos de hepatopâncreas e fezes obtidos na preparação das amostras para análise em CLAE. Uma vez secados em corrente de N<sub>2</sub> para evaporar o metanol, esses extratos foram resuspensores com 15 µl de metanol, e seu volume foi elevado a 3 ml com NaCl 2%.

Nos ensaios realizados com os extratos das amostras de fezes e hepatopâncreas dos mexilhões, não foi verificada a diminuição da luminescência de *Vibrio fischeri*, evidenciando a ausência de toxicidade aguda das amostras testadas sobre as bactérias luminescentes (ANEXO 1).

Foram realizados também dois ensaios com extratos dos controles hepatopâncreas e fezes, a fim de verificar uma possível toxicidade do metanol utilizado como solvente. Também nesses ensaios não foi verificada toxicidade aguda, para *V. fischeri*, das amostras testadas.

### 5. 3 Teste de bioacumulação do ácido ocadaico

Foram realizados três ensaios a fim de verificar a concentração do ácido ocadaico nos tecidos e fezes dos mexilhões, a qual foi determinada analiticamente mediante Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com as condições descritas para esses experimentos (ANEXO 2).

Na Tabela 4, aparecem a média e os valores máximos e mínimos de pH, OD e temperatura monitorados durante os três ensaios realizados. Novamente os valores de pH e temperatura obtidos se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pela resolução nº 20/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), enquanto os valores de OD novamente se mantiveram abaixo desses mesmos limites.

A concentração de AO na amostra injetada foi calculada a partir das seguintes equações modificadas de PEREIRA *e col.*, 1995:

$$g_{AM-AO_i} = \frac{A_{9AM-AO}}{A_{9AM-DEO}} \times \frac{g_{9AM-DEO}}{PM_{9AM-DEO}} \times PM_{9-AO}$$

$$AO_h = 9_{AM - AO_i} \times 1000 \times \frac{10}{V_i}$$

sendo:

9AM-AO<sub>i</sub>: massa de AO da amostra injetada (µg)

A<sub>x</sub>: área de 9AM-AO ou 9AM-DEO

g: massa de 9AM-DEO injetado (µg)

PM<sub>x</sub>: peso molecular de 9AM-AO (804) ou 9AM-DEO (582)

AO<sub>h</sub>: concentração de ácido ocadaico nos hepatopâncreas (µg.g<sup>-1</sup>)

V<sub>i</sub>: volume injetado (µl)

Os valores das áreas referentes aos picos do AO e do DEO, utilizados para o cálculo da concentração AO na amostra, foram obtidos a partir dos cromatogramas, (Anexo 2). Para uma melhor representatividade, foi utilizada a média das áreas do ácido deoxicólico obtido na análise de todas as amostras.

Na análise por cromatografia líquida, é empregada, em primeiro lugar, a amostra pura da substância testada, o padrão, que serve para identificar o tempo de retenção do composto na coluna, e as áreas correspondentes às diferentes concentrações.

As concentrações de AO obtidas nos ensaios 1, 2 e 3, com as diferentes densidades celulares (1 x 10<sup>6</sup>, 2 x 10<sup>6</sup>, 3 x 10<sup>6</sup> células de *P. lima*. mexilhão<sup>-1</sup>), calculadas mediante análises em CLAE, estão indicadas na Tabela 5. Nos três ensaios realizados a não detecção do AO nos animais do grupo controle demonstra que os mesmos não estavam contaminados pelo AO quando foram retirados da estação de cultivo, bem como a água e o alimento utilizado no

experimento estavam isentos de qualquer possível contaminação por ácido ocadaico.

Também foi estudada a concentração individual de AO nas células de *P. lima* em duas amostras do cultivo celular que continha  $6,25 \times 10^4$  cel.ml<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos foram de 0,17 e 0,24 pg.cel<sup>-1</sup>, demonstrando uma concentração de AO inferior à normalmente encontrada em células de *P. lima* que varia entre 2,33 e 7,06 pg.cel<sup>-1</sup>, segundo MORTON e TINDALL, 1996, ou entre 5,0 e 26,0 pg.cel<sup>-1</sup>, segundo LEE e col, 1989. Cabe salientar que, em estudos realizados (QUILLIAM e col., 1996; McLACHIAN e col, 1994), foi verificada uma grande variação no perfil da toxina entre diferentes cultivos de *P. lima* e entre as diferentes espécies de *Prorocentrum*. Essas variações da concentração celular podem estar ligadas a vários fatores bióticos e abióticos, como a concentração celular, o estresse dos organismos, a falta ou excesso de nutrientes, a temperatura, a luminosidade, as condições de cultivo, etc.

No ensaio 1, foi analisada a concentração de AO na carne, nos hepatopâncreas e nas fezes dos mexilhões. Assim foi possível verificar uma relação entre as concentrações de AO, obtidas na análise das fezes e hepatopâncreas, e as densidades celulares de *P. lima*. Podemos concluir também que a relação crescente entre o número de *P. lima* no meio e a concentração de AO encontrada nos hepatopâncreas reforça a hipótese de que as principais atividades biológicas dos animais foram preservadas.

Como apresentado na Tabela 5, especificamente para o ensaio 1, não foi encontrado AO na carne dos mexilhões, mostrando que a toxina ou não foi absorvida pelos organismos, ou foi metabolizada em subprodutos não

detectáveis pelo método utilizado. Nesse caso, resta saber se esses subprodutos são ativos toxicologicamente como o AO. Fica aberta uma via de pesquisa para estudar essa hipótese.

Ainda no primeiro ensaio, foram observadas concentrações crescentes de AO nos hepatopâncreas dos animais expostos ao *P. lima*, à medida que a concentração celular deste dinoflagelado aumentou, evidenciando o uso das células de *P. lima* disponíveis no meio como alimento por parte dos mexilhões (Figura 18). Esse tema foi abordado, pois, segundo DEFOSSEZ e DAGUZAN, 1996, e FERREIRA e MAGALHÃES, 1997, os bivalves, entre eles o *Perna perna*, apresentam uma seletividade em relação ao tamanho das partículas ingeridas (ingerem preferentemente partículas de até 25 $\mu$ ), sendo que partículas de maior tamanho seriam seletivamente eliminadas via pseudofezes, e o tamanho médio das células de *P. lima* é de, aproximadamente, 40 $\mu$ .

Apesar de a maior parte dessa toxina bioacumular-se nos hepatopâncreas, concentrações menores de AO foram encontradas nas fezes dos mexilhões (Tabela 5), demonstrando que esta é uma importante via de eliminação dessa toxina.

Nos ensaios 2 e 3, foram analisados somente os hepatopâncreas dos mexilhões (Tabela 5). Neles verificou-se também que a concentração de AO aumentou conforme o aumento da concentração celular de *P. lima* no meio. Os fatores de multiplicação nas concentrações não se mantiveram constantes, eles variaram de 1,2 a 6. Essas oscilações nos valores de concentração podem estar ligadas a fatores biológicos individuais, a estresse dos animais (Zalesky e col., 1999) e também as dificuldades inerentes ao método.

Observamos que as concentrações do AO nos hepatopâncreas dos mexilhões expostos ao maior número de células de *P. lima* ( $3 \times 10^6$  cel.mexilhão<sup>-1</sup>) foram praticamente iguais em todos os ensaios, indicando a possibilidade de causas ligadas a:

- Produção constante de AO com o aumento da concentração de *P. lima*.
- Bioacumulação mais regular com o aumento da concentração de *P. lima*.
- Mecanismos de defesa nos mexilhões que são superados a concentrações elevadas do *P. lima*.

As possibilidades citadas acima também são importantes caminhos de pesquisa para uma maior compreensão dos fenômenos das florações e do mecanismo de ação do AO em mexilhões.

É importante salientar que, apesar de ter sido usada como alimentação uma alta concentração de células de *P. lima* por microlitro de solução, o conteúdo de AO encontrado nas células desses dinoflagelados foi baixo, como comentado anteriormente. Conseqüentemente, a concentração dessa toxina encontrada nos hepatopâncreas também foi baixa, não chegando ao nível de saturação e também não superando os níveis estabelecidos na legislação de diversos países (ANEXO 3). Segundo LEE e col, 1987, mexilhões contendo mais que  $2 \mu\text{g.g}^{-1}$  e/ou  $1,8 \mu\text{g.g}^{-1}$  de DTX-1 são considerados impróprios para o consumo humano, e os valores de concentração encontrados nos ensaios realizados foram inferiores a  $0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ , conforme pode ser verificado na Tabela 5 .

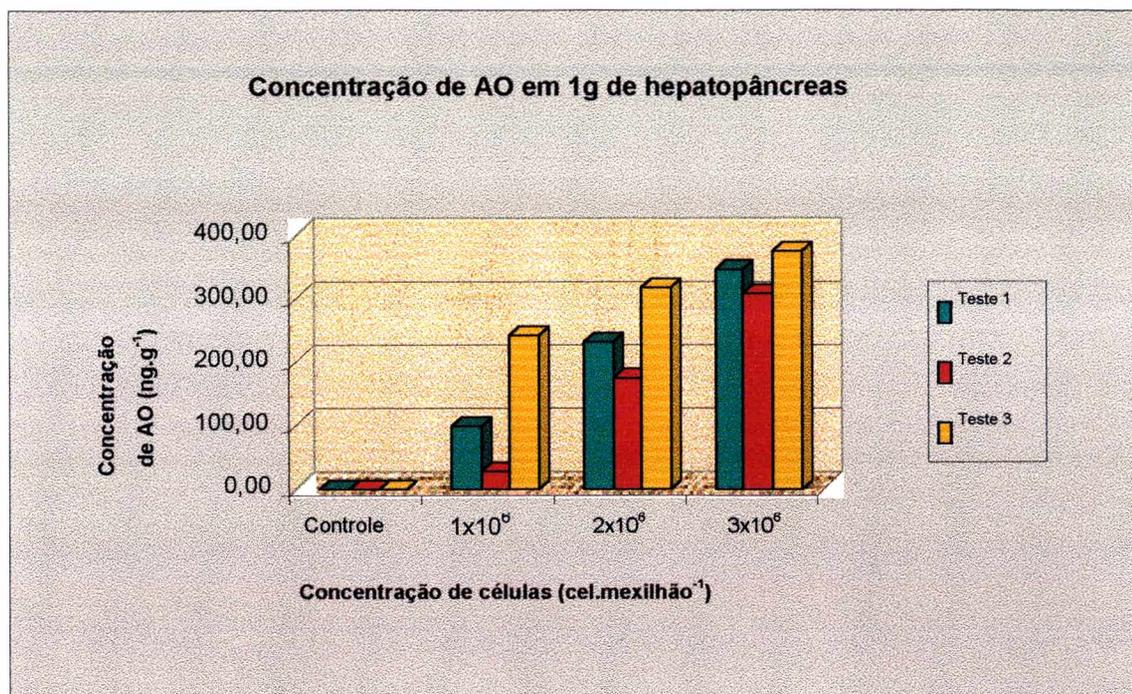
**Tabela 4:** Valores de pH, OD e temperatura medidos durante os três ensaios realizados.

<b>Exposição</b> <b>(células de <i>P. lima</i>.</b> <b>Mexilhão<sup>-1</sup>)</b>		<b>PH</b>	<b>OD (mg.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>Ensaio</b> <b>Número 1</b>	<b>Controle</b>	7,18 (±0,07)	3,55 (±0,26)	22 (±1)
	<b>1 x 10<sup>6</sup></b>	7,29 (±0,84)	3,74 (±0,17)	22 (±1)
	<b>2 x 10<sup>6</sup></b>	7,35 (±0,11)	3,64 (±0,16)	22 (±1)
	<b>3 x 10<sup>6</sup></b>	7,46 (±0,07)	3,66 (3,39 – 3,92)	22 (±1)
<b>Ensaio</b> <b>Número 2</b>	<b>Controle</b>	7,39 (±0,11)	3,21 (±0,32)	22 (±1)
	<b>1 x 10<sup>6</sup></b>	7,59 (±0,11)	3,30 (±0,28)	22 (±1)
	<b>2 x 10<sup>6</sup></b>	7,46 (±0,18)	3,17 (±0,21)	22 (±1)
	<b>3 x 10<sup>6</sup></b>	7,54 (±0,18)	3,08 (±0,16)	22 (±1)
<b>Ensaio</b> <b>Número 3</b>	<b>Controle</b>	7,52 (±0,27)	3,99 (±0,51)	22 (±1)
	<b>1 x 10<sup>6</sup></b>	7,52 (±0,21)	3,81 (±0,47)	22 (±1)
	<b>2 x 10<sup>6</sup></b>	7,45 (0,25)	3,83 (±0,49)	22 (±1)
	<b>3 x 10<sup>6</sup></b>	7,50 (±0,22)	3,84 (0,47)	22 (±1)

**Tabela 5:** Concentração de AO das amostras realizadas, obtidas nos três testes efetuados.

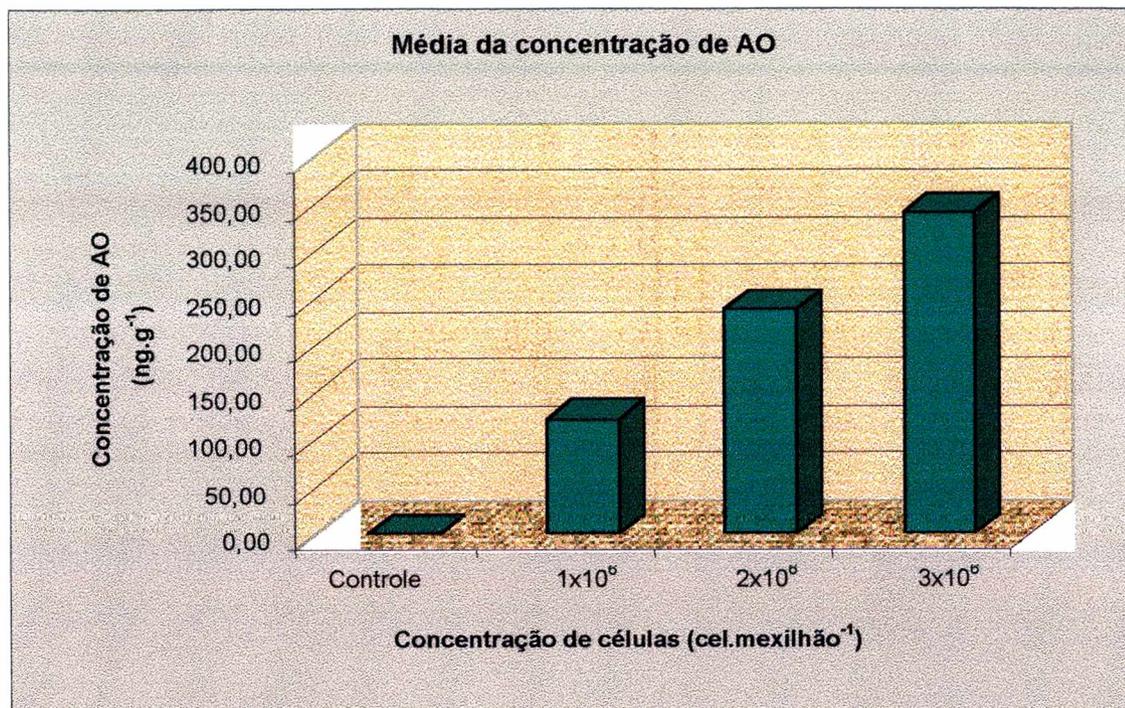
Exposição (celulas de <i>P. lima</i> .mexilhão <sup>-1</sup> )		Concentração de AO em 1 g de hepatopâncreas (ng.g <sup>-1</sup> )	Concentração de AO em 1 g de carne (ng.g <sup>-1</sup> )	Concentração de AO nas fezes (ng.mexilhão <sup>-1</sup> )
Ensaio Número 1	Controle	0,00000	0,00000	0,00000
	1 x 10 <sup>6</sup>	100,400	0,00000	0,01037
	2 x 10 <sup>6</sup>	230,400	0,00000	0,03873
	3 x 10 <sup>6</sup>	344,700	0,00000	0,06320
Ensaio Número 2	Controle	0,00000	-	-
	1 x 10 <sup>6</sup>	25,6000	-	-
	2 x 10 <sup>6</sup>	173,400	-	-
	3 x 10 <sup>6</sup>	307,900	-	-
Ensaio Número 3	Controle	0,00000	-	-
	1 x 10 <sup>6</sup>	242,400	-	-
	2 x 10 <sup>6</sup>	314,900	-	-
	3 x 10 <sup>6</sup>	370,800	-	-

Embora já demonstrados os valores na tabela 5, na Figura 15 é apresentada uma comparação das concentrações de AO encontradas nos hepatopâncreas dos mexilhões, nos três testes realizados. A figura permite uma visualização mais adequada do aumento da concentração do AO, em função da maior densidade celular de *P. lima* utilizada como alimento para os mexilhões.



**Figura 15:** Concentração AO encontrada nos hepatopâncreas dos mexilhões nos três ensaios realizados.

A Figura 16 mostra a média das concentrações de AO nos hepatopâncreas para as diferentes concentrações de *P. lima* dos três ensaios realizados. Como se pode verificar, o uso de um valor médio conduz a uma melhor definição do caso estudado, reduzindo valores extremos próprios da experimentação (amostragem e análise).



**Figura 16:** Média da concentração de AO obtida nos três ensaios.

#### 5. 4 Teste de Bioacumulação e eliminação do ácido ocadaico

Foram realizados dois testes, com a finalidade de verificar a bioacumulação e a cinética de eliminação do AO nos hepatopâncreas e nas fezes dos mexilhões.

No primeiro ensaio, que teve uma duração de quinze dias, os mexilhões de todos os aquários-teste, exceto o grupo controle, foram alimentados, nos cinco primeiros dias, com uma solução contendo uma concentração de  $2 \times 10^5$  cel.dia<sup>-1</sup>.mexilhão<sup>-1</sup> de *P. lima*. Nos 10 dias seguintes, todos os mexilhões foram alimentados com uma solução de *Chaetoceros* sp com concentração de  $3,6 \times 10^7$  cel.dia<sup>-1</sup>.mexilhão<sup>-1</sup>. Porém esse ensaio foi interrompido no décimo segundo

dia, como consequência de desova e morte dos mexilhões nos aquários de teste.

O segundo ensaio, com dez dias de duração (cinco dias de alimentação com *P. lima* e cinco dias de alimentação com *Chaetoceros* sp), foi realizado com sucesso, observando a metodologia descrita no item 2. 2. 4. 3.

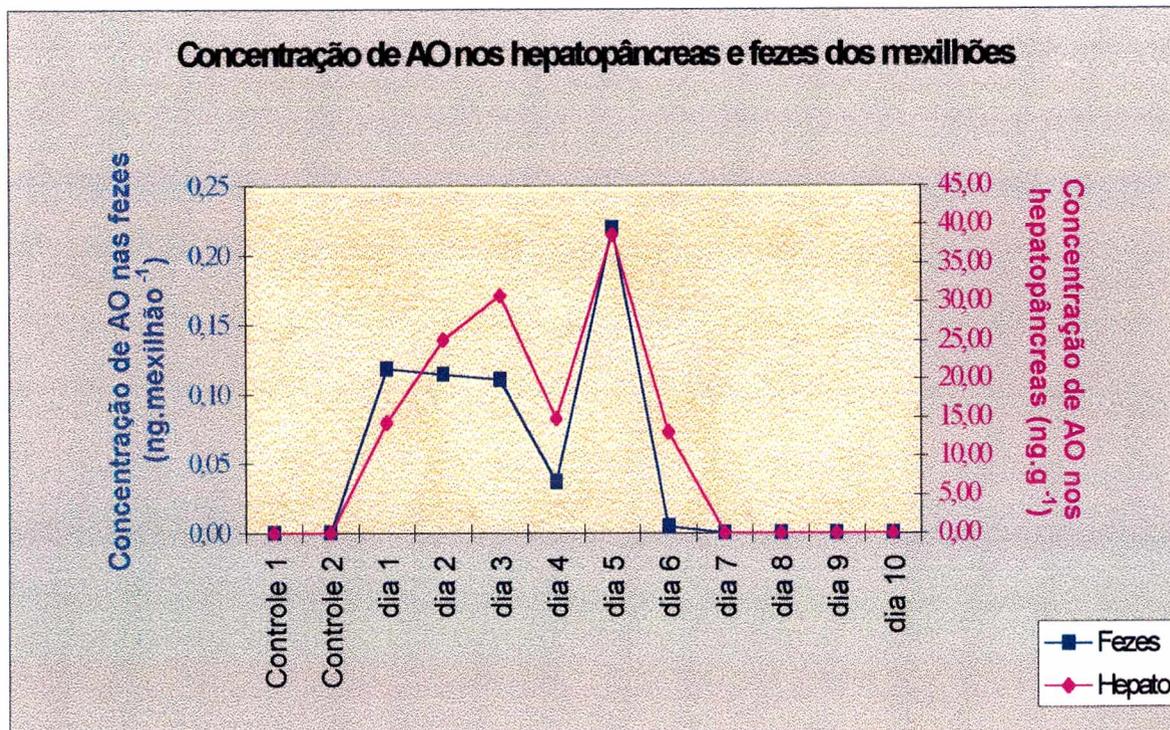
Os valores de concentração de AO dos hepatopâncreas e das fezes, encontrados através da análise em CLAE, estão listados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Concentração de AO nos hepatopâncreas ( $\text{ng.g}^{-1}$ ) e nas fezes ( $\text{ng.mexilhão}^{-1}$ ) encontradas nos mexilhões, no teste de bioacumulação e eliminação do .AO

<b>Dia</b>	<b>Concentração de AO em 1g de hepatopâncreas (<math>\text{ng.g}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração de AO nas fezes (<math>\text{ng.mexilhão}^{-1}</math>)</b>
Controle 1	0,0000	0,000
Controle 2	0,0000	0,000
Dia 1	14,304	0,118
Dia 2	25,029	0,114
Dia 3	30,689	0,110
Dia 4	14,818	0,370
Dia 5	38,692	0,219
Dia 6	13,074	0,005
Dia 7	0,0000	0,000
Dia 8	0,0000	0,000
Dia 9	0,0000	0,000
Dia 10	0,0000	0,000

Foi observada a ausência de AO nos animais do grupo controle, evidenciando a não-contaminação anterior dos mesmos.

Durante os dias em que os animais foram alimentados com *P. lima*, houve uma certa proporcionalidade entre o bioacumulado e o eliminado nas fezes, fato observado na Figura 17.



**Figura 17:** Concentração de AO nos hepatopâncreas e fezes dos mexilhões estudados.

Através da figura apresentada acima, pode-se verificar a correspondência entre as curvas de concentração de AO nos hepatopâncreas e nas fezes dos mexilhões, apesar da utilização de escalas diferentes para a apresentação dos valores das referidas concentrações. Porém, nesta mesma figura, observa-se um comportamento inesperado na tendência geral das

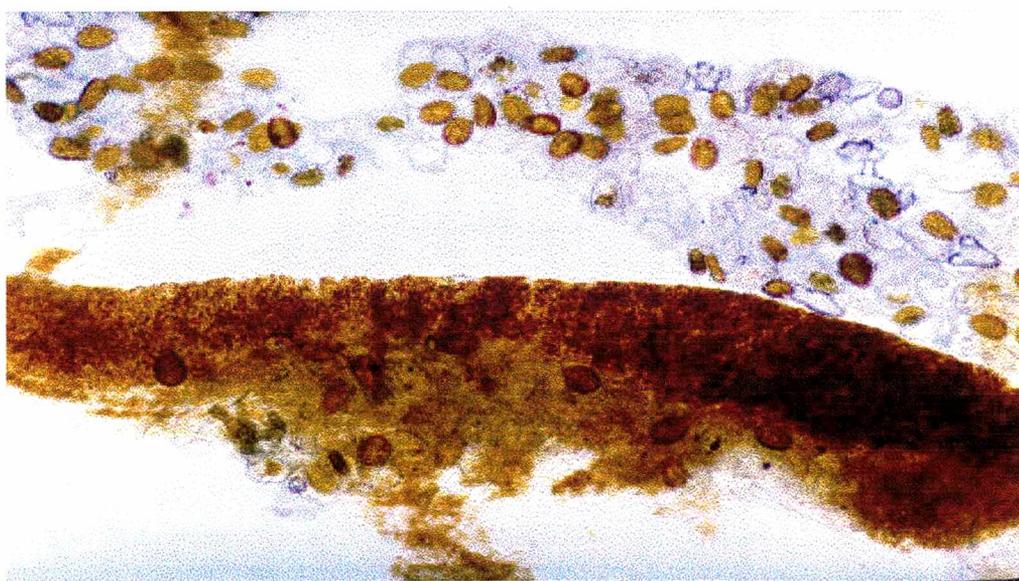
curvas obtidas, referentes ao quarto dia de experimento. A diminuição da concentração de AO, tanto nos hepatopâncreas como nas fezes dos mexilhões, foi inesperada, já que as condições de teste não variaram durante todo o período do ensaio. Sugere-se a possibilidade de que, neste período, os animais tenham deixado de se alimentar por algum fator biológico não estudado, ou de que tenha havido uma baixa da concentração de AO nas células de *P. lima*.

Segundo BAUDER e col., 1996, em anteriores estudos realizados, quando foi avaliada a absorção das toxinas de DSP por moluscos da espécie *Mytilus edulis* alimentados com *P. lima*, foi verificado um padrão errático do conteúdo da toxina presente nos hepatopâncreas dos mexilhões durante o período de exposição a estes dinoflagelados. O mesmo padrão de comportamento de acumulação das toxinas de DSP foi também observado em moluscos da espécie *Argopecten irradians*. A variação na concentração das toxinas de DSP poderia ser explicada como uma flutuação no conteúdo de toxina presente nas células de *P. lima* e também pela bioconversão do AO e da DTX-1 realizada pelos mexilhões.

Outro ponto a ser comentado é a observação de um pico que aparece nas análises das amostras de fezes do primeiro até o quinto dia, junto ao pico de DEO (ANEXO 2), o que sugere a presença de DTX-1 nas amostras testadas, já que ela elue imediatamente antes do DEO. A Dinophysistoxina-1 (DTX-1) se refere a uma das toxinas de DSP e apresenta-se um pouco mais tóxica que o AO com uma LD50 de 160 $\mu$ g/Kg em bioensaio com camundongos, enquanto o AO apresenta uma LD50 de 200 $\mu$ g/Kg. Essa toxina, juntamente

com o AO e as DTX-2 e DTX-3 são responsáveis pelos eventos de “Envenenamento diarréico por consumo de mariscos” (QUILLIAM e WRIGHT, 1995).

Cabe assinalar também que, em todos os momento, foram observadas nas fezes dos mexilhões células aparentemente intactas de *P. lima*, assim como carapaças vazias, comprovando a importância da eliminação do *P. lima* via trato digestivo dos mexilhões (Figura 18). A esse respeito, BRICELJ e col., (1993), sugeriram a possibilidade de que, através da constante filtração dos moluscos, os organismos tóxicos seriam transferidos, juntamente com os biodepósitos (fezes e pseudofezes), da coluna de água para o fundo do mar. Esse processo, além de influir negativamente nos organismos bentônicos presentes nos sedimentos marinhos e em outros que deles poderiam se alimentar, poderia ter alguma relação com a duração e a recorrência das eflorescências algais (LAABIR e GENTIEN, 1999).



**Figura 18:** Presença de carapaças vazias e células de *P. lima* verificada nas fezes dos mexilhões.

O principal resultado obtido com este estudo foi a verificação da rápida eliminação do AO realizada pelos mexilhões *P. perna* após o restabelecimento das condições normais, ou seja, o cultivo em águas sem a presença do *P. lima* e alimentação farta com *Chaetoceros* sp. Os resultados mostraram que, apenas 48h após a troca da alimentação utilizando células de *P. lima* por células de *Chaetoceros* sp., não foi mais encontrado AO bioacumulado nos hepatopâncreas dos mexilhões *P. perna*, fato que contradiz as experiências realizadas no hemisfério norte. Quando ocorrem as contaminações em países europeus, a descontaminação de mexilhões da espécie *Mytilus edulis* ocorre mais lentamente, podendo demorar alguns dias, ou até semanas (IFREMER, 1993).

As condições ambientais do Brasil propiciam um crescimento mais rápido dos mexilhões do que aquele verificado em países europeus. Sendo assim, esses animais atingem um tamanho comercial com seis a oito meses de cultivo, enquanto, na Europa, o tempo de cultivo varia de quatorze a dezoito meses. Esse fato pode estar intimamente ligado a fatores ambientais e ao metabolismo dos animais, podendo explicar o motivo da eliminação mais rápida para a espécie *P. perna*, em localidades onde as temperaturas anuais sejam mais elevadas.

É importante ressaltar a necessidade da repetição dos ensaios realizados, a fim de confirmar os resultados obtidos e, também, possibilitar a aplicação de técnicas estatísticas. A análise estatística teria como objetivo minimizar variações nos valores de concentração encontrados através das análises em CLAE, bem como facilitar a interpretação dos mesmos.

As oscilações encontradas nos valores de concentração podem estar ligadas a fatores biológicos individuais (ZALESKY e col., 1999) e às dificuldades inerentes do método. As operações com os hepatopâncreas dos mexilhões, a coleta das fezes e o método de análise empregado com múltiplas manipulações conduzem a uma infinidade de pequenos erros na preparação das amostras e, sendo assim, a uma inevitável dispersão dos valores obtidos (QUILLIAM, 1995).

Nesse sentido, com relação á análise de controle das toxinas, segundo informações obtidas através do Dr. José Benedicto Albaladejo, do Centro Oceanográfico de Murcia, muito recentemente se desenvolveu um método de ensaio "in vitro" para detectar a presença de toxinas de DSP em mexilhões. Esse método, destinado a substituir o ensaio com camundongos, que é considerado pouco preciso e sem possibilidade de automatização, foi patenteado e é fruto de um projeto de investigação de uma equipe composta pelos pesquisadores da CECOPESCA, pelos laboratórios da Associação Nacional de Fabricantes de Conserva e Pescado e Mariscos (ANFACO) sitos em Vigo (Pontevedra) e pelos Departamentos de Farmacologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Veterinária de Vigo. A técnica proposta, que oferece maior rapidez e confiabilidade que a anterior (bioensaio com camundongos), encontra-se ainda em fase de validação, existindo para isso um projeto, amparado pelas autoridades da Comunidade Européia, para sua implantação nos diferentes laboratórios nacionais de controle.

---

## 6 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Foi comprovado que o “Envenenamento diarréico por consumo de mariscos” (DSP) é um severo distúrbio gastrointestinal causado pelo consumo de moluscos contaminados por dinoflagelados tóxicos, como certas espécies de *Dinophysis* e *Prorocentrum*. (YASUMOTO e col., 1985)

*Prorocentrum lima* é um organismo bentônico que produz ácido ocadaico e seus derivados (DTX). Mundialmente distribuído, no Brasil foi detectado no litoral de São Paulo e de Santa Catarina (CARDOSO, 1993).

Sendo assim, constatada a presença de *P. lima* (CARDOSO, 1993) e de espécies de *Dinophysis*, inclusive *D. acuminata* (PROENÇA e col., 1999) nas águas do litoral brasileiro, particularmente no litoral de Santa Catarina, e dado o potencial tóxico desses dinoflagelados e a importância do cultivo de mexilhões *Perna perna* para a região, o objetivo da presente investigação foi o estudo dos mecanismos de bioacumulação e de eliminação do ácido ocadaico em moluscos da espécie *P. perna*.

Ao término do trabalho chegou-se a importantes conclusões baseadas nos resultados experimentais:

- Primeiramente, por não ter sido encontrado AO nos animais do grupo controle, conclui-se que, em situação normal, os mexilhões podem ser utilizados como alimento sem qualquer risco de intoxicação com AO para os consumidores, fato que reforça a necessidade de um sistema de monitorização das eflorescências de algas nocivas.

- Através dos resultados obtidos nos ensaios realizados, verificou-se a ausência de toxicidade aguda de *P. lima*, para os mexilhões *P. perna*, nas concentrações utilizadas.
- Não foi detectada a toxicidade aguda de extratos de hepatopâncreas e fezes contaminados com *P. lima*, para as fotobactérias *Vibrio fisheri*, nas concentrações-teste.
- Apesar do tamanho, as células de *P. lima* foram utilizadas como alimento para os mexilhões *P. perna*, e o ácido ocadaico se acumulou em seus hepatopâncreas.
- Foi constatada a presença de células de *P. lima*, aparentemente viáveis, nas fezes dos mexilhões contaminados, o que pode influir na recorrência e duração de eventos tóxicos e na contaminação de outros compartimentos do ecossistema marinho.
- Nos experimentos em que os mexilhões da espécie *P. perna* foram alimentados com cultivo de *P. lima*, através das análises realizadas com cromatografia líquida, as maiores concentrações das toxinas DSP (ácido ocadaico) se encontram tanto nos hepatopâncreas como nas fezes, seguindo uma possível seqüência de acumulação e eliminação, comprovando-se que a deposição fecal é um importante mecanismo de desintoxicação.
- A eliminação do ácido ocadaico nos hepatopâncreas e nas fezes dos mexilhões mostrou-se bastante rápida, a partir do momento em que foi mudado o tipo de alimentação dos mexilhões, substituindo *P. lima* por *Chaetoceros* sp.

Embora haja necessidade de repetir os experimentos para a confirmação dos resultados, através da realização deste estudo obteve-se um bom indício do comportamento metabólico dos mexilhões *P. perna*, em face de uma floração de algas tóxicas.

Dada a importância do problema de moluscos contaminados com AO em relação à Saúde Pública, parece conveniente que as autoridades competentes articulem normas para um melhor controle das produções, isto é, uma regulamentação sanitária que fixe as normas aplicáveis à produção e comercialização de moluscos bivalves com base em critérios técnicos. Tais normas sanitárias deveriam mencionar os conteúdos máximos permitidos em exames bacteriológicos, os compostos tóxicos e nocivos de origem natural ou introduzidos no meio ambiente e em toxinas (PSP, ASP e DSP). A esse respeito, para orientação, inclui-se neste trabalho uma tabela (ANEXO 3) onde são informados os métodos exigidos para a determinação dos conteúdos de toxina diarréica (DSP) em diferentes países, assim como os valores máximos neles permitidos.

Conhecendo os efeitos nefastos das toxinas marinhas e a crescente produção de moluscos em Santa Catarina, o maior produtor nacional de moluscos, constatou-se que há necessidade de um controle eficiente da qualidade dos mexilhões, com o fim de evitar grandes intoxicações agudas e seus efeitos crônicos. Portanto, a implantação de um “Programa Estadual de Controle de Eflorescências de Algas Tóxicas”, é fundamental para três setores distintos, ou seja: a Saúde Pública, o Meio Ambiente e a Economia.

**ANEXO 1: Relatórios dos testes de toxicidade  
aguda com *Vibrio fisheri***



test: FEZES02  
 sample: Fezes dia 02  
 date: 24.11.99

sample-concentration: ,5  
 dimension: ml  
 dilution series: geometr.  
 No. Of steps: 9  
 pre-dilution: 1  
 (1=without dilution)

examiner: Márcia  
 batch: 1  
 instr. type + no.: LPG259/750479  
 time: 30 minutes

Dr. Bruno Lange GmbH							
Values							
concentr.	G-value	lo	lc	lct	inh. T	Inh. mean	validity
k1	0	2326,00	2523,00	2497,66	-1,01		1,01
		2352,00	2500,00	2525,58	1,01	0,00	yes
0,00	512	2387,00	2523,00	2563,16	1,57		0,28
		2351,00	2499,00	2524,50	1,01	1,29	yes
0,00	256	2332,00	2536,00	2504,10	-1,27		-0,58
		2363,00	2540,00	2537,39	-0,10	-0,69	yes
0,00	128	2363,00	2515,00	2537,39	0,88		0,38
		2445,00	2582,00	2625,44	1,65	1,27	yes
0,01	64	2404,00	2601,00	2581,42	-0,76		0,67
		2398,00	2560,00	2574,97	0,58	-0,09	yes
0,02	32	2365,00	2076,00	2539,54	18,25		10,36
		2422,00	2665,00	2600,74	-2,47	7,89	no
0,03	16	2420,00	2583,00	2598,60	0,60		0,86
		2411,00	2618,00	2588,93	-1,12	-0,26	yes
0,06	8	2358,00	2425,00	2532,02	4,23		1,40
		2465,00	2609,00	2646,92	1,43	2,83	yes
0,13	4	2482,00	2520,00	2665,17	5,45		0,36
		2517,00	2536,00	2702,75	6,17	5,81	yes
0,25	2	2558,00	2538,00	2746,78	7,60		0,13
		2600,00	2587,00	2791,88	7,34	7,47	yes

correction factor fc	fc:	% deviation:	valid acc to DIN:
correction 1: 1,0847	1,0738		
correction 2: 1,0629	valid	1,03	yes

lo mean: 2326,00	ec50:	GL: 2
color correction	:	GL:

ec-calculation with following values:						reg-table	
con	% inhib.	gamma	log gamma	log con	Gamma lin. Reg	ec	concentr. ml
ml			Y	X			
0,00	1,296	0,013				20	
0,00	-0,69	-0,007				30	
0,00	1,27	0,013				40	
0,01	-0,09	-0,001				50	
0,02	7,89	0,086				60	
0,03	-0,26	-0,003				70	
0,06	2,83	0,029				80	
0,13	5,81	0,062					
0,25	7,47	0,081					





test: HEPATO02  
 sample: hepatopancreas dia 02  
 date: 24.11.99

sample-concentration: ,5                      examiner: Márcia  
 dimension: ml                                batch: 1  
 dilution series: geometr.                instr. type + no.: LPG259/750479  
 No. Of steps: 9                                time: 30 minutes  
 pre-dilution: 1  
 (1=without dilution)

Dr. Bruno Lange GmbH							
Values							
concentr.	G-value	lo	lc	lct	inh. T	Inh. mean	validity
k1	0	2078,00	2180,00	2251,10	3,16		3,15
		2009,00	2245,00	2176,35	-3,15	0,01	no
0,00	512	1888,00	2037,00	2045,27	0,40		1,10
		1634,00	1724,00	1770,11	2,60	1,50	yes
0,00	256	1748,00	1787,00	1893,61	5,63		1,92
		1516,00	1613,00	1642,28	1,78	3,71	yes
0,00	128	1686,00	1748,00	1826,44	4,29		0,85
		2097,00	2213,00	2271,68	2,58	3,44	yes
0,01	64	1706,00	1732,00	1848,11	6,28		1,43
		1858,00	1944,00	2012,77	3,42	4,85	yes
0,02	32	1909,00	1801,00	2068,02	12,91		1,33
		1982,00	1927,00	2147,10	10,25	11,58	yes
0,03	16	1749,00	1698,00	1894,69	10,38		-0,80
		1603,00	1584,00	1736,53	8,78	9,58	yes
0,06	8	1945,00	1862,00	2107,02	11,63		0,32
		1987,00	1916,00	2152,52	10,99	11,31	yes
0,13	4	2095,00	2125,00	2269,51	6,37		0,07
		2059,00	2085,00	2230,51	6,52	6,45	yes
0,25	2	1848,00	1811,00	2001,94	9,54		0,05
		2124,00	2084,00	2300,93	9,43	9,49	yes

correction factor fc	fc:	% deviation:	valid acc to DIN:
correction 1: 1,0491	1,0833		
correction 2: 1,1175	valid	3,06	no

lo mean: 2078,00	ec50:	GL: 2
color correction	:	GL:

ec-calculation with following values:						reg-table	
con	% inhib.	gamma	log gamma	log con	Gamma	Ec	concentr. ml
ml			Y	X	lin. Reg		
0,00	1,50	0,015				20	
0,00	3,71	0,039				30	
0,00	3,44	0,036				40	
0,01	4,85	0,051				50	
0,02	11,58	0,131	-0,883	-1,699		60	
0,03	9,58	0,106				70	
0,06	11,31	0,128	-0,893	-1,222		80	
0,13	6,45	0,069					
0,25	9,49	0,105					

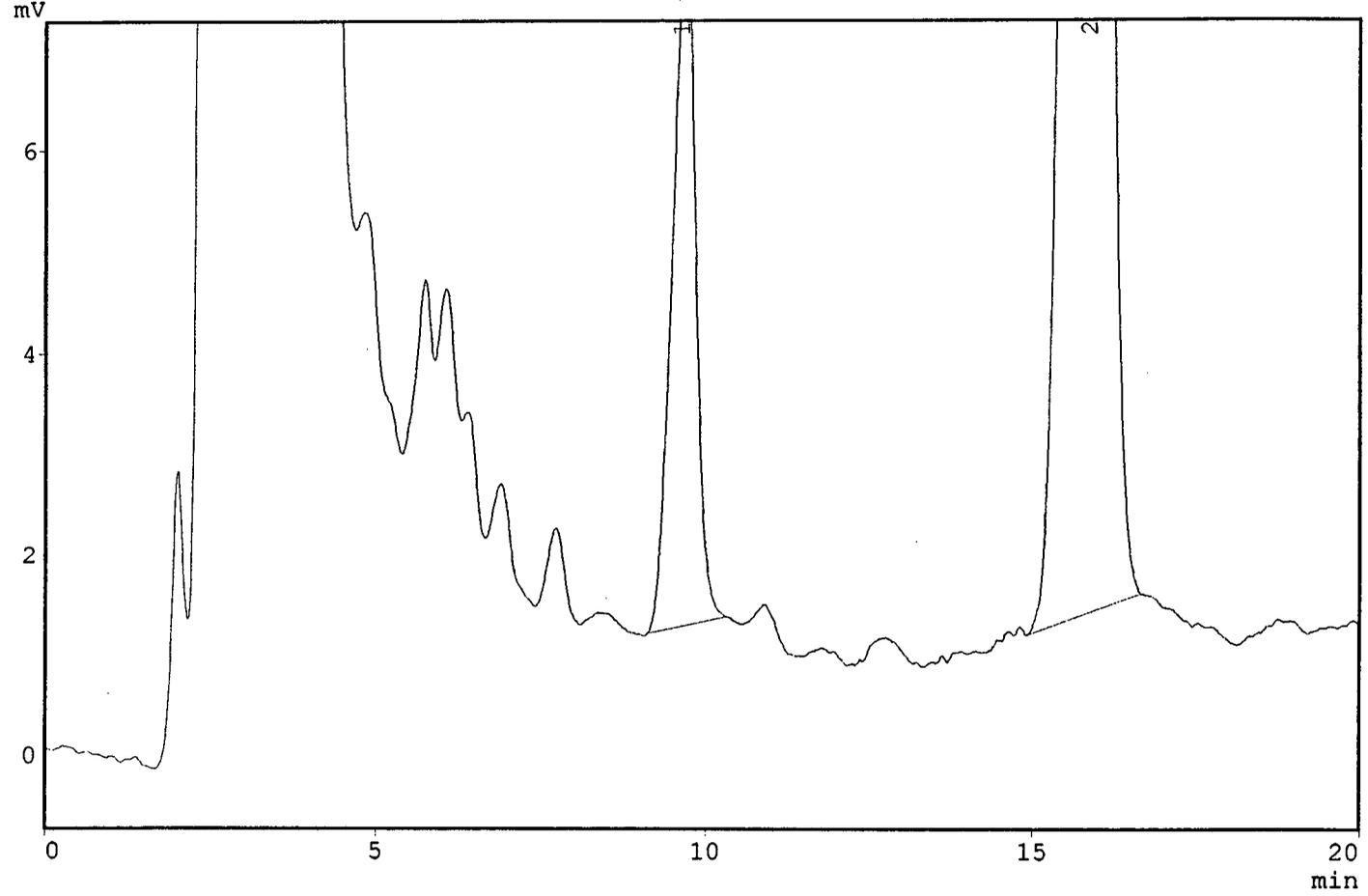


## **ANEXO 2: Cromatogramas das análises em CLAE**

le :  
ctor : Other:fluoresc  
ator : Marcia  
od Name : OKADAICO.MET

Fabricao  
móvel acetonitrila e água (8:2)  
do: Isocratico  
na: Novapac  
o: 0.5 ml/min  
Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
rimetro: ex 365 : em 415

Chromatogram \*\*\* Filename:P02F2.C01



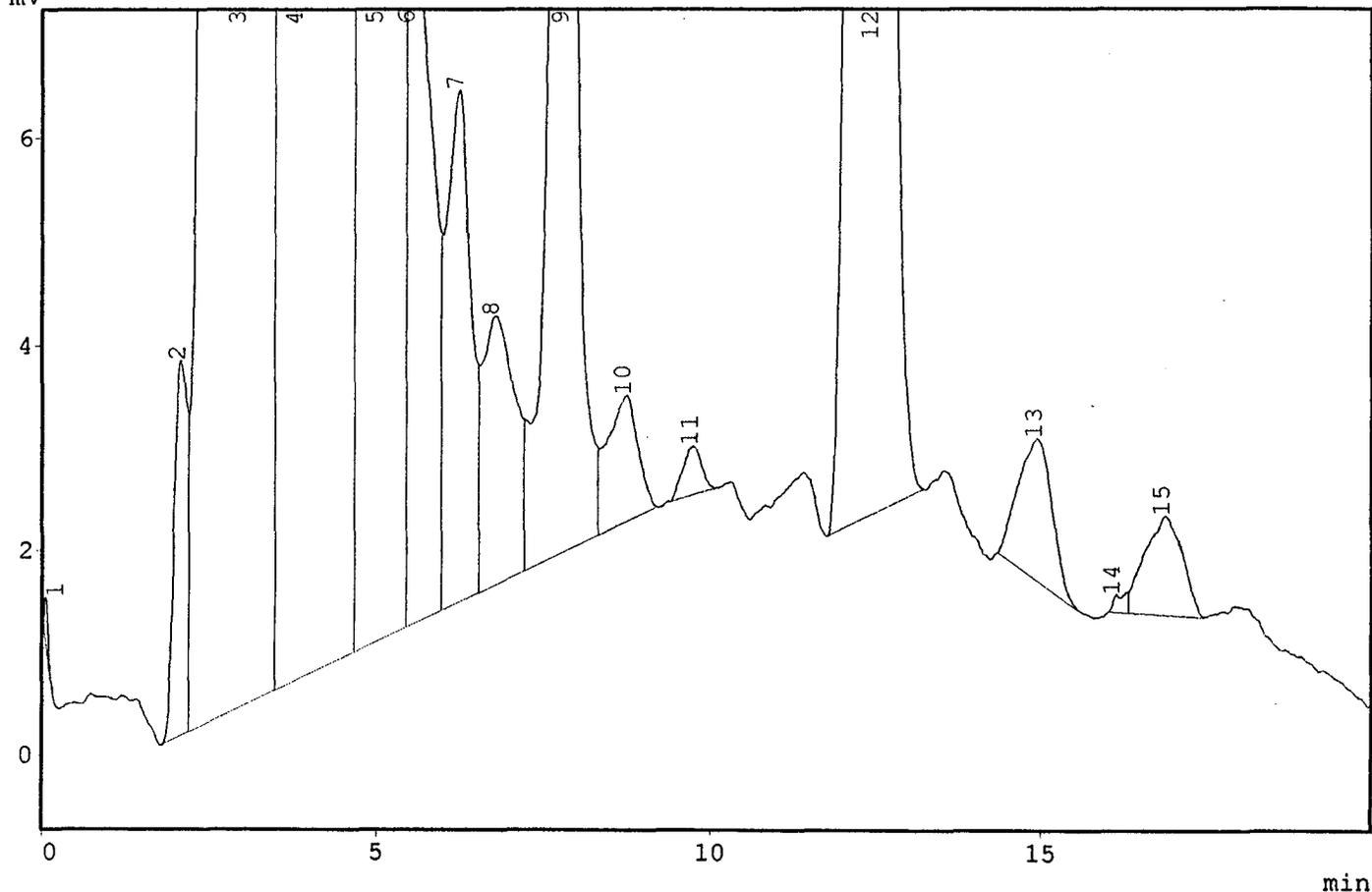
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
9.642	169669	6977
15.892	1150167	32373
-----		
	1319836	39350

le :  
 ctor : Other:fluoresc  
 ator : Marcia  
 od Name : OKADAICO.MET

AO DE OKADAICO (P01 Fabricio)  
 móvel acetonitrila e água (8:2)  
 do: Isocratico  
 na: Novapac  
 o: 0.5 ml/min  
 Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 rímetro: ex 365 : em 415

Chromatogram \*\*\* Filename:PO1M.C01  
 mV



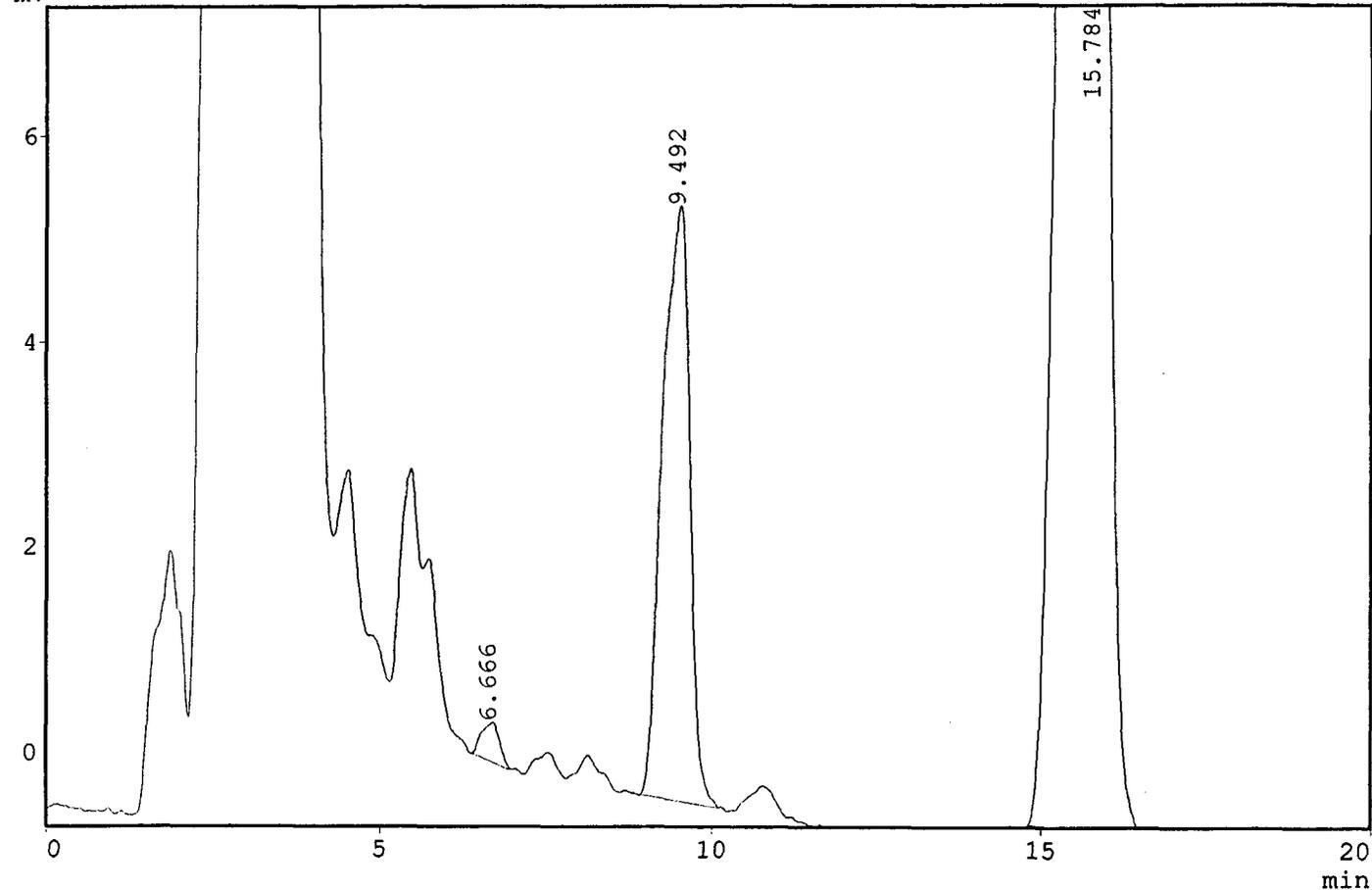
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
0.042	1401	363
2.057	51309	3669
2.944	5212030	136105
3.799	2174414	70640
4.993	467313	11864
5.467	178926	7904
6.195	125693	4985
6.733	87728	2621
7.760	398917	16970
8.720	39449	1230
9.726	9274	470
12.430	1576638	52570
14.921	48325	1379
16.108	2693	161
16.858	37393	966
-----		
	10411502	311897

Operator :  
Detector : Other:fluoresc  
Sample Name : Marcia  
Sample Name : OKADAIC2.MET

Sample Name: Padrao Acido Ocadaico  
Injection Volume: 0.5 ml  
Mobile Phase: Isocratic ACN: H2O 80:20  
Wavelength: 365 nm  
Flow Rate: 1.0 ml/min  
Column: Purospher RP-18 5 um  
Injection Volume: 0.5 ml

Chromatogram \*\*\* Filename: PADRAOAO.C01



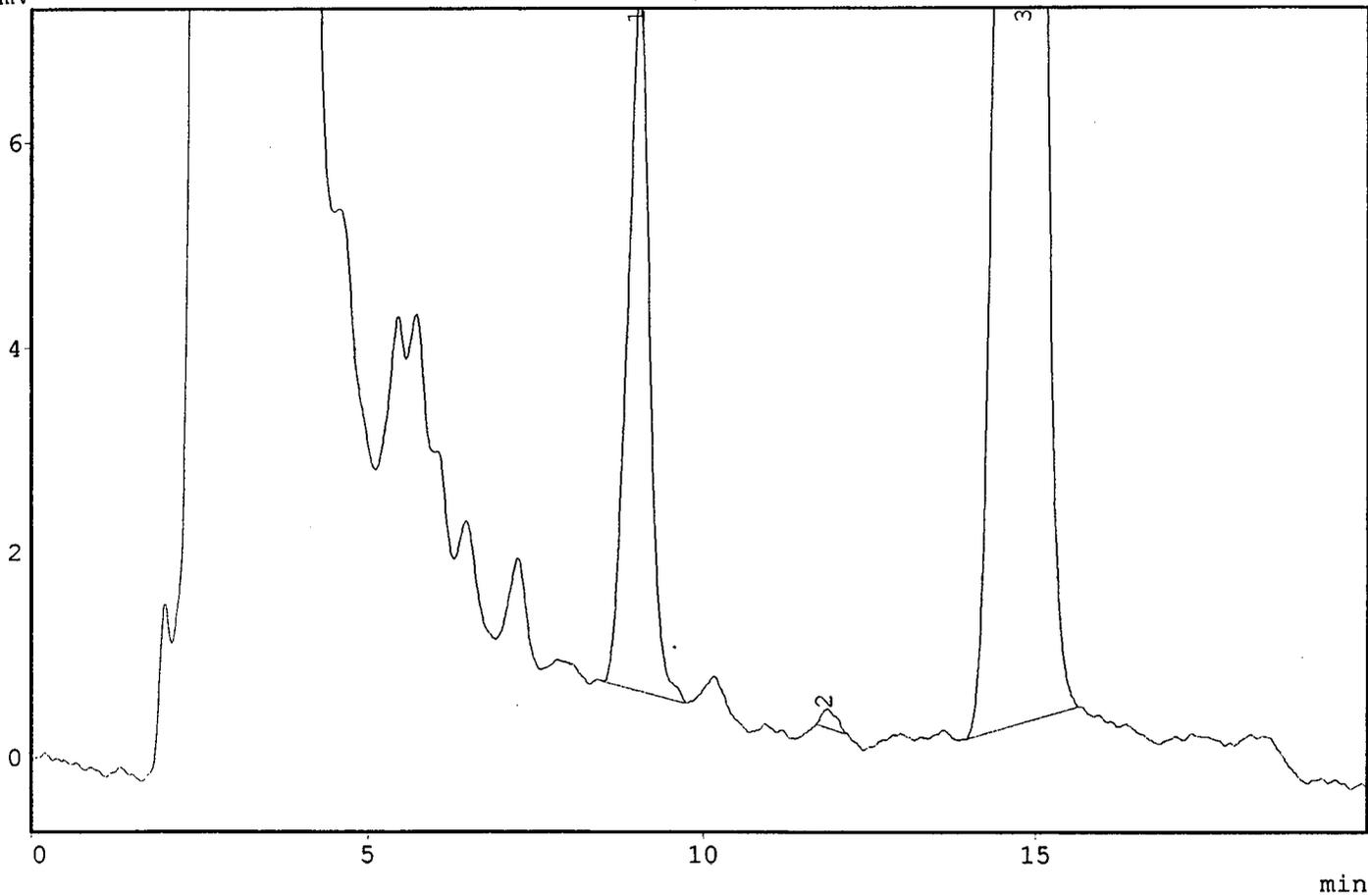
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
6.666	6899	378
9.492	165849	5785
15.784	736597	15765
-----		
	909345	21927

Operator : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Sample Name : OKADAICO.MET

Sample: P02 Fabrício  
 Solvent: móvel acetonitrila e água (8:2)  
 Mode: Isocratico  
 Column: NovaPac  
 Flow Rate: 0.5 ml/min  
 Injection: inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 Wavelength: comprimento: ex 365 : em 415

Chromatogram \*\*\* Filename:P02M.C01



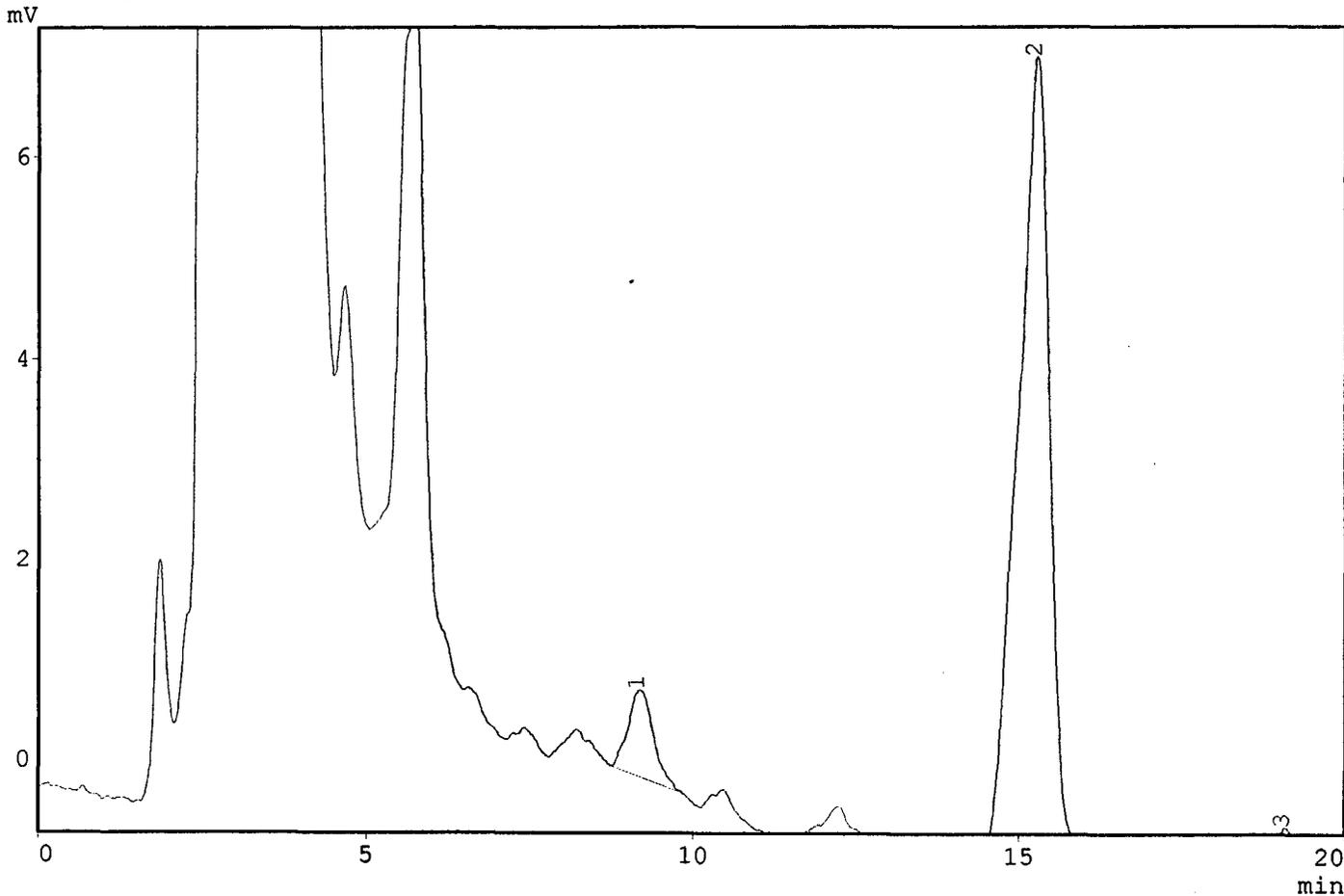
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
9.014	156128	6746
11.867	2677	178
14.836	1116537	33617
-----		
	1275341	40541

ble :  
ector : Other:fluoresc  
rator : Marcia  
od Name : OKADAICO.MET

stra P. lima 62.500cel/ml  
e móvel acetonitrila e água (8:2)  
odo: Isocratico  
ina: Novapac  
co: 0.5 ml/min  
Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
orímetro: ex 365 : em 415

Chromatogram \*\*\* Filename:PL62500.C01



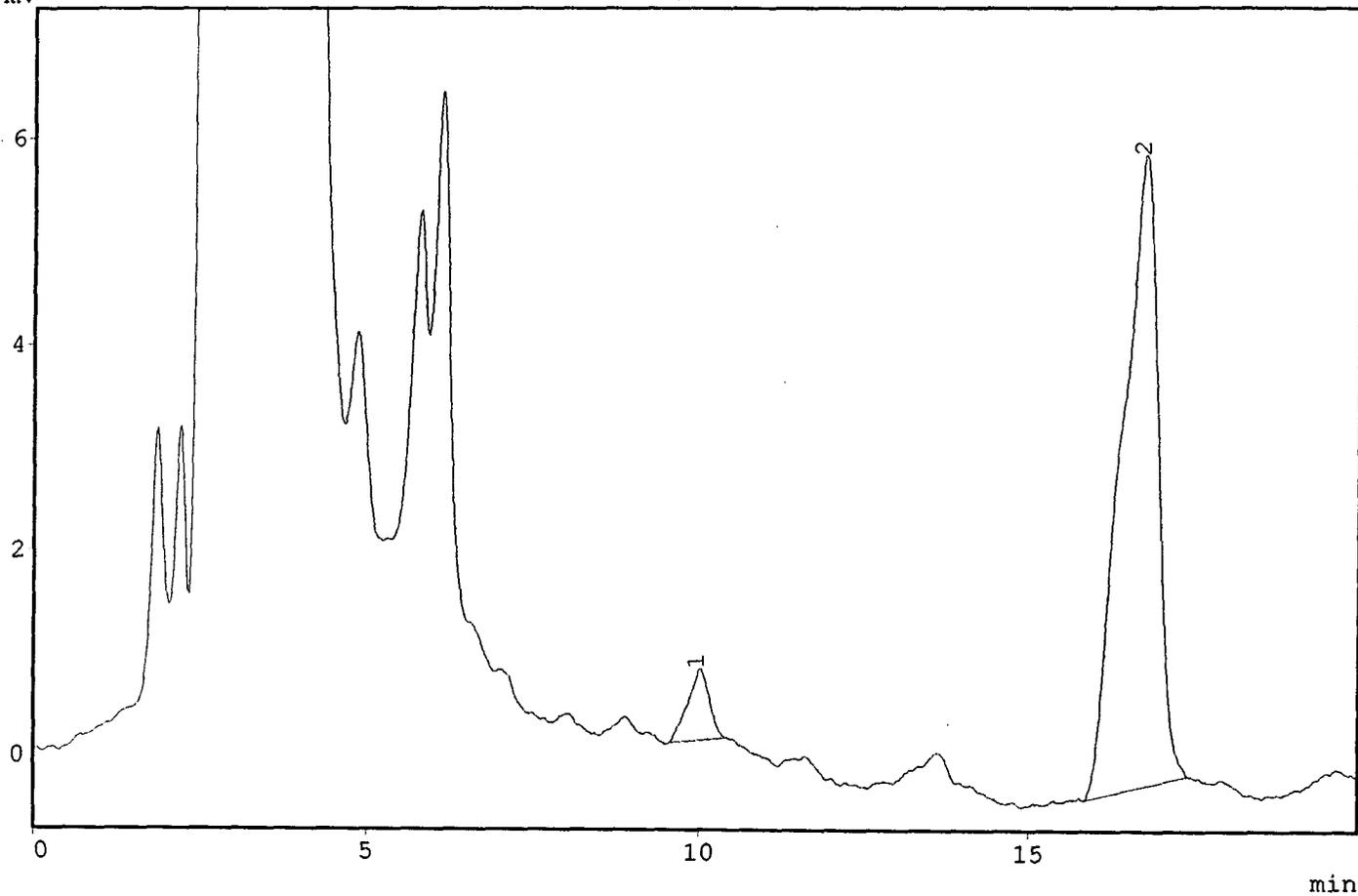
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
9.168	22333	843
15.249	261570	7844
19.071	25283	732
-----		
	309186	9420

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Substrate: Prorocentrum lima 62.500cel/ml 21/6  
Mobile phase: acetonitrila e água (8:2)  
Mode: Isocratico  
Column: Novapac  
Flow: 0.5 ml/min  
Injection: 20 ul (10 ul + 10 ul)  
Wavelength: ex 365 : em 415

Chromatogram \*\*\* Filename:PLI62500.C01  
mV



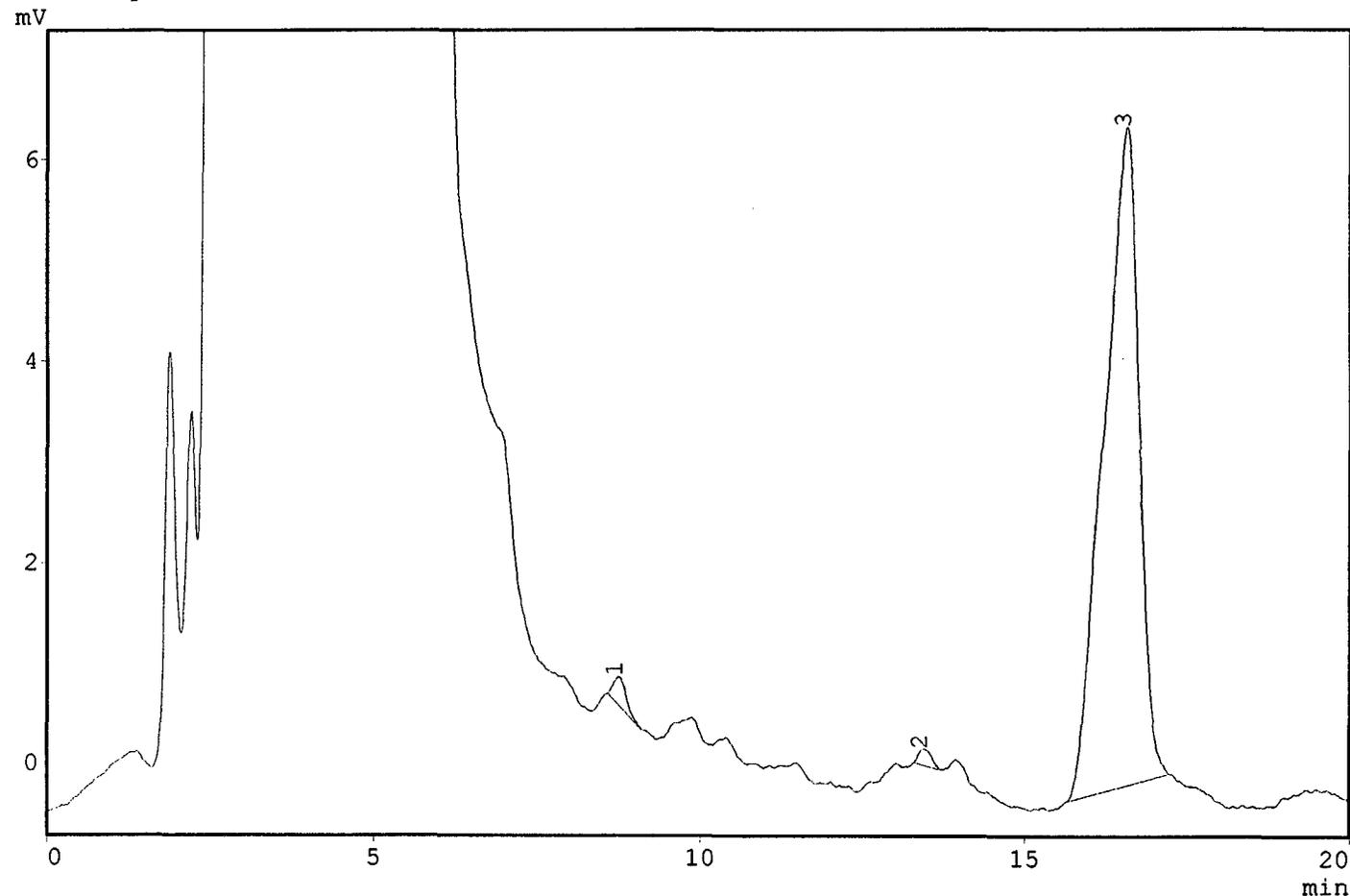
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
10.001	15293	690
16.722	232863	6122
-----		
	248156	6811

le :  
ctor : Other:fluoresc  
ator : Marcia  
od Name : OKADAICO.MET

role 07/5 Tecido  
móvel acetonitrila e água (8:2)  
do: Isocratico  
na: Novapac  
o: 0.5 ml/min  
Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
rímetro: ex 365 : em 415

Chromatogram \*\*\* Filename:C075T.C01



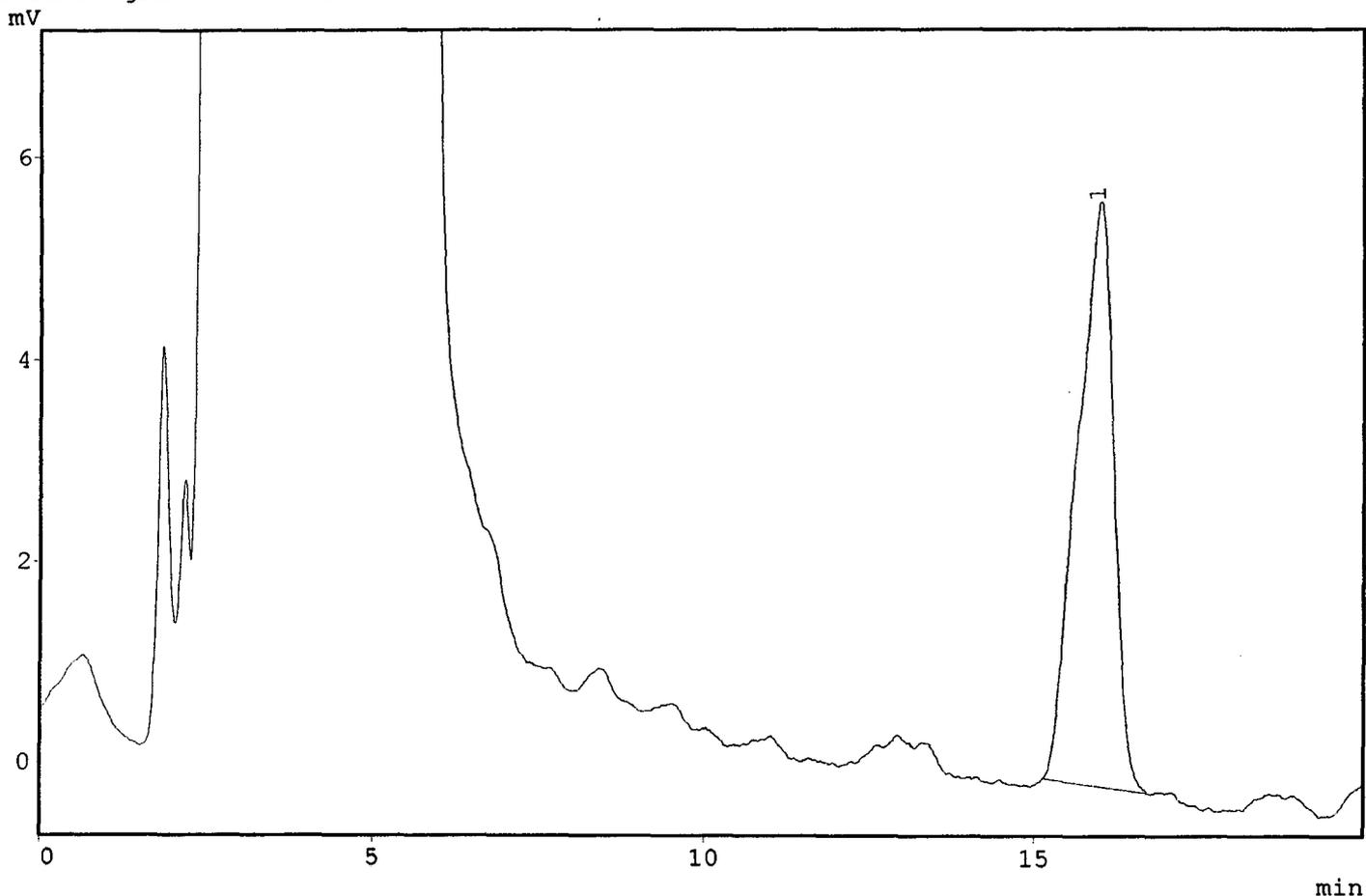
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
8.725	3494	270
13.429	2128	155
16.531	243780	6532
-----		
	249402	6958

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Amostra 3000cel/ml 07/5 Tecido  
Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
Método: Isocrático  
Coluna: Novapac  
Fluxo: 0.5 ml/min  
Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:3075T.C01



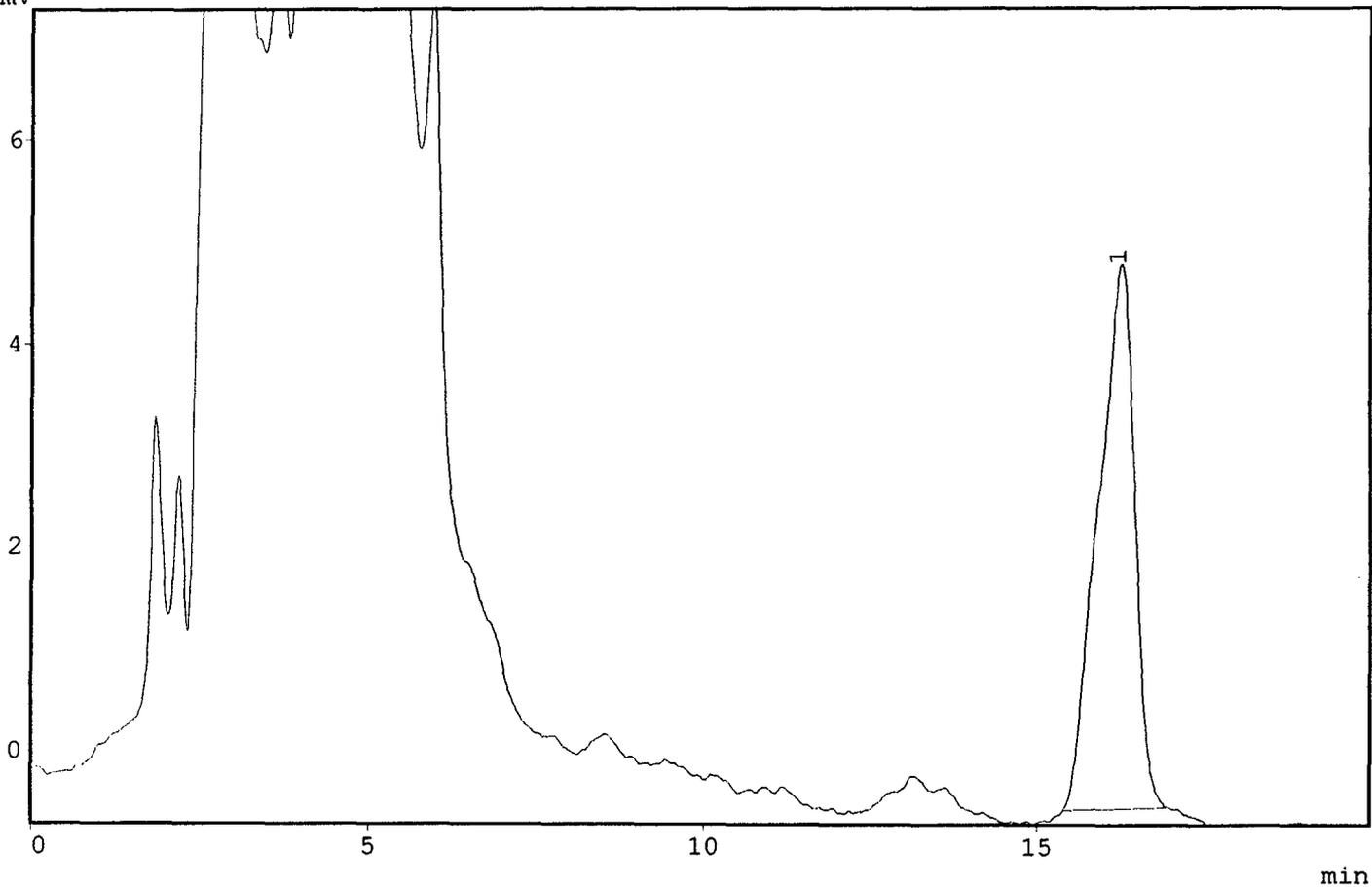
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	15.983	219901	5777
-----		219901	5777

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Substrate 6000cel/ml 07/5 Tecido  
Mobile phase: acetonitrila e água (8:2)  
Mode: Isocratic  
Column: Novapac  
Flow rate: 0.5 ml/min  
Injection: 20 ul (10 ul + 10 ul)  
Wavelength: ex 365 : em 415

\* Chromatogram \*\*\* Filename:6075T.C01  
mV



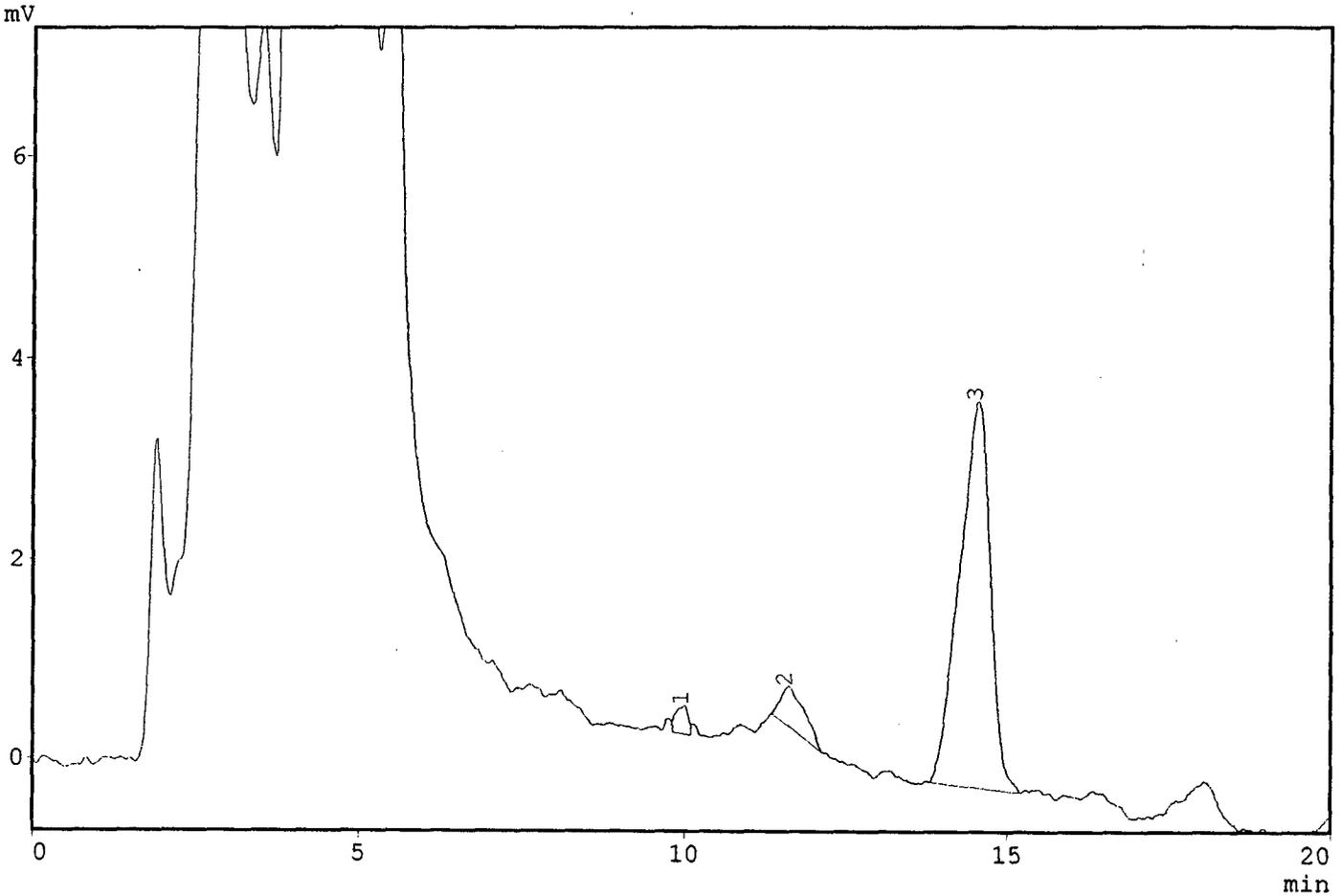
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.247	199659	5331
-----		199659	5331

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Sample: 07/05 - 9000/ml tecido  
Solvent: móvel acetonitrila e água (8:2)  
Mode: Isocratico  
Column: Novapac  
Flow: 0.5 ml/min  
Injection: 20 ul (10 ul + 10 ul)  
Wavelength: ex 365 : em 415

Chromatogram \*\*\* Filename:9075T.C01



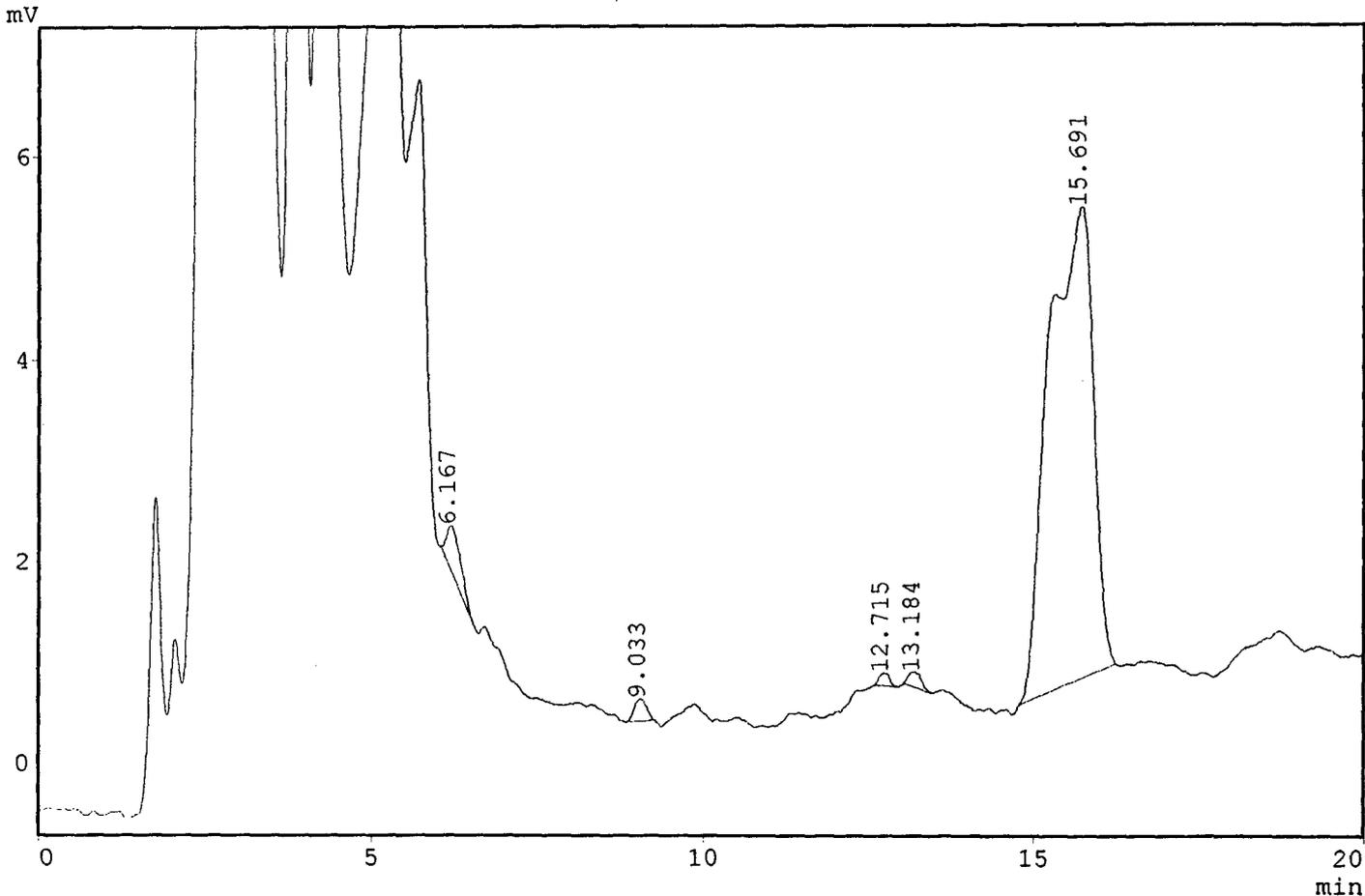
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
9.976	3663	277
11.582	10109	384
14.526	127712	3848
-----		
	141485	4509

mple :  
 tector : Other:fluoresc  
 erator : Marcia  
 thod Name : OKADAIC2.MET

ostra:Controle hepatopancreas teste 07/5  
 P: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 ; 365 am 415  
 rno 40  
 luna Purospher RP-18 5 um  
 uxo: 0,5 ml.mim  
 t+10

\* Chromatogram \*\*\* Filename:CHE075.C01



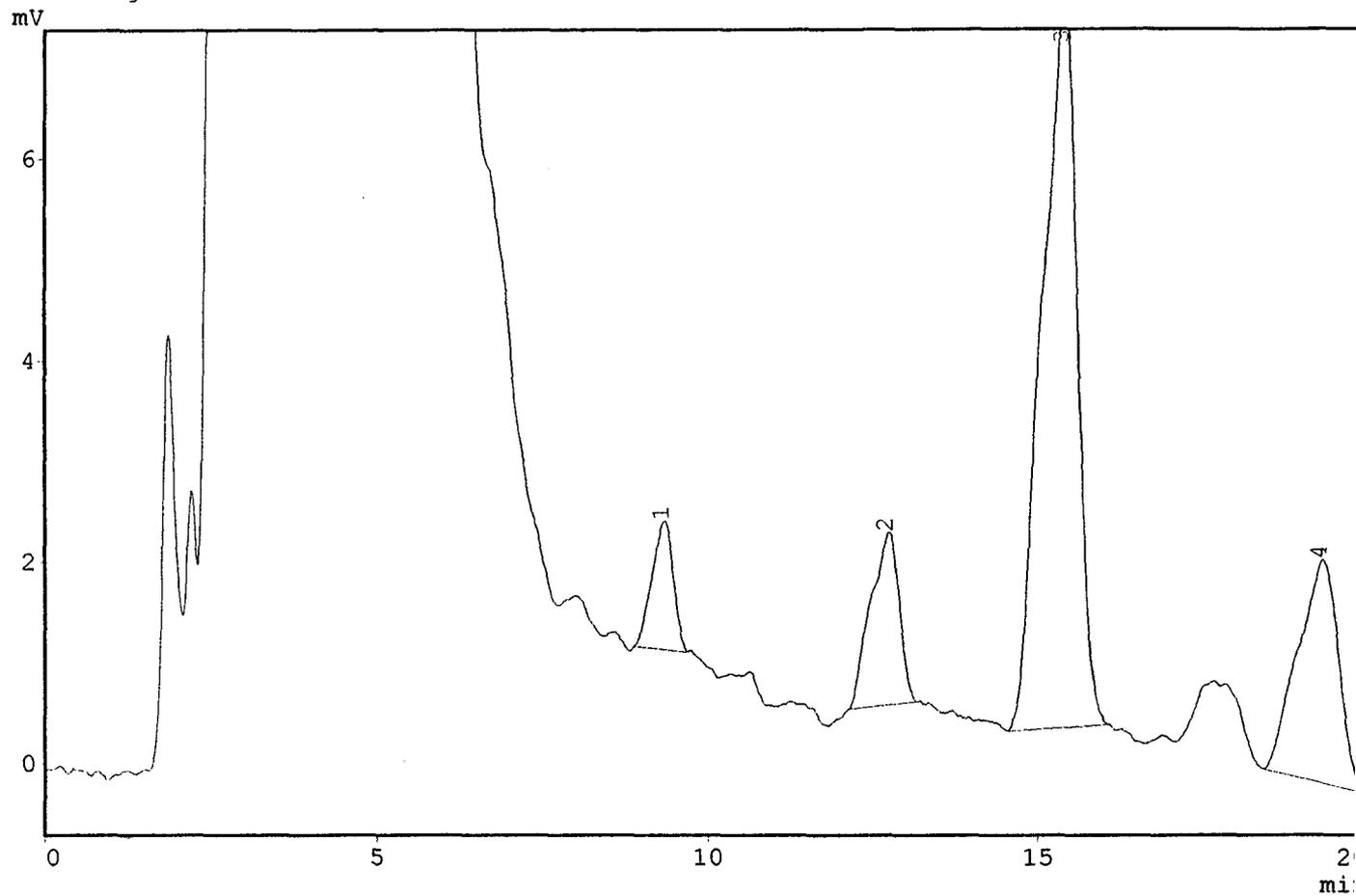
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	6.167	6274	423
2	9.033	2766	216
3	12.715	1264	121
4	13.184	1926	144
5	15.691	216233	4653
		228462	5557

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAICO.MET

Amostra 3000cel/ml 07/5 Hepatopâncreas  
 Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
 Método: Isocratico  
 Coluna: Novapac  
 Fluxo: 0.5 ml/min  
 Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:3075H.C01



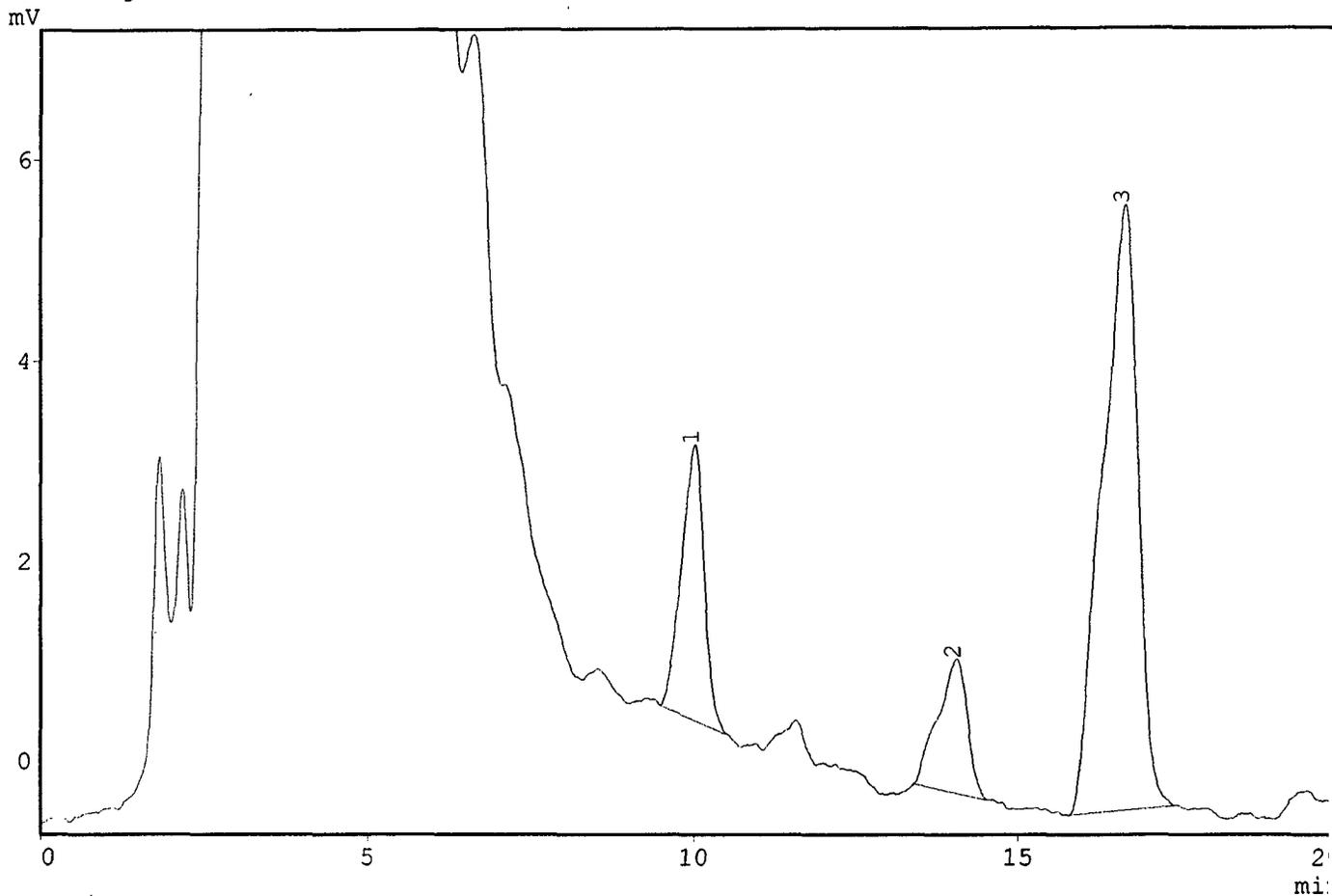
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.326	28312	1268
2	12.722	51098	1700
3	15.392	265865	7306
4	19.317	93432	2188
		438707	12461

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAICO.MET

Amostra 6000cel/ml 07/5 Hepatopâncreas  
 Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
 Método: Isocratico  
 Coluna: Novapac  
 Fluxo: 0.5 ml/min  
 Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:6075H.C01



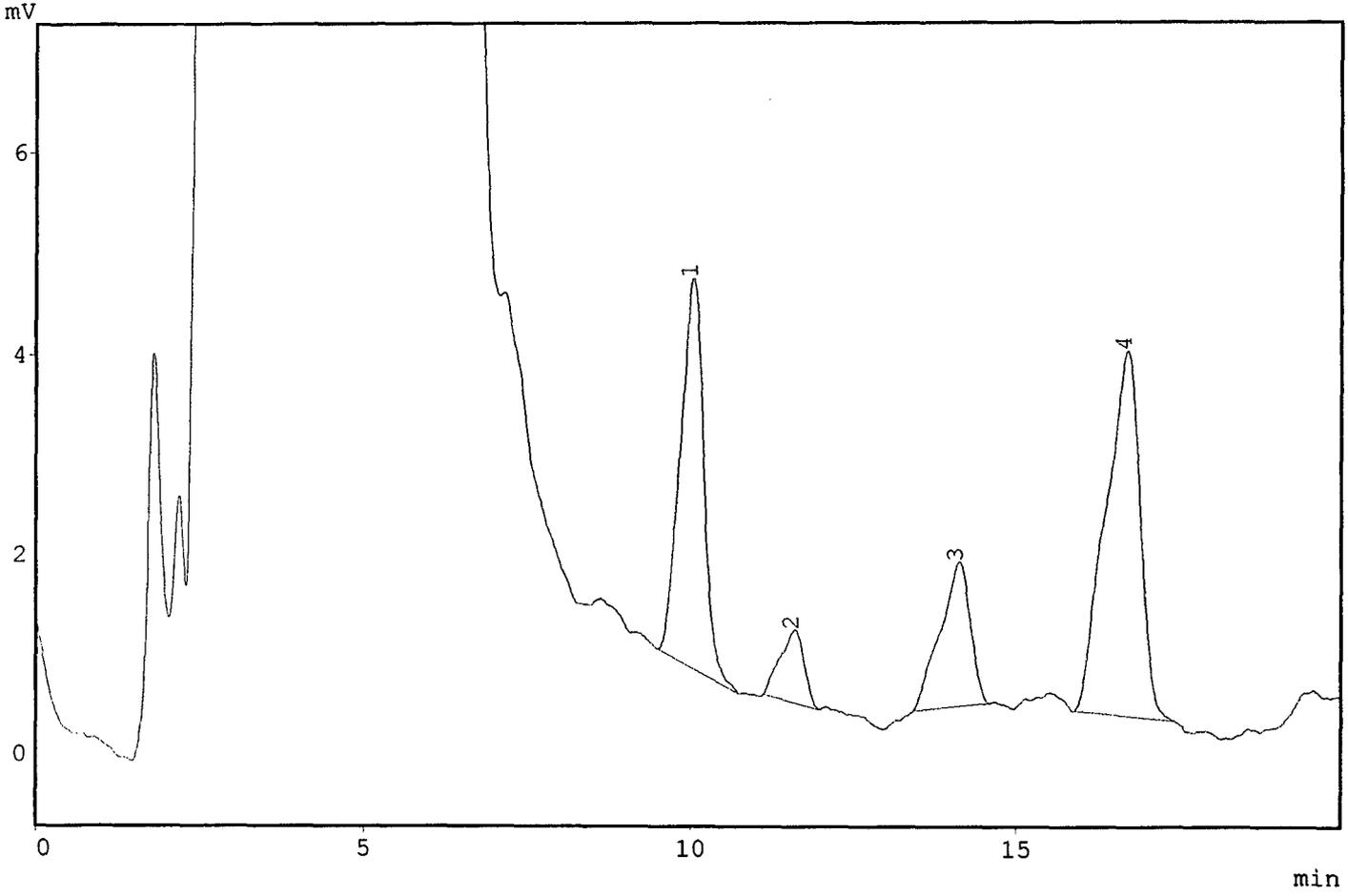
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.990	66313	2729
2	14.041	41741	1337
3	16.641	229334	6013
-----		337387	10079

sample :  
detector : Other:fluoresc  
operator : Marcia  
method Name : OKADAICO.MET

mostra 9000cel/ml 07/5 Hepatopâncreas  
fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
método: Isocrático  
coluna: Novapac  
fluxo: 0.5 ml/min  
vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:9075H.C01



\*\* Peak Report \*\*\*

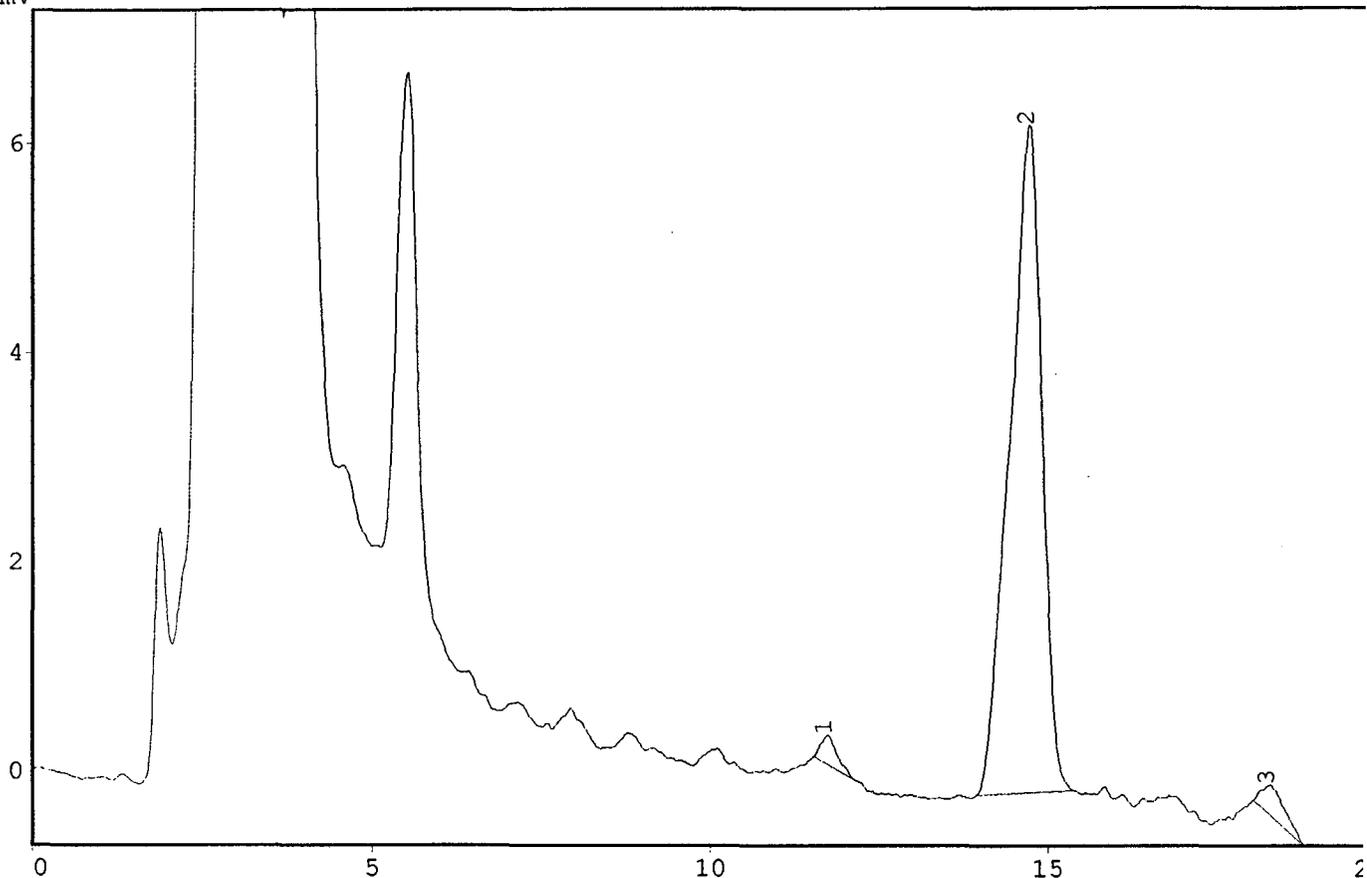
KNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	10.009	97107	3863
2	11.583	18199	723
3	14.109	46079	1439
4	16.688	133419	3634
		294804	9659

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Amostra de 07/05 - Controle Fezes  
Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
Método: Isocratico  
Coluna: Novapac  
Fluxo: 0.5 ml/min  
Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
Fluorimetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:C075F.C01

mV



\*\*\* Peak Report \*\*\*

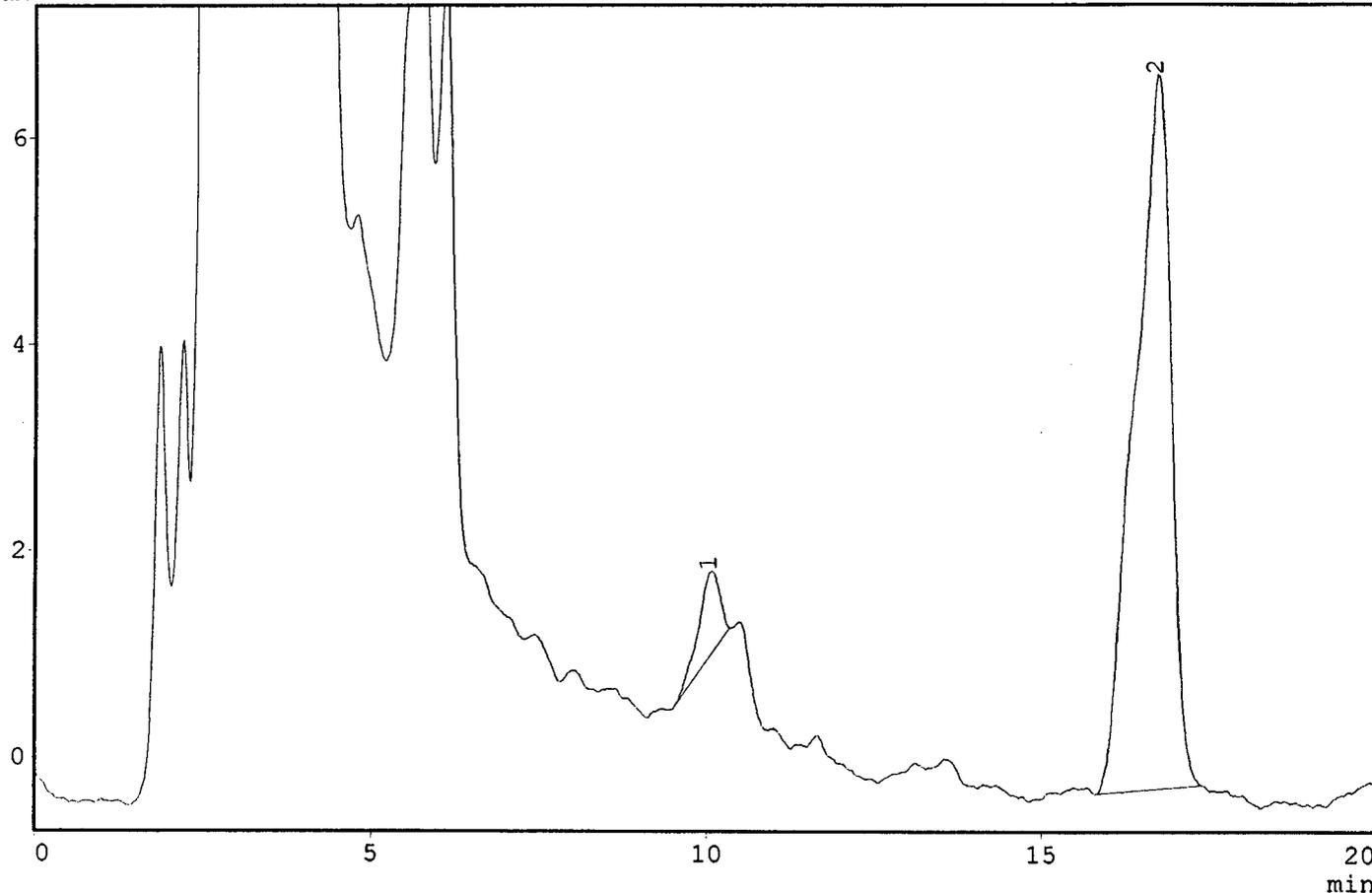
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	11.724	4422	273
2	14.705	207548	6363
3	18.272	6559	279
		-----	
		218530	6915

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Amostra 3000cel/ml 07/5 Fezes  
Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
Método: Isocratico  
Coluna: Novapac  
Fluxo: 0.5 ml/min  
Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
Fluorimetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:3075F.C01

mV



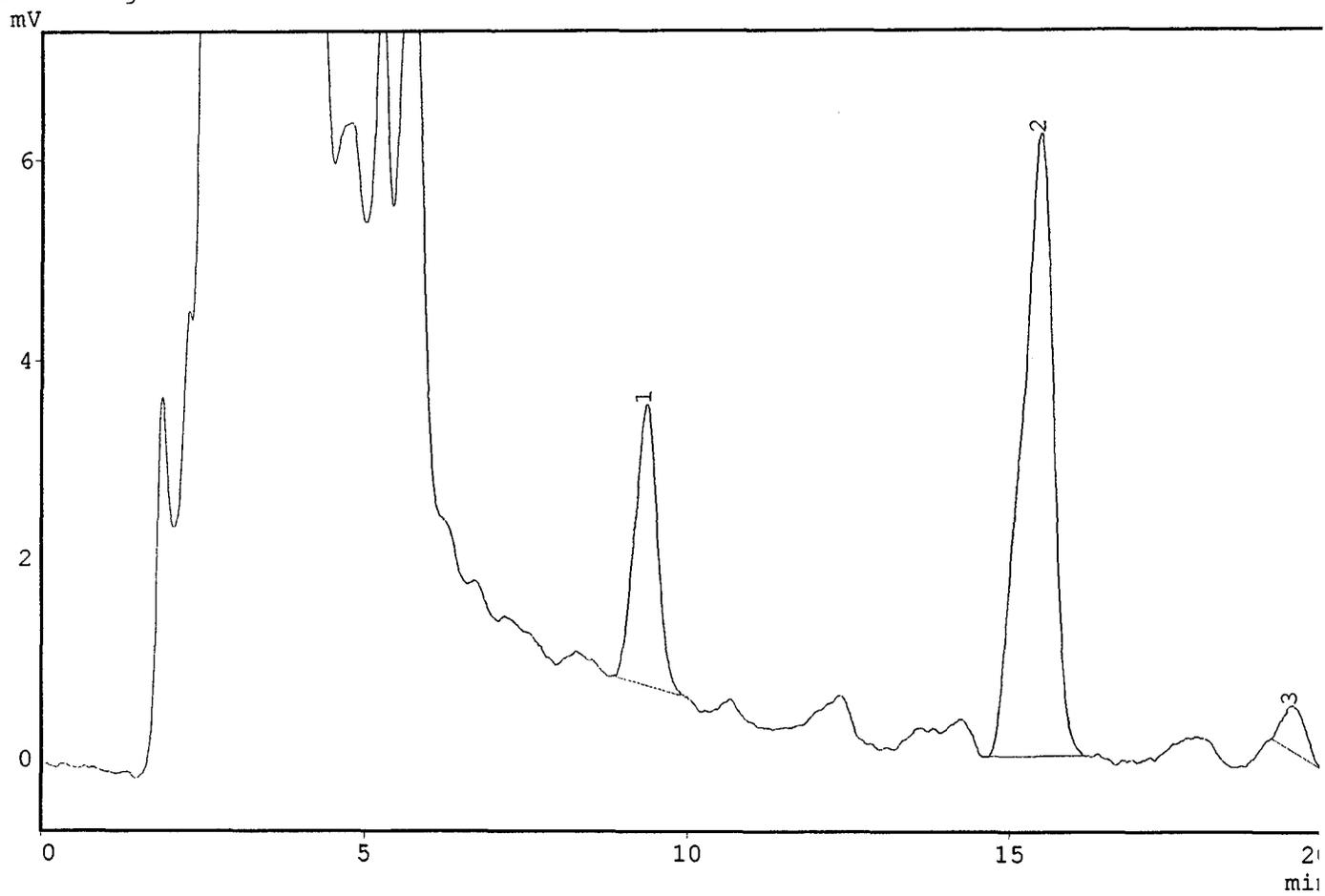
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	10.050	18262	812
2	16.712	260136	6902
-----		278398	7714

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Amostra 20/06 6000cel/ml Fezes  
Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
Método: Isocratico  
Coluna: Novapac  
Fluxo: 0.5 ml/min  
Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:6206F.C01



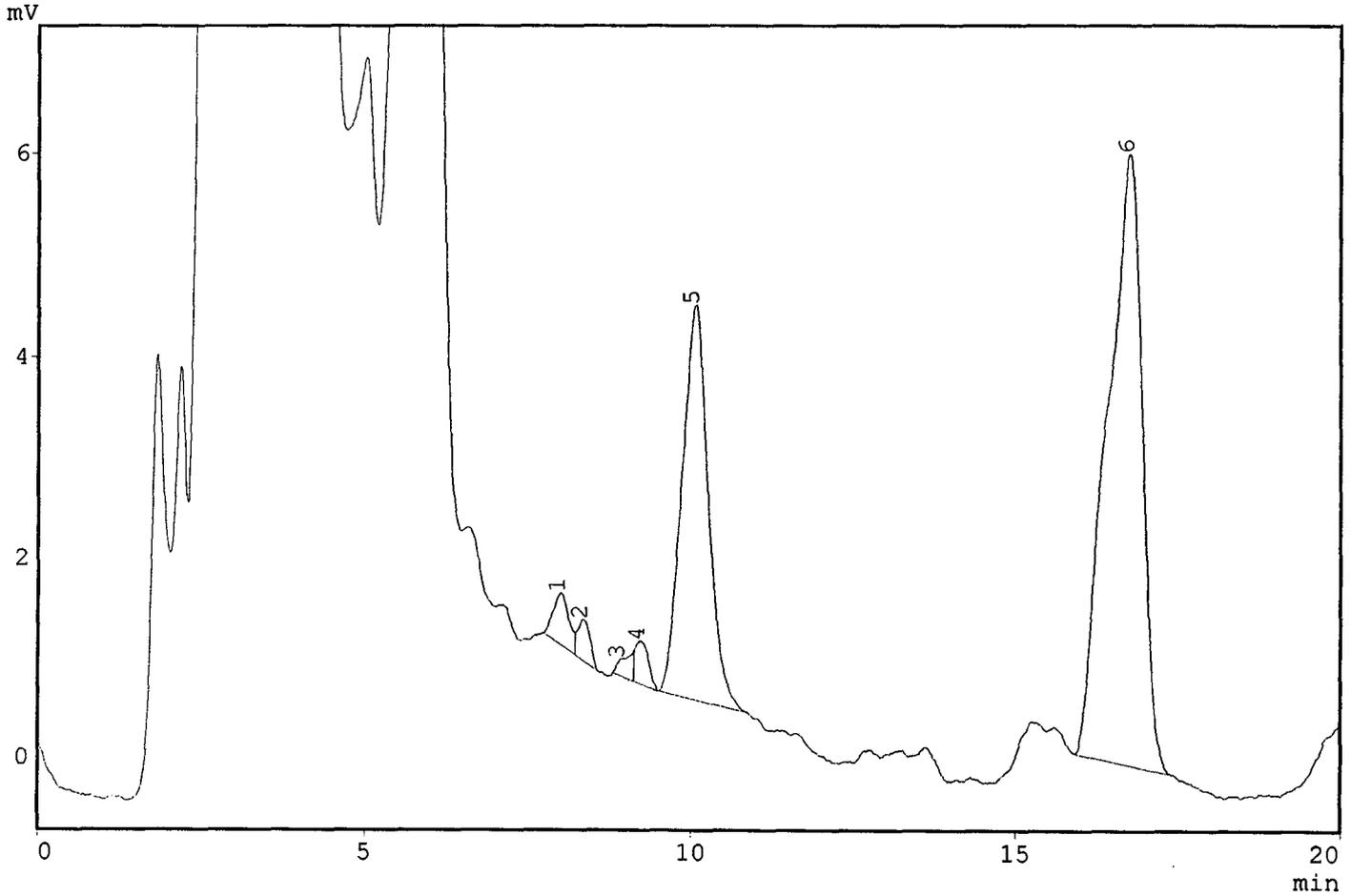
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.342	68207	2812
2	15.454	210440	6214
3	19.389	10928	442
		289575	9469

mple :  
 tector : Other:fluoresc  
 erator : Marcia  
 thod Name : OKADAICO.MET

ostra 9000cel/ml 07/5 Fezes  
 se móvel acetonitrila e água (8:2)  
 todo: Isocratico  
 luna: Novapac  
 uxo: 0.5 ml/min  
 l.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 uorímetro: ex 365 : em 415

\* Chromatogram \*\*\* Filename:9075F.C01



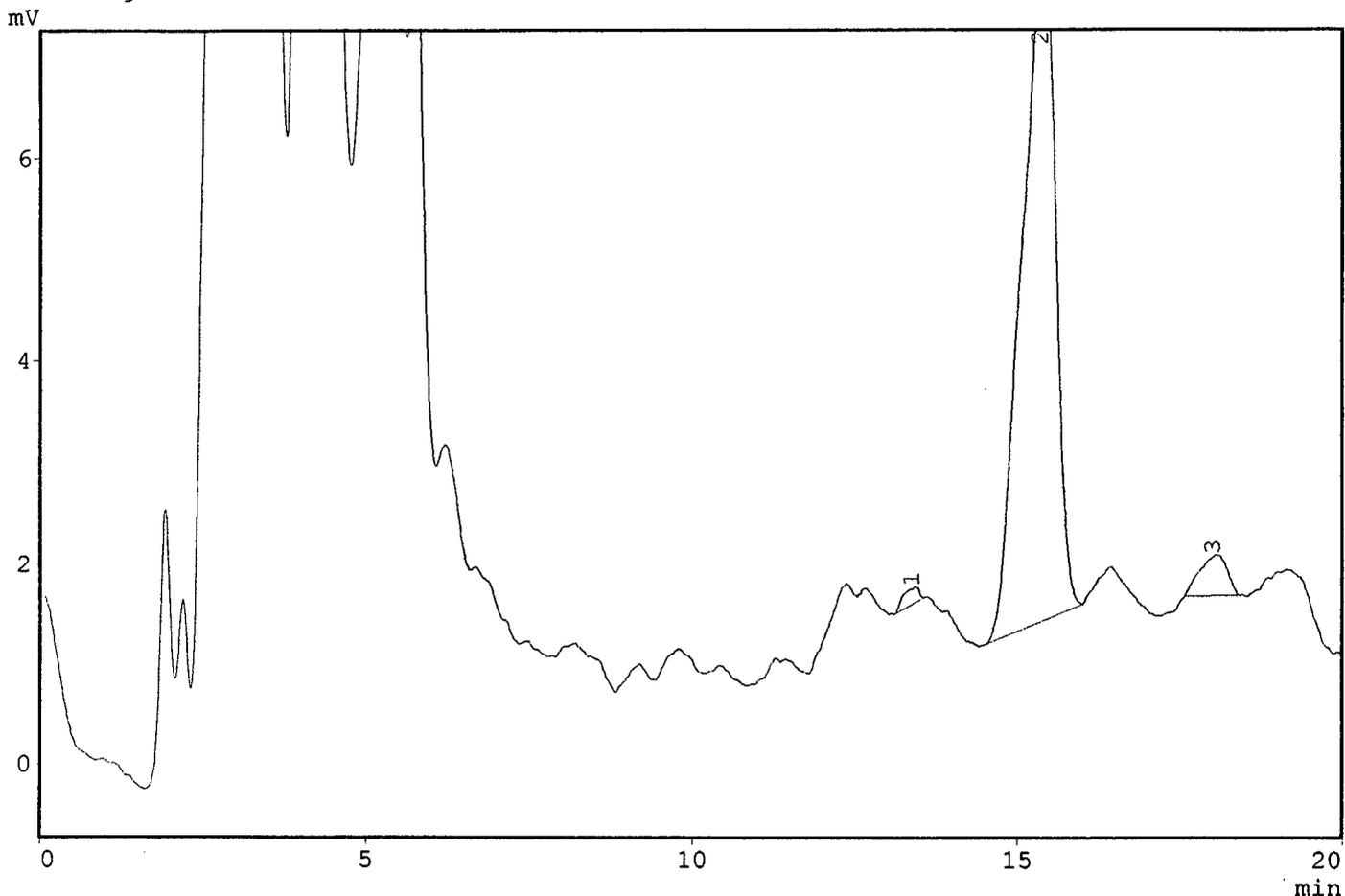
Peak Report \*\*\*

O	TIME	AREA	HEIGHT
1	7.982	8744	516
2	8.328	5176	413
3	8.892	3424	156
4	9.199	5627	422
5	10.038	111302	3930
6	16.733	225506	6059
-----		359779	11495

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAICO.MET

Controle 28/5 Hepatopâncreas  
 Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
 Método: Isocratico  
 Coluna: Novapac  
 Fluxo: 0.5 ml/min  
 Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:C285H.C01



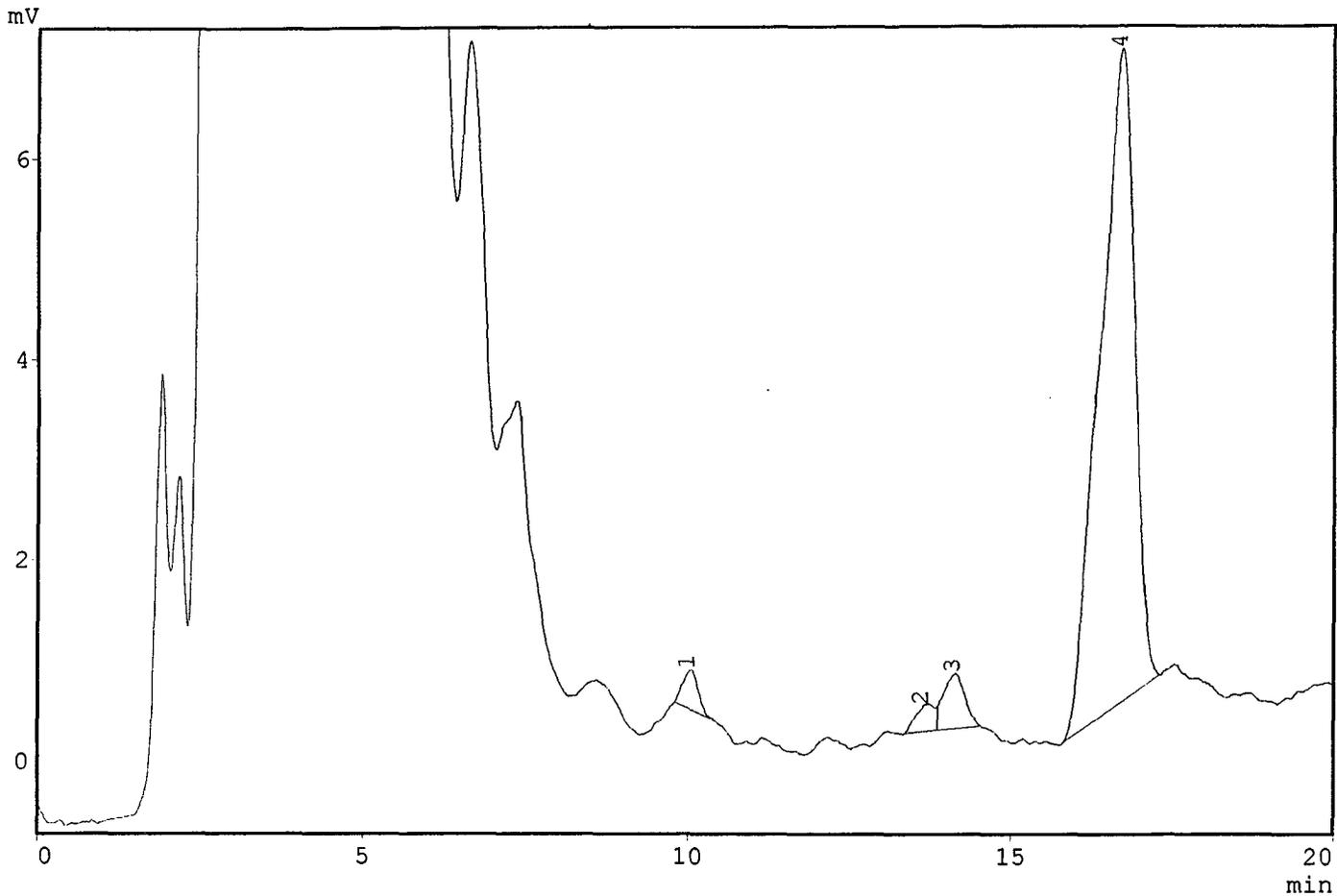
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	13.415	2852	160
2	15.370	239752	6863
3	18.044	11571	399
		254176	7422

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

mostra 3000cel/ml 28/5 Hepatopâncreas  
base móvel acetonitrila e água (8:2)  
Método: Isocrático  
Coluna: Novapac  
Fluxo: 0.5 ml/min  
Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:3285H.C01



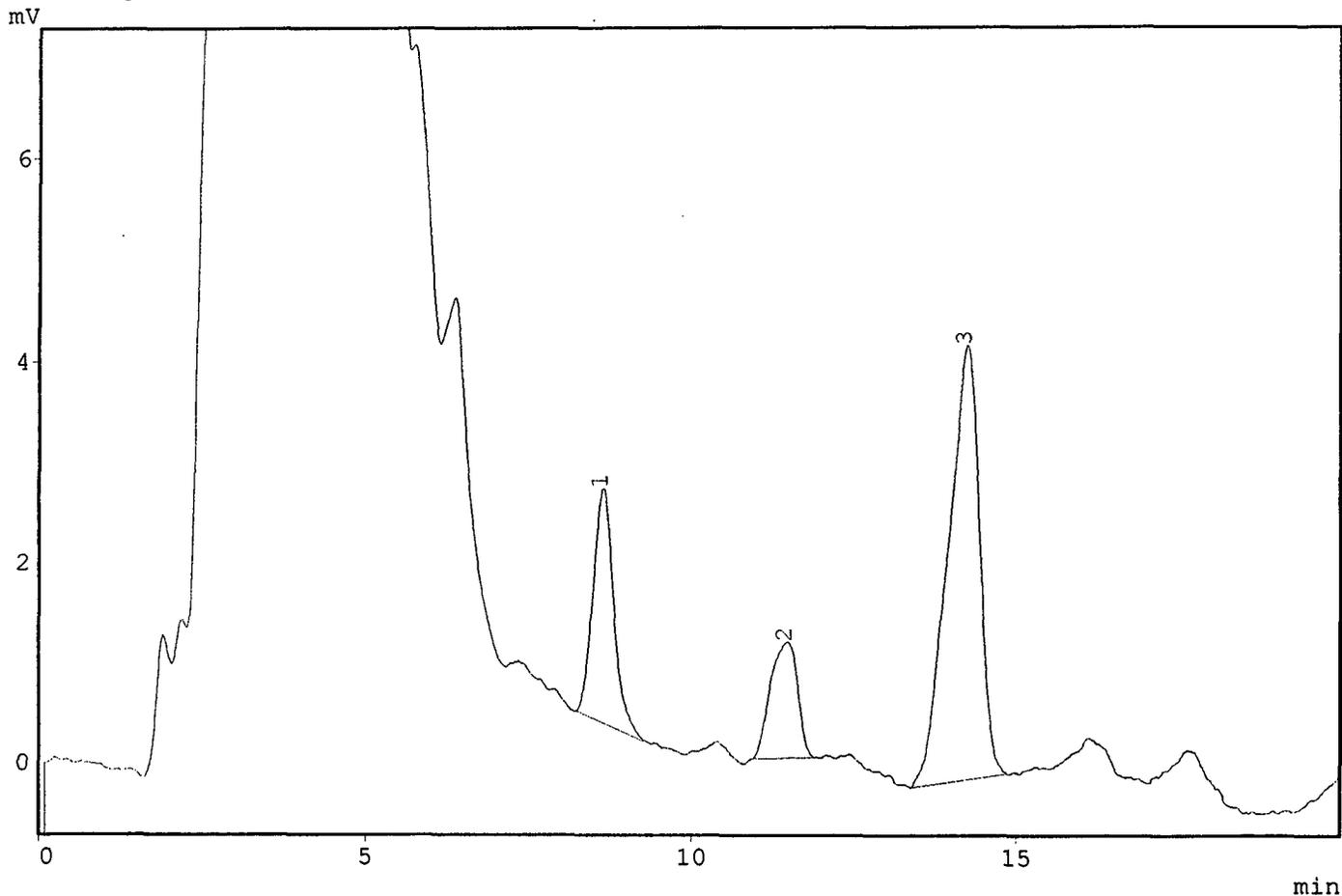
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	10.024	6033	382
2	13.642	5556	256
3	14.125	12182	537
4	16.692	241158	6463
		264929	7638

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

amostra de 26/05 - 6000/ml hepatopancreas  
fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
Método: Isocratico  
Coluna: Novapac  
Fluxo: 0.5 ml/min  
Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:6285H.C01



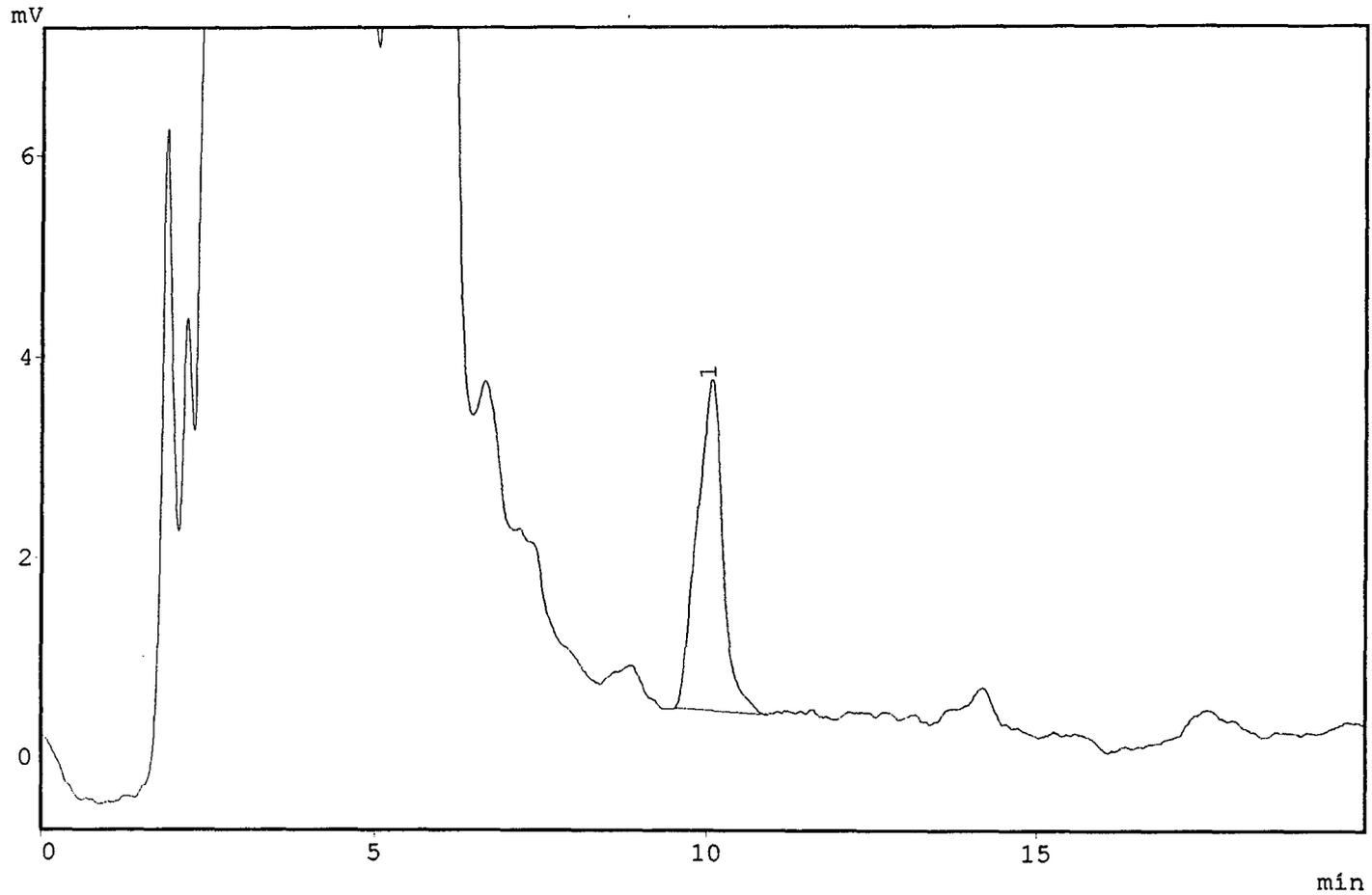
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	8.626	50897	2325
2	11.469	33151	1142
3	14.233	144982	4307
		229030	7774

mple :  
tector : Other:fluoresc  
erator : Marcia  
thod Name : OKADAICO.MET

ostra 9000cel/ml 28/5 Hepatopâncreas  
se móvel acetonitrila e água (8:2)  
todo: Isocratico  
luna: Novapac  
uxo: 0.5 ml/min  
l.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
uorímetro: ex 365 : em 415

\* Chromatogram \*\*\* Filename:9285H.C01



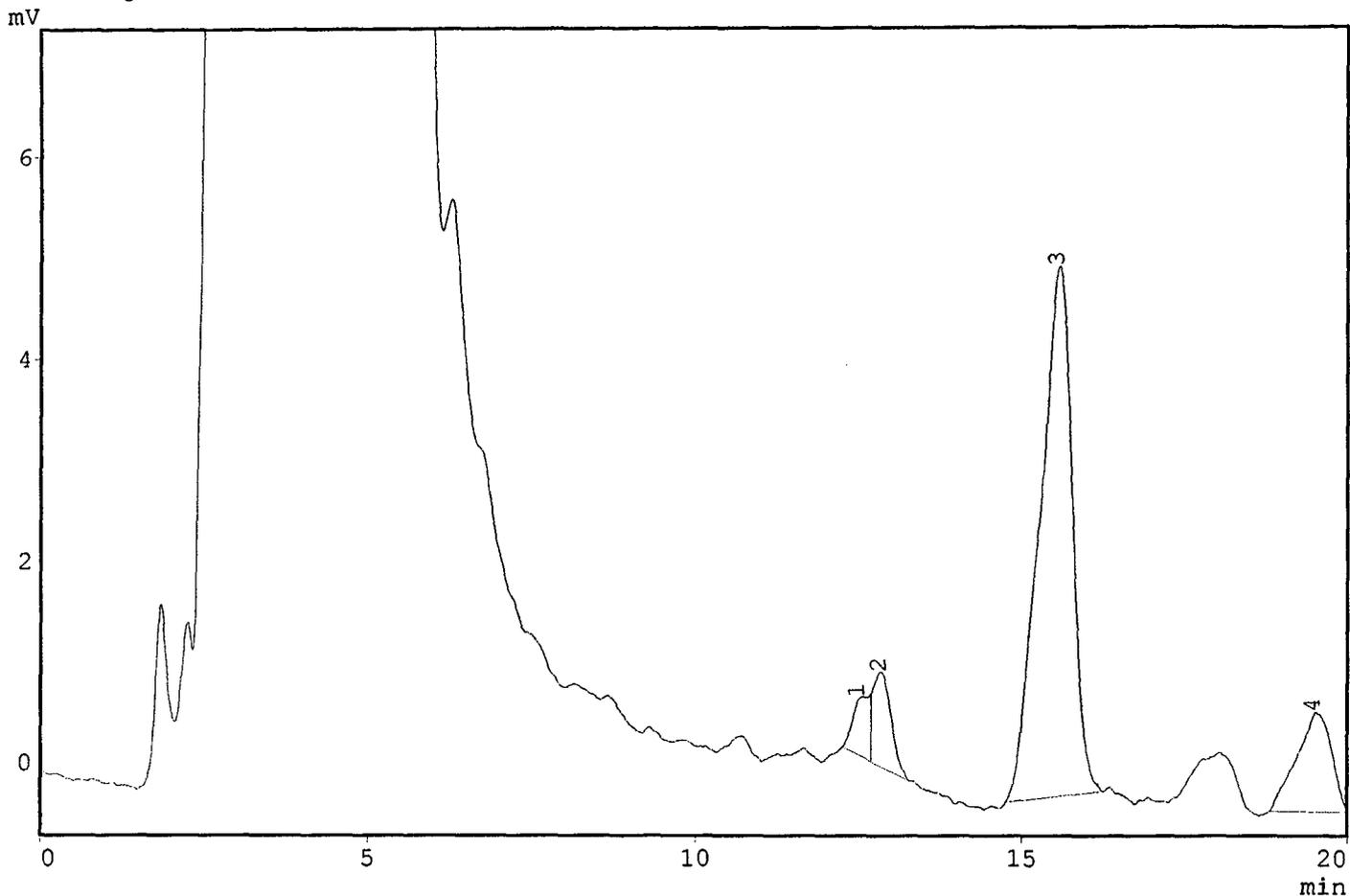
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	10.049	89749	3294
-----		89749	3294

mple :  
 tector : Other:fluoresc  
 erator : Marcia  
 thod Name : OKADAICO.MET

ostra 20/06 Controle Hepatopâncreas  
 se móvel acetonitrila e água (8:2)  
 todo: Isocratico  
 luna: Novapac  
 uxo: 0.5 ml/min  
 l.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 uorímetro: ex 365 : em 415

\* Chromatogram \*\*\* Filename:C206H.C01



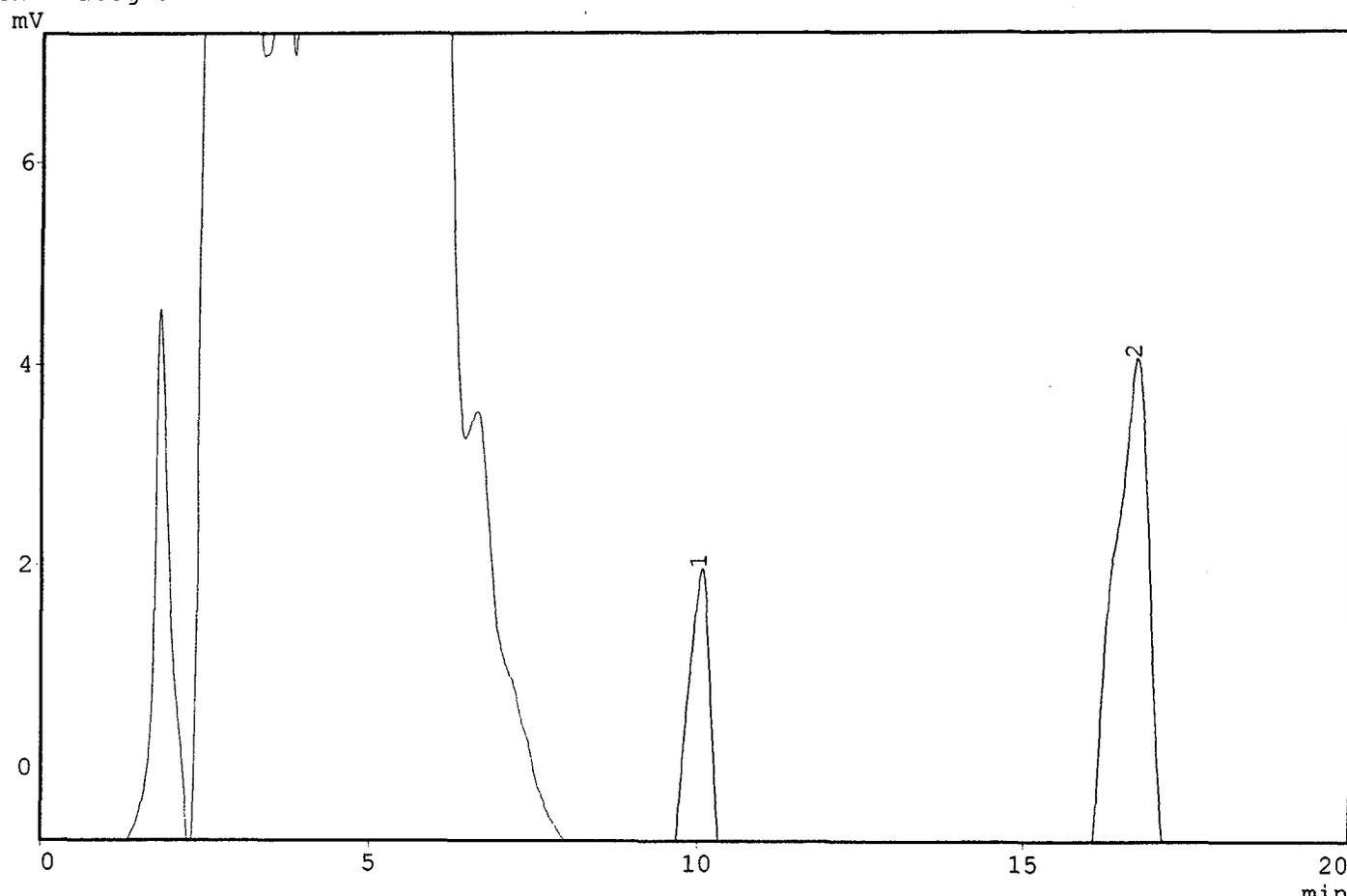
\*\* Peak Report \*\*\*

KNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	12.508	11188	569
2	12.834	17262	936
3	15.555	179042	5226
4	19.500	36397	983
-----		243889	7715

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAICO.MET

Amostra 3000cel/ml 20/6 Hepatopâncreas  
Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
Método: Isocratico  
Coluna: Novapac  
Fluxo: 0.5 ml/min  
Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
Fluorímetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:3206H.C01



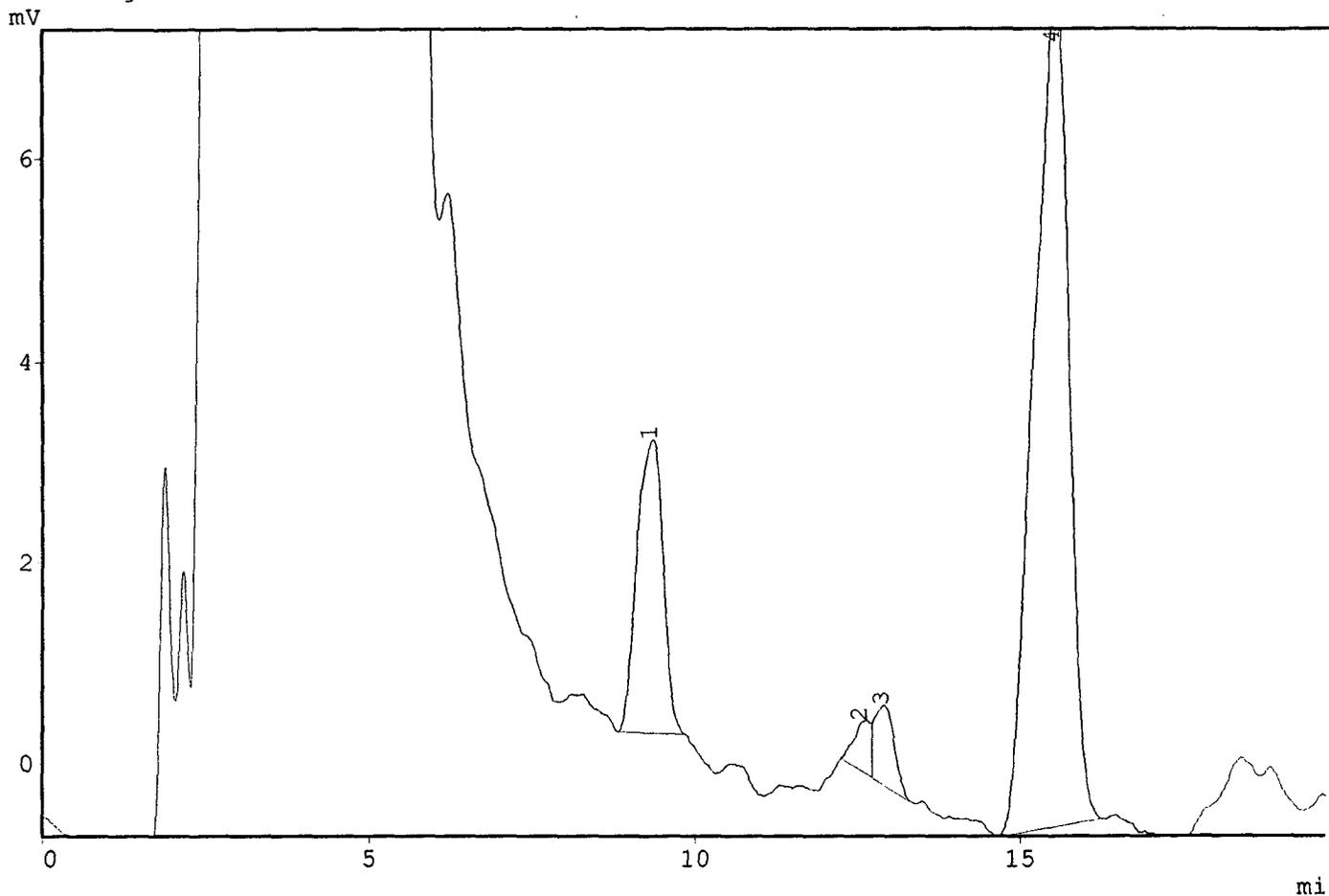
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	10.050	88381	3299
2	16.713	240924	5615
		329306	8914

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAICO.MET

Amostra 6000cel/ml 20/6 Hepatopâncreas  
 Fase móvel acetonitrila e água (8:2)  
 Método: Isocratico  
 Coluna: Novapac  
 Fluxo: 0.5 ml/min  
 Vol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 Fluorimetro: ex 365 : em 415

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:6206H.C01



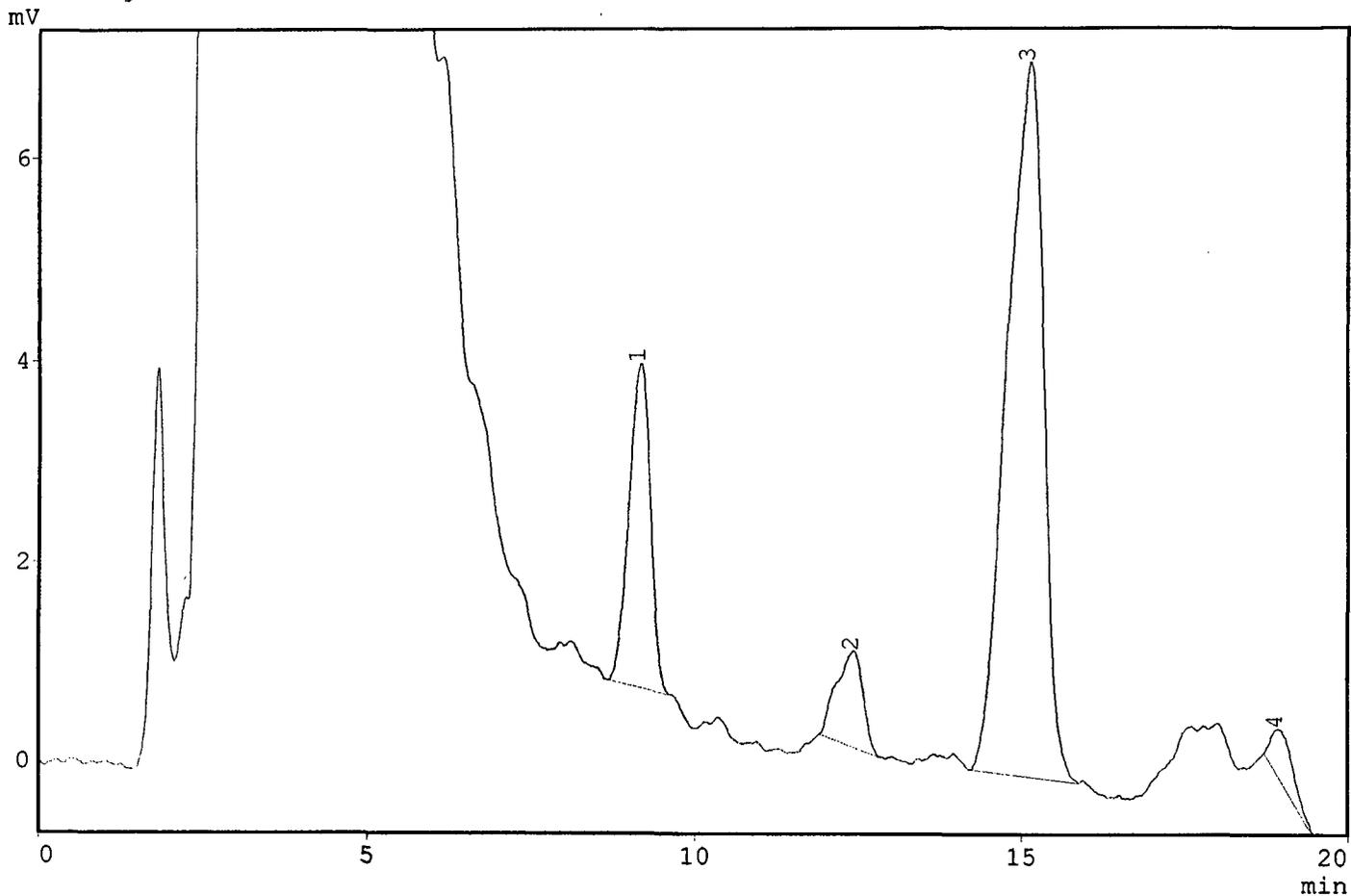
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.349	81378	2913
2	12.583	9552	490
3	12.919	15378	779
4	15.555	311609	8389
-----		417917	12571

ample :  
 etector : Other:fluoresc  
 perator : Marcia  
 ethod Name : OKADAICO.MET

mostra 20/06 9000cel/ml Hepatopâncreas  
 ase móvel acetonitrila e água (8:2)  
 étodo: Isocratico  
 oluna: Novapac  
 luxo: 0.5 ml/min  
 ol.Inj.:20 ul (10 ul + 10 ul)  
 luorimetro: ex 365 : em 415

\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:9206H.C01



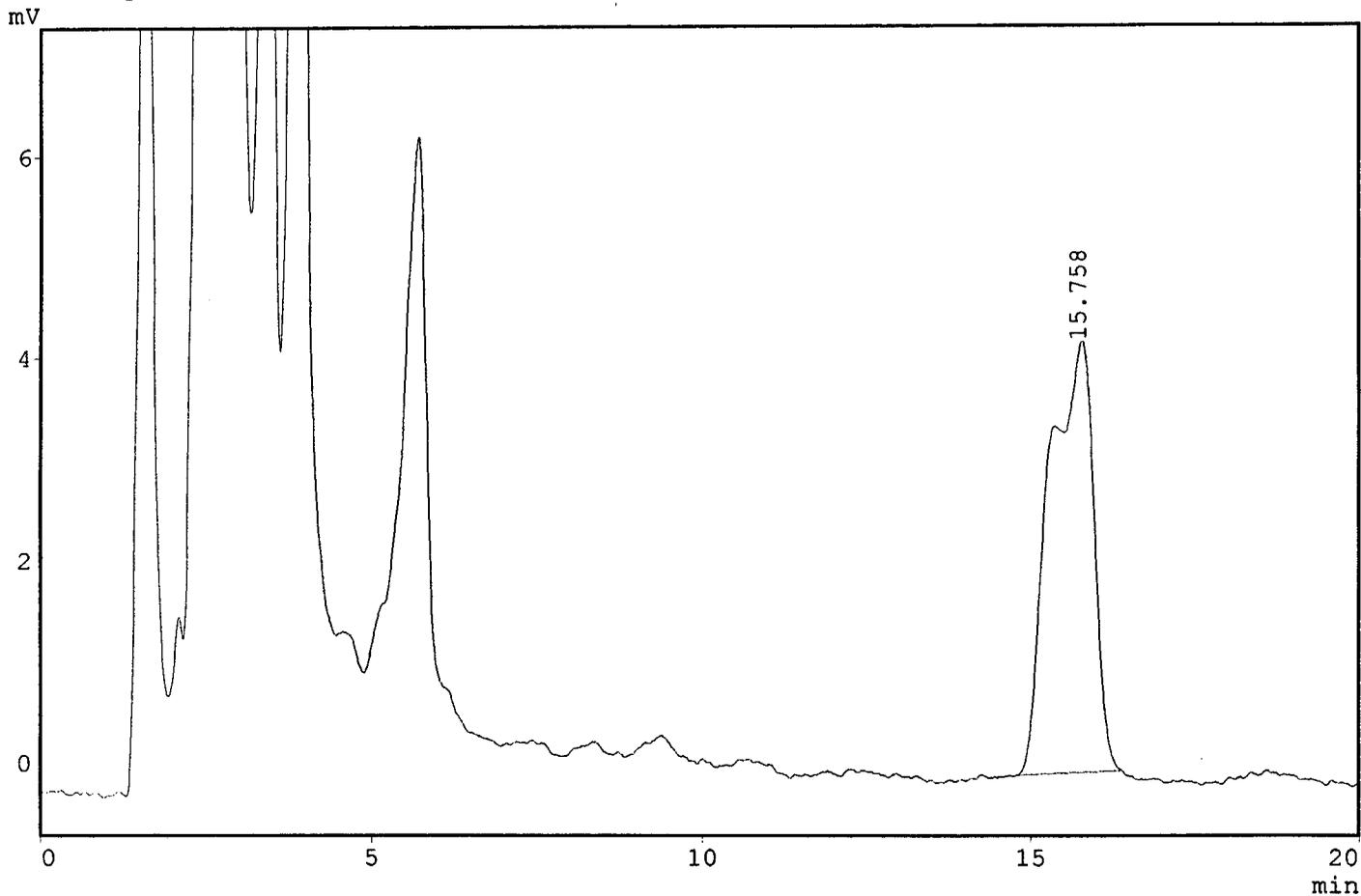
\*\* Peak Report \*\*\*

KNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.148	72965	3208
2	12.421	26670	960
3	15.114	276252	7082
4	18.918	11228	470
-----		387115	11720

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Mostra: Amostra P. lima, teste 1 (36.041,665 cel/ml)  
Método: Isocrático ACN: H2O 80:20  
Comprimento: 365 mm 415  
Número de pratos: 40  
Coluna: Purospher RP-18 5 µm  
Fluxo: 0,5 ml.min  
Temperatura: 30+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename: PLIMATT1.C01



\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	15.758	196229	4234
-----		196229	4234

le :  
ctor : Other:fluoresc  
ator : Marcia  
od Name : OKADAIC2.MET

tra:P. lima, teste 2 (9.250 cel/ml)

Isocratico ACN: H2O 80:20

365 am 415

o 40

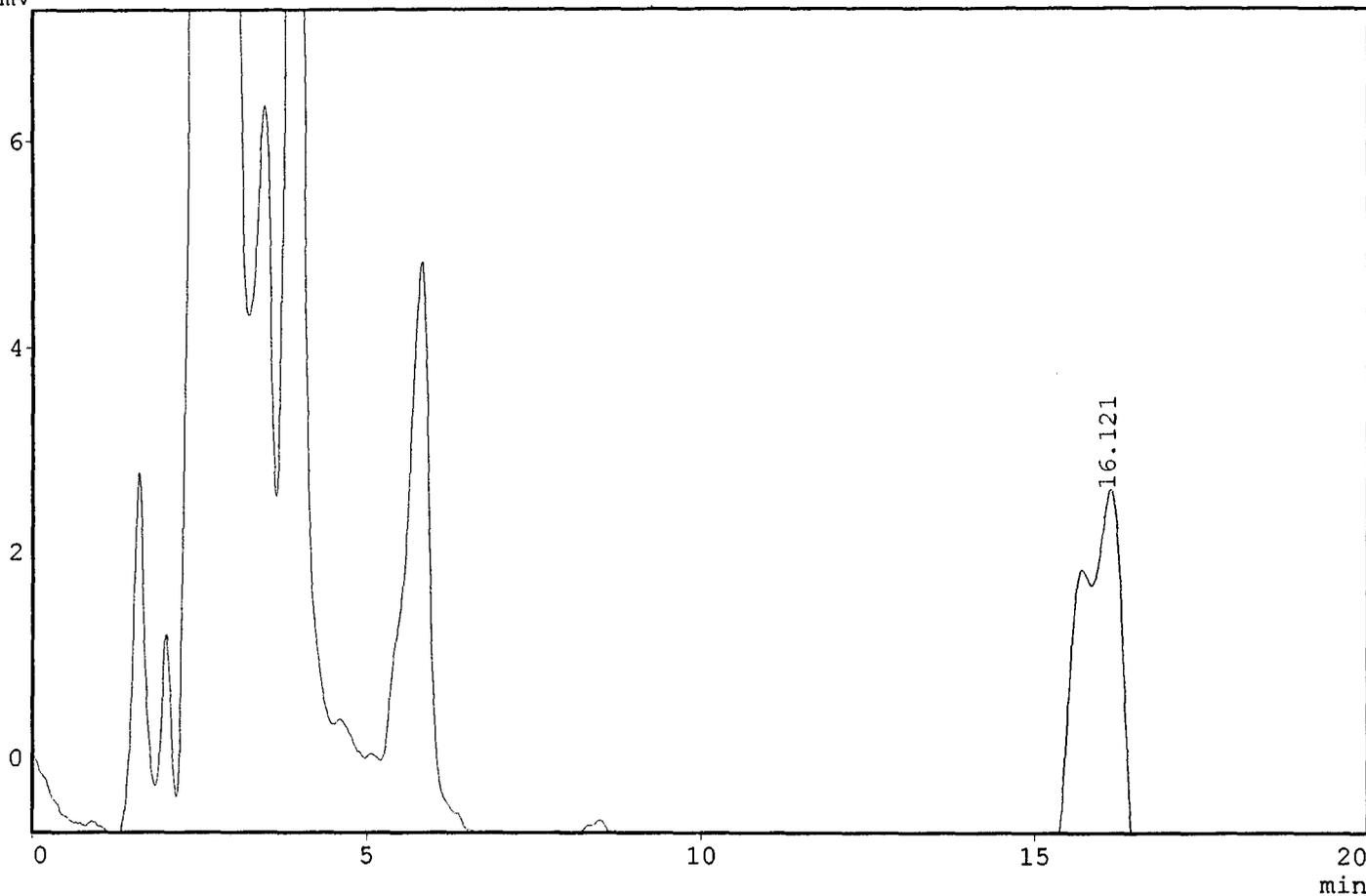
na Purospher RP-18 5 um

o: 0,5 ml.mim

0

Chromatogram \*\*\* Filename:PLIMATT2.C01

mV



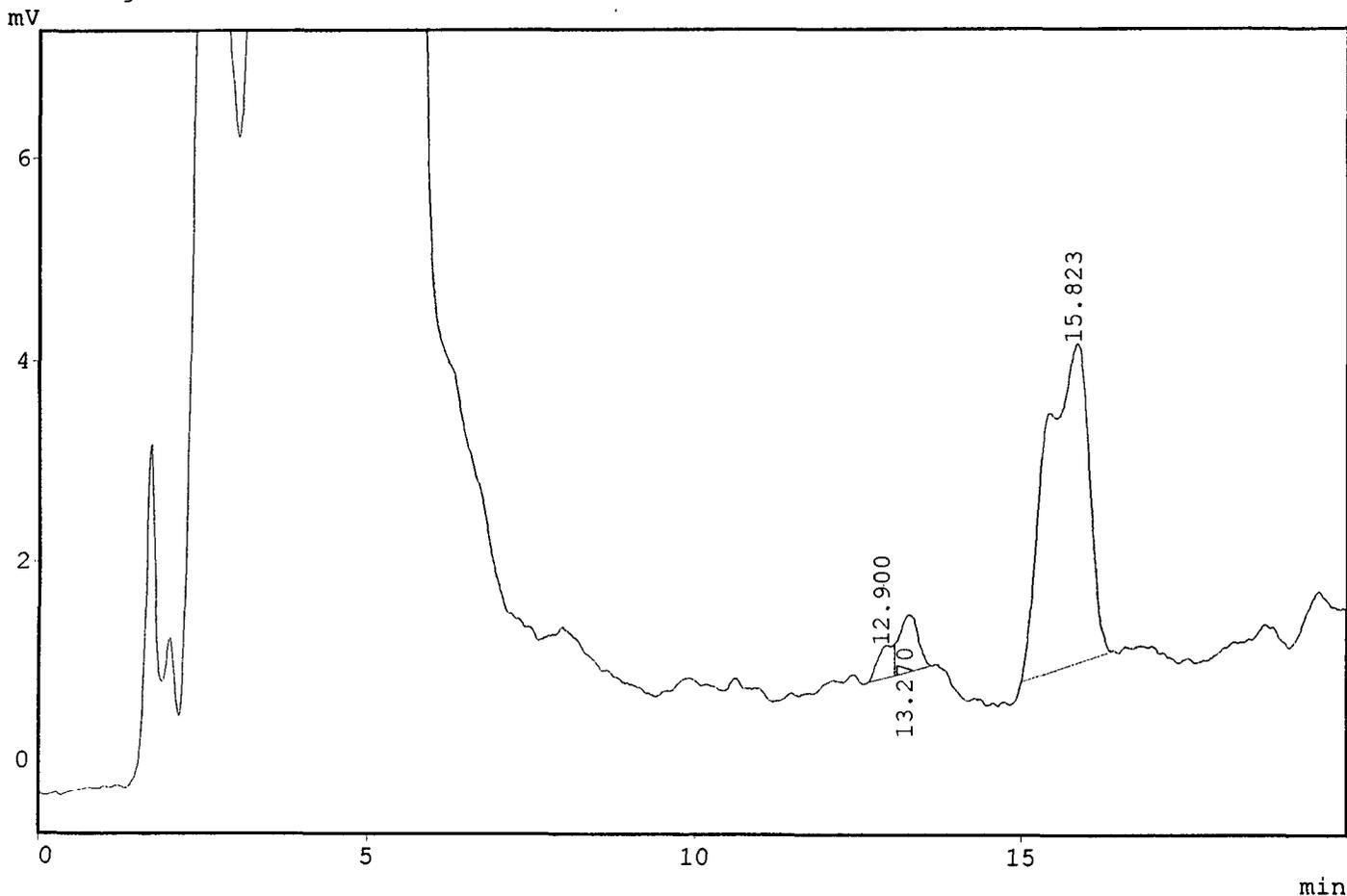
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
16.121	185430	4030
	185430	4030

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Sample: Controle hepatopancreas dia 1  
P: Isocratico ACN: H2O 80:20  
; 365 am 415  
Flow rate: 40  
Column: Luna Purospher RP-18 5 um  
Injection volume: 0,5 ml.mim  
+10

\* Chromatogram \*\*\* Filename:CDIA1H.C01



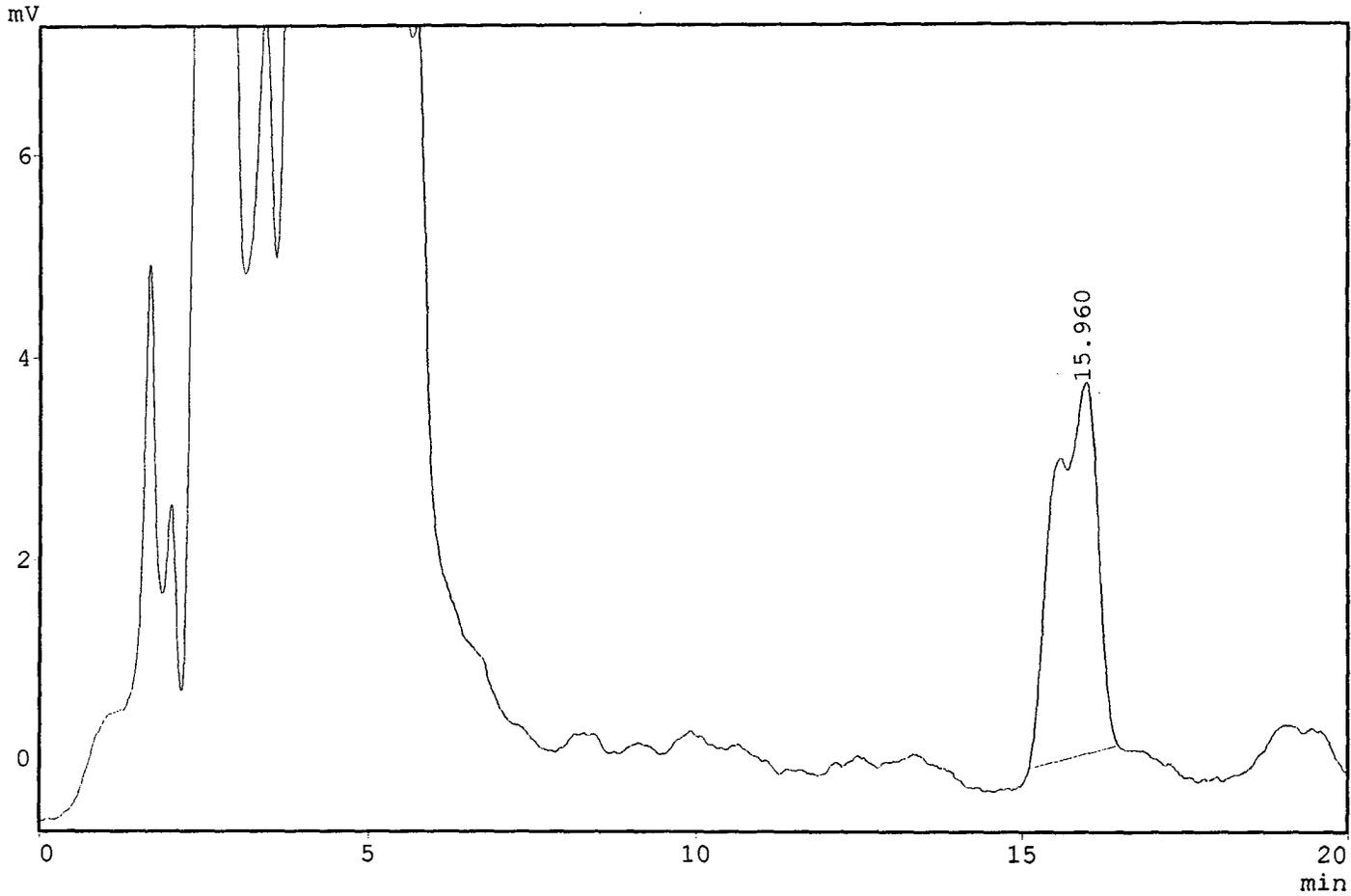
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	12.900	5635	320
2	13.270	11233	574
3	15.823	145399	3188
-----		162268	4083

le :  
ctor : Other:fluoresc  
ator : Marcia  
od Name : OKADAIC2.MET

tra:Controle hepatopaneas dia 10  
Isocratico ACN: H2O 80:20  
365 am 415  
o 40  
na Purospher RP-18 5 um  
o: 0,5 ml.mim  
0

Chromatogram \*\*\* Filename:CDIA10H.C01



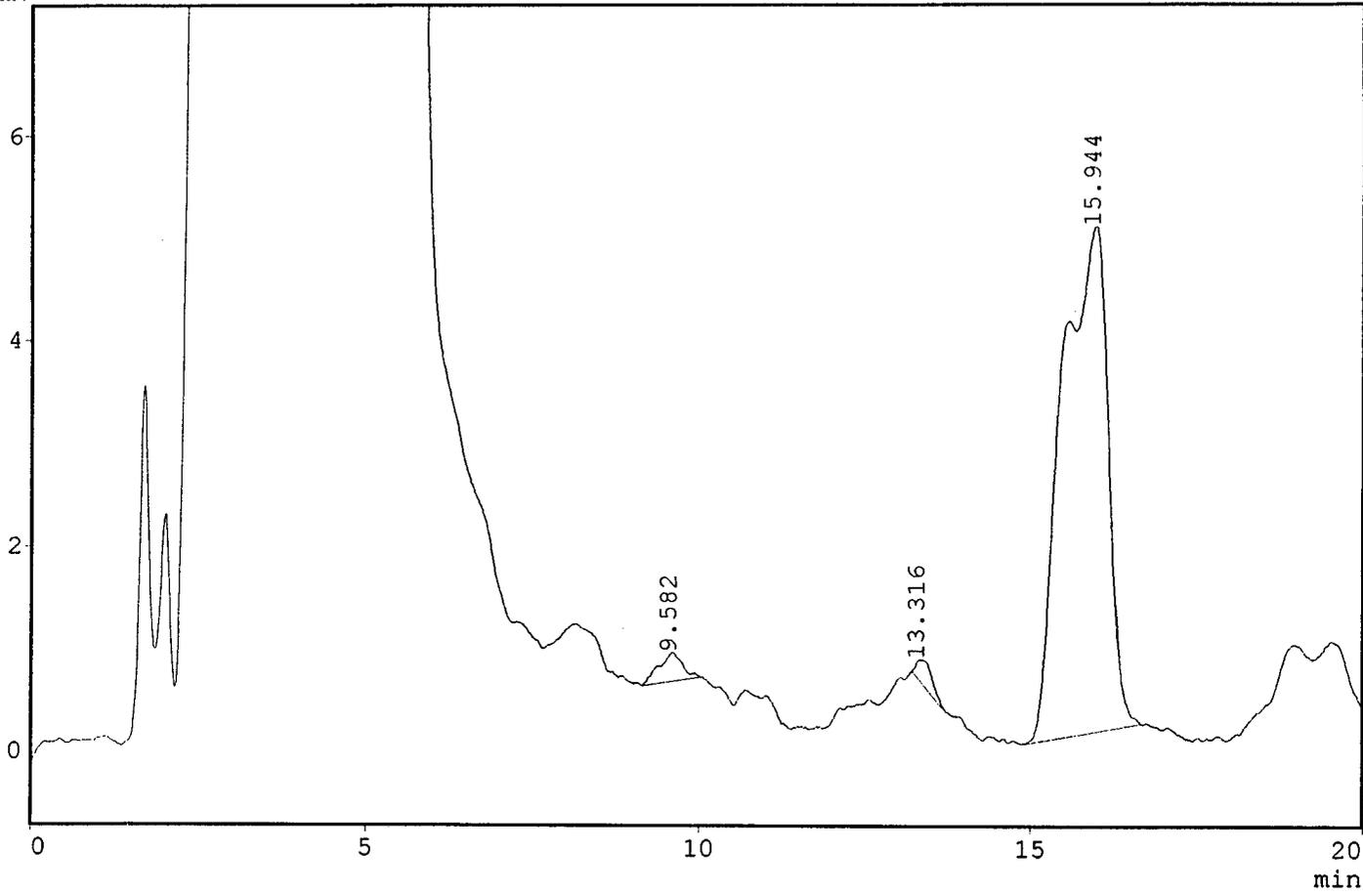
Peak Report \*\*\*

O	TIME	AREA	HEIGHT
1	15.960	170470	3678
-----			
		170470	3678

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Mostra:hepatopancreas dia 1  
SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
X; 365 am 415  
Orno 40  
Coluna Purospher RP-18 5 um  
Fluxo: 0,5 ml.mim  
0+10

\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO01.C01  
mV



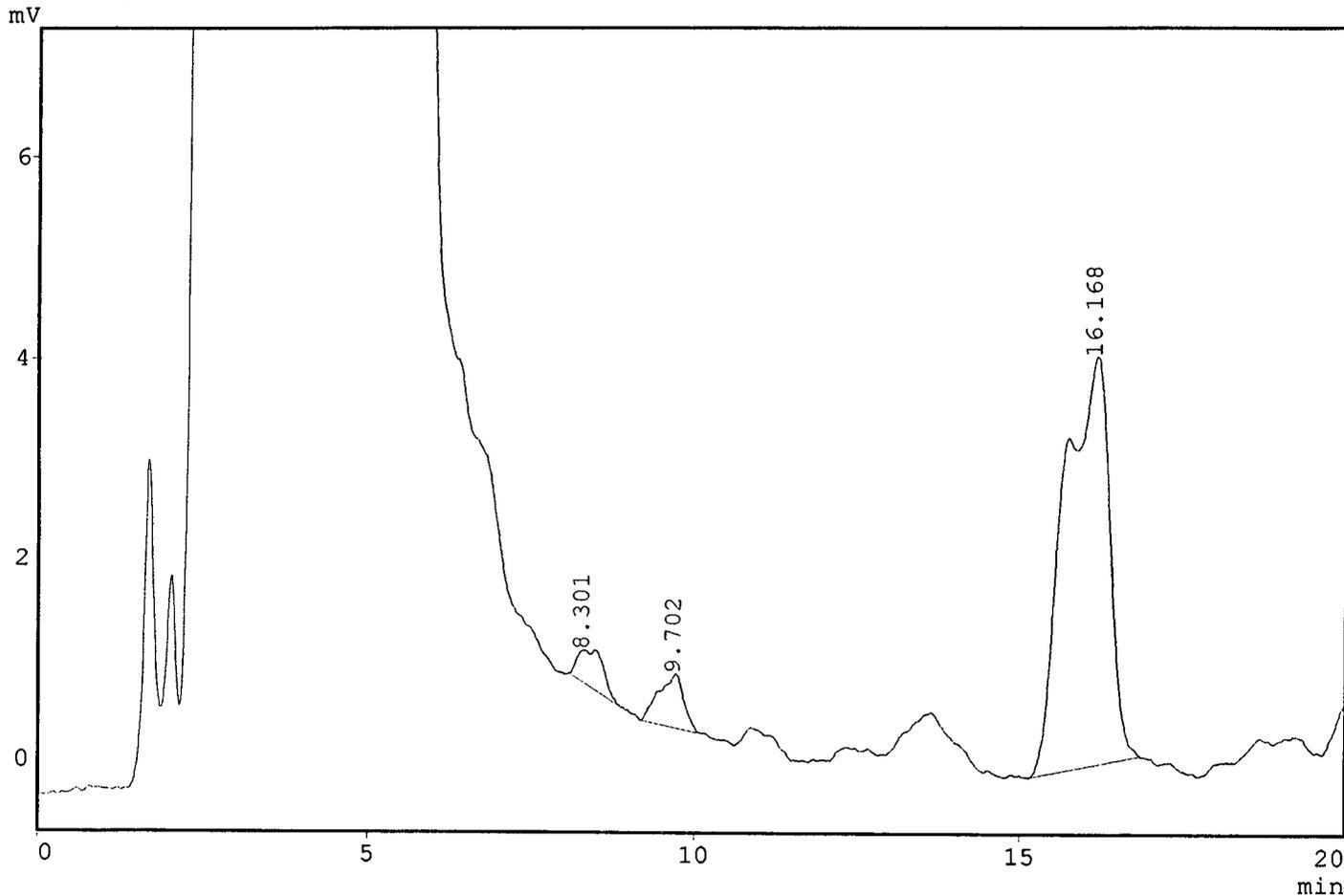
\*\* Peak Report \*\*\*

KNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.582	6934	279
2	13.316	3695	193
3	15.944	234265	4910
		244894	5382

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Host: Hepatopancreas dia 02  
P: Isocratico ACN: H2O 80:20  
; 365 am 415  
Pore size 40  
Column: Luna Purospher RP-18 5 um  
Flow rate: 0,5 ml.min  
+10

\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO02.C01



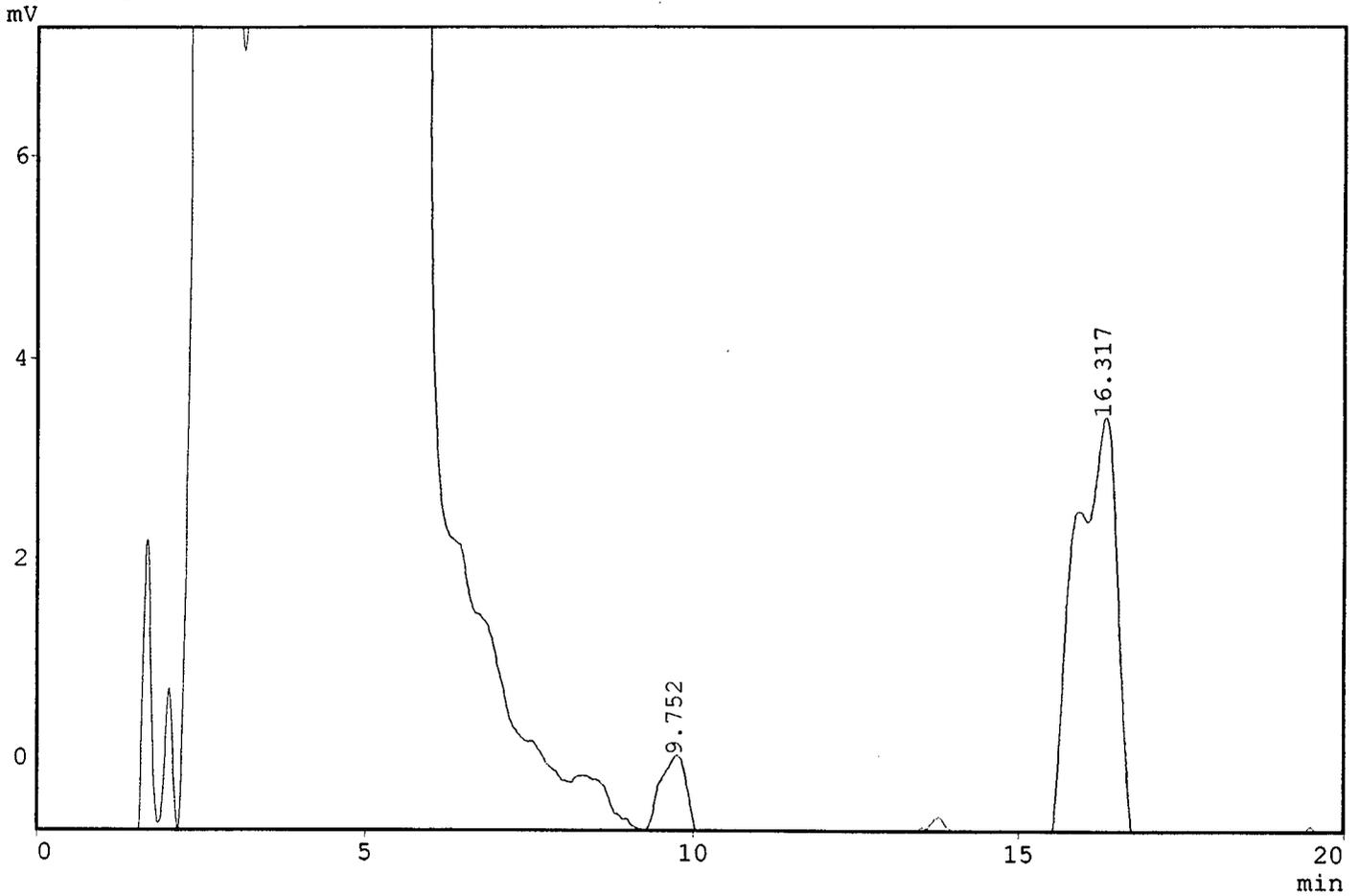
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	8.301	9661	325
2	9.702	13716	529
3	16.168	193918	4047
-----		217295	4900

le :  
ector : Other:fluoresc  
ator : Marcia  
od Name : OKADAIC2.MET

tra:Hepatopancreas dia 03  
Isocratico ACN: H2O 80:20  
865 am 415  
p 40  
na Purospher RP-18 5 um  
p: 0,5 ml.mim  
)

Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO03.C01



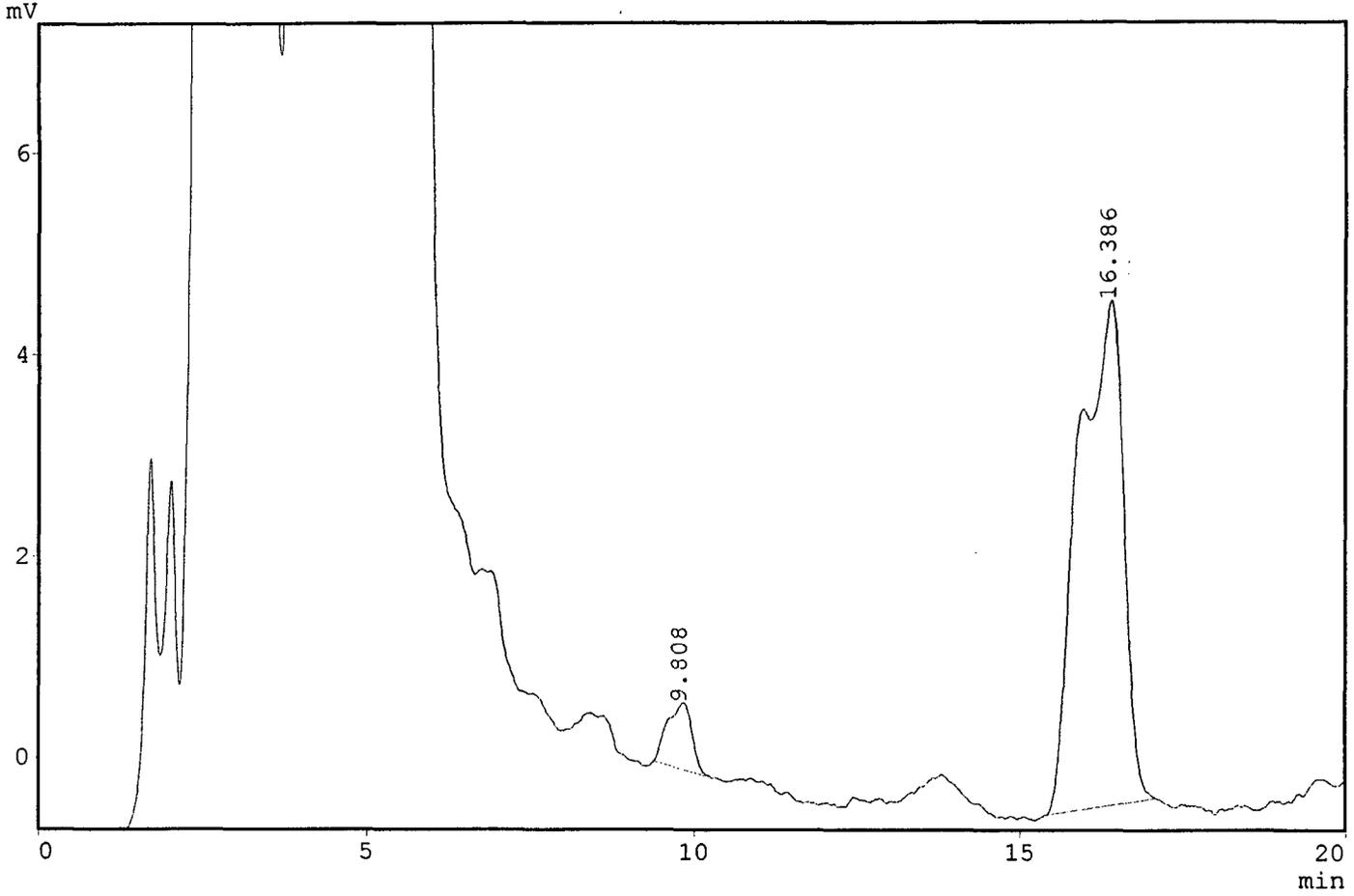
Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	HEIGHT
9.752	22103	800
16.317	208644	4444
-----		
	230746	5243

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Source: Hepatopancreas dia 04  
Type: Isocratic ACN: H2O 80:20  
Flow: 365 am 415  
Column: Luna Purospher RP-18 5 um  
Injection: 0,5 ml.mim  
Injection Volume: 10

\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO04.C01



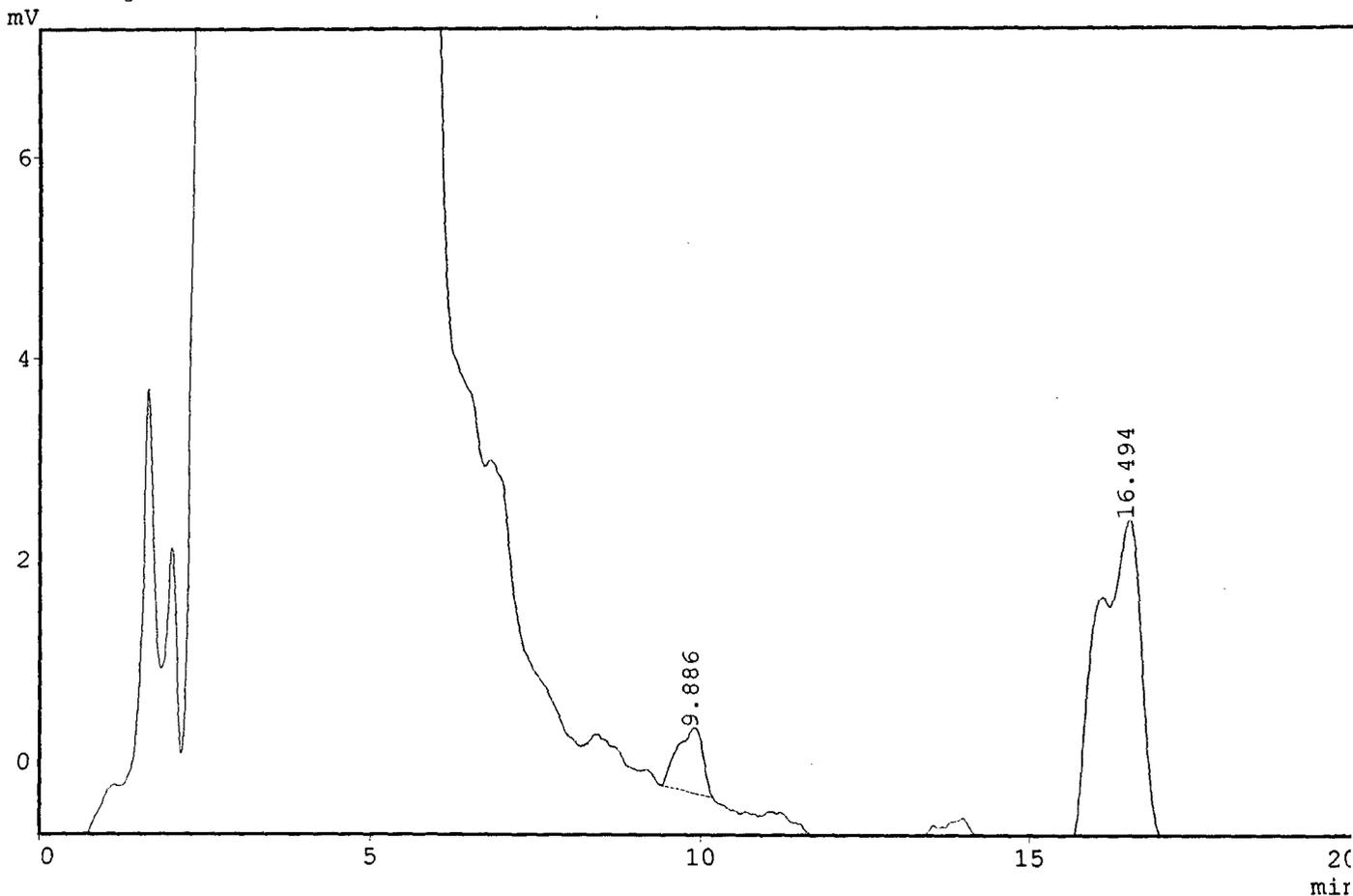
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.808	16979	662
2	16.386	238012	4995
-----		254990	5656

ample :  
etector : Other:fluoresc  
operator : Marcia  
ethod Name : OKADAIC2.MET

mostra:Hepatopancreas dia 05  
SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
x; 365 am 415  
orno 40  
oluna Purospher RP-18 5 um  
fluxo: 0,5 ml.mim  
.0+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO05.C01



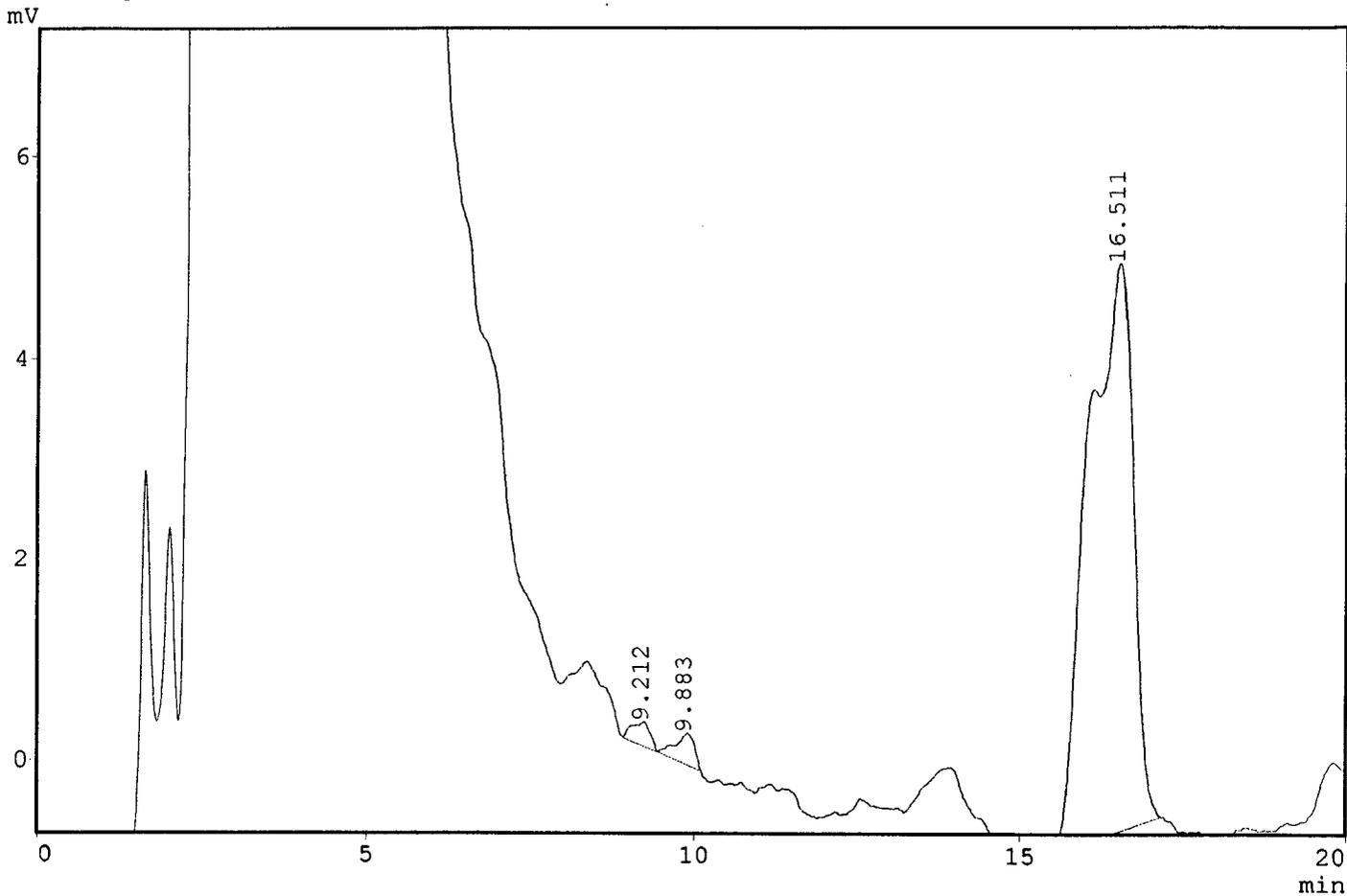
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.886	16531	637
2	16.494	155554	3278
-----		172085	3916

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAIC2.MET

Mostra:Hepatopancreas dia 06  
 SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 Wavelength: 365 nm 415  
 Column: Purospher RP-18 5 um  
 Flow: 0,5 ml.min  
 Offset: 10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO06.C01



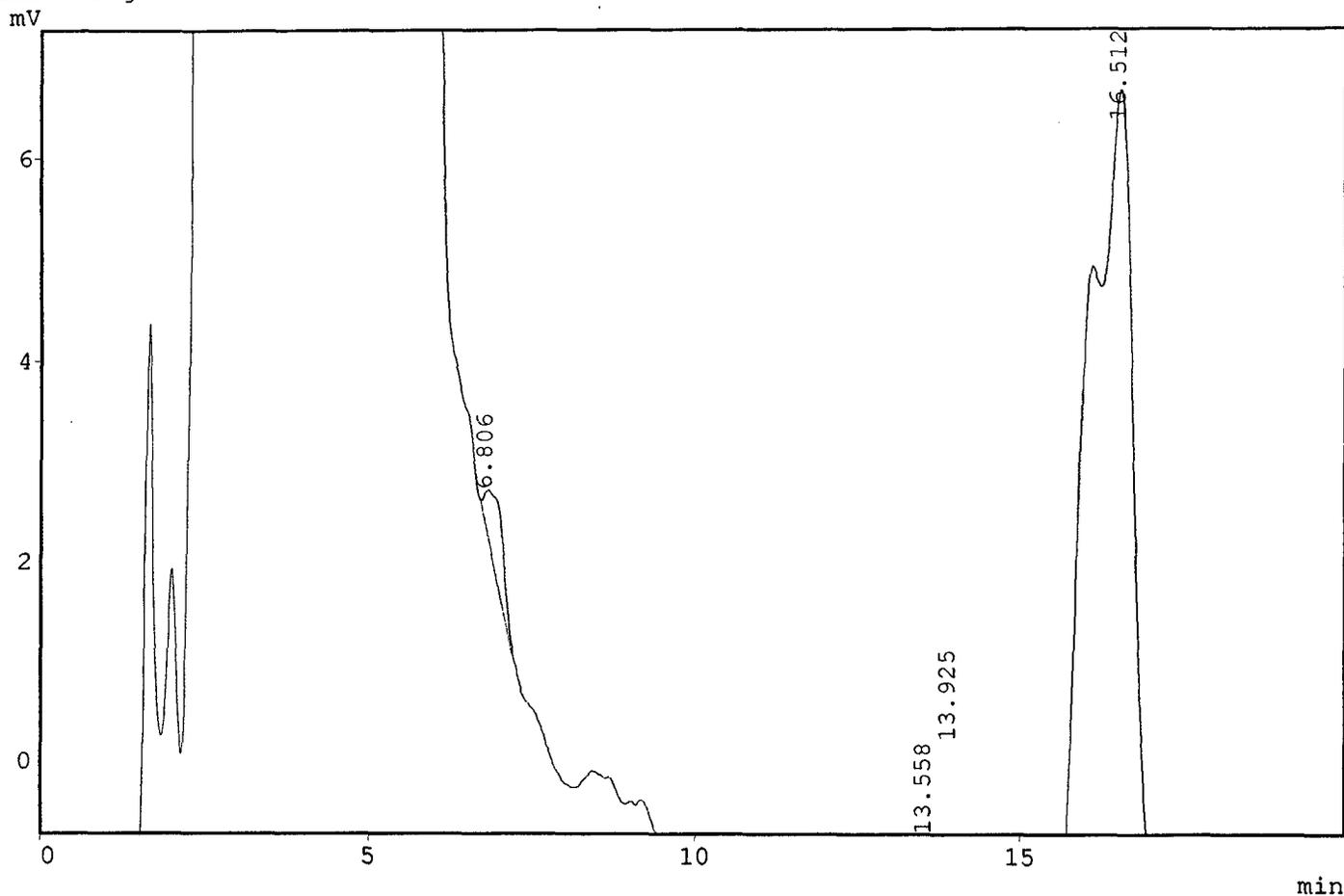
\*\*\* Peak Report \*\*\*

KNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.212	4260	235
2	9.883	5885	303
3	16.511	270907	5636
		281052	6174

LASS-LC10 Ver.=1.61 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=41 DATA=HEPATO07.D01 99/03/22 16:18:44  
 ample :  
 etector : Other:fluoresc  
 perator : Marcia  
 ethod Name : OKADAIC2.MET

mostra:Hepatopancreas dia 07  
 SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 x; 365 am 415  
 orno 40  
 oluna Purospher RP-18 5 um  
 lux: 0,5 ml.mim  
 0+10

\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO07.C01



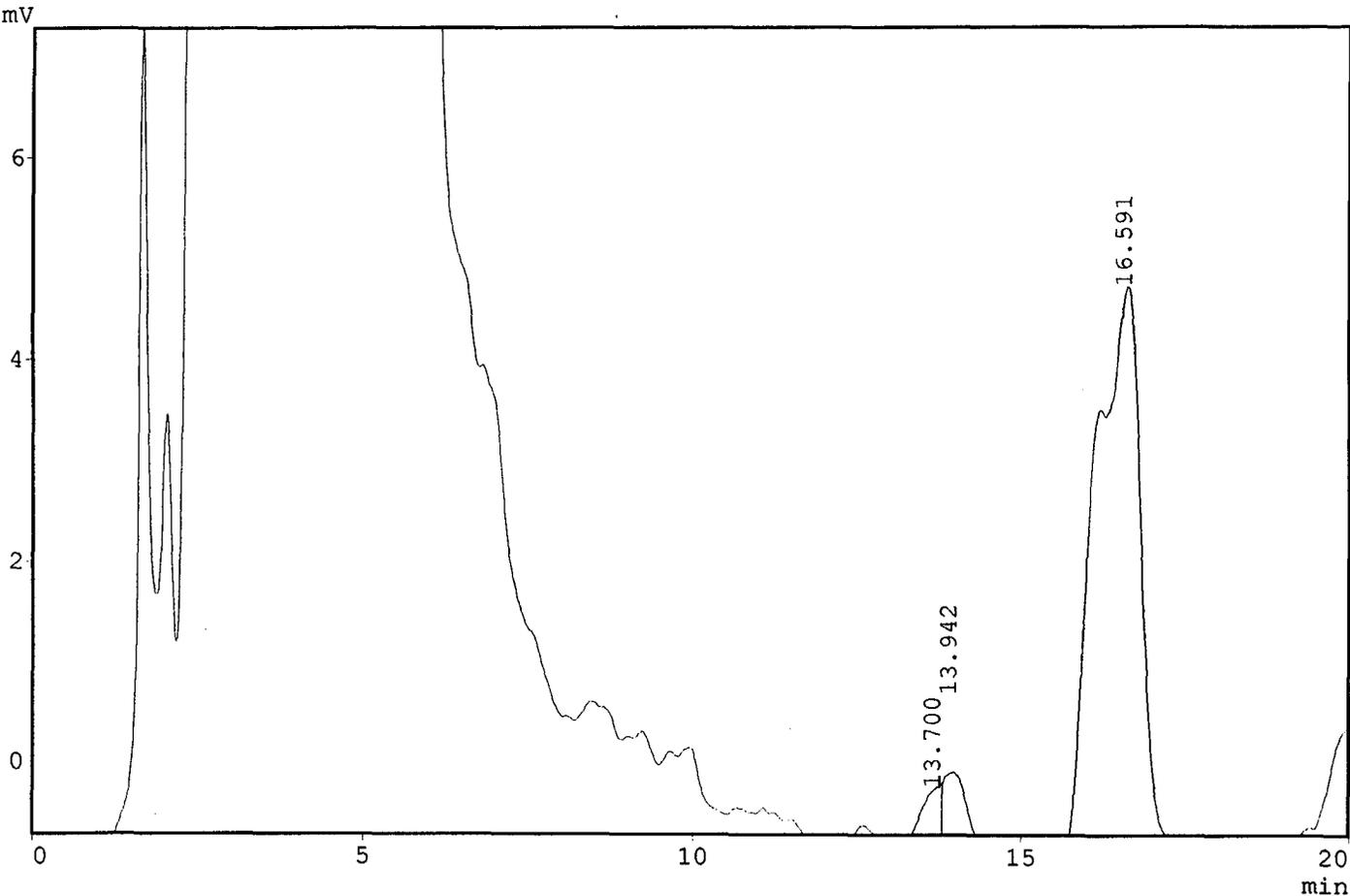
\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	6.806	11444	416
2	13.558	9929	424
3	13.925	13382	666
4	16.512	389623	8097
-----		424377	9603

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAIC2.MET

Prostra:Hepatopancreas dia 08  
 P: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 ; 365 am 415  
 Perno 40  
 Luna Purospher RP-18 5 um  
 Flow: 0,5 ml.min  
 +10

\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO08.C01



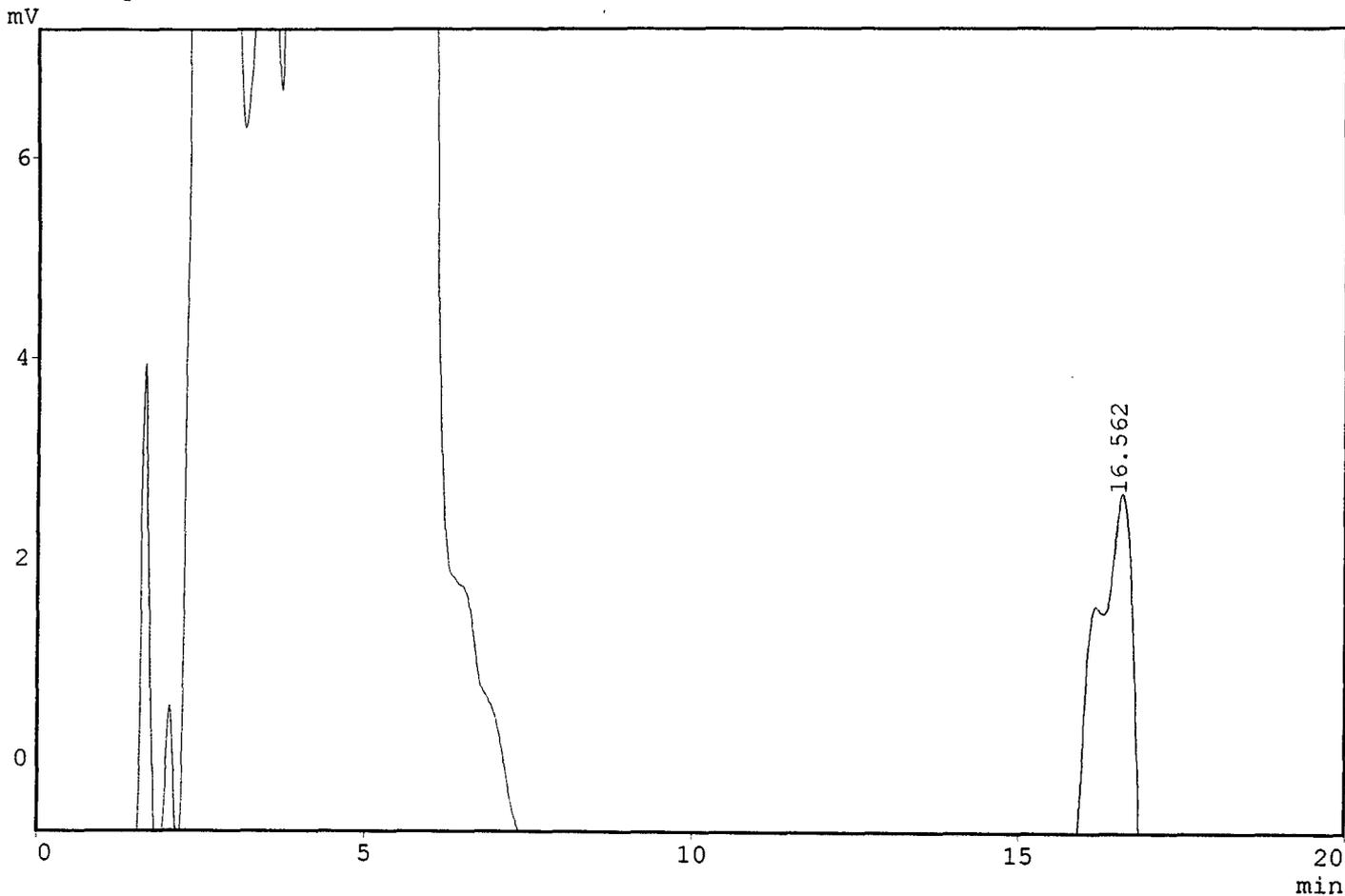
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	13.700	10184	520
2	13.942	15838	696
3	16.591	272797	5584
		-----	
		298819	6799

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Mostra:Hepatopancreas dia 09  
SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
Wavelength: 365 nm  
Flow rate: 415  
Column: Purospher RP-18 5 um  
Injection volume: 0,5 ml  
Injection time: 10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO09.C01



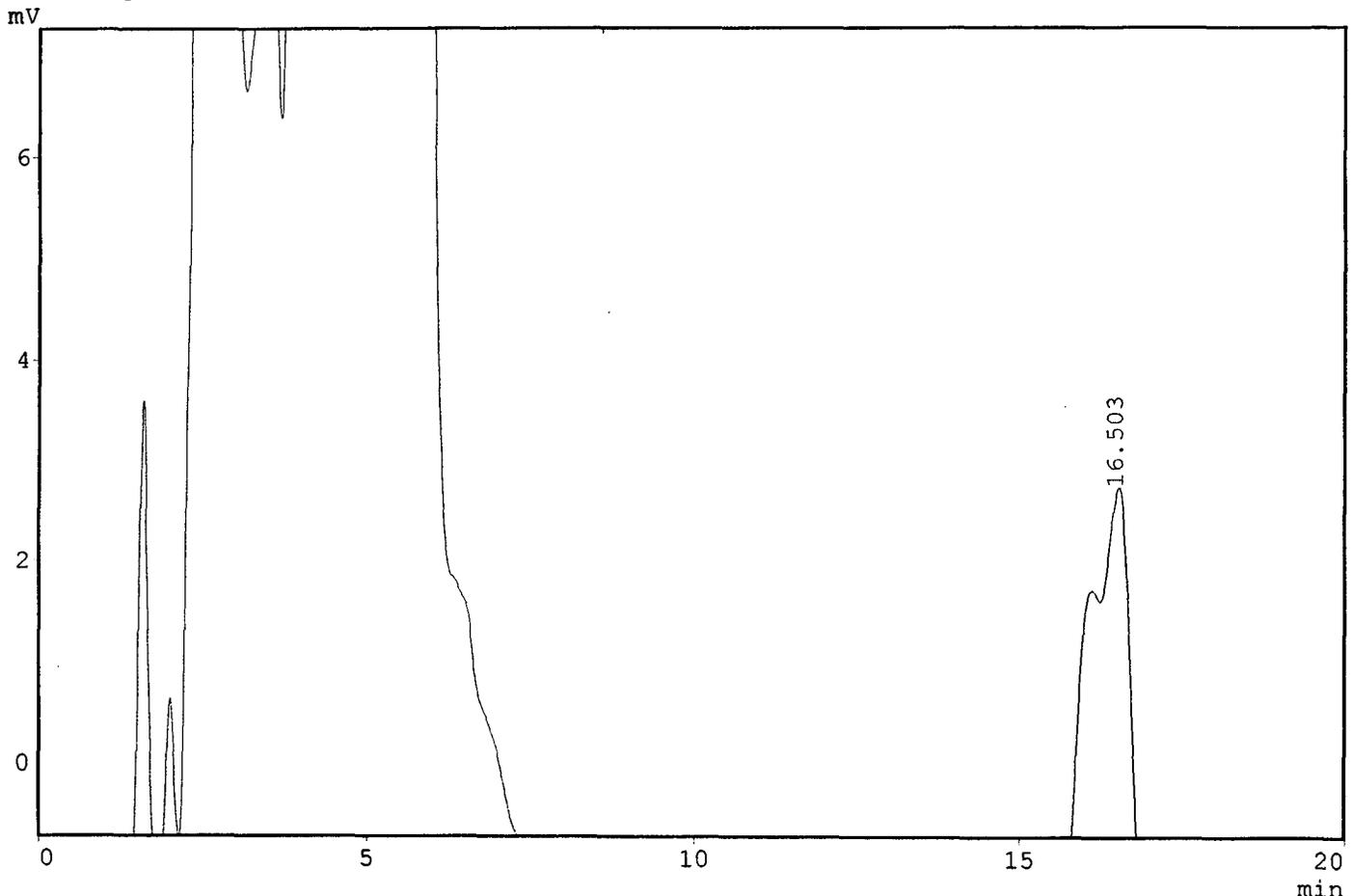
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.562	261949	5436
-----		261949	5436

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Sample: Hepatopancreas dia 10  
SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
Wavelength: 365 nm  
Flow rate: 415  
Column: Purospher RP-18 5 um  
Injection volume: 0,5 ml.mim  
Injection time: 10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:HEPATO10.C01



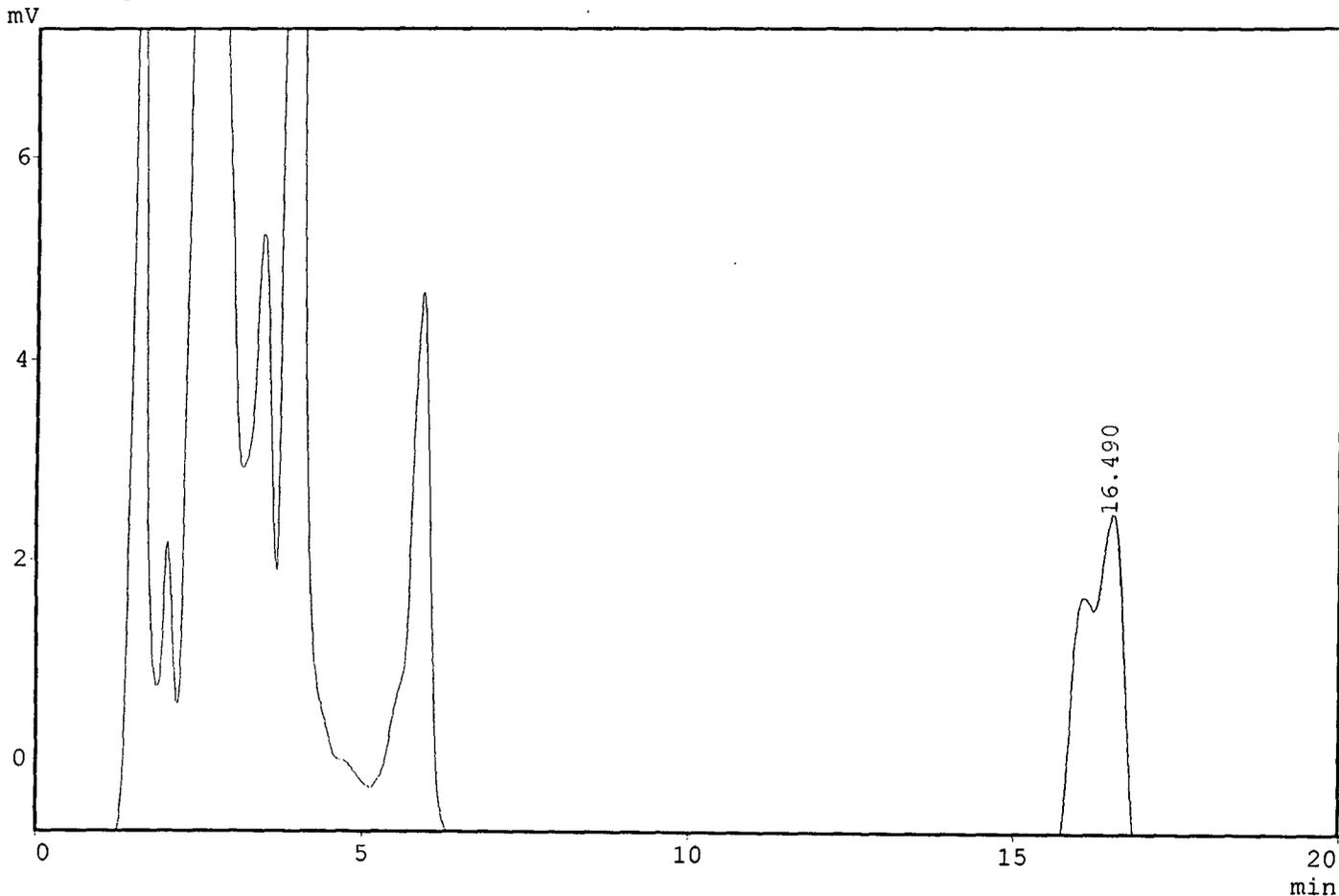
\*\*\* Peak Report \*\*\*

KNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.503	237885	4931
-----		237885	4931

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Amostra:Controle fezes dia 1 a 5  
DSP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
ex; 365 am 415  
forno 40  
coluna Purospher RP-18 5 um  
fluxo: 0,5 ml.mim  
10+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:CDIA1A5F.C01



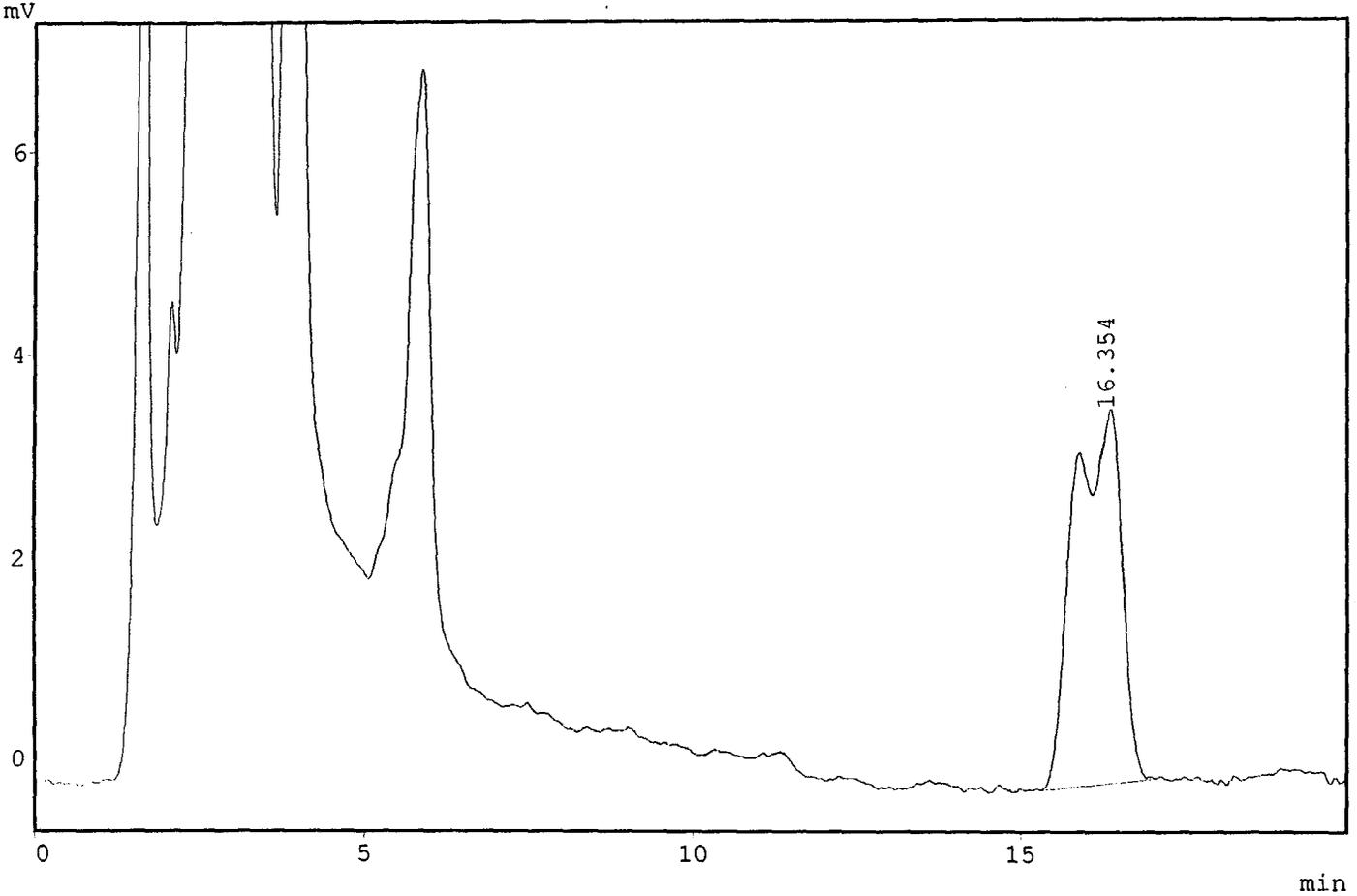
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.490	199726	4034
-----		199726	4034

mple :  
tector : Other:fluoresc  
erator : Marcia  
thod Name : OKADAIC2.MET

ostra:Controle fezes, dia 6 a 10  
P: Isocratico ACN: H2O 80:20  
; 365 am 415  
rno 40  
luna Purospher RP-18 5 um  
luxo: 0,5 ml.mim  
+10

\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:CDI6A10.C01



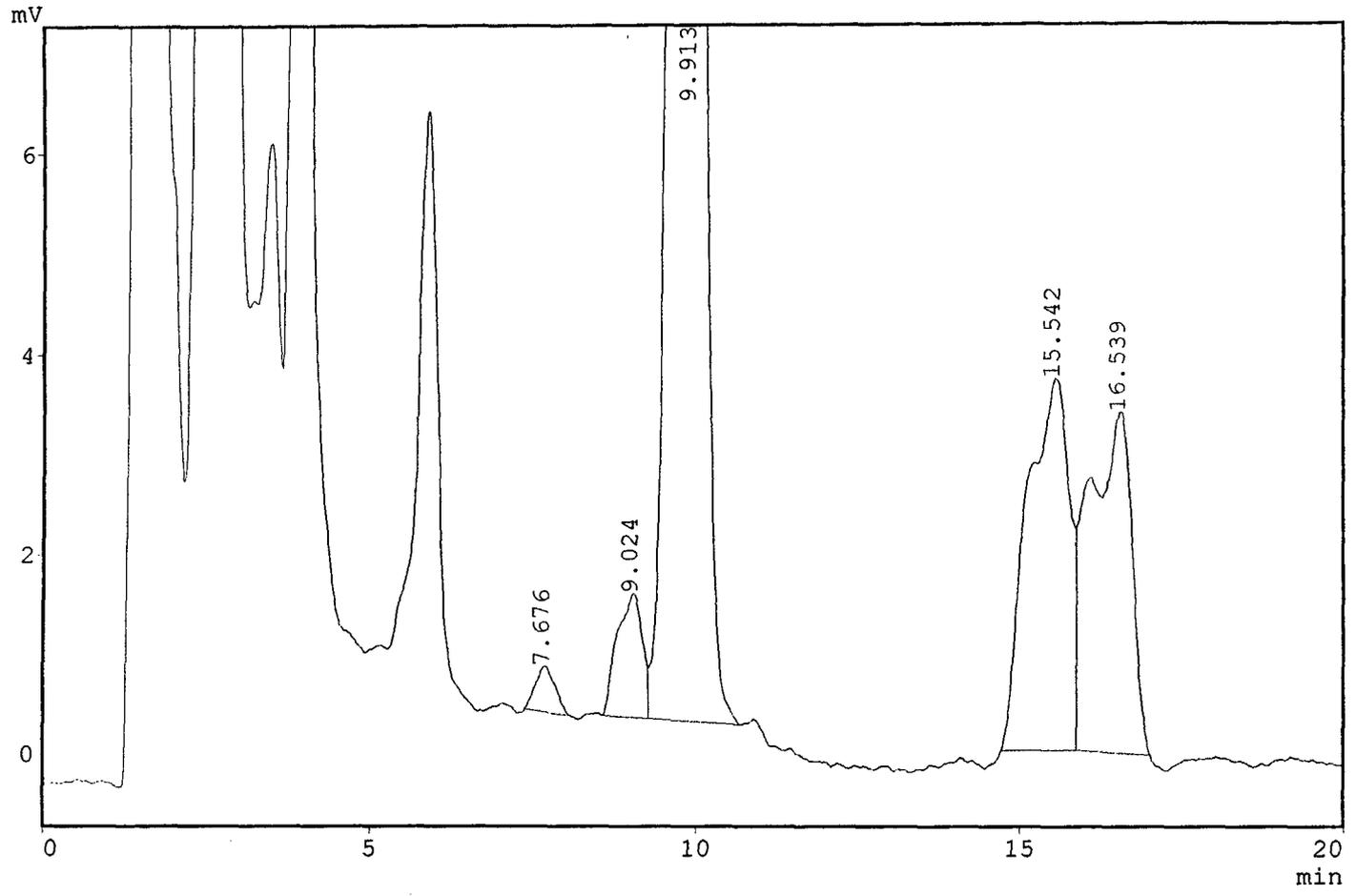
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.354	185611	3666
-----		185611	3666

mple :  
 tector : Other:fluoresc  
 erator : Marcia  
 chod Name : OKADAIC2.MET

ostra:Fezes dia 1  
 P: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 ; 365 am 415  
 rno 40  
 luna Purospher RP-18 5 um  
 uxo: 0,5 ml.mim  
 +10

\* Chromatogram \*\*\* Filename:FEZES01.C01



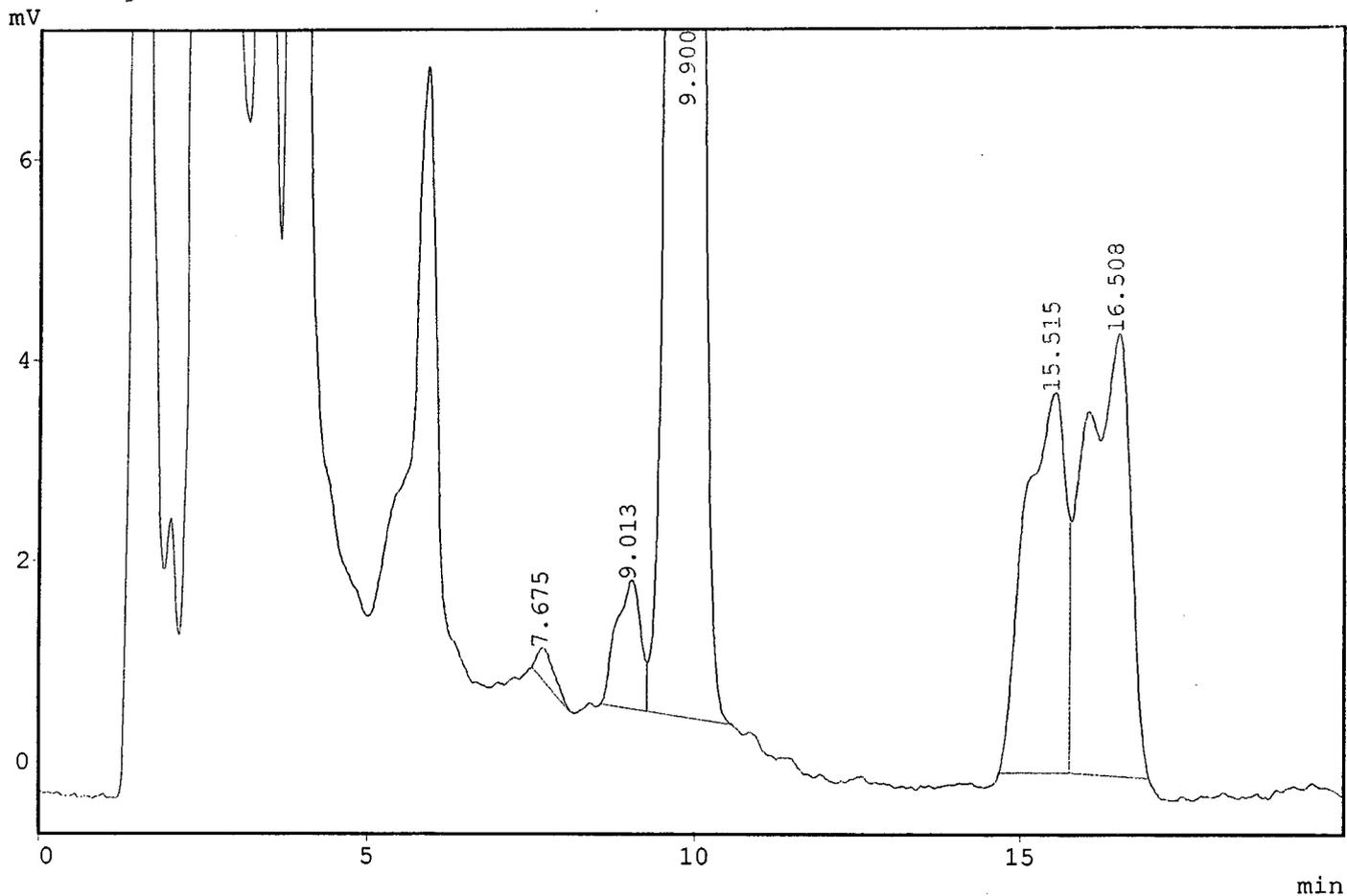
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	7.676	9433	459
2	9.024	32833	1231
3	9.913	893143	29684
4	15.542	167892	3711
5	16.539	153390	3402
		1256692	38487

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAIC2.MET

Amostra:Fezes dia 2  
 DSP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 ex; 365 am 415  
 forno 40  
 coluna Purospher RP-18 5 um  
 fluxo: 0,5 ml.mim  
 10+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:FEZES02.C01



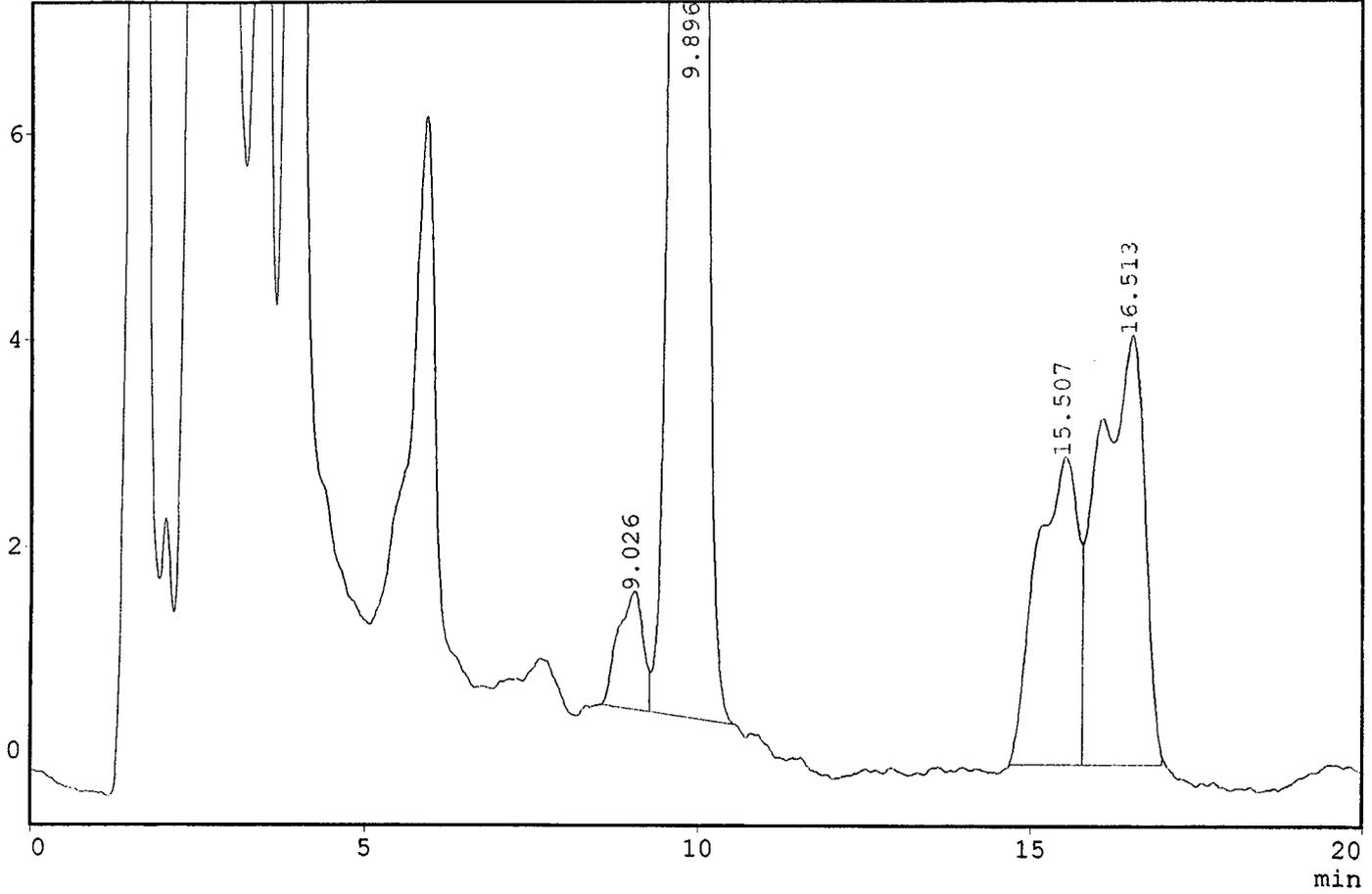
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	7.675	5388	308
2	9.013	32818	1268
3	9.900	777202	25972
4	15.515	163042	3765
5	16.508	210099	4377
		1188548	35691

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAIC2.MET

Mostra: Fezes dia 3  
 SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 Wavelength: 365 nm 415  
 Inlet: 40  
 Column: Purospher RP-18 5 um  
 Flow: 0,5 ml.min  
 Offset: +10

\* Chromatogram \*\*\* Filename: FEZES03.C01



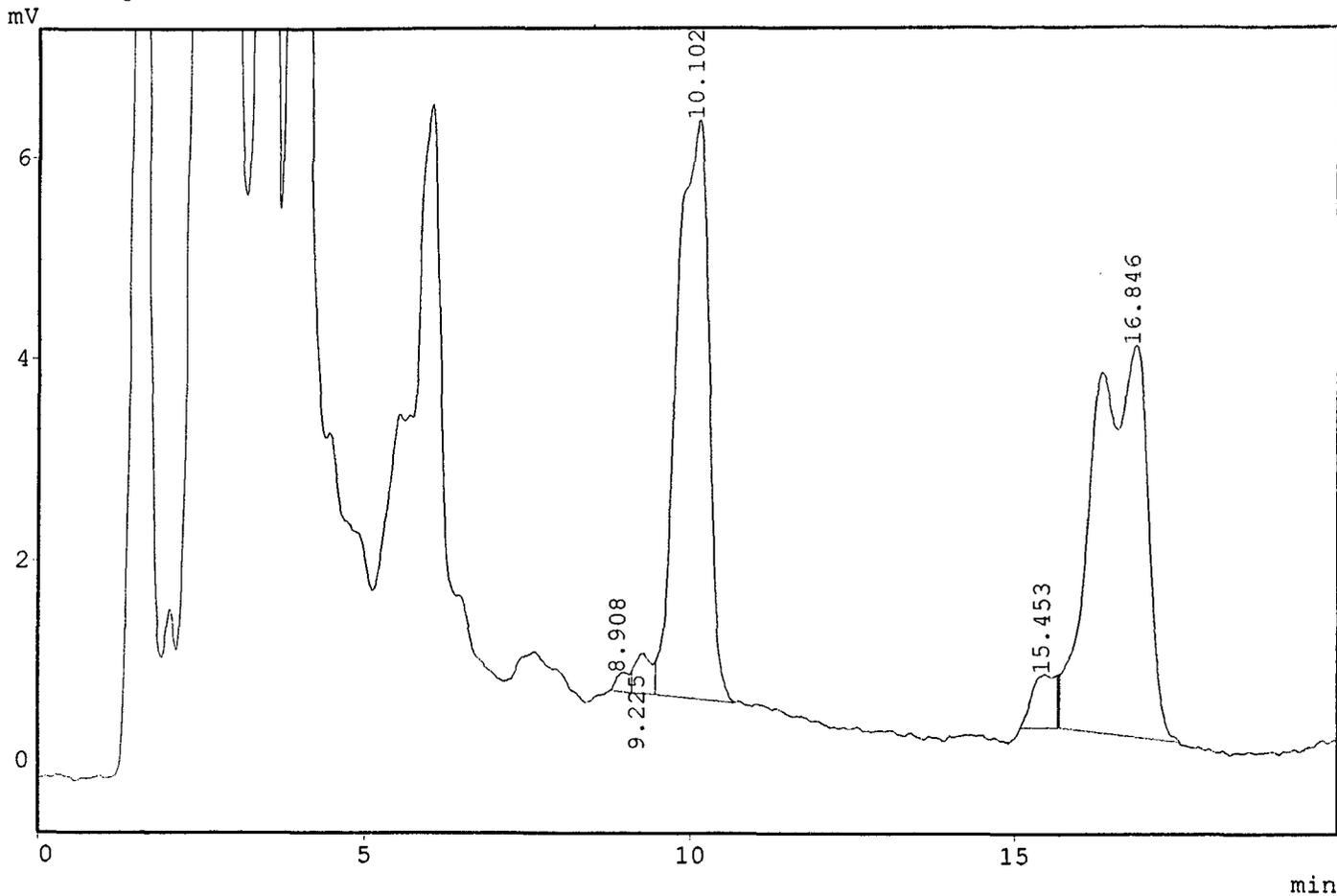
\* Peak Report \*\*\*

NO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.026	29693	1146
2	9.896	668089	22492
3	15.507	130198	2985
4	16.513	196666	4150
-----		1024645	30773

Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAIC2.MET

Amostra: Fezes dia 4  
 DSP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 ex; 365 am 415  
 forno 40  
 coluna Purospher RP-18 5 um  
 fluxo: 0,5 ml.mim  
 10+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:FEZES04.C01



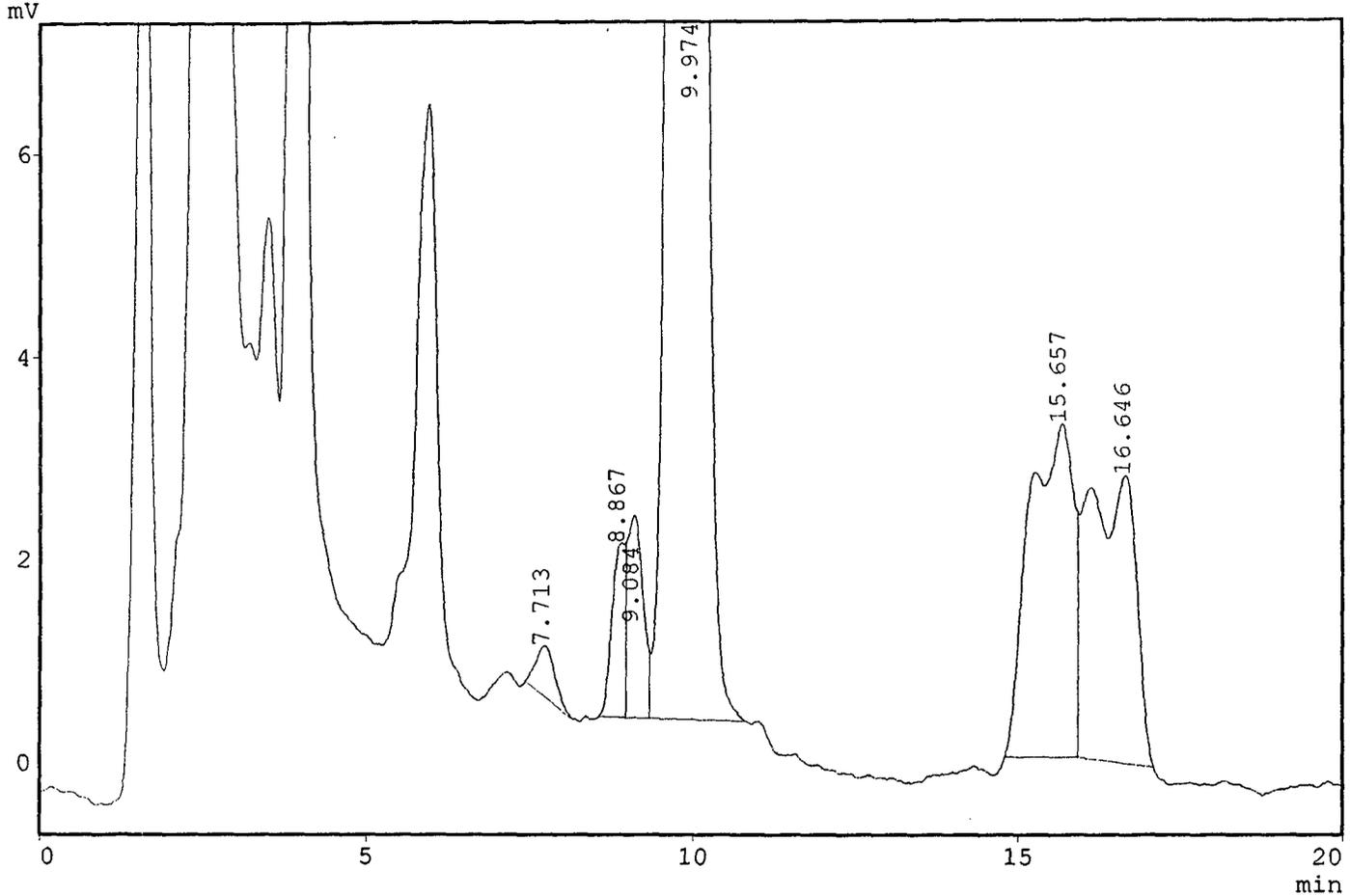
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	8.908	2847	173
2	9.225	7294	384
3	10.102	193746	5741
4	15.453	13716	528
5	16.846	224168	3865
		441770	10692

LASS-LC10 Ver.=1.61 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=13 DATA=FEZES05.C01 09/03/99 01:00  
 Sample :  
 Detector : Other:fluoresc  
 Operator : Marcia  
 Method Name : OKADAIC2.MET

mostra:Fezes dia 5  
 SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
 x; 365 am 415  
 orno 40  
 coluna Purospher RP-18 5 um  
 fluxo: 0,5 ml.mim  
 0+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:FEZES05.C01



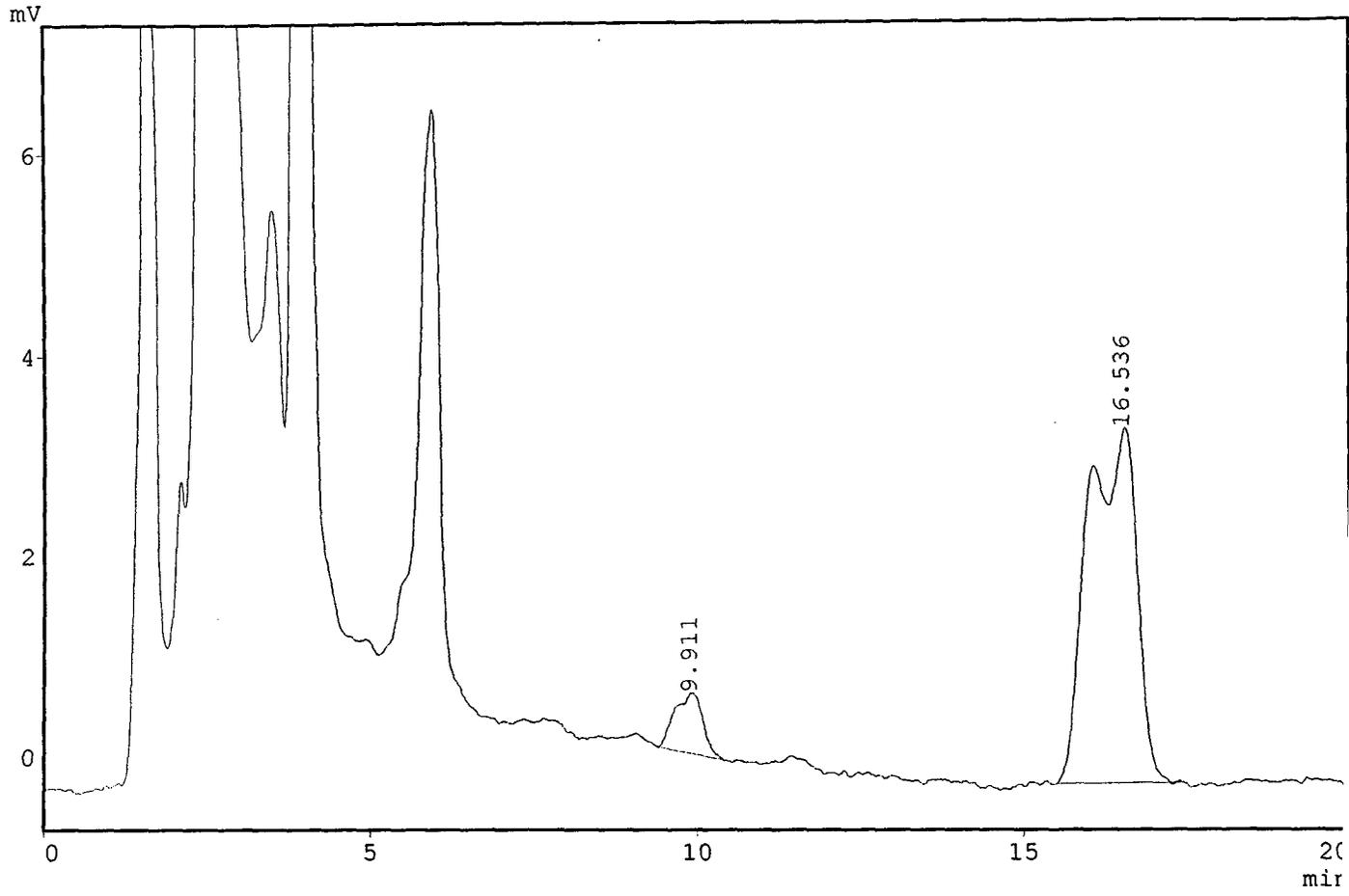
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	7.713	9699	488
2	8.867	25039	1676
3	9.084	32063	1969
4	9.974	994957	30735
5	15.657	153767	3269
6	16.646	142270	2815
		-----	
		1357795	40952

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Amostra: Fezes dia 6  
MSP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
Ex; 365 am 415  
Forno 40  
Coluna Purospher RP-18 5 um  
Fluxo: 0,5 ml.mim  
10+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename: FEZES06.C01



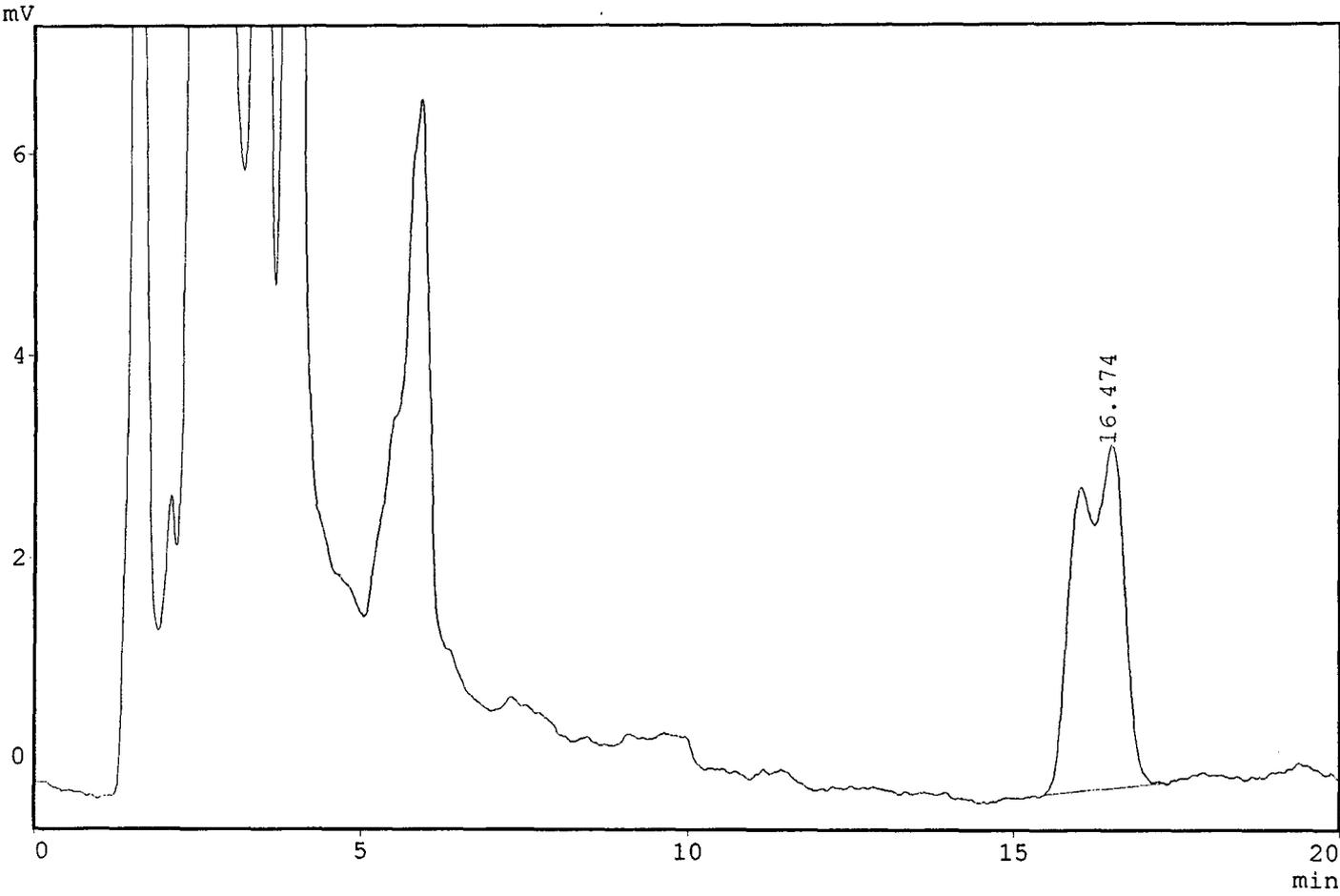
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	9.911	17232	590
2	16.536	181641	3512
		198874	4103

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Mostra: Fezes dia 7  
SP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
Wavelength: 365 nm 415  
Flow rate: 0.40 ml/min  
Column: Purospher RP-18 5 um  
Injection volume: 0.5 ml  
Sensitivity: 10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename: FEZES07.C01



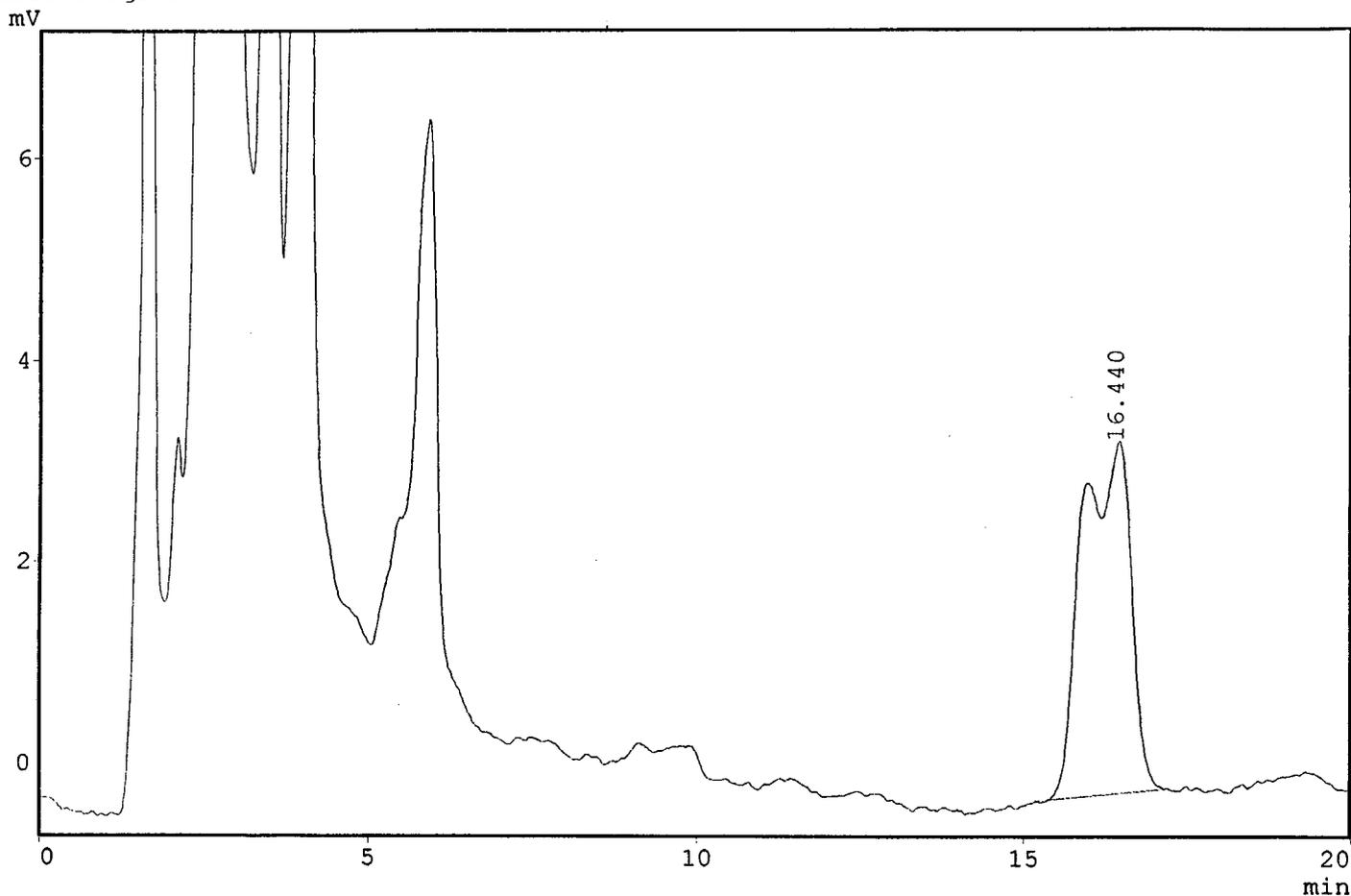
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.474	173924	3399
-----		173924	3399

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Amostra:Fezes dia 8  
OSP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
ex; 365 am 415  
Forno 40  
coluna Purospher RP-18 5 um  
Fluxo: 0,5 ml.mim  
0+10

\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:FEZES08.C01



\*\* Peak Report \*\*\*

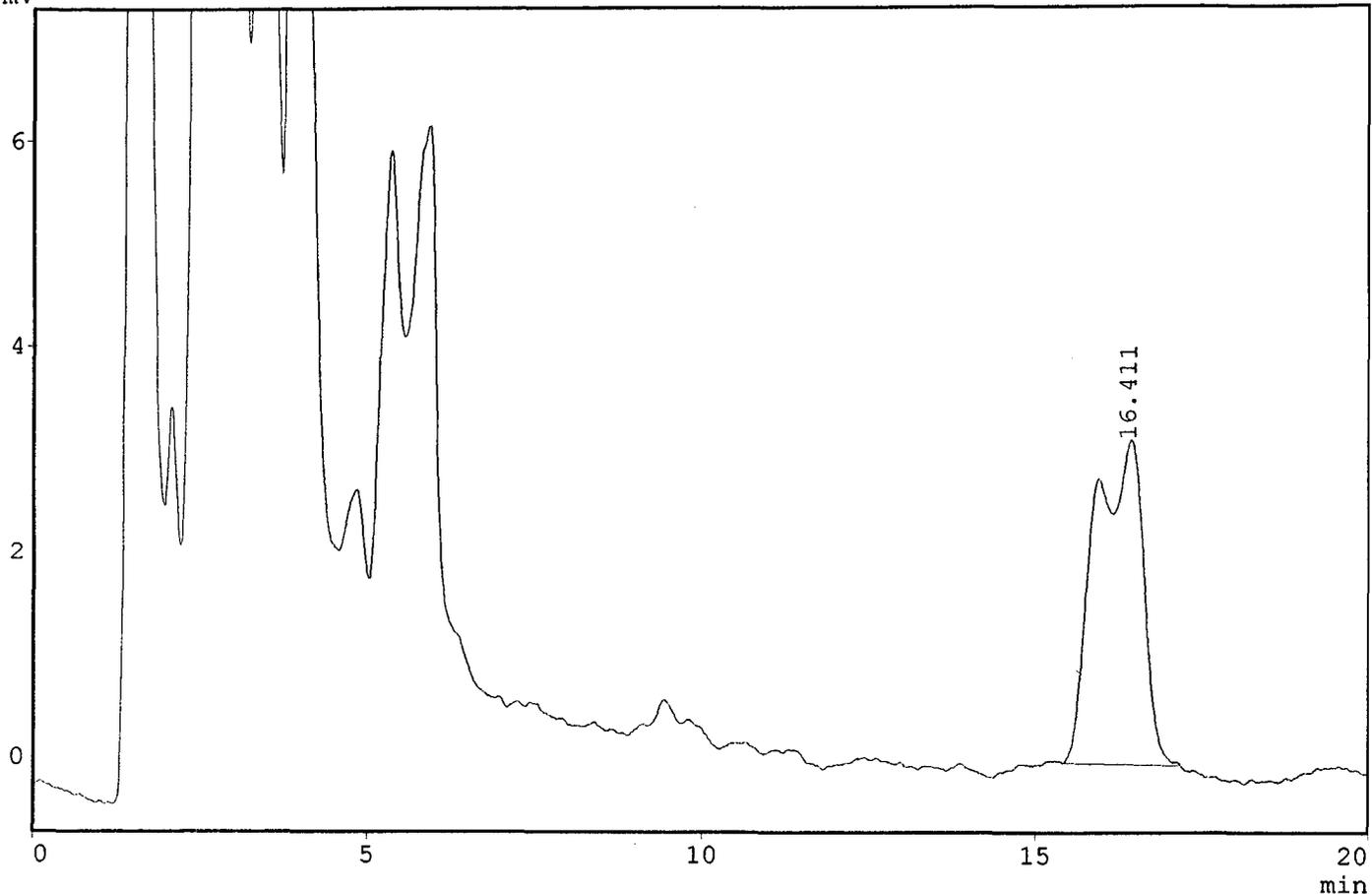
KNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.440	179976	3476
-----			
		179976	3476

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

Amostra:Fezes dia 9  
DSP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
ex; 365 am 415  
forno 40  
coluna Purospher RP-18 5 um  
fluxo: 0,5 ml.mim  
10+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:FEZES09.C01

mV



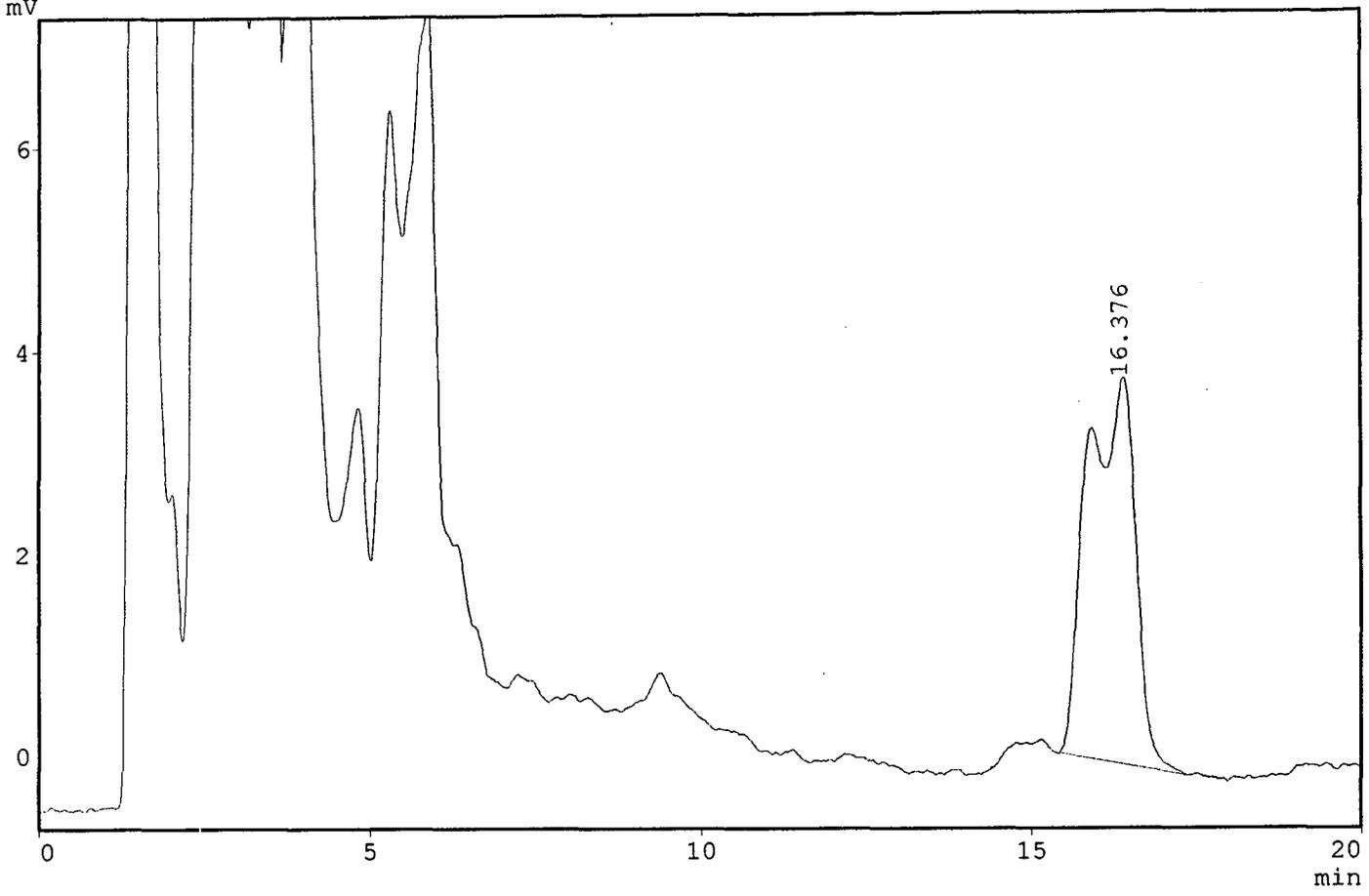
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.411	159252	3143
-----		159252	3143

Sample :  
Detector : Other:fluoresc  
Operator : Marcia  
Method Name : OKADAIC2.MET

amostra:Fezes dia 10  
MSP: Isocratico ACN: H2O 80:20  
Ex; 365 am 415  
Forno 40  
coluna Purospher RP-18 5 um  
Fluxo: 0,5 ml.mim  
0+10

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:FEZES10.C01



\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	16.376	189176	3787
-----			
		189176	3787

**ANEXO 3: Limites máximos permitidos do  
conteúdo de toxinas de DSP em moluscos  
(LUCKAS, 1992).**

Limites máximos permitidos do conteúdo de toxinas de DSP em moluscos segundo LUCKAS, (1992).

<b>País</b>	<b>Limites estabelecidos</b>	<b>Métodos de análise</b>
<b>Dinamarca</b>	Quantidade não detectável	Bioensaio com Camundongos e Bioensaio com Ratos
<b>Alemanha</b>	Quantidade não detectável	Bioensaio com Camundongos
<b>França</b>	0,2 – 0,4 MU/g de hepatopâncreas	Bioensaio com Camundongos
<b>Irlanda</b>	Quantidade não detectável	Bioensaio com Ratos e CLAE
<b>Japão</b>	5 MU por 100g de tecido mole	Bioensaio com Camundongos
<b>Holanda</b>	Quantidade não detectável	Bioensaio com Camundongos
<b>Noruega</b>	5 – 6 MU por 100g de tecido mole	Bioensaio com Camundongos
<b>Portugal</b>	Quantidade não detectável	Bioensaio com Camundongos
<b>Espanha</b>	Quantidade não detectável	Bioensaio com Camundongos
<b>Suécia</b>	60µg por 100 g de tecido mole	Bioensaio com Camundongos e CLAE

---

**BIBLIOGRAFIA**

- AGUILERA, A., GONZÁLES-GIL, S., COSTAS, E. e LÓPEZ-RODAS, V. Control mechanisms of cell proliferation in marine dinoflagellates. Rev. Biol. Mar. y Oceanog., v. 33, n. 2, p. 241-250, 1998.
- ANDERSON, D. Eaux colorées et phytoplancton toxique. Pour la Science., v. 204, p. 68-76, 1994.
- AUNE, T., e YNDESTAD, M. Diarrhetic Shellfish Poison. In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water, I. R. Falconer (Ed), Academic Press, London, UK, p. 87-104, 1993.
- BAUDER, A G., CEMBELLA, A. D. e QUILLIAM, M. A. Dynamics of Diarrhetic Shellfish Toxins from the Dinoflagellate, *Prorocentrum lima*, in the Bay Scallop, *Argopecten irradians*. In: Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto, T., Oshima, Y e Fukuyo, Y. (Eds) Intergovernmental Commission of UNESCO, p. 433-436, 1996.
- BAYNE, B., L. The biology of mussel larvae. In: Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. B. L. Bayne (Ed), Cambridge University Press, Cambridge, p. 81-120, 1976.
- BAYNE, B., L., HAWKINS, A, J., NAVARRO, E., e IGLESIAS, J., L., P. The effects of seston concentration on feeding, digestion and growth in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser., v. 55, p.47-54, 1989.
- BELIN, C., BERTHOMÉ, J. P. e LASSUS, P. Dinoflagellé toxiques et phénomènes de aux coloreé sur les cotés Française: Evolution et tendance entre 1975 et 1988. Equinoxe, v. 25, p. 30-38, 1989.
- BENDER, M. E., ROBERTS, M. H., Jr. e FUR, P. O. Unavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from coal particles to the eastern oyster. Environ. Pollut., v. 44, p. 243-260. 1987.
- BERTHOMÉ J. P., BELIN, C. e LASSUS P. Eaux colorées, plancton toxiques et cultures marines. Equinoxe, v. 5, p. 9-16, 1985.
- BIALOJAN, C. e TAKAI, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases: specificity and kinetics. Biochem., v. 256, p. 283-290, 1988.
- BOTANA, L., M., RODRIGUES-VIEYTES, M., ALFONSO, A. e LOUSAL C., N. Phycotoxin: Paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. Handbook of Food Analysis, Leo, M., L., Noletti, L., (Eds), v. 2, 1996.

- BRICELJ, V., M., LEE, J., H. e CEMBELLA, A. D. Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. In: Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Science, Smayda e Shimizu (Eds.). New York, p. 371-376, 1993.
- BRICELJ, V., M. e SHUMWAY, S., E. An overview of the occurrence and transfer kinetics of paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs. In: Harmful Algae, Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M. L. e Wyatt, T (Eds). Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission. UNESCO, p. 431-435, 1998.
- CANDEO, P.M.; FAVARON, I.; LONGVEL, R.M.; MANCY, J.M. e MANCY, H. Pathological phosphorylation causes neuronal death: Effect of okadaic acid in primary culture of cerebellar granule cells. J. Neurochem., v. 59, p. 1558-1561, 1992.
- CARDOSO, L. S. Dinoflagelados da Ilha do Arvoredo e da praia de Ponta das Canas- SC, Brasil (Setembro de 1991 a fevereiro de 1992): Considerações taxonômicas e ecológicas. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, 1993.
- CASABELLAS, M. A. C. Depuración de Moluscos, Conselleria de Pesca, Marisqueo y Acuicultura, Xunta de Galicia. (Eds.), 78p., 1991.
- DEFOSSEZ, J. -M. e DAGUZAN, J. About preferential ingestion of organic matter by bivalves. J. Moll. Stud., v. 62, p. 394-397, 1996.
- DURAND-CLEMENT, M., CLEMENT, J., C., MOREAU, A., JEANNE, N. e PUISEUX-DAO, S. New ecological and ultrastructural data on the dinoflagellate *Dinophysis* species from the french coast. Mar. Biol., v. 97, p. 34-37, 1988.
- EPAGRI. Cadeias produtivas. Empresa de Pesquisas Agropecuárias. Relatório Interno, Florianópolis, 1997.
- FARRINGTON, J. W. Bioaccumulation of hydrophobic organic pollutant compounds. In: Ecotoxicology: Problems and Approaches. S. A. Levin, Harwell, J. R., J. R. Kelly e K. D. Kimball (Eds). Springer-Verlag, New York, p. 279-313, 1989.
- FERREIRA, J. F. e MAGALHÃES, A. R. M. Desenvolvimento do Cultivo de mexilhões em Santa Catarina (sul do Brasil). Resumos do VI Congresso Latinoamericano de Ciência do Mar (COLACMAR), Mar del Plata, Argentina, p. 80, 1995.
- FERREIRA, J., S., e MAGALHÃES, A., R., M. Técnicas básicas em cultivo de moluscos. Apostila elaborada pelo Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, UFSC, 1997.

- FREUDENTHAL, A. R. e JIJINA, J. L. Potential hazards of *Dinophysis* to consumers and shellfisheries. J. Shellfish Res., v. 7, p. 695- 701, 1988.
- FUJIKI, H., SUGANUMA, M., SUGURI, H., YOSHIZAWA, S., OJIKI, M., WAKATSA, K. e SUGIMURA, T. Induction of ornithine decarboxylase activity in mouse skin by a possible tumor promoter, okadaic acid. Proc. Jap. Acad. Ser. B., v. 63, p. 51-53, 1987.
- HALLEGRAEF, G. M. A review of harmful algal bloomn and their apparent global increase. Phycologia, v.33, n.2, p. 79-99, 1993.
- HAWKINS, A. J. S. e BAYNE, B. L. Physiological Interrelations, and the Regulation of Production. In: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture Elisabeth Gosling (Ed), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p.171-222, 1992.
- IFREMER Programme National- Efflorescences Algales Marines- Principaux Résultats, 1989-1992. 1993.
- KAT, M. Diarrhetic Shellfish Poisoning in the Netherlands Related to the Dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. Antonie Leewenhoek, v. 49, p. 417-427, 1983.
- KAT, M. Diarrhetic Mussel Poisoning. Measures and Consequences in the Netherlands. ICES, Special Meeting on Causes, Dynamics and Effects of Exceptional Marine Blooms and Related Events, p. 4-5, Copenhagen, Denmark, October, 1984.
- KELLER, M. D, SELVIN, R. C., CLAUS, W. e GUILLARD, R. R. L. Media for the Culture of Oceanic Ultraphytoplankton. J. Phycol., v. 23, p. 633-638, 1987.
- KIKUCHI, T., SATO, M., KAGA, Y., SATO, K., SATO, S., OGATA, T., e KODAMA, M. Secondary Contamination of Scallops by Ingestion of PSP Toxins in the Feces of Adjacent Higly Toxic Scallops. In Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto, T., Oshima, Y e Fukuyo, Y. (Eds) Intergovernmental Commission of UNESCO, p. 413-415, 1996.
- KOLIBACHUK, D. E GREENBERG, E.P. The photobacteria *Vibrio fisheri*. J. Bacteriol., v. 175, p. 7307-7312, 1993.
- KUMAGAI, M., YANAGI, T., MURATA, M., YASUMOTO, Y., KAT, M., LASSUS, P. e RODRIGUEZ-VASQUEZ. Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe., Agric. Biol. Chem., v. 50, p. 2853-2857, 1986.
- LAABIR, M. e GENTIEN, P. Survival of Toxic Dinoflagellates after gut passage in the Pacif Oyster *Crassostrea gigas*. Thunburg. J. Shellfish Res., v. 18, n. 1, p. 217-222, 1999.

- LASSUS, P. Plancton Toxiques et Plancton d'eaux rouges sur les Côtes Européennes. IFREMER., 111 p., 1989.
- LAWRENCE, J. E., BAUDER, A. G., QUILLIAM, M. A. e CEMBELLA, A. D. Prorocentrum lima: A Puntative Link to Diarrhetic Shellfish Poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Harmful Algae, Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M. L. e Wyatt, T. (Eds). Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission. UNESCO, p. 78-79, 1998.
- LEE, J. S., YANAGI, T., KENMA, R., e YASUMOTO, T. Flourometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem., v. 51, p. 877-881, 1987.
- LEE, J. S., IGARASHI, T., FRAGA, S., DAHL, E., HOVGAARD, P. e YASUMOTO, T. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. J. Appl. Phycol., v. 1, p.147-152, 1989.
- LIVINGSTONE, D. R. DIXON, D. R., DONKIN, P., LOWE, D., M., MOORE, M., N., e WIDDOWS, J. Molecular celular and physiological responses of the common mussel *Mytilus edulis* to pollution: uses in environmental monitoring and management. In: Ecotoxicology, Institute of Biology, UK., p. 26-30, 1989c.
- LIVINGSTONE, D. R. e PIPE, R. K. Mussel and environmental contaminants: Molecular and celular aspects. In: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture Elisabeth Gosling (Ed), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 425-464, 1992.
- LÓPEZ-BAREA, J. Biomarkers in ecotoxicology : an overview, In: Toxicology in Transition., DEGEN, G.H. (ed), Eurotox proceedings., p. 57-79, 1995.
- LUBET, P. Exposé synoptique des donnés biologique sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). Synopsis FAO sur pêches, FAO, Rome, n. 8, 51p, 1973.
- LUCKAS, B. Phycotoxins in seafood- toxicological and chromatographic aspects. J. Chromatography, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, v. 624, p. 439-456, 1992.
- LUTZ, A. R. e KENNISH, M., J. Ecology and Morphology of Larval and Early Postlarval Mussels. In: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elisabeth Gosling (Ed), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 21-85, 1992.
- MAGALHÃES, A., R., M. Teor de proteínas do molusco *Perna perna* (Linné, 1758) (MOLLUSCA:BIVALVIA) em função do ciclo sexual. São Paulo. Dissertação de Mestrado, 1985.

- MARGALEF, R. Red Tides and Ciguatera as successful ways in the evolution and survival of an admirable old phylum. In: Harmful Algae. B. Reguera, J. Blanco, M. A. L. Fernández e t. Wyatt (Eds.) Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, p. 03-07, 1998.
- MARR, J.C., JACKSON, A. e. McLACHLAN, J. L. Occurrence of *Prorocentrum lima*, a DSP toxin-producing species in the Atlantic coast of Canada. J. appl. Phycol., v. 2, p. 17-24, 1992.
- MARR, J.C., McDOWELL, L. M. e QUILLIAM, M. A. Investigation of Derivatization Reagents for the Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins by Liquid Chromatography With Fluorescence Detection. Nat. Toxins, v. 2, p.302-311, 1994.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, E. e HERNÁNDEZ-CAMPOS H. E. Distribución de quistes de dinoflagelados y acritarcas en sedimentos holocénicos del Golfo de California. UNAM. Inst. Geol. Paleont. Mexicana, v. 57, 106 p., 1991.
- MATIAS, W.G. Etude des mecanismes moleculaires d'acção de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrhéique, *in vivo* et *in vitro*. Doctorat de L'Universite de Bordeaux II, 178 p. 1996.
- MATIAS W. G., BONINI M e CREPPY E. E. Inhibition of protein synthesis in a cell-free system and vero cells by okadaic acid, a diarrhetic shellfish toxin. J. Toxicol. Environ. Health, v. 48, n. 3, p. 309-317, 1996a.
- MATIAS W. G. e CREPPY E. E. Evidence for enterohepatic circulation of okadaic acid in mice. J. Toxic. Subst. Mechan., v. 15, n. 4, p. 405-414, 1996b.
- MATIAS W. G. e CREPPY E. E. Transplacental passage of [H-3]-okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and high-performance liquid chromatography. Hum. Exp. Toxicol., v. 15, n. 3, p. 226-230, 1996c.
- MATIAS W. G. e CREPPY E. E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in vero cells. Environ. Toxicol. Water Qual., v. 13, n. 1, p. 83-88, 1998.
- MATIAS, W.G., Algas: A problemática das eflorescências de algas marinhas nocivas. Biotecnol., Ciência e Desenvolv., v. 8, p. 16-17, 1999.
- MATIAS WG, TRAORE A. e CREPPY E. E. Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. Hum. Exp. Toxicol., v. 18, n. 5, p. 345-350, 1999a.

- MATIAS WG, TRAORE A. BONINI, M., SANNI, A. e CREPPY E. E. Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. Hum. Exp. Toxicol., v. 18, p. 634-639, 1999b.
- McLACHIAN, J. L., MARR, J. C., CONION-KELLY, A. e ADAMSON A. Effects of Nitrogen Concentration and Cold Temperature os DSP- Toxin Concentrations in the Dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Prorocentrales, Dinophyceae). Nat. Toxins, v. 2, p. 263-270, 1994.
- MOORE, S., F. Molecular and celular indices of of pollutans effects. Strategies and advanced techniques for marine pollution studies: Mediterranean Sea., v. 9, p. 41-435, 1986
- MORTON, S. L. e TINDALL, D. R. Determination of Okadaic Acid Content of Dinoflagellate Cells: A Comparison of the HPLC- Fluorescent Method and two Monoclonal Antibody Elisa Test Kits. Toxicon, v. 34, n. 8, p. 947-954, 1996.
- MURAKAMI, Y., OSHIMA, Y e YASUMOTO, T. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. Bull Jpn. Soc. Sci. Fish., v. 48, p. 69-72, 1982.
- MURATA, M., SHIMATANI, M., SUGITANI, H., OSHIMA, Y., e YASUMOTO, T. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. Bull. Jpn. Sci. Fish., v. 48, p. 549-552, 1982.
- NORMA DIN 38412 (L34, 341) -Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber der Hemmwirkung abwasser auf die Lichtemission von Photobacterium phosphoreum., Berlin, 1992.
- PEREIRA, A., KLEIN, D., SOHET, K., HOUVENAGHEL e BRAEKMAN, J. C. Improvement to the HPLC-Fluorescence analysis method for the determination of acid DSP toxins. In: Harmful Marine Algal Blooms- P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien e C. Marcaillou. Lavoisier (Eds), Technique et Documentation- Lavoisier, Intercept Ltd, p. 333-338, 1995.
- PROENÇA, L. A., RÖRIG L., BARREIROS M. A. e LAGOS N. Primeiro registro de ácido okadaico, uma toxina diarréica, em moluscos cultivados no sul do Brasil. IV Congresso Latino Americano de Ficologia, Caxambú, MG. Abstract., 1996.
- PROENÇA, L. A. e SCHETTINI, C. A. F. Effect of shellfish culture on phytodetritus vertical fluxes in tropical waters- southern Brazil. Ver. Bras. Oceanogr., v. 46, n. 2, p. 125-133, 1998.

- PROENÇA, L. A., SCHMITT, F., COSTA, T. e RÖRIG, L. R. Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. *Ciência e Cultura*, v. 50, n. 6, p. 458-462, 1998b.
- PROENÇA, L. A. e RÖRIG, L. R. Produção de ácido ocadáico, uma toxina diarréica, por *Dinophysis acuminata* em Santa Catarina. *Atlântica (Prelo)*, v. 21, 1999.
- PROENÇA, L. A., LAGOS, N., RÖRIG, L. R., SILVA, M. e GUIMARÃES, S. Occurrence of paralytic shellfish toxins- PST in southern Brazilian waters. *Ciência e Cultura*, v. 51, n.1, p. 16- 21, 1999.
- QUILLIAM, M. A. Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Tissue by Liquid Chromatography with Fluorometric and Mass Spectrometric Detection. *J. AOAC International*, v. 78, n. 2, p. 555-570, 1995.
- QUILLIAM, M. A. e WRIGHT, J. L. C. Methods for Diarrhetic Shellfish Poisons. Manual on Harmful Marine Microalgae. Manual and Guides. IOC, Hallegraef, G. M., Anderson D. M., Cembella, A. D.(Eds). UNESCO, 1995a.
- QUILLIAM, M. A. e WRIGHT, J. L. C. Production of Diarrhetic Shellfish Poisons (DSP) Toxins by *Prorocentrum lima* in Culture and Development of Analytical Methods. In: *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Yasumoto, T., Oshima, Y e Fukuyo, Y. (Eds) Intergovernmental Commission of UNESCO, p. 289-292, 1996.
- RAUSCH DE TRAUBENBERG C., GÉRAUD, M. L., SOYER - GOBILLARD, M. O. e EMDADI, D. The Toxic Dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its Associated Bacteria. I. Ultrastructural Study. *Europ. J. Protistol.*, v. 31, p. 318-326, 1995.
- REGUERA, J., BLANCO, M., L., FERNANDES, T e WYATT, L. Harmful algae. Xunta de Galicia and IOC-UNESCO. Santiago de Compostela, p. 22-25. 1997.
- RIOS, E., C., Seashell of Brazil. Rio Grande do Sul, Centro de Ciências do Mar. Ed. Fund. Univ. do Rio Grande, 431p., 1994.
- SAMPAYO, M. A. D. M., ALVITO, P., FRANCA, S. e SOUZA, P. *Dinophysis* spp. Toxicity and Relation to accompanying species. In: *Toxic Marine Phytoplankton*, E. Graneli, B., Sunstrom, L. and Edler e D. M. Anderson, (Eds). Elsevier Science Publishing Co. New York., p. 215-220, 1990.
- SCHMITZ, F. J., PRASAD, R. S., GOPICHAND, Y., HOSSAIN, M. B., VAN DER HELM, D. Z. e SCHMIDT, P. Acanthiofolicin, a new episulfide-containing polyether carboxylic acid from the extract of the marine sponge, *Pandaros acanthifolium*. *JACS*, v. 103, p. 2467-2469, 1981.

- SÉCHET, V., SAFRAN, P., HOVGAARD, P. e YASUMOTO, T. Causative species of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway. Mar. Biol., v. 105, p. 269-274, 1990.
- SEED, R e SUCHANEK, T. H. Population an Community Ecology of *Mytilus*. In: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elisabeth Gosling (Ed), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 520-527. 1992.
- SHUMWAY, S. E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and Aquaculture, J. World Aquacult. Soc., v. 21, p. 65-104, 1990.
- SHUMWAY, S. E. Mussels and Public Health. In: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elisabeth Gosling (Ed), Elsevier, Amsterdam, p. 520-527, 1992.
- SILVA, C., R., LEMIESZEK, M., B., FERREIRA, J., F., COSTA, R., CREPPY, E., E. e MATIAS, W., G. Induction of micronuclei in *Perna perna* mussels (MOLLUSCA:BIVALVIA) exposed to okadaic acid. (Submetido para publicação), 2000.
- SMAYDA, T. Global epidemic of noxious phytoplankton blooms and food chain consequences in large ecosystems. In: Food Chains, Yields, Models, and Management of Large Marine Ecosystems, K. Sherman, L. M. Alexander, B. D. Gold (Eds), Westview Press, Boulder CO, p. 275-307, 1992.
- SOURNIA, A., BELIN, B., BERLAND, B., ERARD-LE, DENN, E., GENTIE, P., GRZEBYK, D., MARCAILLOU-LE BAUT, C., LASSUS, P e PARTENSKY, F. Le phytoplancton nuisible des côtes de France: De la biologie à la prevention. IFREMER- Centre de Brest, Plouzane, France., 1991.
- SOHET, K. Growth and Toxicity of *Prorocentrum lima* (ERHENBERG) DODGE in Different Culture Media: Effects of Humics Acids and Organic Phosphorus. In: Harmful Marine Algal Blooms- P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou, (Eds), Technique et Documentation- Lavoisier, Intercept Ltd, p. 234-242, 1995.
- STEIDINGER K. A. Some Taxonomic and Biologic Aspects of Toxic Dinoflagellates, In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water, Ian R. Falconer (Ed), Academic Press, London, UK, p. 1-28, 1993.
- SUBBA RAO D. V., e PAN, Y. Apart from Toxin Production, are the Toxigenic Algae Physiologically different? In Harmful Marine Algal Blooms- P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou (Eds). Technique et Documentation- Lavoisier, Intercept Ltd, p. 193-197, 1995.

- TASCHIBANA, K., SCHEUER, P. J., TSUKITANI, Y., KIKUCHI, H., ENGEN, D., V., CLARDY, J., GOPICHAND, Y., e SCHIMITZ, F. G. Okadaic acid, a cytotoxic polyeter from two marine sponges of the genus *Halichondria*. J. Am. Chem. Soc., v. 103, p. 2469-2471, 1981.
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., LIVINGSTONE, D., R., e ORUNESU, M. Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of antioxidant defence systems. Experientia, v. 47, p. 454-457, 1991a.
- WIDDOWS, J., e DONKIN, P. Mussel and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. In: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture Elisabeth Gosling (Ed), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 383-424, 1992.
- YASUMUTO, T.; OSHIMA, Y. e YAMAGUCHI, M. Occurrence of a new type of toxic shellfish poisoning in the Tohoku district. Bull. Jnp. Soc. Scient. Fish., v. 44, p. 1249-1255, 1978.
- YASUMUTO, T.; OSHIMA, Y. SUGAWARA, W., FUKUYO, Y., OGURI, H., IGARASHI, T. e FUJITA, N. Identification of *Dinophysis fortis* as the causative organism of Diarrhetic Shellfish Poisoning. Bull. Jnp. Soc. Scient. Fish., v. 46, p. 1405-1411, 1980.
- YASUMOTO, T., MURATA, M., OSHIMA, Y., SANO, M., MATSUMOTO, G. K., e CLARDY, J. Diarrhetic Shellfish Toxins. Tetrahedron, v. 41, p. 1019-1025, 1985.
- ZALESKI, J.; STEWARD, R. A. e SIKKA, H. C. Metabolism of benzo[a]pyrene and trans - benzo[a]pyrene - 7,8-dihydrodiol by freshly isolated hepatocytes from mirror carp. Carcinogenesis, v. 12, n.2, p. 167-174, 1991.
- ZENEBON, O e PREGNOLATTO, N. P. Memórias Técnico Científicas da Divisão de Bromatologia e Química. In: 100 Anos de Saúde Pública. J. L. F. Antunes (Ed), Instituto Adolfo Lutz, SP, p. 173-199, 1992.