

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**  
**MESTRADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**  
**MODALIDADE PROFISSIONAL**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM MOLUSCOS DA ESPÉCIE *Perna perna*  
(LINNAEU, 1758) ORIUNDOS DA ATIVIDADE DE CULTIVO - DE ARRAIAL DO  
CABO - UTILIZANDO *Artemia franciscana*.**

**ALAILTON DOS REIS GUARALDE**

MACAÉ/RJ

2016

ALAILTON DOS REIS GUARALDE

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM MOLUSCOS DA ESPÉCIE *Perna perna*  
(LINNAEU, 1758) ORIUNDOS DA ATIVIDADE DE CULTIVO - DE ARRAIAL DO  
CABO UTILIZANDO *Artemia franciscana*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense – IFF como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, área de concentração em Sustentabilidade Regional, linha de pesquisa Avaliação e Gestão Ambiental.

**Orientação:** Manildo Marcião de Oliveira D.Sc. – IFF (Doutor em Biologia - Biociências Nucleares - Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

MACAÉ/RJ  
2016

G914a Guaralde, Alailton dos Reis

Avaliação ecotoxicológica em moluscos da espécie *Perna perna* (Linnaeu, 1758) oriundos da atividade de cultivo - de Arraial de Cabo – utilizando *Artemia franciscana*. / Alailton dos Reis Guaralde. Macaé, RJ : [s.n], 2016.  
87 f. il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, *campus* Macaé, 2016.

Orientador: Manildo Marcião de Oliveira

1. Engenharia ambiental. 2. Meio ambiente 3. Ecotoxicologia. I. Título. II. Instituto Federal Fluminense.

CDD 363.73

Dissertação intitulada **AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM MOLUSCOS DA ESPÉCIE *Perna perna* (LINNAEU, 1758) ORIUNDOS DA ATIVIDADE DE CULTIVO - DE ARRAIAL DO CABO - UTILIZANDO *Artemia franciscana***, elaborado por Alailton dos Reis Guaralde e apresentado publicamente perante a Banca Examinadora, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, na área de concentração Sustentabilidade Regional, linha de pesquisa Avaliação e Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense.

Aprovado em ..06..DE..DEZEMBRO..DE 2016

Banca Examinadora:



.....  
**Manildo Marclão de Oliveira – Orientador**  
Doutor em Biologia (Biotecnologia) – UERJ/2009  
Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental – Campus Cabo Frio - Instituto  
Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense



.....  
**Aloysio da Silva Ferrão-Filho - Examinador Externo**  
Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) – UFRJ/1998  
Departamento de Biologia  
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz



.....  
**Marcos Massao Murata – Examinador Externo**  
Doutor em Fisiopatologia Clínica e Experimental – UERJ/2014  
Gestor Qualitec do Laboratório Radio e Fotobiologia, Departamento de Biofísica e Biometria-  
IBRAG/UERJ

### In memoriam

Dedico este trabalho às memórias do meu pai Augusto de Barros Guaralde e da minha mãe Adélia dos Reis Guaralde pela educação e criação nos dada, para honrarmos nosso nome, nossa família e os bons costumes, sempre nos apoiando e incentivando. Sem isso, nada seríamos!

## Agradecimentos

A Deus, por ter me dado saúde, equilíbrio, força, sabedoria e fé para seguir firme na caminhada, por mais dura e árdua que a mesma tenha sido, Sua presença foi constante, ora guiando meus passos, ora me carregando.

Ao meu Orientador e amigo, Dr<sup>o</sup>. Manildo Marcião de Oliveira, pela orientação, paciência, amizade, compreensão, força e parceria; enfim por tudo que fez durante todo esse período que convivemos e trabalhamos juntos.

À Professora e Mestre Daniela Almeida de Souza que desde o princípio me incentivou, orientou e ajudou das diversas formas que pode. Tenha meu eterno muito obrigado.

Aos meus irmãos Adenilson e Aldeir e todos os familiares pela compreensão e estímulos.

Aos integrantes da Banca de minha qualificação, os Doutores Marcos Massao Murata e Victor Barbosa Saraiva, que em conjunto com meu orientador apontaram erros e acertos, bem como me orientaram na escolha dos rumos a seguir.

Aos integrantes da Banca Examinadora, os Doutores Aloysio da Silva Ferrão-Filho, Marcos Massao Murata e o meu orientador Manildo Marcião de Oliveira. Pela disposição, colaboração e preciosas sugestões.

A toda equipe de professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental Mestrado Profissionalizante em Engenharia Ambiental do IFF por terem acreditado no potencial da turma de 2014, nos oferecendo sua sabedoria, conhecimento, incentivo e amizade;

A Professora Camilla Coutinho pela grande força nos ajustes ao formato ABNT;

À amiga e professora de inglês Rozana Lopes do Colégio Estadual Dr. Fel. Sodré pela imprescindível ajuda na escrita do inglês;

A Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. João André Duarte do Laboratório de Química do IFF Campus Cabo frio, pelo apoio e gentileza constantes.

Aos profissionais e colegas do LEMAM, Laboratório de Ecotoxicologia e Meio Ambiente do IFF Cabo Frio pela ajuda, convívio e amizade durante este período, especialmente aos incansáveis colaboradores Rafael e Celso que atuaram diretamente em nossa pesquisa.

Aos amigos da FIPERJ Cabo Frio-RJ, especialmente a Guilherme Burigo Zannete e Lucimar Domard pela mão constantemente estendida, prontos a ajudar.

Aos amigos e colegas de trabalho do Colégio Estadual Dr. Feliciano Sodré de São Pedro da Aldeia - RJ e da Secretaria de Meio Ambiente e Pesca da cidade de Cabo Frio-RJ pela amizade, estímulo e compreensão.

A todos os colegas da turma de 2014 do Mestrado em Engenharia Ambiental do IFF Macaé-RJ, pela amizade, carinho, sorrisos e fascinante troca de experiências, em especial Jorge Barbosa, Ana Rita, Marla, Thais, Roberto Rousenhain e Villas Boas.

“Uma paixão forte por qualquer objeto assegurará o sucesso, porque o desejo pelo objetivo mostrará os meios.”

-William Hazlitt-

## RESUMO

A crescente exaustão dos recursos pesqueiros promoveu incremento nas atividades de aquicultura e maricultura nas últimas décadas, com destaque também para a malacocultura, que vem se mostrando uma boa opção com o cultivo do mexilhão, sendo a espécie *Perna perna* a cultivada no Brasil. Certas espécies de microorganismos (microalgas e cianobactérias) podem multiplicar-se de forma incrivelmente rápida, promovendo as chamadas florações de algas nocivas (FAN) e, caso sejam produtoras de toxinas, liberá-las em grandes percentuais na água onde esses moluscos bivalves são cultivados para consumo humano. Mesmo não sendo letais aos mexilhões, estas toxinas podem causar uma série de transtornos à saúde de quem consumi-los, provocando as chamadas síndromes associadas ao consumo de carne de moluscos contaminados, como a síndrome diarreica de moluscos (DSP), síndrome amnésica (ASP), síndrome neurotóxica (NSP) e a síndrome paralisante de moluscos (PSP), dentre outras. Desta forma, torna-se importante trabalhar no sentido de se monitorar as áreas produtoras e de extrativismo de mexilhões para consumo humano. Uma das formas de se fazer tal monitoramento é a aplicação de testes diversificados que são referenciados em diversos países produtores, dentre os quais, o Brasil. Além dos testes de referência, como o bioensaio com camundongos e a cromatografia líquida com espectrometria de massas, há outros testes alternativos que podem ser usados para que se faça tal monitoração sem que se esbarre em entraves, como a necessidade autorização para uso de vertebrados em experimentos ou altos custos em equipamentos e pessoal treinado. O teste de inibição de fosfatase e o bioensaio com náuplios de *Artemia franciscana* são testes menos complexos que podem vir a desempenhar tal monitoramento regularmente como alternativas viáveis aos testes convencionais, porém de forma rápida, prática sem altos custos. O monitoramento do efeito de microalgas tóxicas junto às áreas de produção moluscos bivalves foi então investigado através da aplicação do teste toxicológico usando *A. franciscana* como organismo teste e do ensaio de inibição de fosfatase utilizando-se extratos metanólicos, a 10% e a 100% de metanol, de mexilhões coletados entre agosto de 2013 e maio de 2014, onde se buscou avaliar a toxicidade destes e verificar a potencialidade de testes de inibição de fosfatase extraída de artêmia como teste de alarme. Os resultados mostraram que em alguns meses do estudo houve similaridade entre a presença de microalgas tóxicas com a os processos de inibição enzimática e efeito tóxico, porém não na sua totalidade. Entretanto este estudo especula as possibilidades do uso destas metodologias como testes de alarme.

**Palavras-chave:** Mexilhão. Ficotoxinas. Testes alternativos. Artêmia.



## ABSTRACT

The growing exhaustion of fishery resources has promoted an increase in aquaculture and mariculture activities in the last decades, with emphasis also on malacoculture, which has been shown to be a good option with mussel cultivation, with *Perna perna* being cultivated in Brazil. Certain species of micro-organisms (microalgae and cyanobacteria) can multiply in an incredibly fast way, promoting so-called harmful algal blooms (FAN) and, if they are toxin producers, releasing them in large percentages in the water where these bivalve molluscs are grown For human consumption. Even though they are not lethal to mussels, these toxins can cause a number of disruptions to the health of those consuming them, leading to the so-called meat syndromes of contaminated molluscs such as diarrhea mollusc syndrome (DSP), amnesic syndrome (ASP), Neurotoxic syndrome (NSP) and mollusc paralytic syndrome (PSP), among others. In this way, it is important to work to monitor the production and extraction areas of mussels for human consumption. One of the ways to do such monitoring is the application of diversified tests that are referenced in several producing countries, among which, Brazil. In addition to the reference tests, such as mouse bioassay and liquid chromatography with mass spectrometry, there are other alternative tests that can be used to perform such monitoring without encountering obstacles such as the need to authorize vertebrates in Experiments or high costs on equipment and trained personnel. The phosphatase inhibition test and the *Artemia franciscana* nauplii bioassay are less complex tests that can perform such monitoring regularly as viable alternatives to conventional tests, but in a quick, practical way without high costs. The monitoring of the effect of toxic microalgae near the bivalve mollusc production areas was then investigated by applying the toxicological test using *A. franciscana* as a test organism and the phosphatase inhibition assay using 10% and 100% methanolic extracts, Of metanol, from mussels collected between August 2013 and May 2014, which sought to evaluate the toxicity of these and to verify the potentiality of tests of inhibition of phosphatase extracted from artemia as an alarm test. The results showed that in some months of the study there was similarity between the presence of toxic microalgae with the enzymatic inhibition processes and toxic effect, but not in its totality. However, this study speculates on the possibilities of using these methodologies as alarm tests.

**Keywords:** Mussel. Phycotoxin. Alternative tests. Artemia.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AD – Ácido Domóico

ADDA - Ácido 3-Amino-9-Metóxi-2,6,8-Trimetil-10-Fenil-Deca-4,6-Dienóico

ADAM - 9-athryldiazomethane

AMAB - Associação de Maricultura de Armação dos Búzios

AO – Ácido Ocadaico

AOAC –Association of Official Analytical Chemists

APEMABJG - Associação de Pescadores e Maricultores de Armação dos Búzios de José Gonçalves

ASP - Amnesic Shellfish Poisoning

AZP - Azaspiracid Poisoning

BAP - 1-bromoacetylpyrene (bromoacetil pireno)

BTX – Brevetoxinas

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CE – Comissão Europeia

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

ChE – Colinesterase

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

DA - Ácido Domóico

*D. acuminata – Dinophysis acuminata*

DDT – Ditiotreitól (1,4 Dithiotheitol)

DSP – Diarrheic Shellfish Poisoning - (Envenenamento diarréico por marisco)

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

DTXs - Dinofisistoxinas

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético (Ethilenediamine tetraacetic acid)

EGTA – Ácido etilenoglicol diaminoetil tetra-acético (Ethilene glycol bis (2-aminoethyl Ether) tetraacetic acid

ESI – Espectometria por ionização e eletropulverização

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nation

FAL – Fosfatase Alcalina (Enzima)

FAN - Floração de algas nocivas

FT - Fosfatase Total

FIPERJ- Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro

GC-IV – Cromatografia gasosa – espectroscopia infravermelho

GC-MS - Cromatografia gasosa – espectrometria de massa

GTX – Gonyautoxinas

GYM – Gymnodimina (Gymnodimine)

HAB- HARMFUL ALGAL BLOON

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

HPLC-FLD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Fluorimétrica

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH - Índice de Desenvolvimento Humano

IEAPM – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

IPqM - Instituto de Pesquisas da Marinha

LC – MS/MS – Cromatografia líquida com espectrometria de massa – tandem

LEMAM – Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (IF Fluminense – Cabo Frio)

L.929 (CÉLULAS) – Tipo de Cultura de Fibroblastos Usados como Células Alimentadoras para Cultivo de Células.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MCT - Ministério da Ciência e Tecnologia

MBA – Bioensaio com camundongos (mouse bioassay)

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

NEO-STX – Neossaxitoxina

NPLJ<sup>4</sup> – Identificação da cepa de cianobactéria usada como controle

NSP - Neurotoxic Shellfish Poisoning - (Envenenamento neurotóxico por marisco)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PbTx-1- Brevetoxina Tipo 1

PbTx-2- Brevetoxina Tipo 2

PMSF – Floreto de fenil metano sulfonil (Phenylmethanesulfony fluoride)

PNUD- Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento

PSP – Paralytic Shellfish Poisoning - (Envenenamento paralisante por marisco)

PTXs - Pectenotoxinas

MTT (ENSAIO) - Teste de Citotoxicidade pelo Método Direto, com Redução Celular De 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il) -2,5-Difeniltetrazólio (Mtt) de Amarelo para Violeta

RCF – Relative Centrifugal Force

RPM – Rotações por minuto

STX – Saxitoxina

UE – União Europeia

UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro

VSP - Venerupine Shellfish Poisoning

PVC – Policloreto de Polivinila

TNB - ácido Tionitrobenzóico

YTXs - Yessotoxinas

**LISTA DE SÍMBOLOS**

° C - Graus centígrados  
S - Sul  
W - Oeste  
Kg - Quilograma  
g - Grama  
mg - Miligrama ( $=10^{-3}$  g)  
Km - Quilômetros  
Km<sup>2</sup> - Quilômetros quadrados  
L - Litro  
mL - Mililitro  
% - Porcentagem  
cm - Centímetros  
cel.L<sup>-1</sup> - Células por litro  
m - Metros  
R1 - Radical 1  
R2 - Radical 2  
R3 - Radical 3  
H - Hidrogênio  
NH<sub>2</sub> - grupo funcional amina secundária  
CO<sub>2</sub> - Gás Carbônico  
OH - Hidroxila  
SO<sub>3</sub> - Trióxido de enxofre  
NH - Grupo Funcional Amina Primária  
CH<sub>3</sub> - Radical Metil (metila)  
N<sub>2</sub> - Nitrogênio Atmosférico  
Ca(ClO)<sub>2</sub> - Hipoclorito de cálcio  
HCl - Ácido clorídrico  
Na OH - Hidróxido de sódio  
NaCl - Cloreto de sódio  
NaHCO<sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
Leu - Leucina

Ala - Alanina

Tyr –Tirosina

Arg – Arginina

Met – Metionina

§ - Parágrafo

XXI - Vinte e um (Século)

XX – Vinte (século)

mM – Milimolar

M – Molar

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

Mg.L<sup>-1</sup> – Miligrama por litro

μmol.min<sup>-1</sup> – mcromolar por minuto

μL – Microlitro (=L<sup>-6</sup>)

nm - Nanômetro

M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> – Unidade de medida para absortividade molar

min - Minutos

s – Segundos

DTNB - 1,2-dicloro-4-nitrobenzeno

U – Unidade enzimática

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1-</b> Associação dos resultados obtidos nos ensaios de inibição de fosfatase e bioensaios com artêmia a 10% e 100% com a PRESENÇA DE microalgas detectadas nos meses de coleta .....	75
---	----



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigo 1

**FIGURA 1:** Localização das cidades de: A) Armação de búzios e B) Arraial do Cabo.....29

**QUADRO 1:** Correlação entre as síndromes provocadas pelo consumo de moluscos contaminados, as toxinas causadoras, as principais microalgas produtoras e seus respectivos sintomas.....37

**QUADRO 2:** Caracterização dos principais grupos de biotoxinas.....39

**QUADRO 3:** Estrutura das biotoxinas.....40/41

**FIGURA 2-** molécula básica de microcistina – LR (1: D-alanina; 2: L-leucina; 3: ácido metilaspártico; 4: L-arginina; 5: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10- fenildeca-4,6-dienóico; 6: ácido D-glutâmico; 7: N-metildihidroalanina.....42

### Artigo 2

**QUADRO 1:** Composição das soluções metanólicas de extração .....68

**FIGURA 1:** Percentuais de mortalidade em náuplios de *Artemia franciscana* submetidos a extratos de hepatopâncreas de mexilhões a 10% e a 100% de metanol.....71

**FIGURA 2:** Percentuais de inibição de enzima fosfatase extraída de *Artemia franciscana* submetidos a extratos de mexilhões a 10% e a 100% de metanol.....72

**FIGURA 3** – Atividade fosfatásica de náuplios de artêmia em presença de extratos metanólicos de hepatopâncreas de *Perna perna*.<sup>a</sup> diferenças entre as médias de inibição de atividade fosfatásica com extratos metanólicos 10% em relação ao controle sem incubação com extrato. <sup>b</sup> diferenças entre as médias de inibição de atividade fosfatásica com extratos metanólicos 100% em relação a atividade do controle sem incubação com extrato. <sup>c</sup> diferença entre a média de inibição do extrato 10% em relação ao controle de maio. <sup>d</sup> diferença entre a média de inibição do extrato 100% em relação ao controle de maio.(ANOVA, complementado com teste Tukey, p<0,05) .....73

**FIGURA 4:** Correlações entre inibição de atividade fosfatásica de náuplios de artêmia e letalidade para os náuplios de artêmia com os extratos metanólicos 100% e 10%.....73/74

|

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	20
OBJETIVOS.....	22
OBJETIVO GERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
Artigo 1 .....	23
<b>SITUAÇÃO DA ATIVIDADE DE PRODUÇÃO DE MEXILHÕES <i>Perna perna</i> (LINNAEU, 1758) EM ARRAIAL DO CABO E ARMAÇÃO DOS BÚZIOS E RISCOS DE CONTAMINAÇÃO POR BIOTOXINAS DE ALGAS: A NECESSIDADE DE SE MONITORAR</b>	
Resumo.....	23
Abstract.....	24
<b>1 Introdução.....</b>	<b>25</b>
<b>2 Revisão de Literatura.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1- Arraial do Cabo e Armação dos Búzios.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Aquicultura e Maricultura .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Situação da maricultura na região de estudo.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Suscetibilidade de Mexilhões a contaminantes.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 Florações de algas .....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Principais Ficotoxinas e síndromes associadas.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7 Métodos para detecção de ficotoxinas.....</b>	<b>43</b>
<b>2.7.1 Metodologias padronizadas utilizadas para detecção de ficotoxinas marinhas em moluscos.....</b>	<b>43</b>
<b>2.7.2 Outros métodos alternativos não padronizados.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7.2.1 Bioensaios com <i>Artemia sp</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7.2.1 Bioensaios com Enzimas .....</b>	<b>48</b>
<b>3 Considerações Finais.....</b>	<b>49</b>
<b>4 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>51</b>
Artigo 2. ....	61
<b>ESTUDO DA APLICAÇÃO DE TESTES TOXICOLÓGICO E ENZIMÁTICO PARA MONITORAR FICOTOXINAS ACUMULADAS EM MOLUSCOS BIVALVES</b>	
Resumo.....	61

Abstract.....	62
<b>1 Introdução.....</b>	<b>63</b>
<b>2 Material e Métodos.....</b>	<b>67</b>
<b>3 Resultados.....</b>	<b>70</b>
<b>4 Discussão.....</b>	<b>75</b>
<b>5 Considerações finais.....</b>	<b>78</b>
<b>6 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE A - Cartas Controle do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) para     ensaio com <i>Artemia franciscana</i>.....</b>	<b>87</b>

|

## APRESENTAÇÃO

A sobrevivência humana sobre o Planeta Terra está diretamente ligada à preservação dos recursos ambientais, cuja fragilidade, bem conhecida, tornou-se ainda mais evidenciada na chegada do Séc. XXI, com a consolidação da importância do conhecimento científico e tecnológico e a busca pela sustentabilidade (DIAS, 2006).

Técnicas e métodos eficientes e eficazes de comunicação e transportes, combustíveis alternativos, saúde, alimentação adequada, rapidez e agilidade, estética corporal, conforto e tantos outros desejos e necessidades tornaram-se vitais para a sociedade. Mas na contramão da satisfação dessas e outras necessidades estão os recursos ambientais, cada vez mais limitados, escassos, explorados ao limite e dando sinais de profunda exaustão. A redução da biodiversidade por ações diretas e indiretas, o depauperamento dos solos, a poluição atmosférica, o dilema do que fazer com cada vez mais lixo, as poluições sonora e visual, a radiação e o desmatamento, além do comprometimento dos corpos d'água independente da sua dimensão testemunham que os modos de desenvolvimento até aqui utilizados não se mostraram capazes de garantir a perpetuação da espécie humana, seu sustento e, menos ainda a futura existência da vida no planeta (ASSADOURIAN; PRUGH, 2013).

O conhecimento do ambiente dá ao homem uma infinidade de possibilidades; desde o seu aproveitamento mais racional até a prevenção de catástrofes e danos à própria saúde. Estudos do comportamento e da biologia das espécies permitiram ao homem o direcionamento da exploração de praticamente todas as formas de vida e de todos os ecossistemas existentes (Gasparoni, 2014). Neste contexto a fronteira oceânica foi obtendo cada vez mais destaque na busca por fontes alimentares alternativas, sobretudo de proteínas. Assim, maricultura, produção de seres marinhos para uso da humanidade, vem ganhando cada vez mais destaque gerando grande quantidade de divisas e alta produtividade, até porque cada vez mais se conhece e se divulga as vantagens nutritivas do pescado como alimento fornecedor de proteínas, vitaminas e ácidos graxos insaturados, que também possui baixo teor de colesterol e que o torna mais saudável que outras fontes proteicas. (GONÇALVES, 2011).

A existência de produção e consumo, certamente demanda fiscalização, taxaço e regulamentação. Assim, os produtos oriundos desse ramo de atividade, para serem comercializados devem ser licenciados e os riscos associados aos mesmos conhecidos e prevenidos. Uma ameaça constante associada ao consumo de mexilhões e outros moluscos são as toxinas produzidas por microalgas e cianobactérias (DARANAS et. al.; 2001) que, uma

vez apresentando as chamadas florações de algas nocivas (FAN), multiplicam-se de forma acelerada e suas populações tornam-se extremamente elevadas, podendo haver elevada produção de toxinas por partes desses seres fitoplânctônicos. O consumo destas toxinas ou das próprias microalgas por parte de moluscos bivalves como mexilhões e ostras que são filtradores pode fazer com que os mesmos fiquem contaminados pelas mesmas. Tais ficotoxinas podem causar diversos tipos intoxicações em quem consumir estas espécies de moluscos contaminados ou simplesmente entrar em contato direto com tais substâncias (BARBIERI, 2009).

Existe uma grande preocupação a nível internacional de se fazer o monitoramento de florações de algas bem como de se detectar a presença de toxinas que possam contaminar a carne de moluscos usados na alimentação humana (FERREIRA; MAGALHÃES, 2004). É necessário que se faça a detecção da presença de toxinas em áreas de cultivo de moluscos usados na alimentação humana através de metodologia sensível, rápida e confiável (SASSOLAS et. al., 2013).

Existem muitas técnicas de detecção de ficotoxinas, sendo algumas delas consideradas de referência e outras consideradas metodologias alternativas aos métodos de referência. Entretanto há outras técnicas que podem ser usadas como testes complementares e de alarme no auxílio à detecção de ficotoxinas contaminantes da carne de moluscos bivalves como ostras e mexilhões, que são usados na alimentação humana. Muitos desses testes alternativos podem ser mais economicamente viáveis ou mesmo mais adequados a determinadas realidades (CHRISTIAN; LUCKAS, 2008).

Este trabalho é composto por 2 artigos, sendo o primeiro uma revisão sobre o tema da produção de moluscos como fonte de alimentos, apresentando um breve panorama a nível mundial e nacional dessa atividade e dimensionando esta atividade ao cenário dos municípios de Arraial do Cabo e Armação dos Buzios -RJ. Também faz uma associação desta atividade com a necessidade de se conhecer os riscos de contaminação dos moluscos por diversas ficotoxinas marinhas e as respectivas consequências dessa contaminação, evidenciando-se assim a constante necessidade de se monitorar tal produção, através de técnicas padronizadas e alternativas de se detectar as biotoxinas marinhas que podem afetar a saúde humana e a indústria da malacocultura. O segundo artigo apresenta um estudo sobre a aplicação de dois tipos de testes alternativos envolvendo o microcrustáceo *Artemia franciscana*, sendo um deles um bioensaio para se verificar a ação de extratos metanólicos produzidos a partir de hepatopâncreas de mexilhões coletados na área de produção da cidade de Arraial do Cabo- RJ contra náuplios recém-eclodidos desse crustáceo e o outro, um ensaio de inibição de fosfatase

extraída do mesmo tipo de náuplios, sendo feita então análises e comparações dessas técnicas como possíveis substitutas de técnicas mais caras e complexas como o bioensaio com camundongos, que assim como outras técnicas de referência ou alternativas recomendadas, apresentam certos inconvenientes como o alto custo.

A partir da constante necessidade de modernização e criação de técnicas mais sustentáveis e menos complexas e dispendiosas, apresenta-se este estudo, com a proposta de desenvolver uma ferramenta de monitoramento aos produtores de mexilhões dessa e outras regiões, trazendo opções que apresentem maior facilidade de aplicação, seja do ponto de vista técnico ou do financeiro para esses produtores, permitindo-lhes oferecer um produto seguro e lucrativo, promovendo assim a sua inserção segura no mercado.

## **OBJETIVOS**

**Objetivo geral:** Investigar o uso de testes alternativos como ferramentas de monitoramento da presença de microalgas tóxicas próximo às áreas de produção de mariscos em Arraial do Cabo e Armação dos Búzios.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1- Avaliar a toxicidade de extratos metanólicos de mexilhões pelo teste ecotoxicológico com náuplios *Artemia franciscana*;

2- Verificar através de testes de inibição de fosfatase extraída de náuplios de *Artemia franciscana*, as suas potencialidades como teste de monitoramento de ficotoxinas

3- Verificar a eficiência do uso consorciado do teste ecotoxicológico e do ensaio de inibição de fosfatase realizados com *Artemia franciscana* como método alternativo para monitoramento de mexilhões de cultivo em Arraial do Cabo-RJ.

## Artigo 1

# SITUAÇÃO DA ATIVIDADE DE PRODUÇÃO DE MEXILHÕES *Perna perna* (LINNAEU, 1758) EM ARRAIAL DO CABO E ARMAÇÃO DOS BÚZIOS E RISCOS DE CONTAMINAÇÃO POR BIOTOXINAS DE ALGAS: A NECESSIDADE DE SE MONITORAR.

## RESUMO

O desenvolvimento da atividade de produção de moluscos, como o mexilhão - *Perna perna* para consumo humano vem crescendo acentuadamente nas últimas décadas mostrando ser uma alternativa sustentável e promissora frente às atividades extrativistas normalmente praticadas na região costeira do Estado do Rio de Janeiro. Um dos entraves à expansão dessa atividade é o risco de contaminação das águas onde são cultivados por biotoxinas de microalgas e cianobactérias, onde uma ou mais espécies, por motivos naturais ou antrópicos podem apresentar multiplicação excessiva, as chamadas florações de algas nocivas (FAN) e assim causar riscos aos usos diversos da água, podendo afetar desde a balneabilidade, até as atividades de pesca. Os mexilhões são animais filtradores e podem, mesmo que temporariamente, acumular as substâncias que filtram da água do mar, contaminando-se e, se consumidos nestas ocasiões, podem provocar intoxicações diversas nas pessoas, as chamadas síndromes associadas ao consumo de carne de moluscos contaminada, sendo conhecidas diversas delas. Estas síndromes são classificadas em função do principal sintoma que provocam. Para se prevenir destas é recomendado que sejam feitos testes para se detectar a presença das toxinas que as causam. Existem muitos tipos de testes e bioensaios que podem exercer tal função, sendo alguns deles de referência, enquanto outros são alternativos. Alguns testes alternativos indicados podem ser caros e de difícil execução, sendo imprescindível viabilizar o uso e a confiabilidade de outros testes alternativos como o bioensaio com larvas de *Artemia franciscana* e testes de inibição enzimática que podem se tornar opções eficazes sem gerar altas despesas, podendo se viabilizar a sua realização como eficiente ferramenta de monitoração e assim evitar transtornos no âmbito da saúde pública, da indústria pesqueira e do turismo na região de Armação dos Búzios e Arraial do Cabo.

**Palavras-chave:** Mexilhão. Ficotoxinas. Testes ecotoxicológicos. *Artêmia franciscana*.

Monitoramento



## ABSTRACT

The development of mussel production activity, such as the mussel - *Perna perna* for human consumption, has been growing strongly in the last decades, proving to be a sustainable and promising alternative to the extractive activities normally practiced in the coastal region of the State of Rio de Janeiro. One of the obstacles to the expansion of this activity is the risk of contamination of the waters where they are cultivated by microalgae of microalgae and cyanobacteria, where one or more species, due to natural or anthropogenic reasons may present excessive multiplication, called harmful algal blooms (FAN) and Thus causing risks to the diverse uses of the water, being able to affect from the bathing, until the fishing activities. Mussels are filtering animals and may, even temporarily, accumulate substances that filter from contaminated seawater, and if consumed on such occasions may lead to various intoxications in people, the so-called syndromes associated with the consumption of contaminated shellfish meat, Being known several of them, that are classified due to the main symptom that cause. To prevent these, it is recommended that tests be performed to detect their presence. There are many types of tests and bioassays that can perform such a function, some of which are reference, while others are alternative. Some alternative tests indicated may be expensive and difficult to perform, and it is essential to make the use and reliability of alternative tests such as bioassay with *Artemia franciscana* larvae and enzymatic inhibition tests that can become effective options without generating high expenses. To make possible its realization as an efficient tool of monitoring and to avoid disorders in the scope of public health, fishing industry and tourism in the region of Armação dos Búzios and Arraial do Cabo.

**Keywords:** Mussel. Phycotoxins. Ecotoxicological tests. *Artêmia franciscana*. Monitoring.

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente aquático pelo aporte de substâncias contaminantes diversas tais como metais pesados, pesticidas e petróleo ou mesmo pela liberação de toxinas de algas é uma realidade (SOUZA, 2014). Eventualmente podem ocorrer as chamadas Florações de Algas Nocivas (FAN) ou “Waters blooms” (TORGAN, 1989) mais conhecidas como Harmful Algal Blooms (HAB).

Estes fenômenos podem ocorrer por situações naturais ou mesmo ser estimulados por diversos fatores ambientais ou antrópicos (HALLEGRAEFF, 2003), dentre os quais os processos de eutrofização que se caracterizam pelo aporte excessivo de compostos ricos em nutrientes, especialmente o nitrogênio e o fósforo, em corpos d’água (AZEVEDO; VASCONCELOS, 1998). Aumentos consideráveis de temperatura e variações na diversidade de espécies que compõem o fitoplâncton, também são fatores que ajudam a desencadear estas florações dentre outros (VIEIRA, 1991). Estas florações podem desencadear uma série de consequências negativas para o meio ambiente em si, por afetar as populações de seres vivos e interferir na dinâmica populacional da comunidade biológica (WEIS, 2014). Podem também comprometer a saúde desses organismos, desencadeando uma série de efeitos tóxicos desde o nível molecular até o funcionamento dos sistemas corporais, estando o próprio homem suscetível a estes males (FERRANTE et al., 2013) e por fim ainda podem interferir na economia local, trazendo prejuízos na indústria pesqueira e turística além de afetar de sobremaneira as populações dessas áreas (BARBOSA, 2015)

Diversas espécies de organismos podem ser afetadas pelas florações de algas, mesmo que estas não sejam tóxicas, pois ainda assim uma floração de algas pode provocar aumento do DBO (demanda biológica de oxigênio) devido ao consumo desse gás por microorganismos e por conguite desencadear mortandade de peixes, crustáceos e outros representantes aeróbios da fauna (VIEGAS, 2009). Pode-se relatar ainda que as próprias algas podem obstruir a capacidade filtradora das brânquias de peixes e outros organismos dificultando-lhes a obtenção do O<sub>2</sub> (AZEVEDO; VASCONCELOS, 1998). Há ainda o risco dessas algas, com suas carapaças de sílica ou outro componente rígido, lesionar estes órgãos respiratórios. Moluscos filtradores podem receber estas toxinas e armazená-las em seus tecidos, promovendo sua bioacumulação por certo período, até que ocorra depuração. Nesse período, alguns seres podem passá-lo para os seus predadores, intoxicando-os (CASTRO; MOSER, 2012).

O homem, além de prejuízos econômicos, pode também se contaminar através do consumo da carne de moluscos filtradores, pois estes animais se alimentam capturando partículas em suspensão ou misturadas na água ao movimentá-la intensamente através de batimento ciliar (SOUZA, 2014). Os moluscos podem ser considerados importante fonte de alimento para as populações locais que os capturam como forma de subsistência ou através do seu cultivo em lugares apropriados, denominados fazendas marinhas “*Sea Farms*”, sendo esta atividade denominada maricultura (MPA,2013). Os principais moluscos cultivados pelo homem são a vieira, *Pecten maximus* a ostra, *Crassostrea gigas* e o mexilhão, *Perna perna* (FURLAN, 2004).

Cada vez mais a produção de seres aquáticos de forma regulada e controlada pelo homem tem crescido e movimentado cifras mais expressivas (FAO, 2013). No entanto, é necessário que se faça um controle rigoroso da qualidade desse produto, desde os primeiros estágios da cadeia produtiva até o preparo e consumo dos mesmos. Nesse sentido, o monitoramento intensivo das águas onde são produzidos para que se certifique de que estas não possuam algas produtoras de biotoxinas nem as próprias toxinas se faz necessário.

No Brasil a Instrução Normativa Interministerial nº 07/2012 do antigo Ministério da Pesca e Aquicultura, hoje Secretaria de Pesca e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), indica que gêneros de microalgas pertencentes os grupos dos dinoflagelados e das diatomáceas são os principais produtores de toxinas causadoras de patologias em seres humanos devido ao consumo de carne de molusco contaminada. A mesma norma lista as principais síndromes associadas a tal consumo: Síndrome Diarréica (DSP), síndrome paralisante (PSP), síndrome amnésica (ASP), síndrome do venerupino (VSP), síndrome neurotóxica (NSP) e a síndrome por consumo de azaspirácidos (AZP) (BARBIERI, 2009, BRASIL, 2012; CASTRO; MOSER, 2012; HALLEGRAEFF, 2003). A intoxicação por toxinas causadoras da PSP, por exemplo, pode causar morte de várias pessoas durante uma ocorrência (SCHRAMM et al., 2006).

Além das síndromes causadas por ficotoxinas, há também diversas toxinas produzidas por cianobactérias, como as da espécie *Microcystis aeruginosa* e as dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*, por exemplo (DITTMANN et al., 2013; PAERL; OTTEN, 2013). Estudos revelaram que uma mesma espécie de cianobactéria pode ter várias estirpes ou cepas diferentes e que algumas dessas cepas podem se mostrar tóxicas enquanto outras não (D’ORS et al, 2013), sem contar na possibilidade de variáveis abióticas do meio poderem afetar os resultados dos testes (ROSET et al, 2001).

Zagatto e Bertoletti (2008, p. 347) salientam que:

O uso de análises ecotoxicológicas, ao longo do tempo, tem demonstrado a sua importância como instrumental no gerenciamento ambiental. Pelo fato de serem utilizadas com maior intensidade somente a partir da década de 1950, ainda há um longo caminho para que a consciência de sua serventia seja percebida por aqueles que não convivem, cotidianamente, com a Ecotoxicologia.

Para se avaliar os graus de toxicidade de substâncias tóxicas tanto qualitativamente quanto quantitativamente são empregados os chamados testes de toxicidade. Estes testes são extremamente eficientes e no Brasil tornaram-se obrigatórios pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente através da Resolução 357 (CONAMA, 2005), sendo posteriormente alterada pela Resolução 430 (CONAMA, 2011), dispondo sobre a avaliação da qualidade de águas de efluentes industriais. Existem muitos tipos de testes distintos, sendo alguns indicados pelos órgãos oficiais de controle e outros alternativos. Um teste que vem sendo amplamente empregado em avaliação de vários tipos de materiais, é o teste que emprega uma forma juvenil, náuplio, do microcrustáceo *Artemia sp* como organismo testador (GORDON et al., 2002; LIMA et al., 2009; PIMENTEL et al., 2011). O baixo custo de todo o processo, a facilidade de obter cistos de artêmia no mercado, o seu prático manuseio em laboratório, a facilidade de executar todo o protocolo do teste e a dispensa de autorização legal para uso de animais de laboratório são vantagens indiscutíveis de se empregar este teste (PIMENTEL, 2011). Bioensaios com náuplios de artêmia tem sido usados para se avaliar desde efluentes de petróleo (CAMPOS et al, 2002; ARTHAUD,2005) até a toxicidade de nanopartículas (RAJABI, et al. 2015), sendo bastante empregados em avaliações com bioensaios vegetais (RAMAZANI, 2010). Quando comparados com outros testes como os bioensaios usando camundongos, por exemplo, os testes com artêmia podem até não ter eficiência absoluta, contudo devido a uma planilha de custos e grau de complexidade significativamente inferiores, dependendo do propósito, seu uso certamente é mais vantajoso (LEE, et al, 1999).

A comprovação da eficiência da aplicação de testes usando náuplios de artêmia na avaliação da toxicidade em moluscos cultivados nas águas onde se faz esta produção pode ser feita através da comparação dos resultados destes testes aos de outros mais sofisticados.

Outra metodologia existente que se apresenta como uma ferramenta apropriada para se fazer estudos toxicológicos é o uso de bioensaios enzimáticos, com medição da variação da atividade específica de certas enzimas em extratos corporais e sanguíneos de animais expostos a contaminantes (MILLER; GONÇALVES, 1999). Proteínas do grupo das fosfatases podem

ser inibidas por várias toxinas de microalgas, como o ácido ocaídoico (AO) e as dinofisistoxinas (DTX) 1 e 2 e também por cianotoxinas como a microcistina-LR, inclusive em intensidades diferentes (HUHN, 2009). Dentre os efeitos desse processo inibitório pode ser citado o aumento considerável de proteínas hiperfosforiladas nas células como a citoqueratinas de membrana, podendo também levar à formação de tumores, além de diversas alterações celulares, como a desorganização do citoesqueleto e da sinalização celular (CRUZ et al., 2008; VALDIGLESIAS et al., 2013) O AO, por exemplo, e alguns derivados inibem fortemente a ação das fosfatases (MUNDAY, 2013).

A avaliação do comportamento de enzimas como fosfatases e colinesterases mostra-se extremamente eficaz para se detectar a presença de algumas ficotoxinas, funcionando como biomarcadores de exposição e de efeito dessas toxinas, que tem efeito inibidor da ação enzimática em determinados casos (OLIVEIRA, 2009). Quando aplicados concomitantemente ao teste usando artemia, podem representar um novo *end point* além da análise de sobrevivência que caracteriza o teste de toxicidade aguda.

É importante que se faça o monitoramento da presença de microalgas produtoras de ficotoxinas em áreas próximas onde se cultiva moluscos (SMAAL et al., 2002). Em Arraial do Cabo e Armação dos Búzios este fato ganha relevância dada a riqueza de espécies fitoplanctônicas presentes (Moser, et al, 2014). A realização de ensaios toxicológicos em tecidos de moluscos cultivados nestas áreas através da aplicação de testes diferenciados para a averiguação da toxicidade certamente trará mais segurança e menores riscos a quem consome estes bivalves na alimentação. A comparação dos resultados de bioensaios toxicológicos obtidos por testes utilizando náuplios de artêmia com os resultados de ensaios específicos de enzimas como a fosfatase mostrará o quanto esses testes podem ser eficientes e complementares na determinação de toxicidade de ficotoxinas acumuladas em bivalves para programas de biomonitoramento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Arraial do Cabo e Armação dos Búzios

A cidade de Arraial do Cabo situa-se entre as coordenadas 22° 57' 57" S, 42° 1' 40" W. Tem área territorial de 152,305 km<sup>2</sup> localizado na zona costeira do Estado do Rio de Janeiro, distando 158 km da capital e possui cerca de 28.800 habitantes (IBGE, 2012) e IDH de 0,733 (PNUD, 2010). Já o Município de Armação dos Búzios, está localizado numa península envolta por diversas praias nas coordenadas 22° 44' 49" S 41° 52' 55" W. Tem uma área territorial de 69,287 km<sup>2</sup> distando 165 km da capital, possui uma população de cerca de 35.000 habitantes (IBGE, 2014) e IDH de 0,728 (PNUD,2010). Na figura 1 podemos verificar a localização das cidades de Armação dos Búzios e Arraial do Cabo no Estado do Rio de Janeiro e no Brasil e observar o quanto as mesmas localizam-se junto à costa.

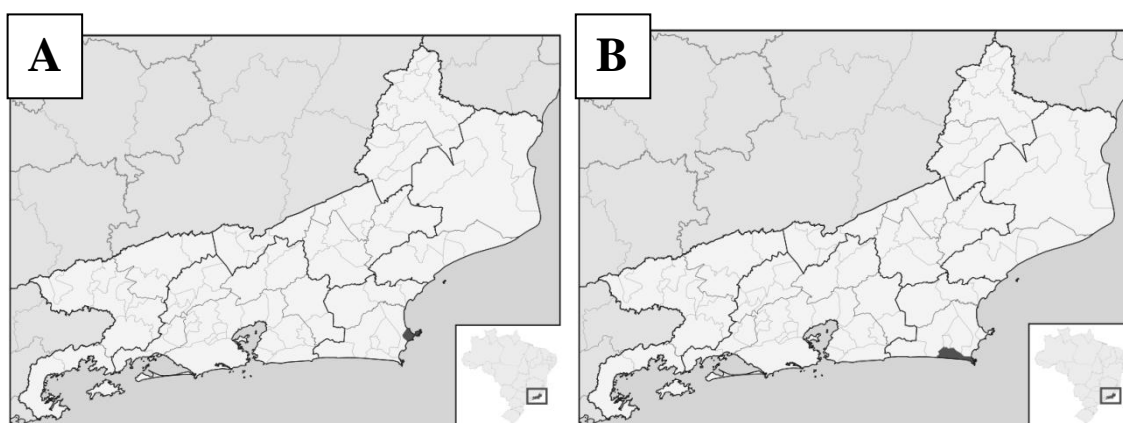


Figura 1: Localização das cidades de: A) Armação de búzios e B) Arraial do Cabo.

Fonte: <<http://www.RiodeJaneiro.MesoMicroMunicip.svg.ownwork.>>

Ambos os municípios possuem litoral bastante recortado, apresentando enseadas, canais e belas praias. Em Arraial do Cabo há 3 fazendas marinhas na Enseada do Forno cuja produção beneficia diretamente as famílias que vivem da renda gerada pela venda, principalmente em alta temporada no município. Em Armação dos Búzios a fazenda marinha usada para criação de mexilhões fica na Praia da Rasa, onde um projeto criado em parceria com a FIPERJ está sendo desenvolvido e beneficiando pescadores de comunidades pesqueiras locais (FIPERJ 2014).

Arraial do Cabo apresenta uma expansão oceânica em relação ao litoral, tornando-a um dos pontos da costa brasileira que mais se projeta em direção ao oceano. Toda a região é

beneficiada pela ocorrência do fenômeno da ressurgência (RODRIGUES, 2011). A ressurgência (*upwelling*), consiste no afloramento das águas mais profundas e frias (abaixo de 20° C) até a superfície do oceano, condicionado por efeitos físicos aumentando o teor de nutrientes (CARVALHO; RODRIGUES, 2004), com picos de ocorrência na primavera e verão. Nesse sentido, essa região apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento do cultivo de moluscos (LAVINAS et al., 2008) e da pesca em geral.

## 2.2 Aquicultura e Maricultura

A aquicultura é o cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático (MPA, 2013). Pillay (1996) define a aquicultura como o processo de criação e cultivo de organismos no ambiente aquático de forma controlada e sob técnicas específicas. Num Relatório de 1995, o Banco Mundial, declarou a aquicultura como "próximo grande salto em produção de alimentos" (MACGIN, 1998), mostrando a consistência do potencial de desenvolvimento social e econômico dessa atividade, que vem sendo praticada há milhares de anos, com registros de que os chineses conheciam certas técnicas há muitos séculos e que os egípcios teriam criado tilápias há cerca de quatro mil anos (MPA, 2013).

A aquicultura pode ser uma alavanca de desenvolvimento social, mas pode gerar impactos sociais negativos se não houver harmonia com as comunidades locais, tais como o comprometimento das áreas extrativistas usadas pelas comunidades locais e do seu uso comunitário para atividades econômicas e de lazer das áreas exploradas, além da descaracterização da cultura local. Contudo, poderá promover uma melhor utilização dos recursos naturais, gerando emprego e renda e atraindo novos investimentos, podendo melhorar a qualidade de vida da população local e gerar riquezas e ganhos significativos para a economia regional e nacional (VALENTI, 2002). Porém, há de se tomar os devidos cuidados em preservar os recursos naturais e de se monitorar a produção, com ênfase, sobretudo na qualidade do produto final. Muir (1995), afirmou que, de forma geral, quando comparada com outras atividades produtivas, a aquicultura é mais sensível a impactos externos tanto resultantes da ação do homem quanto da natureza.

O desenvolvimento de atividades de aquicultura pode ser feito com a criação de diversos tipos de organismos. A criação de moluscos de maneira geral, como ostras, mexilhões, caramujos e vieiras recebe a classificação de Malacocultura. A produção

específica de mexilhões é denominada Mitilicultura. A aquicultura realizada em ambientes de água salgada recebe a denominação de Maricultura (MPA, 2013).

O consumo de moluscos pelo homem data desde tempos pré-históricos, comprovado através da observação dos “sambaquis”. Segundo Nascimento (1996), as ostras e os mexilhões sempre foram os moluscos mais consumidos. Gregos e romanos consideravam os mexilhões um alimento nobre que era servido em ocasiões muito importantes (FERREIRA; MAGALHÃES 2004). Atualmente, o consumo desse tipo de alimento pode ser observado nas regiões litorâneas, seja por pequenos pescadores artesanais que o fazem para subsistência ou para comercializá-lo informalmente ou sendo produzido em escala comercial. De qualquer modo, o mexilhão ainda pode ser considerado uma iguaria e não faz parte do cardápio diário da população em geral e, sua aceitação, restringe-se a uma camada muito pequena de consumidores (FURLAN, 2004). Entretanto, este quadro vem mudando bastante nas três últimas décadas. Nos últimos 35 anos a produção da aquicultura cresceu a uma taxa média de 8,6% ao ano, aumentando em torno de 12 vezes, sendo o grupo dos moluscos de cultivo o mais representativo de todos, com produção aproximada de 15,2 milhões de toneladas, o que equivale a 22,8% da produção total da aquicultura e 60,3% da produção da maricultura. (FAO, 2014).

A produção nacional apresentou crescimento de 12,9 mil toneladas no ano 2000 para 18,5 mil toneladas em 2011, registrando um aumento de 43,4%, com destaque para o cultivo do mexilhão *Perna perna* que corresponde a 86,2% da produção brasileira (MPA, 2013). Acompanhando a produção, o consumo também vem crescendo. De acordo com o extinto Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA (2011), o consumo brasileiro de pescado cresceu 7,9% entre os anos de 2009 e 2010 e 23,7% entre 2010 e 2011, alcançando naquele ano um consumo médio anual por habitante de 11,17 quilos (MPA, 2011). Segundo um Levantamento do MPA (2013), os brasileiros consomem uma média de 17,3 kg de pescado per capita/ano, quantidade que alcança a média mundial divulgada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e supera a média mínima recomendada por esta instituição que é de 12 kg de pescado per capita/ano.

Assim, constatamos que a maricultura tornou-se uma atividade importante de produção de alimento (LUNETTA, 1988). A produção, coleta e comercialização de ostras e mexilhões vem há tempos sendo reconhecida como um recurso de inegável importância estratégica para a instauração de padrões sociais e ecologicamente mais equilibrados de dinamização econômica dos ecossistemas litorâneos (VIEIRA, 1991). A costa brasileira possui uma extensão de 7.364 Km e que pode chegar a quase 9.200 Km, se considerarmos



todas as baías, estuários, costões, reentrâncias etc, e assim, torna-se muito coerente o seu uso e exploração sustentáveis. O Estado do Rio de Janeiro por sua vez detém a terceira maior extensão litorânea do país com 638Km, o equivalente a 8,6%, sendo o segundo maior produtor brasileiro de mexilhões para consumo, superado apenas por Santa Catarina (MPA, 2013).

Os mexilhões consumidos no Brasil são da espécie *Perna perna*: filo *Mollusca*, classe Bivalvia (Linné, 1758), ordem Mytiloidea (Férursac, 1822), família Mytilidae (Rafmesque, 1815), gênero *Perna* (Retzius, 1788). Segundo Klappenbach (1965), este é o maior mitilídeo brasileiro com ampla distribuição geográfica, sendo muito abundante entre o litoral do Espírito Santo e Santa Catarina. Trata-se de uma espécie que possui alta taxa de crescimento, bentônica, eurialina com faixa ótima de salinidade entre 34 e 36, embora seja uma espécie adaptada a grandes variações climáticas e de salinidade (SALOMÃO et al., 1980) e de temperatura (BASTOS et al., 1999), ocorrendo predominantemente em costas abertas, particularmente nos costões rochosos mais expostos à ação das ondas (BUITRÓN VUELTA, 2002). Os bancos naturais formados por esses mexilhões têm grande importância ecológica, pois fornecem alimento, refúgio e espaço para inúmeros organismos que nele habitam e também para espécies visitantes, tais como aves e peixes (DANKERS; ZUIDEMA, 1995). É popularmente conhecido como marisco, ostra-de-pobre, marisco-da-pedra e sururu (MAGALHÃES, 1985. Segundo Galvão et al. (2006), os fatores bióticos e abióticos como temperatura, salinidade, circulação de água, densidade de indivíduos e a qualidade dos alimentos disponíveis controlam a eficiência do cultivo do *Perna perna*.

### **2.3 A situação da maricultura na região de estudo**

No Estado do de Janeiro a produção de moluscos bivalves para o consumo humano ocorre em fazendas marinhas localizadas na Baía de Ilha Grande em Angra dos Reis e alguns outros Municípios do Estado, como Parati e Armação de Búzios, além de Arraial do Cabo, que se destaca também pelo pioneirismo nas pesquisas e implantação de áreas produtoras experimentais de moluscos bivalves e criação de peixes (MARENZI et al., 2008). Esse pioneirismo se deve principalmente a criação do Projeto Cabo Frio em 1971 pelo Instituto de Pesquisas da Marinha (IPqM), que por sua vez, derivou de um projeto inicial de reconhecimento das condições de fertilização das águas da costa brasileira que agraciou a região fronteira de Cabo Frio devido ao fenômeno da ressurgência para desenvolvimento de

um empreendimento cuja finalidade seria a produção de proteínas a partir da riqueza natural daquelas águas (IEAPM, 2003). Este projeto tinha como objetivo a criação de uma instituição destinada a apoiar e executar estudos do mar e dos seus recursos oceanográficos, físico-químicos e biológicos, estimulando a produção natural e promovendo a produção controlada de peixes, crustáceos, moluscos e algas, com o máximo aproveitamento das condições, o Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM.

Em Arraial do Cabo existem 3 fazendas de cultivo de moluscos, que segundo Duarte (2007) foram criadas a partir de 2005 com apoio do SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas) a associações de catadores de mariscos, pescadores, populações tradicionais e maricultores.

Em Armação dos Búzios a implantação das fazendas marinhas teve início no ano de 2009 através de um projeto piloto desenvolvido na praia Brava envolvendo pescadores da comunidade pesqueira do Centro. A comunidade de José Gonçalves foi a escolhida para realizar o cultivo de mexilhões. Para implantar o programa de maricultura a Prefeitura orientou os pescadores a formarem a Associação de Maricultura de Armação dos Búzios (AMAB). O município conta também com a Associação de Pescadores e Maricultores de Armação dos Búzios de José Gonçalves. Parceiro na implantação de Fazendas Marinhas em Armação dos Búzios, a Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ) ensina técnicas e dá suporte para criações marinhas de mexilhões, objetivando transferir tecnologia aos pescadores artesanais para que possam deixar de lado o extrativismo e se dedicar à criação desses organismos (FIPERJ 2014).

Ambos os municípios possuem uma paisagem privilegiada e condições plenas de implementar atividades que permitam aos seus habitantes se beneficiarem do uso sustentado dos recursos provenientes do mar, seja através do turismo, da maricultura ou qualquer outra atividade que venha a melhorar a qualidade de vida dessas populações.

As técnicas de cultivo do *Perna perna* são simples e ainda muito dependentes da coleta de “sementes” do ambiente natural. Ferreira e Magalhães (2005) descrevem de forma simplificada que o cultivo de mexilhões tem início com a captura de formas jovens chamadas de sementes e indivíduos juvenis de aproximadamente 3cm de comprimento em costões rochosos das regiões onde são cultivados ou mesmo das próprias estruturas de cultivo. As sementes então são colocadas em 2 redes distintas com auxílio de canos de PVC. A rede externa é de nylon e a interna é de algodão, que irá apodrecer em pouco tempo e os mexilhões, já aderidos às cordas ou pencas crescerão nestas estruturas, que possuem em torno de 1,5 m de comprimento. Nas áreas de estudo o cultivo também se dá dessa forma.

## 2.4 Suscetibilidade de mexilhões a contaminantes

Além de ser usado para consumo, o mexilhão *Perna perna* é bastante utilizado como um recurso de monitoramento ambiental, sendo usado em estudos ecotoxicológicos (FERREIRA *et. al.*, 2013). Estes estudos se justificam pela natureza filtradora destes moluscos bivalves, que tem a capacidade de bioacumular substâncias captadas do ambiente, podendo filtrar grandes quantidades de água expondo-se ainda mais a toxinas produzidas por micro-organismos fitoplanctônicos (MARINÉ *et al.*, 2009). Como no fitoplâncton existem muitas espécies de microalgas e de cianobactérias produtoras de toxinas, torna-se necessária a realização de estudos dessa natureza nas áreas próximas às regiões de cultivo e de coleta desses animais para evitar que se comercialize e que se consuma essa carne contaminada e as desastrosas consequências desse consumo.

Os mexilhões, sendo organismos filtradores, alimentam-se de partículas em suspensão na água que são selecionadas basicamente pela sua dimensão, não havendo algum processo mais apurado ou criterioso de escolha pelo que captam. Dessa forma, muitas partículas tóxicas podem ser absorvidas e acumular-se temporariamente tecidos desses animais (ALVES *et. al.*, 2010), sendo um grande risco consumi-los nestas condições. A contaminação da água onde são feitas as culturas de mexilhões pode ocorrer por substâncias tóxicas naturais ou decorrentes das atividades humanas, tornando-se indispensável a avaliação da qualidade da água onde a mitilicultura é praticada.

## 2.5 Florações de algas

As águas dos mares, rios, lagos, lagoas, estuários e reservatórios são habitadas por milhões de micro-organismos que não tem força para vencer as correntes e são arrastados por elas, sendo designados pelo termo genérico plâncton (RAYMONT, 2014). O fitoplâncton corresponde à massa de microorganismos fotossintetizantes como as microalgas, cianobactérias e bactérias autótrofas com adaptações para viver parte ou todo o seu ciclo vital suspensa na coluna d'água superficial e iluminada (REYNOLDS, 2006). Bactérias autótrofas, cianobactérias e microalgas fazem parte desse grupo. Os organismos heterótrofos, como protozoários, bactérias heterótrofas, fungos e larvas de diversos animais que fazem parte do plâncton são denominados zooplâncton (COLLOQUIUM, 2001).

Dentre as algas microscópicas que compõem o fitoplâncton, ou simplesmente microalgas, há algumas espécies produtoras de toxinas, as ficotoxinas. Normalmente estas espécies existem em percentuais baixos na comunidade fitoplanctônica, entretanto pode ocorrer um crescimento explosivo de uma ou mais dessas espécies, de forma rápida e pouco duradoura, sendo esta multiplicação excessiva denominada Floração de algas nocivas, as HABs (DAVIDSON et al., 2011). Esse crescimento populacional a uma taxa superior a normal de algumas espécies fitoplanctônicas e em determinadas condições ambientais favoráveis eleva sua densidade populacional e faz com que se acumulem na superfície da água, especialmente no período de primavera/verão recebe a denominação de florescência ou Algal Bloom (VIEGAS, 2009). Somente as florações de algas que podem causar danos a outros seres, seja pela produção de ficotoxinas, por alteração das condições físico-químicas da água, pela diminuição dos teores de oxigênio dissolvido ou por causar danos nos sistemas de filtração em outras espécies de organismos aquáticos é que são chamadas de HAB (Harmfull Algae Bloom) (Hallegraeff et al., 1995).

Dentre as incontáveis espécies que compõem o fitoplâncton existem diversas que são produtoras de substâncias tóxicas denominadas toxinas de microalgas ou ficotoxinas. Estas toxinas são substâncias capazes de provocar intoxicação aguda ou crônica em seres suscetíveis aos seus efeitos, estimulando a formação de anticorpos específicos (BARBIERI, 2009). As toxinas de microalgas são produzidas por algumas espécies fitoplanctônicas marinhas e de água doce, podendo ser tóxicas para muitos seres vivos, inclusive seres humanos. A contaminação de organismos marinhos com toxinas de fitoplâncton pode colocar em risco as pessoas que se utilizarem desses organismos como fonte de alimento. É importante se considerar que nem sempre a ocorrência de uma floração de algas esteja relacionada a alterações na coloração do corpo d'água, que pode ocorrer com superpopulações de organismos nanoplantônicos, como *Cryptomonas ovata*, que não promove alterações na cor da água devido ao seu tamanho e volumes reduzidíssimos ou devido a presença de grandes teores de sólidos em suspensão que também podem mascarar a ocorrência de uma floração de micoralgas como as diatomáceas. (TORGAN, 1989).

Segundo os estudos realizados por Ceballos et al. (2006) não existem mecanismos viáveis de curto e médio prazo para evitar a presença de contaminantes orgânicos toxigênicos no ambiente que podem atingir os seres vivos, e em particular o ser humano. Existem, sim, medidas preventivas e corretivas que devem ser praticadas. Dentre as medidas preventivas podemos destacar um constante monitoramento das águas que servem de meio ambiente para

a criação de organismos aquáticos para consumo humano, prevenindo a ocorrência de intoxicações pelo consumo destes.

## 2.6 Principais ficotoxinas e síndromes associadas

As toxinas presentes nas microalgas podem ser responsáveis por causar as chamadas síndromes associadas ao consumo de moluscos contaminados com biotoxinas marinhas. Estas biotoxinas são substâncias termoestáveis que se incorporam aos tecidos dos moluscos através do processo de filtração realizado por esses animais. A ingestão dessas substâncias pode levar a sérias complicações à saúde do consumidor (BRASIL, 2012).

As principais síndromes associadas ao consumo de moluscos contaminados são: a síndrome Diarréica (DSP – Diarrheic Shellfish Poisoning), a síndrome paralisante (PSP – Paralytic Shellfish Poisoning), a síndrome neurotóxica (NSP - Neurotoxic Shellfish Poisoning), a síndrome amnésica (ASP – Amnesic Shellfish Poisoning), a síndrome do venerupino (VSP - Venerupine Shellfish Poisoning) e a síndrome por consumo de azaspirácidos (AZP – Azaspiracid Poisoning) (CASTRO; MOSER, 2012; BARBIERI, 2009; HALLEGRAEFF, 2003). Os nomes das enfermidades estão relacionados ao principal sintoma causado pela toxina desencadeadora das mesmas em quem consome carne de moluscos contaminados. O quadro 1 apresenta uma correlação entre cada síndrome com o grupo das toxinas que a desencadeia, os organismos que as produzem e alguns sintomas característicos de cada uma delas.

Na região costeira brasileira não há relatos de muitas espécies de microalgas produtoras de biotoxinas, entretanto, há registro da ocorrência de *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum* e *Pseudonitzschia* spp, *Ostreopsis ovata*, *Dynophysis acuminata* e da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Estes organismos produzem diversas biotoxinas, tais como palitoxina, saxitoxinas e congêneres (NeoSTX, GTX1-4, C1, C2), ácido domoico, ácido ocadaico e microcistinas (PROENÇA; MAFRA, 2005).

**Quadro 1- Correlação entre as síndromes provocadas pelo consumo de moluscos contaminados, as toxinas causadoras, as principais microalgas produtoras e seus respectivos sintomas.**

Síndrome	Toxinas	Principais Produtores	Principais sintomas
<b>DSP</b>	toxinas lipofílicas (DSP): ácido ocadaico (AO) e seus derivados nomeados dinofisistoxinas (DTXs): dinofisistoxina-1 ou DTX1; e yessotoxinas (YTXs)	Dinoflagelados dos Gêneros: <i>Prorocentrum</i> e <i>Dinophysis</i>	diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal a partir de 30 minutos a algumas horas após a ingestão; Pode provocar câncer no sistema digestório pelo consumo regular de mexilhões contaminados.
<b>PSP</b>	toxinas PSP: Saxitoxina (STX) e um grupo de mais de 20 outras semelhantes como a neossaxitoxina (neo-STX) e as gonyautoxinas (GTX)	Dinoflagelados dos Gêneros: <i>Gonyaulax</i> ( <i>G. tamarensis</i> e <i>G. catenella</i> ); <i>Gimnodinium</i> ; <i>Alexandrium</i> ; e <i>Pyrodinium</i> . • No Brasil ocorrem as espécies <i>Alexandrium catenella</i> e <i>Gonyaulax catenatum</i>	leve formigamento ou dormência nas extremidades até parada respiratória e óbito, que ocorre em média de 2 a 12 horas após a ingestão do alimento contaminado.
<b>NSP</b>	brevetoxinas (BTX): PbTx-1 e PbTx-2	Dinoflagelados. Gêneros: <i>Gonyaulax</i> , <i>Gimnodinium</i> e <i>Pyrodinium</i> ; ( <i>Ptychodiscus brevis</i> )	distúrbios respiratórios com sintomas semelhantes à asma, incluindo bronco espasmos, redução da frequência respiratória, distúrbios cardíacos e diminuição da temperatura corporal.
<b>ASP</b>	ácido domóico (DA)	Diatomáceas do gênero <i>Pseudo-nitzschia</i> ( <i>Pseudo-nitzschia Pungens etc</i> ) e as espécies: <i>Amphora coffeaeformis</i> e <i>Nitzschia navis-varingica</i>	vômitos e uma síndrome de neuropatia sensorio-motora axonal, amnésia, convulsões, coma e morte.
<b>VSP</b>	“VSP” toxina desconhecida	- Dinoflagelados-Gêneros: <i>Gonyaulax</i> , <i>Gimnodinium</i> e <i>Pyrodinium</i> ; - ( <i>Prorocentrum Minimum</i> )	24-48 Horas após ingestão provoca anorexia, halitose, náuseas, vômitos, dores gástricas, constipação e cefaleia. Podendo avançar para sangramento das mucosas nasal e oral, icterícia, patéquias, equimoses, lesão hepática aguda, excitação extrema, delírios, coma e óbito.
<b>AZP</b>	azaspirácidos (AZP)	- <i>Protoberidinium crassipes</i>	náuseas, vômitos, diarreia severa e cólica.

Fonte: Adaptado de (CASTRO; MOSER, 2012; Ferrari, 2001; Yasumoto *et al.*, 1980; Vale, 2004; Bates *et al.*, 1989; Baden *et al.*, 1995b; APHA, 1995; HALLEGRAEFF, 2003 e BARBIERI, 2009).

As saxitoxinas, causadoras de PSP são sintetizadas tanto por cianobacterias quanto por certas espécies de microalgas. Vale (2004) especula a possibilidade a cianobactéria viver endossibioticamente na microalga e ser ela a responsável pela produção da toxina.

É importante se conhecer os mecanismos de ação bem como as características básicas e a natureza química dessas toxinas para facilitar na busca pelo desenvolvimento de soros e medicamentos que possam reverter o quadro clínico provocado pelas mesmas e a dimensão dos danos por elas provocados. No quadro 2 estão descritas algumas características e mecanismos de ação tóxica das principais biotoxinas produzidas por algas estudadas. De uma maneira geral pode-se afirmar que a maioria dessas toxinas atua em canais membranares de sódio, potássio e cálcio, afetando o funcionamento do sistema nervoso e conseqüentemente a contração muscular. Muitas delas têm ação hepatotóxica, provocando alterações no fígado, em enzimas que atuam em reações ligadas a este órgão e sobre o seu funcionamento.

As síndromes associadas ao consumo de mexilhões e outros moluscos contaminados já provocaram muitos eventos de intoxicações apresentando inclusive casos fatais em diversas regiões do mundo. Um caso relatado ocorreu numa aldeia da Guatemala no ano de 1987 onde uma intoxicação por saxitoxina, uma toxina PSP, levou a óbito 26 pessoas num universo de mais de 180 contaminadas, principalmetne crianças menores de 6 anos (ROSALES-LOESSENER et al., 1989). Estas toxinas impedem a propagação do impulso nervoso ao afetarem o funcionamento dos canais de sódio, imprescindíveis à condução do impulso nervoso e funcionamento da musculatura torácica (BADEN et al., 1995), não sendo por acaso classificada por muitos pesquisadores como a mais perigosa de todas as toxinas marinhas pelo fato de não existir antídoto e a respiração artificial ser imprescindível à sobrevivência da pessoa intoxicada. (WIESE et al., 2010).

No Brasil, a espécie *Gymnodinium catenatum* que é produtora de ficotoxinas PSP, tendo sido relatada contaminação de mexilhões *Perna perna* no Estado de Santa Catarina (SCHRAMM et al., 2006). Espécies potencialmetn produtoras de ficotoxinas como *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis acuta*, *Dinophysis trippos*, o próprio *Gymnodinium catenatum* e outras tem sido reladas ao longo da costa do Brasil de outros países da América do Sul (TAVARES et al., 2011).

**Quadro 2- Caracterização dos principais grupos de biotoxinas e sua ação tóxica.**

<b>Grupos de biotoxinas</b>	<b>Principais características</b>	<b>Mecanismos de ação tóxica</b>
<b>Saxitoxinas e congêneres (STX, GTX, neoSTX)</b>	Alcalóides e hidrossolúveis, termoestáveis em meio ácido, porém extremamente instáveis e facilmente oxidadas em meio alcalino e levemente ácido.	- inibição difusa do impulso nos nervos periféricos e no músculo esquelético por bloqueio do influxo de Na <sup>+</sup> da membrana. paralisia da musculatura torácica – asfixia e morte.
<b>Toxinas DSP:</b> <b>Ácido ocadaico (AO)</b> <b>dinofisistoxinas – (DTX)</b> <b>Pectenotoxinas (PTX)</b> <b>Yesotoxinas (YTX).</b>	- toxinas lipofílicas e termo-estáveis produzidas por dinoflagelados, como os bentônicos do gênero <i>Prorocentrum</i> e as formas planctônicas de <i>Dinophysis</i> .	- O AO é um inibidor potente de enzimas como as fosfatases proteicas do tipo PP2a e PP1.
	- componente ativo é um grupo de poliésteres lactônicos	- Ação hepatotóxica;
	- toxinas com grupos sulfato quase insolúveis em meio aquoso e solúveis em meio orgânico, como a acetona	- Ação cardiotoxica leve;
<b>Azaspirácido (AZA)</b>	- poliéter ácido contendo um anel azaspiro pouco comum.	- altera a concentração de F-actina, (citoesqueleto); - aumenta o nível de íons de cálcio no citoplasma celular;
<b>Ácido Domóico (AD)</b>	molécula pequena, polar, solúvel em água e relativamente estável à temperatura ambiente; sofre ação de degradação a temperaturas acima de 50°C e em extremos de pH.	Ação antagonista a glutamato, inibindo sua ação no sist. nerv. central (SNC), despolarizando a membrana pós-sináptica.
<b>Brevetoxinas (BTXs)</b>	- PbTx-1: Poliéster com 10 anéis na molécula principal - PbTx-2: Poliéster com 11 anéis na molécula principal	- Ativação persistente do canal de sódio, originando descargas elétricas contínuas; - Irritação da mucosa nasal após inalação do aerossol marinho em zonas costeiras com florações de algas produtoras.
<b>Venepurino (VSP)</b>	Natureza ainda desconhecida.	Provoca um quadro hemorrágico e hepatotóxico.

Fontes: Tubaro *et al.*, 2003; Bialojan e Takai, 1988; Satake *et al.*, 1998; Román *et al* 2002; Todd, 1993; Baden *et al.*, 1995; (Baden *et al.*, 1995); Murata *et al.*, 1982; Barbieri, 2009.



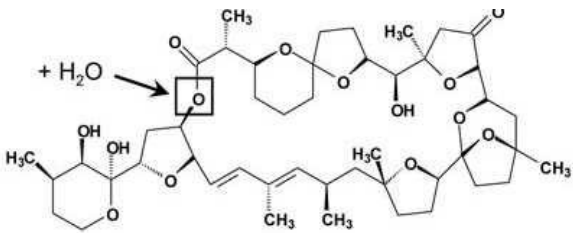
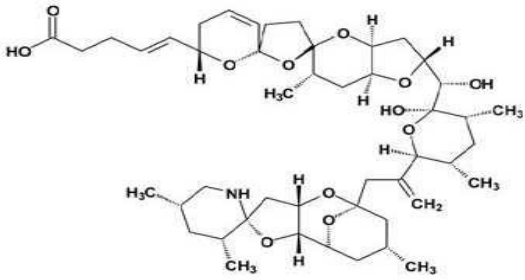
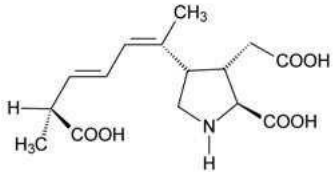
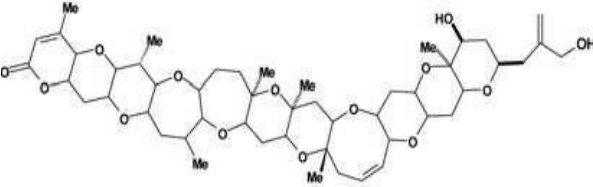
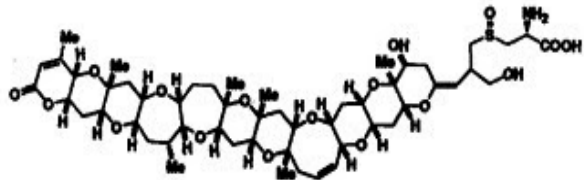
As toxinas DSP como o ácido ocadaico e as dinofisistoxinas estão distribuídas de forma abrangente por todo o mundo, sendo documentadas com bastante intensidade na América do Sul, Japão e Europa, mas com cada vez mais relatos por outras regiões do mundo (Lawley et al, 2008; Trainer et al, 2013). Como são termoresistentes (suas características toxinas não se alteram com cozimento ou congelando) e também não alteram o sabor do alimento em caso de contaminação, sua detecção torna-se mais difícil e os riscos de ocorrência de um evento de intoxicação são ainda maiores (McCarron et al., 2008; Reboreda et al., 2010).

Outro fator muito importante com relação ao estudo das ficotoxinas e síndromes associadas é o conhecimento da natureza química e das fórmulas estruturais dessas substâncias, pois ao se ter conhecimento sobre suas fórmulas, torna-se mais fácil detectar qual é o radical ou grupo funcional presente em cada molécula que é responsável pela toxicidade da substância.

O quadro 3 apresenta as fórmulas químicas das principais ficotoxinas associadas a intoxicações provocadas pelo consumo de moluscos contaminados.

**Quadro 3: Estrutura da biotoxinas**

Biotoxina	Fórmula geral ou fórmula do composto	Variações
Saxitoxina (STX)		R1 = H ou OH; R2 e R3 = H ou OSO <sup>3-</sup> ; e R4 = NH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> nas toxinas carbamato; SO <sub>3</sub> NHCO <sub>2</sub> nas toxinas N-sulfocarbamoyl; OH nas toxinas decarbamoyl e H nas toxinas deoxydecarbamoyl. *Há pelo menos 21 toxinas caracterizadas estruturalmente.
Ácido Ocadaico (AO)		R1 = CH <sub>3</sub> ; R2 = H; DTX1: R1 = R2 = CH <sub>3</sub> ; DTX2: R1 = H; R2 = CH <sub>3</sub> ; DTX3': R3 = acilo. Nas restantes: R3 = OH.

<p><b>Pectenotoxina (PTX)</b></p>		
<p><b>azaspirácido-1, ou AZA1</b></p>		
<p><b>Ácido Domóico (AD)</b></p>		
<p><b>Brevetoxinas BTX-1</b></p>		
<p><b>Brevetoxinas BTX-2</b></p>		

Fonte: Adaptado de Barbieri, 2009

Outro grupo de organismos capazes de produzir e liberar toxinas em corpos d'água são as cianobactérias, estas são responsáveis pela produção das chamadas cianotoxinas (toxinas de cianobactérias). Há uma quantidade enorme de espécies e gêneros descritos como produtoras de cianotoxinas, sendo que as principais são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Planktothrix* (CARMICHAEL, 2001). Várias espécies de cianobactérias podem produzir toxinas poderosas em ambientes aquáticos (ROSET et al, 2001). Contudo, dentro de uma mesma espécie, podem existir estirpes capazes de produzir e outras incapazes de produzir toxinas. Em muitos casos, estas toxinas são

metabólitos secundários originadas durante a síntese de fotopigmentos que se acumulam no citoplasma (PAERL; DAVID, 1996). As microcistinas, por exemplo, podem ser definidas como heptapeptídeos cíclicos produzidos por cianobactérias tóxicas presentes no fitoplâncton (SIVONEN *et al.* 1992), apresentando termorresistência e porções polares e apolares em suas moléculas (WILHELM *et al.*, 2007).

Tanto a ocorrência de “*blooms*”, como a produção de toxinas ter como fator propiciador um aumento de temperatura (KAMOGAE & HIROOKA, 2008). Eloff *et al.* (1982) estudando variações dessa toxina, produzida pela linhagem de *Microcystis aeruginosa* inicialmente chamada de LRC-1 por Bishop *et al.* (1959), e que Konst *et al.* (1965) denominaram MCYST, concluíram que havia várias toxinas distintas, com variações especialmente nos aminoácidos que compoem suas fórmulas (fig. 2). Foi descoberto ainda que uma mesma linhagem poderia produzir mais de uma toxina distinta. Atualmente, são identificadas diversas variedades de microcistinas e muitos estudos foram feitos a respeito desses tipos buscando obter o componente ou parte da molécula associada à toxicidade, bem como identificar as variedades tóxicas e as que não apresentam toxicidade, além de se quantificar o poder tóxico das mesmas.

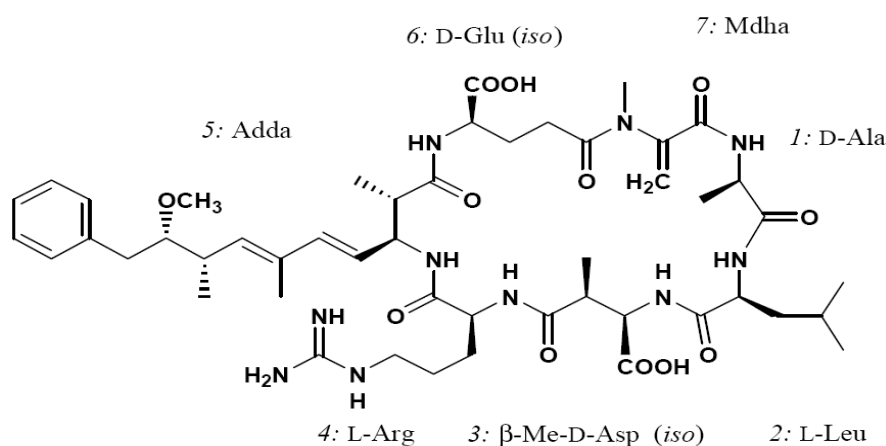


Figura 2- molécula básica de microcistina – LR (1: D-alanina; 2: L-leucina; 3: ácido  $\beta$ -metilaspártico; 4: L-arginina; 5: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10- fenildeca-4,6-dienóico; 6: ácido D-glutâmico; 7: N-metildihidroalanina.

Fonte: Harada *et al.*, 2004.

Experimentos com ratos comprovaram a hepatotoxicidade da microcistina – LR, com entumescimento do fígado que pode apresentar um volume duas vezes maior que o normal causado pela captação de sangue por parte deste órgão (HOOSER *et al.*, 1990). Provavelmente, isto seja provocado pela incapacidade do sistema circulatório em disponibilizar um volume adequado de sangue aos órgãos vitais (choque hipovolêmico). Estes

Estudos revelaram ainda que a microcistina – LR apresenta também capacidade de promover a formação de tumores e que tem ação inibitória das enzimas serina treonina fosfatases 1 e 2A, o que provavelmente justifica sua ação hepatológica.

## **2.7 Métodos para detecção de ficotoxinas**

### **2.7.1 Metodologias padronizadas utilizadas para detecção de ficotoxinas marinhas em moluscos**

No mundo inteiro existe uma grande preocupação em se monitorar a qualidade dos moluscos bivalves, como ostras e mexilhões produzidos e/ou coletados com o intuito de servir de alimento ao homem, existindo diversas metodologias aprovadas e indicadas para que o referido monitoramento seja feito. No Brasil, a Instrução Normativa Interministerial (INI) n° 7 de 08 de maio de 2012, do atualmente extinto Ministério da Pesca (MPA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves – PNCMB que é responsável pelo monitoramento desses organismos através da aplicação de testes específicos para se averiguar a possibilidade de contaminação (BRASIL, 2012b). A realização dos diagnósticos e o desenvolvimento de novas metodologias de análise ficam a cargo de uma rede oficial de laboratórios (RENAQUA), instituída pela Instrução Normativa n° 3, de 13 de abril de 2012 do MPA (BRASIL, 2012a; PROENÇA; SCHRAMM, 2013).

As metodologias oficiais que a RENAQUA deve utilizar estão descritas nos parágrafos 3, 4, 5 e 6 do Art. 4 da Portaria 204 de 28 de junho de 2012 do extinto MPA, estando todas elas de acordo com as utilizadas em países da União Europeia e Estados Unidos da América e que determina que a concentração de toxinas paralisantes (PSP) deve ser feita pelo método biológico – MAB de referência (AOAC 959.08). O método de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC-FLD com detecção por fluorescência e derivatização pré-coluna (AOAC 2005.06) ou com derivatização pós-coluna (AOAC 2011.02) é o método alternativo indicado. A concentração de toxinas amnésicas (ASP) deve ser determinada usando a metodologia de referência de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em Ultra Violeta (UV) referenciado pelo Regulamento CE n° 1244/2007 da União Europeia (EURL- MB-Harmonised-ASP-HPLC-UV) ou o método cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas (LC MS/MS) usado como metodologia alternativa, referenciado pelo Regulamento CE n° 1244/2007 da EURL- MB-Harmonised-ASP-HPLC-MS. Toxinas lipofílicas como o ácido ocadaico, as yessotoxinas e os azaspirácidos devem ter suas

concentrações determinadas pela metodologia de referência da cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas - LC-MS/MS (referência EU-RLMB-Harmonised-LIPO-LCMS/MS - Regulamento UE n° 15/2011), onde os compostos AO, DTX1, DTX2 e DTX3 e seus respectivos ésteres formam o grupo do ácido ocadaico (grupo I); os compostos YTX, 45-OH-YTX, Homo-YTX, 45-OH-Homo-YTX formam o grupo das yessotoxinas (grupo II) e os compostos AZA1, AZA2, AZA3 compõem o grupo dos azaspirácidos (grupo III). O método alternativo para detecção das toxinas lipofílicas é o método biológico (EU-RLMB-HarmonisedMBA-Lipophilic - Regulamento UE n° 15/2011).

Os limites máximos aceitáveis para cada ficotoxina que pode promover intoxicação humana também foram determinados na Instrução Normativa Interministerial (INI) n° 07/2012, que estipulou como aceitáveis para permitir a retirada de moluscos bivalves para consumo humano os seguintes limites máximos de cada toxina por quilograma de parte comestível do bivalve: 0,16 mg equivalentes de ácido ocadáico, 1,0 mg equivalentes de yessotoxina, 0,16 mg equivalentes de azaspirácidos (AZA1), 20 mg de ácido domoico e 0,8 mg equivalentes de saxitoxina (PROENÇA; SCHRAMM, 2013). O anexo I da Portaria 175 de 15 de maio de 2013 do MPA determina que a retirada de moluscos bivalves para consumo humano só estará liberada se não houver nenhuma amostra onde cada um desses valores seja ultrapassada, devendo ficar suspenso até que se obtenha dois (2) resultados consecutivos com todas as substâncias dentro dos limites estabelecidos (MPA, 2013).

## **2.7.2 Outros métodos alternativos não padronizados**

### **2.7.2.1 Bioensaios com *Artemia sp***

Os estudos ecotoxicológicos demandam de testes para que sejam feitas avaliações quantitativas e qualitativas da capacidade lesiva das diversas substâncias de origem antrópica ou natural que porventura existam junto aos corpos d'água. Zagatto e Bertolletti (2008) destacam a importância da ecotoxicologia na avaliação dos danos ocorridos em ecossistemas após a contaminação dos mesmos e também na previsão de impactos provocados pela comercialização de algum produto químico e/ou seu despejo num dado ambiente. De acordo com Pimentel et al. (2011) toxicidade pode ser definida como “qualquer efeito adverso manifestado por organismos testes, o que pode incluir desde alterações genéticas, imobilidade, deformidades até letalidade”. Desde o ano de 2005 o Conselho Nacional do

Meio Ambiente (CONAMA) regulamentou, através de sua resolução 357, o uso de testes ecotoxicológicos para avaliar a qualidade de águas e efluentes (CONAMA, 2005). As análises ecotoxicológicas constituem um ramo da toxicologia que preocupa-se com os efeitos das substâncias químicas naturais ou manufaturadas sobre os organismos aquáticos (SOUSA, 2002).

Cada vez mais são necessárias caracterizações ecotoxicológicas para complementarem as análises químicas que, por si só não garantem eficiência em avaliações de riscos em amostras coletadas do ambiente, já que não conseguem quantificar os contaminantes disponíveis no meio e os seus efeitos ao se misturarem (SVENSSON et al., 2005). Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais realizados sob condições experimentais específicas e controladas. São utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos) (COSTA *et al*, 2008).

Existe uma grande variedade de metodologias e testes diferenciados no mundo, em especial nas regiões temperadas. Entretanto, é importante que sejam desenvolvidas metodologias que possam ser aplicadas com confiança nas regiões tropicais porque nem sempre os resultados de ensaios “*in situ*” adaptados de regiões temperadas podem gerar resultados totalmente satisfatórios (DORNFELD et. al, 2006). Muitos desses ensaios são dispendiosos e trabalhosos e a escolha do tipo de teste a ser realizado em cada pesquisa deve ser feito de forma cuidadosa para que este atenda às necessidades do estudo e não venha a comprometer os objetivos desejados. São necessários testes padronizados tanto para estudos “*in vivo*” quanto para estudos “*in vitro*” para que se desenvolvam técnicas mais rápidas e eficientes que possam rastrear e prever os efeitos de toxicidade (RAJABI, et al, 2015).

O uso de diversos organismos, como peixes, dafnídeos, anfípodos e quironomídeos, dentre outros como organismos teste tem propiciado o desenvolvimento de muitos bioensaios “*in situ*” para monitorar os sistemas aquáticos (MEREGALLI et al. (2000). Um dos testes aplicados em estudos ecotoxicológicos é o bioensaio que usa espécies de microcrustáceos do gênero *Artemia* como organismo teste. O ensaio usando artêmia foi proposto por Michael et al. (1959), sendo adotado como um método de estimativa preliminar de toxicidade em uma infinidade de laboratórios. Desde então vem se mostrando eficiente e utilizado com cada vez mais frequência. Além disso, variadas aplicabilidades do mesmo no campo da pesquisa toxicológica e ecotoxicológica vem sendo feitas, o que sugere que continuará sendo amplamente utilizado (RAJABI et al 2015; NUNES et al, 2006).

O microcrustáceo *Artemia sp.* pertence ao filo Arthropoda, classe Crustácea, subclasse Branquiopoda, ordem Anostraca, família Artemidae e Gênero *Artemia* – Leach, 1819. Possui

distribuição cosmopolita e caráter extremamente eurialino. Sua capacidade de reprodução partenogenética, sem presença de machos, pode ser a responsável pela grande dispersão desse crustáceo pelo mundo (VEIGA; VITAL, 2002).

As artêmias se alimentam de fitoplâncton e partículas em suspensão na água. Trata-se de um importante elo de ligação com os níveis tróficos superiores, sendo também de fácil manutenção em laboratório (PIMENTEL, *et al*, 2011). Os bioensaios com este organismo são de fácil preparação e baixos custos e não esbarram em entraves legais. O teste em si consiste na exposição de náuplios nas suas fases iniciais pós-eclosão dos cistos a concentrações crescentes da substância que se deseja testar por normalmente 24 e/ou 48 horas e a avaliação da concentração letal média (CL50) e/ou outros parâmetros que se desejar averiguar ao final do período de exposição escolhido (VEIGA; VITAL, 2002).

Muitos cientistas em diversos ramos de pesquisa vêm considerando a importância e multiuso do teste de artêmia. Pimentel (2011) realizou testes de toxicidade agudos de efluentes residuários da atividade de beneficiamento da castanha de caju antes e após terem sido tratados num reator biológico experimental. Usando bioensaio com artêmia e SDS como substância de referência para avaliar a sensibilidade dos náuplios utilizados no trabalho, o autor obteve resultados que, levaram à constatação de diferenças significativas nos resultados dos testes, comprovando importância e eficiência daquele tratamento sobre os efluentes e também a adequação do uso do ensaio agudo com náuplios de artêmia para avaliar o referido tratamento.

Diversos outros exemplos da utilização do crustáceo *Artemia sp* na realização de bioensaios para testar toxicidade e eficiência na aplicabilidade de mecanismos de depuração de efluentes podem ser citados. Dentre eles podemos destacar os estudos sobre a eficiência de tratamento primário associado a secundário em efluentes de uma refinaria de petróleo (CAMPOS *et al.*, 2002) e os testes de eficiência de reatores aeróbios inoculados pelo fungo *Aspergillus niger* para redução da toxicidade de efluentes gerados pelo refino do petróleo (ARTHAUD, 2005). Já Aggelis *et al.* (2003) avaliaram a toxicidade de efluentes do processamento da oliva antes e depois do tratamento com o fungo *Pleurotus ostreatus*. Os resultados em todos estes estudos demonstraram que os testes com artêmia se mostraram muito eficazes e sua utilização satisfatória. Rajabi *et al.* (2015) realizaram estudos de toxicidade de nanopartículas utilizando bioensaio com artêmia salina devido a seu baixo custo, simplicidade e conveniência e compararam estes resultados a outros obtidos com ensaios “in vivo” realizados através de testes MTT (2,5-Difeniltetrazólio) com células L.929. Estes autores constataram que os testes com artêmia se mostraram tão eficazes quanto os

MTT, embora com uma intensidade de trabalho e custos extremamente inferiores e tendo ainda como vantagem o fato de não precisar utilizar animais de laboratório como cobaias, que exigem autorização de órgãos regulamentadores. Estes estudos comprovaram que tanto a classificação e o grau de citotoxicidade foram semelhantes entre o ensaio de letalidade com artêmia e o ensaio com células L.929.

Ensaio usando artêmia vem sendo usado com regularidade em estudos de toxicologia aplicada (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2005). Pesquisas para descobrir novos fitoterápicos em plantas medicinais tem sido feitas utilizando ensaios com *Artemia sp* devido a sua eficiência e simplicidade, além de dispensar técnicas acéticas para sua realização (RAMAZANI, 2010).

Lee *et al.* (1999) realizaram ensaios de toxicidade com artêmias de oito cepas diferentes de *Microcystis aeruginosa* e uma de *Coelosphaerium Kuetzingianum* e os comparou com ensaios dessas mesmas cepas usando testes em ratos e concluíram que apesar dos bioensaios usando artêmias serem menos sensíveis e apresentarem resultados com menor rapidez do que os realizados com ratos, estes ainda assim são um método conveniente para rastrear estirpes de cianobactérias hepatotóxicas pelo fato dessa técnica ser mais barata, mais fácil de ser realizada e dispensar autorização de uso de animais de laboratório. Estes autores relataram a existência de dezenas de tipos de microcistinas identificadas a partir de espécies de cianobactérias como *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (CARMICHAEL, 1997) e que novos tipos estão sendo descobertos. Segundo os autores, o uso de bioensaios com aplicação de injeções de extratos de cianobactérias ou toxinas purificadas com a finalidade de se conhecer a toxicidade de microcistinas tem sido muito comum. O método HPLC de cromatografia foi amplamente utilizado para a detecção e identificação de alguns padrões de microcistina (MOOLLAN *et al.*, 1996). O uso de imuno-ensaios (CHU *et al.*, 1990) e os ensaios de citotoxicidade “*in vitro*” (HENNING *et al.*, 1992) foram usados para a detecção de toxinas de cianobactérias. Entretanto todas estas metodologias exigem instalações e técnicas nem sempre disponíveis nos laboratórios de pesquisas, além de exigirem habilidades, reagentes e equipamentos mais dispendiosos, sem contar a exigência legal para o uso de animais de laboratório. Assim sendo, tornou-se necessário a aplicação de um método convincente e confiável para se verificar a toxicidade de cianobactérias. Alguns estudos revelaram que os náuplios do crustáceo do gênero *Artemia* se mostravam suscetíveis a extratos tóxicos de cianobactérias (KIVIRANTA *et al.*; 1991; CAMPBELL *et al.*, 1994). A partir daí os testes de artêmia passaram a ser realizados também para avaliação de toxicidade em cianobactérias (LEE *et al.*, 1999).



Sem dúvida alguma uma das vantagens do uso dos testes de artêmia é evitar testes com o uso de animais que exigem prévia autorização legal. No Brasil o uso de animais em laboratórios é controlado pela Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca). Esta lei veio a regulamentar o inciso VII do §1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais e revogando a Lei nº 6.638 de 08 de maio de 1979, além de dar outras providências. Ela foi regulamentada em 19 de abril de 2012 através da aprovação de 2 resoluções normativas pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Governo Federal (MCT, 2015a). A Lei 11.794 também criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), uma instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal, a quem compete normatizar o uso de animais em ensino ou pesquisa científica (MCT, 2015b). Já os testes de artêmia devem ser feitos seguindo-se a metodologia escolhida com ou sem adaptações e seguir a normatização indicada para a mesma. A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - SP (CETESB) e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabelecem diversas normas para a realização de ensaios ecotoxicológicos com seres aquáticos. Além disso, vários métodos estão descritos no Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos, organizado pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (SISINNO et al., 2004).

### **2.7.2.2 Testes com enzimas**

Enzimas são proteínas de estrutura terciária ou quaternária e conformação globular. Atuam como catalisadores biológicos, acelerando a velocidade das reações químicas no metabolismo dos seres vivos sem sofrer alterações durante o processo (CHAMPE & HARVEY, 1989). As enzimas possuem alta seletividade e especificidade catalisando uma grande quantidade de reações de acordo com as condições a que são submetidas (CAMPBELL, 2000).

O resultado da ação enzimática é a produção de uma determinada substância, normalmente designada por produto, a partir de uma ou mais substâncias alvo, denominada(s) substrato(s). A avaliação da atividade enzimática ou cinética enzimática envolve fatores químicos e ambientais, como por exemplo, a temperatura e o pH, que afetam a ocorrência e a velocidade com que tais reações ocorrem, assim como as concentrações de substrato e da própria enzima também afetam a velocidade e eficiência dessas reações (LEHNINGER *et al*, 2014). Normalmente quando algum fator externo ou uma disfunção orgânica afeta o organismo, os mecanismos de produção de alguma enzima são alterados e estes podem

apresentar variações aos padrões conhecidos. As enzimas colinesterase e fosfatase podem ser usadas como biomarcadores da ação de substâncias tóxicas sobre o organismo, já que muitas substâncias podem agir inibindo ou estimulando a ação e a produção destas enzimas (BAYNES; DOMINICZAK, 2011). As colinesterases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de colina, existindo dois tipos de colinesterases em vertebrados: a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (pseudocolinesterase) encontrada em neurônios e células gliais (GIACOBINI, 2003) A acetilcolinesterase é responsável pela degradação da acetilcolina nas junções neuromusculares ou nos terminais nervosos de neurônios da substância cinzenta do cérebro, podendo ser fortemente inibida por anatoxina(s), cianotoxina produzida por cianobactérias de água doce (MATSUNAGA et al., 1989). Estudos de Kamogae e Hirooka (2008) descrevem a ação molecular da inibição das enzimas serina treonina fosfatase 1 e 2A como sendo específica e irreversível pela toxina microcistina, que por sua vez pode levar o corpo a ter um colapso nos suprimentos energéticos. A fosfatase alcalina (FAL) é uma enzima encontrada em vários tecidos do corpo como o epitélio do trato biliar e os ossos, existindo também em altas concentrações no fígado, onde é secretada pelas células da mucosa e do trato biliar. Sua ação é de fosfohidrolase e nos casos de intoxicação do corpo por drogas hepatotóxicas, ocorre elevação dos níveis dessa enzima quando comparados aos níveis normais da mesma. Um evento que provoca um consistente aumento das concentrações dessa enzima é a obstrução do trato biliar (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Alterações nos níveis de fosfatase e colinesterase podem ser usadas como indicadores moleculares da contaminação de tecidos do corpo, uma vez que bioensaios podem ser feitos de forma controlada e com metodologia determinada para que os resultados possam ser interpretados e verificados os graus de toxicidade envolvidos. Resultados obtidos a partir de ensaios enzimáticos podem ser confrontados com resultados de toxicidade encontrados em outros tipos de testes para as mesmas amostras e assim se fazer um quadro comparativo a respeito das eficiências e deficiências encontradas em cada caso e a partir daí propormos *end points* adequados a determinados monitoramentos ecotoxicológicos.

### **2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A Região dos Lagos no Estado do Rio de Janeiro desponta no cenário nacional como sendo um importante polo turístico. A indiscutível beleza cênica associada à cultura local vem atraindo cada vez mais turistas e novos moradores. O recente impulso da indústria petrolífera nos anos 2.000 também serviu pra a alavancar o crescimento demográfico em toda a região.

Atividades relacionadas ao turismo, petróleo, especulação imobiliária e outras afins tem crescido e respondido cada vez mais com a arrecadação desses municípios. Neste cenário, encontram-se Armação dos Búzios e Arraial do Cabo, que tem sua economia baseada nestas atividades. Contudo, praticamente como uma extensão da indústria do turismo, está a gastronomia, que num contexto mais amplo está diretamente ligada ao consumo de pescado e frutos do mar. Estas cidades se destacam também pela indústria da pesca, tanto a realizada de forma artesanal como a realizada em escala industrial.

Uma das atividades que vem crescendo nas zonas costeiras do Estado é a malacocultura. Armação dos Búzios e Arraial do Cabo possuem fazendas marinhas experimentais que empregam populações locais na criação de moluscos. Dentre as espécies produzidas estão ostras, vieiras e mexilhões.

A atividade de maricultura requer extremos cuidados em todas as etapas de sua realização, desde a adoção de práticas de higiene na coleta, processamento e preparo até a avaliação da qualidade da água onde são cultivados.

Um risco de contaminação existente na atividade de malacocultura é a contaminação das águas onde estes animais são cultivados por biotoxinas de microalgas e cianobactérias, sendo extremamente importante que se faça um monitoramento de florações de algas tóxicas (FAN) de modo a evitar a contaminação dos mexilhões produzidos para consumo humano. Souza (2014) salienta a necessidade de se desenvolver um programa de monitoramento das águas usadas para cultivar moluscos bivalves no sentido de se prevenir o consumo desses animais em caso de contaminação. Na busca de métodos alternativos de detecção de ficotoxinas ou dos efeitos provocados por estes, os testes ecotoxicológicos podem ser importante ferramenta no processo de monitoramento desses ambientes. Neste sentido, torna-se extremamente importante a seleção dos testes mais adequados, a exemplo do teste com artemia franciscana e ensaios enzimáticos, para serem utilizados na determinação da presença de ficotoxinas e do grau de toxicidade a que tais culturas possam estar sujeitas. Concomitante a realização de experimentos comparativos destes com outros métodos mais sofisticados de forma a averiguar sua eficácia.

Entende-se que o aperfeiçoamento e a adequação de testes existentes, com apresentação de resultados mais rápidos e com custos inferiores possa ser um estímulo à implantação de monitoramentos regulares da presença de toxinas nas águas de cultivo de moluscos. Dessa forma, o desenvolvimento destes estudos e a comprovação da eficácia de tais testes são de grande importância para garantir o êxito e o crescimento das atividades de maricultura na região e garantir a qualidade do produto a ser comercializado e consumido.

## 2.4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGELIS, G., et al. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in a bioreactor cultures and biological evaluation of the process. **Water Res**, 37:3897-3904, 2003.

ALVES, T. P.; et al. **Implementação e avaliação do monitoramento de algas nocivas e de ficotoxinas em um cultivo de moluscos em Florianópolis – SC**. Atlântica, Rio Grande, 32(1) 71-77, 2010.

APESTEGUTA, C.; MARTA, J.M.; EMILIANI, M.O.G. Floracion Acuítica de Algas Verdes-azules en el Lago del Parque Belgrano. **Rev. Tema de Salud** , (2):1-20, Santa Fé, Argentina, 1974.

ARTHAUD, I. D. B. **Redução de toxicidade do efluente de uma refinaria de petróleo, empregando reatores biológicos aeróbios, de leito fixo e fluxo contínuo ascendente, inoculados com *Aspergillus niger***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil)-Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2005, 71p.

ASSAD, L. T. Maricultura para a produção de pescado em zonas costeiras. In- Fonteles-Filho, A.A. (Ed.) Anais do Workshop Internacional sobre a pesca Artesanal. Laboratório de ciências do Mar- UFC, Fortaleza, 1996. p. 113-118, 1996.

AZEVEDO, S. M. F. O., VASCONCELOS, V. M. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina on line**, 3(1), 1-19, 1998.

BADEN, D.G.; FLEMING, L.E.; BEAN, J.A. Marine toxins. In: Handbook of clinical neurology, Vol. 21. **Intoxications of the nervous system**, Part III. Editor: F.A. Wolf. Elsevier Science (B.V.): 141-174, 1995.

BANCO MUNDIAL. Perspectivas regionais sobre o desenvolvimento mundial. Reformas econômicas e trabalhistas na América Latina e no caribe American Writing Corporation, 1995.

BARBIERI, E. **O Perigo das Biotoxinas Marinhas**. Instituto de Pesca, São Paulo, 2009.

BARBOSA, L.P.J.L. **Avaliação da toxicidade de cianobactérias na água e da presença de microcistinas nos tecidos de peixes de viveiros em Macapá (AP)**. 2015. 111 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2015.

BASTOS, M.; et al. **Cultivo do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758), na Enseada do Sítio Forte e Vila Dois Ricos – Ilha Grande, Angra dos Reis/RJ**. In: SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 12, Rio de Janeiro. Resumos Expandidos., 1999; p. 229-231.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. Bioquímica Médica – 3ª Ed. Elsevier, 2011.

BOUAÏCHA, N., et al. A colorimetric e fluorimetric microplate assay for the detection of microcystin LR in drinking water without preconcentration. **Food and Chemical Toxicology** 40: 1677-1683, 2002.

BRASIL, 2012. Instrução normativa interministerial nº 7, de 8 de maio de 2012 - Ministério da Pesca e Aquicultura e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil de 09/05/2012**. Seção 1, p. 55-59.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Portaria nº 1469/2000, de 29 de dezembro de 2000. Aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União, nº1, 22 de janeiro de 2001**. Seção 1. p. 19.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria MS nº 518/2004**. 34p. Brasília. 2004.

BUITRÓN VUELTA, L. **Fixação de jovens de *Perna perna* (Bivalvia, Mytilidae) em coletores artificiais no parque de cultivo de Guaibuna, Guarapari/ES- Brasil**. São Paulo. 60p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CAMPBELL, M. K.; Bioquímica; 3ª Edição; Porto Alegre: Artmed; 2000.

CAMPBELL, D. L., L. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and Microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 71-77, 1994.

CAMPOS, J. C. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. **Water Res.** 6:95-104, 2002.

CARMICHAEL, W.W, *et al.* Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ Health Perspect.** 109(7):663-8, 2001.

CARNEIRO T.G, LEITE F. Cianobactérias e suas toxinas. **Rev Analyt.** 2008;(32):36-41, 2008.

CARRAHER, D. W. **Senso crítico: do dia-a-dia às ciências humanas**. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

CASTRO, N. O.; MOSER, G. A. O. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. **Oecologia Australis.** 16 (2): 235-264, Junho, 2012.

CEBALLOS, B. S. O.; AZEVEDO, S. M. F. O.; BENDATE, M. M. A. (2006). Fundamentos biológicos e ecológicos relacionados às cianobactérias. In: **Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano**. Coordenador Valter Lúcio de Pádua, SERMOGRAF – Artes Gráfica e Editora LTDA – PROSAB 4, Rio de Janeiro - RJ.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Enzimas**. In: *Bioquímica Ilustrada*, 2ed. São Paulo: Artes médicas, 1989. .

CHAPMAN, P.M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, v.44, p.7-15. 2002.

CHU, F. S., X. HUANG AND R. D. WEI. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J. Assoc. Official Anal. Chem.* 73: 451-456, 1990.

COLLOQUIUM, Marine Zooplankton. Future marine zooplankton research a perspective. **Marine Ecology Progress Series**, v. 222, p. 297-308, 2001.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n. 357 de 15 de março de 2005**. Brasília, DF, 2005.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n. 450 de 13 de maio de 2011**. Brasília, DF, 2011.

COSTA, C.R.; et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. 31(7), 1820-1830, 2008.

COSTA-LOTUFO LV, et al. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **J Ethnopharmacol**. 2005;99:21–30.

CRUZ, P.G.; Fernández, J.J.; Norte, M.; Daranas, A.H. Belizeanic acid: A potent protein phosphatase 1 inhibitor belonging to the okadaic acid class, with an unusual skeleton. **Chemistry** 14, 6948–6956, 2008.

DAVIDSON, Keith; TETT, Paul; GOWEN, Richard. Harmful algal blooms. In: **Marine Pollution and Human Health**. 2011. p. 95-127.

DANKERS, N. e ZUIDEMA, D.R. The role of the mussel (*Mytilus edulis* L.), and mussel culture in the Dutch Wadden Sea. **Estuaries**, 18(1A): 71-80, 1995.

DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 1, p. 23-43, 2013.

D'ORS, A., BARTOLOMÉ, M. C., & SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxic risk associated with sporadic occurrences of *Microcystis aeruginosa* blooms from tidal rivers in marine and estuarine ecosystems and its impact on *Artemia franciscana* nauplii populations. **Chemosphere**, 90(7), 2187-2192, 2013.

DORNFELD, et al. Comparação de Bioensaios Laboratoriais e “in situ” Utilizando *Chironomus xanthus* na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, 2006, 161-165.

DUARTE, R. B. A. **Histórias de sucesso: agronegócios: aquicultura e pesca / coordenadora nacional do projeto Casos de Sucesso**, Renata Barbosa de Araújo Duarte. – Brasília: Sebrae, 2007.

FAO, F. Statistical Yearbook. World Food and Agriculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 289, 2013.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome., 2014, 223p.

ELLMAN, G.L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7: 88-95, 1961.

FERNANDES, V.O, *et al.*. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecol Brás.** 3(2):247-58, 2009.

FERRANTE, M.; CONTI, G. O.; FIOREL, M.; RAPISARDA, V.; LEDDAL, C. et al. Harmful algal blooms in the Mediterranean Sea: effects on human health. **EuroMediterranean Biomedical Journal**, v. 8, n. 6, p. 25-34, 2013.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. 2004. Cultivo de mexilhões. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E. BELTRAME, E. **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Multitarefa Editora, Florianópolis, p. 221-250.

FERREIRA, M. S.; *et al.* Contaminação por metais traço em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. **Ciência Rural**, 43(6), junho, 2010.

FIPERJ, fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. Relatório Final 2014. Secretaria de Estado de Desenvolvimento Regional Abastecimento e Pesca do Estado do Rio de Janeiro. 2014.

FURLAN, E. F. **Vida Útil dos Mexilhões *Perna perna* cultivados no Litoral Norte de São Paulo: Aferição dos Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Univ. de São Paulo.

GALVÃO, J. A; et al. **Características Físico-Químicas e Microbiológicas (Staphylococcus aureus e Bacillus cereus) da Água e dos Mexilhões Cultivados Na Região De Ubatuba, SP. Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v. 30, n.6, p. 1124-1129, nov./dez., 2006.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **Neurochemical research**, v. 28, n. 3-4, p. 515-522, 2003.

GORDON, A.S; DYER, B.J; SEABORN, D; MARSHALL, H.G. Comparative toxicity of *Pfiesteria* spp., prolonging toxicity of *P. piscicida* in culture and evaluation of toxin(s) stability. **Harmful Algae**. Vol. 1, n. 1, p. 85-94, 2002.

HALLEGRAEFF, G.M. Harmful algal blooms: a global overview. In: ALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA A.D. (eds.). **Manual on Harmful Marine Microalgae**. IOC Manuals and Guides, 33, UNESCO, Paris, France, 2003.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology** 11 (7), 714-719, 1977.

HARADA, K.; *et al.* Comprehensive analysis system using liquid chromatography-mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. **Journal of Chromatography. A** 1033: 107-113, 2004.

HARADA, K. Chemistry and Detection of Microcystins. In: Watanabe, M.; HARADA, K-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Ed.). **Toxic Microcystis**. Boca Raton: CRC Press 1996. p.106-108.

HENNING, K., J. CREMER; MEYER, H. **Cytotoxicity of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa***. J. Vet. Med. B 39: 307-310, 1992.

HIROOKA, E.Y.; *et al.* Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Parana, Brazil using ELISA. **Nat Toxins**, 7(3):103-109, 1999.

HOOSER S.B.; *et al.*- Induced ultrastructural changes in rats. **Vet. Pathol.**, 27:9-15, 1990.

Huhn, J.; Jeffrey, P.D.; Larsen, K.; Rundberget, T.; Rise, F.; Cox, N.R.; Arcus, V.; Shi, Y.; Miles, C.O. A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2. **Chem. Res. Toxicol.** 22, 1782–1786, 2009.

IBAMA, 2000. **Estatística da Pesca 2000** – Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília, 16p.

IEAPM. Nossa História. **A Ressurgência**, ano 1(1):3-5, 2003. Disponível em <<https://www1.mar.mil.br/ieapm/?q=historico>> Acesso em: 01/08/2015.

KAMOGAE, M.; HIROOKA, E. Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum. Technology**, 22, 1189-1200, 2008.

KLAPPENNBACH, M. A. Lista preliminar de los mytilidae brasilenos, conclaves para su derenninación y notas sobre su distribución. **An. Acad. Bras. V.** 37 (supl), Cienc p. 327-352, 1965.

KAYA, k. Ocology of microcystins. In: Wanable, M.; Harada, K-I.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (Ed.). **Toxic Microcystis**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 1 - 11. F1.

KIVIRANTA, J., K. SIVONEN AND S. I. NIEMELA. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. **Environ. Toxicol. Water Qual.** 6: 423-436, 1991.

KONST, H.; *et al.*. Symptoms and pathology produced by *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, 29:221-228, 1965.

LAVINAS, A. F.; VILLAÇA, R. C.; SAAD, A. M. Evaluation of the growth and mortality of the oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1795) in the sea farm in Arraial do Cabo, RJ. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 34(4): 497-504, 2008.

LAWLEY, R.; CURTIS, L.; DAVIS, J. Biological toxins: Fish Toxins. In *The Food Safety Hazard Guidebook*; RSC Publishing: London, UK, p. 253–270.

LEE, T.-H.; CHEN, Y.- M.; CHOU, H.- N. **Toxicity Assay of Cyanobacterial Strains Using *Artemia salina* in Comparison with the Mouse Bioassay**. **Acta Zoologica Taiwanica**. 10(1): 00-00. Republic of China, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Omega. 6ª edição; 839p. 2014.



LIMA, J.M.; SILVA, C.A.; ROSA, M.B.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.G.; SILVA, M.B. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Planta daninha*, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LUNETTA, J. E. Fundamentos essenciais para o estabelecimento de um cultivo de mexilhões. In: Simpósio Latinoamericano de Aquicultura, 6. Florianópolis, Santa Catarina, **Anais...** p.152-159, 1988.

MACEDO, D. R. G. **Microcistina na água e biomagnificação em peixes de reservatórios de abastecimento público do Estado da Paraíba**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente). Universidade Estadual da Paraíba, Programa de Pós-Graduação e Pesquisa, 2009.

McCARRON, P.; KILCOYNE, J.; HESS, P. Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). **Toxicon** 51, 1081-1089, 2008.

MAGALHÃES, A.R.M. **Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia), em função do ciclo sexual**. (Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo). 117 p. São Paulo, 1985.

MACGIN, A. R. Rocking the boat: conserving fisheries and protecting jobs. **World Watch Paper** no. 142. World Watch Institute, Washington DC. 92p, 1998.

MARENZI, A. W. C.; et al. **O Mexilhão *Perna perna* (L.). Biologia, ecologia e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 169-181, 2008.

MATSUNAGA, S.; MOORE, R. E.; NIEMCZURA, W. P.; CARMICHAEL, W. W. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 20, p. 8021-8023, 1989.

MEREGALLI, G., VERMEULEN, A. C.; OLLEVIER, F. The use of chironomidae deformation in an in situ test for sediment toxicity. **Ecotox. and Environ. Saf.**, 47: 231-238, 2000.

MARINÉ, G. F.; et al. Detecção de ácido ocadaico em cultivo de mexilhões *Perna perna*, Angra dos Reis, RJ. **Ciência Rural**, [Online], 2009.

MATSUNAGA, S.; MOORE, R. E.; NIEMCZURA, W. P. CARMICHAEL, W. W. Anatoxins, a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. **J. Am. Chem. Soc.** V. 111 (20) p. 8021-8023, 1989.

MEYER, BN, et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med** 45: 31-34, 1982.

MILLER O.; GONÇALVES R.R. **Laboratório para o clínico**. 8 ed. São Paulo: Editora Arheneu, 1999.

MOLICA, R.J.R.; et al. Neurotoxic *Cylindrospermopsis* sp. Blooms in brazilian waterbodies. **International Conference On Toxic Cyanobacteria**, 4., 1998, North Carolina: Beaufort, 1998. p.69.

MOOLLAN, R. W., B. RAE A. VERBEEK. Some comments on the determination of microcystin toxins in waters by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 121: 233-238, 1996.

MOSER, Gleyci AO et al. Phytoplankton spatial distribution on the Continental Shelf off Rio de Janeiro, from Paraíba do Sul River to Cabo Frio. *Hydrobiologia*, v. 728, n. 1, p. 1-21, 2014.

MPA. **Cartilha Balanço da Pesca-Aquicultura**, Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasil, 2013, 14p, 2013.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil** – 201p. Brasília, 2011.

MUIR, J. Aquaculture and the Environment: Challenges for the Millenium. In Eurofish report trade the conference. **Agra Europe**, London, 1995.

MUNDAY, R. Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals?. *Toxins*, v. 5, n. 2, p. 267-285, 2013.

NASCIMENTO, C. F. **Técnicas de Cultivo de Mexilhões em Escala Artesanal. Relatório de Estágio Curricular** – Agronomia, UFSC, Florianópolis, 1996.

NUNES, B. S., et al. Use Of The Genus Artemia In Ecotoxicity Testing. **Environmental Pollution**, 144(2), 453-462, 2006.

NYBOM, et al. Characterization of mycrocystin-LR removal process in the presence of probiotic bactéria. **Toxicon**. Jan;59(1):171-81, 2012.

OLIVEIRA, M.M. **Enzimas em Organismos Aquáticos sob Efeito de Toxinas de Cianobactérias e Microalgas Marinhas**. 2009. Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, 75p.

PAERL H.W; DAVID; MILLIC. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. **Phycologia**.v.35, 160-167, 1996.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. **Microbial ecology** 65.4 (2013): 995-1010.

PILLAY, T.V.R. The Challenges of sustainable aquaculture. **World Aquaculture**, 27(2):7-9, 1996.

PIMENTEL, M. F.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, L. V. C. O Uso de Artemia sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 6, n. 1, 2011.

PNUD, IPEA. "FJP. Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil." (2010). Disponível em:

<<http://www.pnud.org.br/atlas/ranking/ranking-idhm-municipios-2010.aspx>>Acesso em 30/07/2015.

PROENÇA, L. A. O.; MAFRA, L. L. Ocorrência de ficotoxinas na costa brasileira. In: SBFIC. (Org.). Formação de Ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos. Rio de Janeiro, p. 57-77, 2005.

RAJABI, S., *et al.* Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 20, 2015.

RAMAZANI A, *et al.*. In vitro antiplasmodial and phytochemical study of five Artemisia species from Iran and in vivo activity of two species. *Parasitol Res.* 107: 593–9, 2010.

RAYMONT, John EG. **Plankton & Productivity in the Oceans: Volume 1: Phytoplankton**. Elsevier, 2014.

REBOREDA, A.; LAGO, J.; CHAPELA, M.J.; VIEITES, J.M.; BOTANA, L.M.; ALFONSO, A.; CABADO, A.G. Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon* 55, 235–243, 2010.

RIVASSEAU, C.; *et al.* Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 394: 243-257, 1999.

ROSALES-LOESSENER, F.; PORRAS, E.; DIX, M.W. Toxic shell- fish in Guatemala. In: Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology. Editores: T. Okaichi, D.M. Anderson e I. Nemoto. Elsevier (New York), 113-116, 1989.

ROSET, J. AGUAYO, S. MUÑOZ, M. J. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. Madrid – España. *Rev. Toxicol.* 18: 65-7, 2001.

SALOMÃO, L. C.; MAGALHÃES, A. R. M.; LUNETTA, J. E. Influência da Salinidade na Sobrevivência de *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Biol. Fisiologia Animal*. Universidade de São Paulo, 4: 143-152p. 1980.

SANCHES, SM, *et al.* Estudo da presença da toxina microscistina - LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. *Ecl Quim.* 32(4):43-8, 2007.

SANCHES, S. M., *et al.* Presença da Toxina Microcistina em Água, Impactos na Saúde Pública e Medidas de Controle. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(2), 181-187, 2012.

SCHRAMM, M. A.; *et al.* **Toxinas paralisantes em mexilhão *Perna perna* em áreas de cultivo da costa sul do Brasil: estudo de caso.** *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 17, n. 4, p. 443-450, 2006.

SISINNO, C., *et al.* Ensaio ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos, pp. 150-154. In: **III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente**, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004, 164p.

SIVONEM, K.; JONES, G.; in **Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**; Chorus, I; Bartram, J. Eds.; E & FN Spon; Londres, 1999.

SIVONEN, K.; et al. Isolation and structure of five microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU 972. **Toxicon**, 30(11):1481-1485, 1992.

SMAAL, A. C. European mussel cultivation along the Atlantic coast: production status, problems and perspectives. **Hydrobiologia**, v. 484, n. 1-3, p. 89-98, 2002.

SOUZA, D. A. **Avaliação da toxicidade de mexilhões *Perna perna* (Linnaeu, 1758) e monitoramento fitoplanctônico em fazenda de maricultura da Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ** / Daniela Almeida de Souza. – Macaé, RJ: [s.n.], 2014. In Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, *campus* Macaé, 2014.

TAVARES, J. F.; PROENÇA, L. A.O.; ODEBRECHT, C. Ocorrência e variação temporal de microalgas nocivas em área de aquicultura costeira no sul do Brasil. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 31, n. 2, p. 129-144, 2011.

TRAINER, V.L.; MOORE, L.; BILL, B.D.; ADAMS, N.G.; HARRINGTON, N.; BORCHERT, J.; da SILVA, D.A.; EBERHART, B.T. Diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic toxins of human health concern in Washington state. **Mar. Drugs** v. 11, p.1815–1835, 2013.

SOUSA, E. C. P. M. Toxicologia marinha: histórico. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa; M. Nipper (Ed.). **Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil**. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.9-12, 2002.

SVENSSON, B. M., et al., *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachatewater from landfills. **Environ.Monit. Assess.** 102\_p.309-321, 2005.

TODD, E.C.D. 1993. Domoic acid and Amnesic Shellfish Poisoning – a review. **Journal of Food Protection** 56: 69-83, 1993.

TORGAN, L. C.. Floração de algas: composição, causas e consequências. **INSULA Revista de Botânica**, v. 19, p. 15-33, 1989.

TUNDISI, J.G. O plancton estuarino. **Contx. Inst. Oceamog4**. Universidade de São Paulo. *ser. Ocean. Biol.* (19): 22, 1970.

UTERMÖHL, H. **Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik**. *Mitt. Int. Verein.Theor. Angew. Limnol.* v. 9, p. 1-38, 1958.

VALDIGLESIAS, V.; PREGO-FARALDO, M. V.; PÁSARO, E.; MÉNDEZ, J. LAFFON, B. **Okadaic Acid: More than a Diarrheic Toxin**. *Mar. Drugs* 11(11), 4328-4349, 2013.

VALE, P. Biotoxinas Marinhas. Revista |Portuguesa de Medicina Veterinária. 99 (549): p. 03-18, 2004.

VALENTI, W. C. Aquicultura sustentável. In: Congresso de Zootecnia, 12º., Vila Real, Portugal, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. **Anais...**p.111-118, 2002.

VEIGA, L. F.; VITAL, N., Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo. *Artemia* sp. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa; M. Nipper (ed.), **Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil**. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122, 2002.

VIEGAS, S. J. **Alterações do estado de saúde associadas a alimentação: contaminação microbiológica dos alimentos**. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância, 2009.

VIEIRA, P. **Rumo à revolução azul: contribuição à pesquisa de estratégias de desenvolvimento sustentável em ecossistemas litorâneos do sul do Brasil**. Programa de Pós-Graduação em Sociologia Política da UFSC. Florianópolis, 1991.

WEIS, J. S. Introduction to Marine Pollution. In: **Physiological, Developmental and Behavioral Effects of Marine Pollution**. Springer Netherlands, 2014. p. 3-36.

WIESE, M.; D'AGOSTINO, P. M.; MIHALI, T. K.; MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. **Marine Drugs**, 8: 2185-2211, 2010.

WILHELM, H. M.; TRINDADE; E. M., GOMES; A. L.; CIULIK, C. B; MOTTA, H. N.; ZAWADZKI, S. F.; FERNANDES, L.; SARAIVA, A. Tratamento de água de reservatórios impactados com cianotoxinas: desenvolvimento e aplicação de filtros uretânicos. In GRUPO XI GRUPO DE ESTUDO DE IMPACTOS AMBIENTAIS-GIA – XIX SNPTEE – Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica. GIA24, Rio de Janeiro - RJ, Outubro 2007.

YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; YAMAGUCHI, M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44(11): 1249-1255, 1978.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2008.

## ARTIGO 2

### ESTUDO DA APLICAÇÃO DE TESTES TOXICOLÓGICO E ENZIMÁTICO PARA MONITORAR FICOTOXINAS ACUMULADAS EM MOLUSCOS BIVALVES.

#### RESUMO

A necessidade de se monitorar a produção de moluscos bivalves para consumo humano nas áreas de cultivo desses animais aliada a inúmeros inconvenientes dos testes de referência e alternativos, como a ética no uso de animais de laboratório no caso do bioensaio com camundongos e a necessidade de equipamentos sofisticados e mão-de-obra especializada em outras técnicas como a cromatografia líquida com espectrofotometria de massas em tandem, por exemplo, tornando-os financeiramente pouco atrativos, impõe que outros tipos de testes alternativos e complementares sejam desenvolvidos, avaliados e aplicados para que possa ser feito um monitoramento eficaz dessas áreas a respeito da presença de ficotoxinas de microalgas de forma menos dispendiosa, rápida e prática. A crescente problemática da ocorrência de florações de algas nocivas em todo o mundo aliada à natureza filtradora dos moluscos bivalves e a sua capacidade de armazenar, mesmo que por pequenos intervalos de tempo, substâncias absorvidas e em especial a gravidade de muitas das síndromes de envenenamento causadas por consumo de moluscos contaminados, como as síndromes: paralisante, neurotóxica e diarreica dentre outras, nos leva a aplicar o biosensaio utilizando náuplios recém-eclodidos de *Artemia franciscana* e testes de inibição de fosfatase também extraída de náuplios desse crustáceo para se avaliar a eficácia destes testes de alarme no monitoramento dessas toxinas individualmente e comparando seus resultados entre si, averiguando também a possibilidade de presença de toxinas em extratos obtidos de mexilhões *Perna perna* coletados em áreas de cultivo localizadas em Arraial do Cabo-RJ e extraídas com soluções a 10 e a 100% de metanol. Esses extratos metanólicos de hepatopâncreas de mexilhões foram testados submetendo náuplios de artêmia aos mesmos e verificando-se a mortalidade. Foi feito também ensaio de inibição de fosfatase com tais extratos. Nossos resultados, apesar de não conclusivos, mostraram-se promissores, principalmente quando avaliados em conjunto com dados taxonômicos publicados anteriormente e que abrangem o mesmo período em que foram feitas as coletas do material estudado.

**Palavras-chave:** Monitoramento. Ficotoxinas. Mexilhão. Artemia. Testes Alternativos.

## ABSTRACT

The need to monitor the production of bivalve molluscs for human consumption in the areas of cultivation of these animals, coupled with innumerable drawbacks of reference and alternative tests, such as ethics in the use of laboratory animals in the case of mice bioassay and the need for equipment. Sophisticated techniques and skilled labor in other techniques such as liquid chromatography with tandem mass spectrometry, eg making them financially unattractive, requires that other types of alternative and complementary tests be developed, evaluated and applied so that Effective monitoring of these areas on the presence of microalgae phycotoxins in a less costly, rapid and practical way. The growing problem of the occurrence of noxious algal blooms all over the world coupled with the filtering nature of bivalve molluscs and their ability to store absorbed substances and, in particular, the severity of many of the poisoning syndromes. By the consumption of contaminated molluscs, such as the paralytic, neurotoxic and diarrheal syndromes, leads us to apply the biosensing using newly hatched nauplii of *Artemia franciscana* and tests for the inhibition of phosphatase also extracted from the nauplii of this crustacean to evaluate the efficacy of these Tests for monitoring these toxins individually and comparing their results among themselves, also investigating the presence of toxins in extracts obtained from *Perna perna* mussels collected in cultivated areas located in Arraial do Cabo-RJ and extracted with solutions at 10 and 100% methanol. These methanolic extracts of mussels hepatopancreas were tested by subtracting nauplii from artemia to them and checking for mortality. Inhibition of phosphatase with such extracts was also carried out. Our results, although not conclusive, were promising, especially when evaluated in conjunction with previously published taxonomic data and covering the same period as the collections of the material studied.

**Keywords:** Monitoring. Phycotoxins. Mussel. Artemia. Alternative Testing.

## | 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de moluscos bivalves vem alcançando alta produtividade a cada ano. Entretanto, um obstáculo à produção e consumo da carne destes moluscos é a possibilidade de contaminação por toxinas produzidas por microalgas (ficotoxinas), que pode levar ao embargo dos seus produtos quando ocorrem Florações de Algas Nocivas (FAN) nas suas áreas de cultivo (SIMÕES, 2011). Estas FANs (ou blooms, da denominação Harmfull Algae Bloom – HAB em inglês) correspondem a proliferações excessivas da quantidade de indivíduos de certas espécies fitoplanctônicas em curtos espaços de tempo quando encontram condições que favoreçam este desenvolvimento (CASTRO; MOSER, 2012). Nem todas as espécies de algas em que se observam eventos de florações são produtoras de toxinas, mas além da produção de toxinas, outros danos podem ser causados por este fenômeno aos seres e ambiente aquático como o aumento do déficit biológico de oxigênio (DBO) devido ao maior consumo de oxigênio da grande biomassa de micro-organismos (VIEGAS, 2009), obstrução das brânquias e sistemas vitais de peixes e organismos maiores pelas próprias algas, dificultando-os a respiração ou danificando estes sistemas pelo atrito dos mesmos com as carapaças de componentes rígidos das microalgas (HALLEGRAEFF, G.M. 2010), dentre outros.

Os moluscos bivalves são animais filtradores w certas toxinas podem ser armazenadas em seus tecidos, sendo bioacumuladas, como também podem ser passadas ao longo da cadeia trófica para seus predadores, contaminando-os (CASTRO; MOSER, 2012). Ao serem transferidos para níveis tróficos superiores, podem causar intoxicações em diversos organismos, incluindo o homem (PROENÇA *et al.*, 2011; BAINY, 2013). O mexilhão é usado como organismo indicador da presença de ficotoxinas no ambiente através de testes de toxicidade há mais de meio século em países da Europa Ocidental, América do Norte e outros (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2006; RESGALLA JR.; MORAES, 2008; FERREIRA *et al.*, 2013). As ocorrências de FANs podem estar relacionadas a variações climáticas naturais (GILBERT; PITCHER, 2001) ou provocadas pela ação antropogênica (HALLEGRAEFF, 2010), assim como processos de eutrofização que também podem ser naturais ou por ação humana (HALLEGRAEFF, 2003). A crescente detecção de espécies nocivas onde ainda não haviam sido relatadas também pode estar associada ao crescimento desses eventos em todo o mundo, provocadas possivelmente pela contaminação marinha da água de lastro dos navios (BUTRON *et al.*, 2011), pelo transporte natural promovido pelas correntes marinhas (MASÓ; GARCÉS, 2006) ou pelas movimentações de estoques pesqueiros e de moluscos (HEGARET



et al., 2008) e evidentemente pelo crescimento da malacocultura com cada vez mais áreas de cultivo espalhadas pelo mundo, além, é claro, de ser resultado também da multiplicação de programas de monitoramento de algas nocivas (SIMÕES, 2011).

Certos gêneros de microalgas do grupo das diatomáceas e principalmente dos dinoflagelados são produtores de toxinas que podem causar intoxicações no ser humano quando ingeridas através do consumo de moluscos contaminados (BARBIERI, 2009). No Brasil, a Instrução Normativa Interministerial nº 07/2012 dos ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) indica quais os gêneros de algas que produzem tais toxinas, além de listar as principais síndromes provocadas por tal consumo e as respectivas toxinas. A nomenclatura de cada intoxicação relaciona-se ao principal sintoma provocado em humanos, sendo PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) a síndrome paralisante cuja principal toxina envolvida é a saxitoxina (STX) e seus congêneres; ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) a síndrome amnésica provocada pela ingestão do ácido domóico (DA); NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning) a síndrome neurotóxica, provocada por brevetoxinas (BVX); DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) a síndrome diarreica, provocada pelo ácido ocadaico (AO) e derivados como os do grupo das dinofisistoxinas (DTXs), pelas Yessotoxinas (YTXs) e pectonotoxinas (PTXs); AZP (Azaspiracid Poisoning) causada pela ingestão de azaspirácidos (AZP) e VSP (Venerupine Shellfish Poisoning) a síndrome de Venepurino (CASTRO; MOSER, 2012; BARBIERI, 2009; HALLEGRAEFF, 2003).

O ácido ocadaico (OA) e as toxinas DTXs são substâncias lipofílicas que podem contaminar a carne de mariscos (STEIDINGER, 1993), sendo produzidas por dinoflagelados dos gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum* (DOUCET et al., 2007; REGUERA; PIZARRO, 2008). O consumo dessas toxinas pode levar, além do envenenamento diarreico do marisco (DSP), que produz desconforto abdominal, náuseas, vômitos e diarreia (YASUMOTO; MURATA, 1993) a outros problemas como a promoção de tumores e a produção de efeitos mutagênicos e imunotóxicos (SASSOLAS et al.; 2013; MEŠTROVIĆ; PAVELA-VRANČIČ, 2003). Da mesma forma que a microcistina-LR (MC-LR), de cianobactérias, o OA e a DTX podem provocar inibição das proteínas fosfatases PP1 e PP2A (BIALOJAN; TAKAI, 1988; DAWSON, 1998; MESTROVIC; PAVELA-VRANCIC, 2003), sendo também estas duas (MC-LR e AO) as hepatotoxinas consideradas com maior distribuição no mundo (WU et al., 2015).

A detecção da presença de toxinas marinhas em áreas de cultivo é de extrema importância para se evitar tanto problemas de saúde na população consumidora como prejuízos na

produção e comercialização dos mariscos, sendo para isso necessário a existência de métodos sensíveis, rápidos e confiáveis (SASSOLAS *et al.*; 2013). O nível máximo permitido de AO e toxinas semelhantes é de  $160 \text{ mg.Kg}^{-1}$  do todo ou parte consumida dos moluscos bivalves, tanto no Brasil, determinado pela portaria n.º 204 do extinto MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura), como em países da UE (Regulamento n.º 853/2004). A cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC- MS / MS) passou a ser usado a partir de 2011 como método de referência indicado pela UE (CE N.º. 15/2011) para a detecção de toxinas lipofílicas como o ácido ocadaico (SUZUKI *et al.*, 2009; GARIBO *et al.*, 2012), enquanto o bioensaio com camundongos ou MBA (YASUMOTO *et al.*, 1978) tem sido o método alternativo indicado para detecção dessas toxinas DSP, sendo considerado ainda como método de referência para outras toxinas de moluscos, como as toxinas PSP (AOAC 959.08).

O uso do bioensaio usando camundongos recebe muitas críticas como a diversidade de fatores ligados às cobaias e que podem influenciar nos resultados tais como gênero, estado de saúde, peso dos animais e as condições às quais cada laboratório oferece aos mesmos. Pode oferecer falsos positivos devido a influências de outros fatores ou substâncias tóxicas, além da dispendiosa e trabalhosa manutenção dos animais. Mas, certamente um dos maiores entraves para sua utilização rotineira é a restrição ao uso de animais estabelecido pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA), cuja autorização torna-se necessária para o uso de vertebrados em pesquisas e testes experimentais (SASSOLAS *et al.*, 2013; GARIBO *et al.*, 2012).

Uma série de outras técnicas e métodos alternativos ou complementares ao método de Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas (LC- MS / MS) é permitida pelo regulamento CE N.º. 15/2011, como os imunoenaios e outras técnicas de cromatografia, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) e a cromatografia gasosa-espectroscopia infravermelho (GC-IV) (FUGII *et al.*, 2004), além de ensaios funcionais como os de inibição de fosfatases, podendo estes serem realizados de forma individual ou combinados, desde que cumpram o devido papel dos métodos oficiais de proporcionar proteção à saúde pública (GARIBO *et al.*, 2012). Suzuki e Quillian (2011) salientam a importância de se aplicar técnicas mais modernas que não detectem substâncias que podem mascarar os resultados dos testes apresentando falsos positivos. Pectenotoxinas (PTXs) e yessotoxinas (YTXs), apesar de serem substâncias classificadas como análogas às causadoras de DSP: grupo do ácido ocadaico (AO) e das dinofisistoxinas (DTXs), não podem mais ser definidas como toxinas DSP, mas são detectadas pelo bioensaio com camundongos (MBA),

demonstrando a aplicação de uma técnica baseada em espectrometria por ionização e eletropulverização (ESI) e cromatografia líquida com espectrometria de massa como aliadas para a análise de cada grupo de toxinas separadamente.

Além dos métodos citados, verificamos a possibilidade de implementação de outros métodos alternativos que embora não tenham o rigor de especificidade dos métodos de referência, são mais adequados na aplicação em laboratórios que promovam monitoramento e que não possuem grande aporte de recursos financeiros. Testes toxicológicos são aplicados em monitoramento de ambientes poluídos, sendo chamados de ecotoxicológicos (ANSELMO *et al.*, 2011) e também na prospecção de substâncias bioativas e ficotoxinas, como é o caso dos testes que utilizam espécies do gênero *Artemia* (ASTUYA *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2013; FAIMALI *et al.*, 2012). Este teste foi sugerido para ser o teste ecotoxicológico de alarme para efeitos de Palitoxina e compostos relacionados produzidos por dinoflagelados bentônicos (FAIMALI *et al.*, 2012). As artêmias, conhecidas vulgarmente por camarão salmoura são microcrustáceos cujos estudos toxicológicos de letalidade contra sua forma jovem ou náuplio tem sido um dos instrumentos dos mais úteis para se avaliar a toxicidade de um modo preliminar (AMARANTE *et al.*, 2011). A espécie *Artemia franciscana* (*A. franciscana*) é uma das espécies utilizadas em testes experimentais de toxicidade de contaminação marinha, podendo ser também um organismo experimental ideal em testes de monitoramento de toxinas de microalgas (D'ORS *et al.*, 2014), sendo que tais testes ainda podem ser usados numa verificação preliminar de atividade biológica e farmacológica (Lopez *et al.*; 2010).

Os Ensaio enzimáticos são menos caros e menos complexos que as técnicas cromatográficas, para a sua manipulação e, da mesma forma que os testes toxicológicos, podem ser aplicados na detecção de diversos compostos químicos classificados como poluentes, tais como pesticidas e metais pesados (OCHOA *et al.*, 2013, CHOUTEAU *et al.*, 2005). Atualmente, verificamos ampla aplicação de métodos bioanalíticos incorporando técnicas eletroquímicas úteis na construção de biossensores com enzimas na detecção de ficotoxinas, como o ácido ocadáico (HAYAT *et al.*, 2012; SASSOLAS *et al.*, 2011).

Neste estudo procura-se verificar o uso consorciado dos testes alternativos de inibição de fosfatases usando extrato enzimático de *Artemia franciscana* com o bioensaio utilizando metanáuplios dessa espécie de crustáceo na avaliação de toxicidade de extratos de mexilhões coletados em áreas de cultivo em Arraial do Cabo-RJ. Como tais testes demandam de menor investimento financeiro e técnicas de aplicação menos sofisticadas, podem vir a ser uma alternativa viável para se monitorar possíveis contaminações por ficotoxinas em mexilhões ao invés do uso de testes mais complexos e de demanda econômica maior.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### ***Reagentes:***

Cloreto de sódio (alphatec), bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, hipoclorito de cálcio, p-nitrofenil fosfato (sigma-aldrich), tris (hidroximetil) aminometano (synth), metanol (dinâmica), etanol (proquimios). Resina cromatográfica fase sólida - DIAION HP 20 (SIGMA-ALDRICH).

### ***Equipamentos:***

Leitor de microplacas DNM-9606 (Labnova Ltda); rotaevaporador (marca fisotom), banho maria ultratermostatizado SL-152/10 (marca solab), lupa estereoscópica (marca Lumen), centrífuga de bancada (Quimis), homogeneizador de tecidos (marca IKA<sup>®</sup> RW 20 digital), centrífuga refrigerada 320R (marca Hettich).

### ***Coleta dos bivalves e armazenamento do hepatopâncreas***

Os mexilhões foram coletados no período de agosto a dezembro de 2013 e em janeiro, fevereiro e maio de 2014, sempre no período da manhã. Em cada coleta foram recolhidos da malha de cultivo pelo menos 50 indivíduos com comprimento médio de  $8,5 \pm 0,59$  cm e peso de  $48,61 \pm 8,45$  g. Após a dissecação no laboratório, os hepatopâncreas dos mesmos foram retirados e agrupados em quantidades de 20 a 25 g e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***Preparação dos extratos metanólicos***

Antes da extração, os hepatopâncreas foram desidratados em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Em seguida realizou-se a extração, aplicando-se metanol na proporção 100 mL para 20 g de hepatopâncreas desidratados, misturando intensamente e depois deixando em repouso por 30 min. Após este repouso filtrou-se o sobrenadante que foi reservado e acrescentou-se novamente o mesmo volume de metanol em cada amostra para uma segunda extração. A seguir, os dois sobrenadantes foram unificados para a etapa de rotaevaporação, que foi feita acoplando-se os balões contendo os sobrenadantes a um condensador rotatório acoplado a uma bomba de vácuo e expondo tal balão a um banho Maria ( $60^{\circ}\text{C}$ ) até que todo o líquido fosse drenado dos balões.

### ***Obtenção dos extratos da cromatografia fase sólida (Clean up).***

O resíduo da rotaevaporação foi ressuspensão em 5mL de água deionizada, ficando em repouso por 30 min. Logo após, retirou-se 1mL para aplicar na coluna de cromatografia fase sólida (DIAION HP 20, C18 fase reversa). A etapa de eluição da fase móvel foi realizada aplicando-se sucessivamente soluções de diferentes concentrações de metanol, conforme a tabela a seguir:

**Quadro 1: Composição das soluções metanólicas de extração.**

Percentual de metanol no extrato	10%	20%	30%	100%
Quantidade de metanol	2,0 ml	4,0ml	6,0ml	20,0ml
Quantidade de água destilada	18,0ml	16,0ml	14,0ml	0,00

As soluções obtidas foram secas por rotaevaporação ou estufa e armazenadas para os ensaios toxicológicos e enzimáticos.

#### ***Preparação do extrato liofilizado de *Microcystis aeruginosa****

O material liofilizado de *Microcystis aeruginosa*, usado como amostra de controle positivo para toxina, foi produzido no Laboratório de Bioquímica Toxicológica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro a partir de inóculos da cepa NPLJ-4 obtidos no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da UFRJ. O extrato liofilizado de *M. aeruginosa* acompanhou a metodologia citada acima para os hepatopâncreas, apenas apresentando como diferenças: 1)- a proporção de metanol para material liofilizado utilizado que foi de 2,5 ml de metanol para 50 mg de extrato liofilizado de *M. aeruginosa*; 2)- a realização de três extrações com metanol e 3)- Centrifugação para obtenção do sobrenadante ao invés de filtração.

#### ***Teste ecotoxicológico com artemia***

Foi realizado de acordo com o método proposto por Meyer et al. (1982), com algumas modificações. 7g de cistos de *Artemia franciscana* foram hidratados, desencapsulados (com hipoclorito de cálcio) e incubados em água do mar artificial (solução de água destilada 1L mais bicarbonato de sódio 2g e cloreto de sódio 8g, à qual denominamos “água-de-artêmia”) à temperatura ambiente por 24 horas com aeração e iluminação constantes. Após este período, as larvas foram atraídas com ajuda de uma fonte de luz e coletadas.

Para a obtenção da carta-controle de validação dos testes, foram utilizadas soluções de dodecil sulfato de sódio (SDS), preparadas em “água do mar artificial” em concentrações variando de 6 mg/L a 35 mg/L para o dodecil sulfato de sódio (Apêndice 1).

Para aplicação dos testes foram usadas placas de acrílico de 6 poços, onde em cada poço foram depositados 10 metanúplios de artêmia. O controle negativo foi composto por 5mL de “água-de-artemia”. Os extratos liofilizados de *M. aeruginosa* (controle positivo) e os de hepatopâncreas extraídos a 10%, 20%, 30% e 100% de metanol foram ressuspensos em 4mL de uma solução de “água-de-artemia” com etanol a 0,1% (49.950 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de artêmia + 50  $\mu$ L de etanol), cuja função desse etanol é auxiliar na solubilização dos extratos. Os poços das placas receberam 1mL dessa solução de extrato a ser testado e 4 mL de “água-de-artemia”, totalizando também 5mL. Foi feito também grupo controle usando 1mL de solução 0,1% de etanol e 4mL de água de artêmia. Todos os grupos: controle negativo (com e sem solução de etanol), controle positivo e soluções de hepatopâncreas foram feitos em triplicatas.

### ***Extração Enzimas de náuplios Artemia franciscana***

Os extratos enzimáticos foram preparados após pesagem de náuplios recém eclodidos de artêmia recém eclodidos e homogeneizados em tampão Tris/HCl 50mM pH 7,4 (contendo sacarose 250 mM, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM) na proporção 1g por 4mL de tampão. Após trinta passagens no homogeneizador de tecidos tipo Potter-Elvehjem (Potter, 1955), o homogeneizado foi centrifugado a 10000 g por 60 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi usado como fonte de enzimas fosfatases.

### ***Ensaio enzimáticos Fosfatase***

A avaliação da atividade da fosfatase total (FT) foi feita com base numa modificação do método de Rivasseau et al. (1999) e Bouaïcha et al. (2002) em os extratos metanólicos de hepatopâncreas foram testados frente a uma mistura de tampão de ensaio (Tris/HCl 40 mM, pH 8,4, contendo MgCl<sub>2</sub> 34 mM, EDTA 4 mM e DDT 4 nM) com substrato p-nitrofenilfosfato na concentração final 9,8 mM e fração enzimática, totalizando um volume final de 200 $\mu$ L. A formação de produto deve ser medida pela absorção contínua a 405 nm em leitor de microplaca, durante 6 min e os cálculos da atividade da enzima devem ser feitos usando o coeficiente de absorvidade do p-nitrofenol (16.890 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). Sendo, 1 unidade enzimática (U) expressa em  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup> de p-nitrofenol por mililitro. No teste de inibição

foram utilizados extratos com fração enzimática extraída de náuplios de artemia e extratos metanólicos de hepatopâncreas de mexilhões incubados por 1 hora a temperatura de 20°C. Os extratos metanólicos foram ressuspensos em 5mL de solução tampão Tris/HCl pH 8,4 e todas as avaliações foram feitas em triplicata.

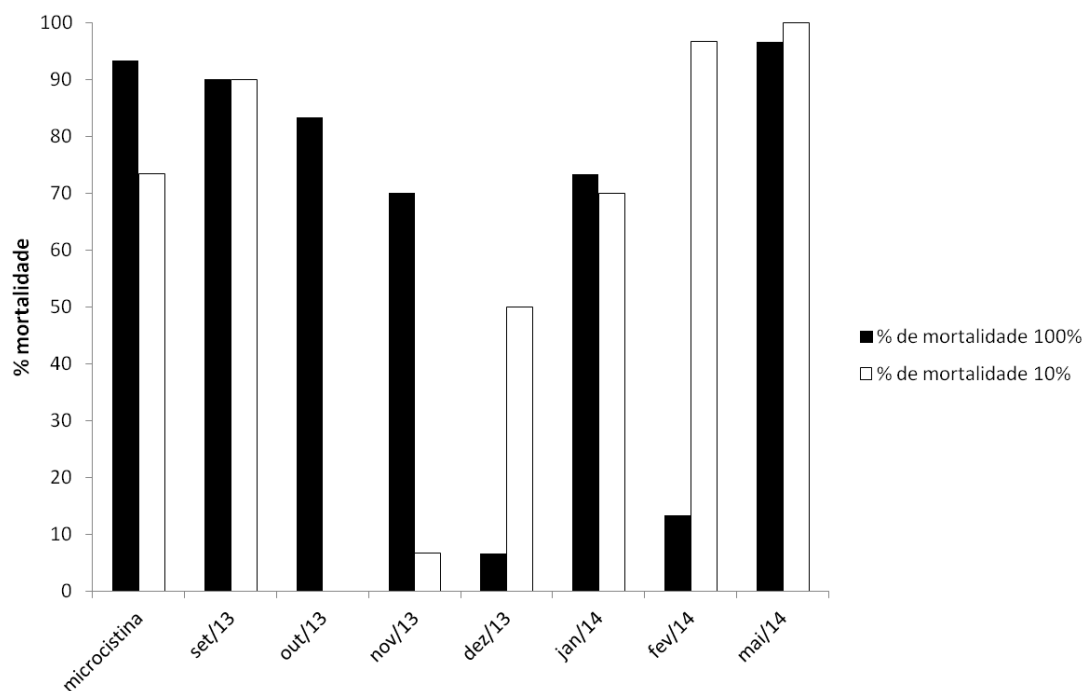
### ***Análise estatística***

Os dados foram analisados por médias e desvios padrões, correlações e regressões lineares e testes de análise de variância pelo Microsoft®Office EXCEL versão 2003. Teste Tukey realizado utilizando programa Past 3.12.

## **3 RESULTADOS**

### ***Testes toxicológico com artemia***

Após 24 horas de exposição de náuplios de artêmia recém-eclodidos aos extratos com 10% de metanol e 100% de metanol observamos que a mortalidade ocorreu na maioria dos poços num percentual efetivamente alto. Com 100% de metanol houve maior mortalidade e apenas os extratos de mexilhões coletados nos meses de dezembro de 2013 e fevereiro de 2014 apresentaram baixo percentual de mortalidade (abaixo de 10% e de 20% respectivamente). Em setembro de 2013 e maio de 2014 a taxa de mortalidade foi tão efetiva quanto a apresentada pelo extrato do liofilizado de *Microcystis aeruginosa* usada como substância de referência, alcançando e ultrapassando os 90% sobre os náuplios submetidos a extratos com 100% de metanol. Já para os extratos à base de 10% de metanol a taxa de mortalidade alcançou ou ultrapassou os 90% para os extratos de mexilhões coletados nos meses de setembro de 2013 e nos meses de fevereiro e maio de 2014. Entretanto, o percentual de mortalidade no mês de outubro de 2013 foi inexistente e em novembro de 2013 ficou abaixo de 10% (Figura 1).



**Figura 1:** Percentuais de mortalidade em náuplios de *Artemia franciscana* submetidos a extratos de hepatopâncreas de mexilhões a 10% e a 100% de metanol.

Os extratos obtidos apresentaram efeitos tóxicos esperados, comparativamente com a toxina usada como referência (extrato liofilizado de *M. aeruginosa*), e produzindo mortalidade acima de 70% para os dois extratos. As amostras obtidas de frações 100% foram mais efetivas na letalidade dos náuplios de artêmia (5 resultados acima de 70% de letalidade) do que as frações 10% (4 igual e acima de 70% de letalidade). Nos meses novembro e dezembro houve um resultado inverso, com alta mortalidade ocasionada pelo extrato 100% em novembro e baixa em dezembro, enquanto o extrato 10% apresentou baixa mortalidade em novembro e alta em dezembro.

### ***Ensaio enzimático com fosfatase***

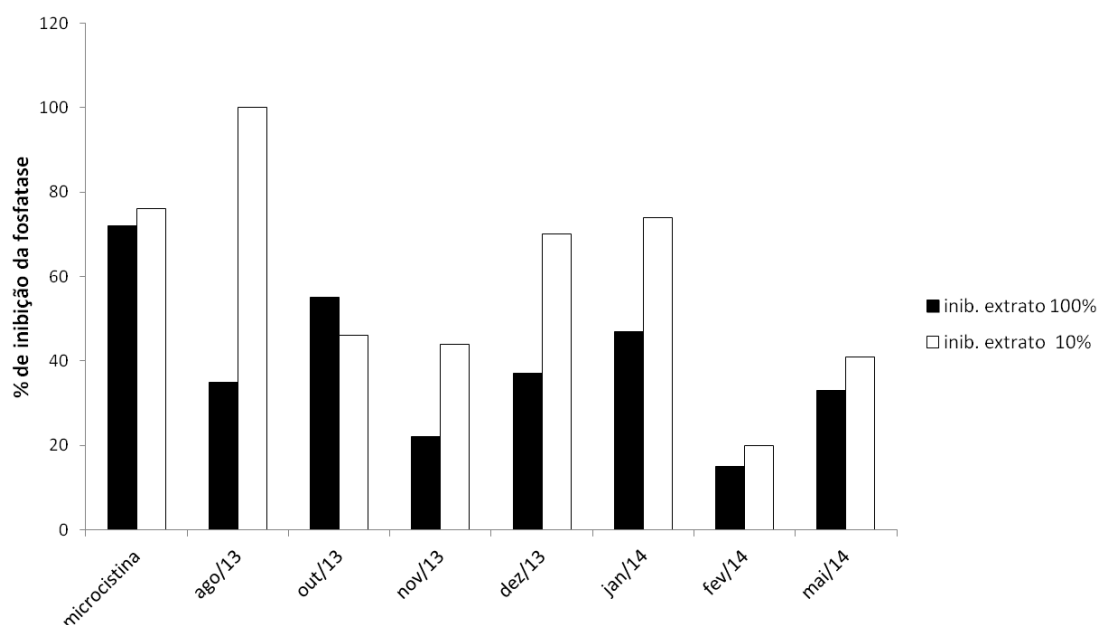
Após ressuspensão dos extratos de hepatopâncreas de mexilhões obtidos por cromatografia de fase sólida, os mesmos foram submetidos a um ensaio de inibição junto da enzima fosfatase (extraída de náuplios de artêmia). A ação desses extratos sobre a atividade da fosfatase serviu para verificar a capacidade dos mesmos em interferir na ação catalítica da enzima extraída de artêmia. Observou-se que a inibição da ação da enzima foi mais efetiva na presença de extratos metanólicos à base de 10% de metanol, especialmente nos meses de setembro e dezembro de 2013 e janeiro de 2014, havendo destaque para a taxa acima de 95% de inibição no mês de setembro de 2013. Nos meses de outubro e novembro de 2013 e fevereiro de 2014



houve inibição de ação enzimática com menor intensidade, ficando em torno dos 45% para estes dois primeiros meses e em 35% para fevereiro de 2014.

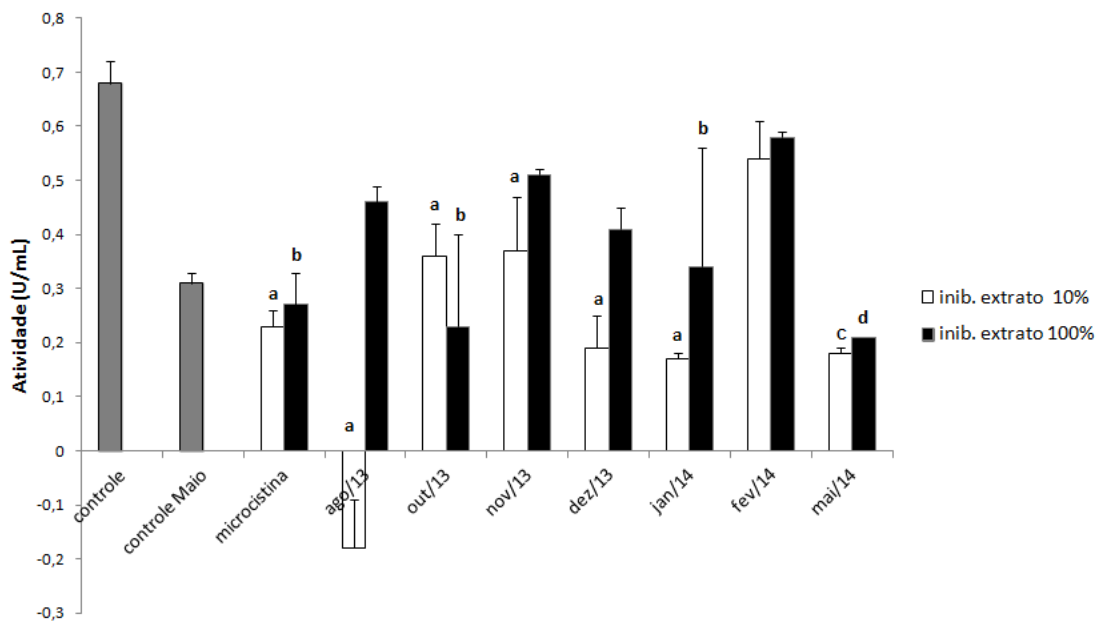
Os resultados da inibição da ação da fosfatase sob presença de extratos metanólicos de hepatopâncreas com 100% de metanol nos mostram que somente no mês de outubro de 2013 o percentual de inibição superou os 50%. Os extratos metanólicos de janeiro de 2014 apresentaram percentual de inibição levemente abaixo dos 50% e os obtidos a partir de hepatopâncreas dos mexilhões dos outros meses de coleta apresentaram ação inibitória abaixo dos 40%, sendo menor no mês de novembro de 2013 quando alcançou em torno de 20% de inibição da ação da fosfatase extraída de artêmia.

O extrato com 10% de metanol foi mais efetivo na inibição da fosfatase de artêmia, com taxa acima de 50% de inibição em 3 meses de coleta enquanto que para os extratos a 100% de metanol houve inibição acima de 50% em apenas 1 mês de coleta. Os resultados obtidos a partir da inibição da ação da fosfatase extraída de artêmias pelos extratos metanólicos a 10% e 100% estão expostos na figura 2.



**Figura 2:** Percentuais de inibição de enzima fosfatase extraída de *Artemia franciscana* submetidos a extratos de mexilhões a 10% e a 100% de metanol.

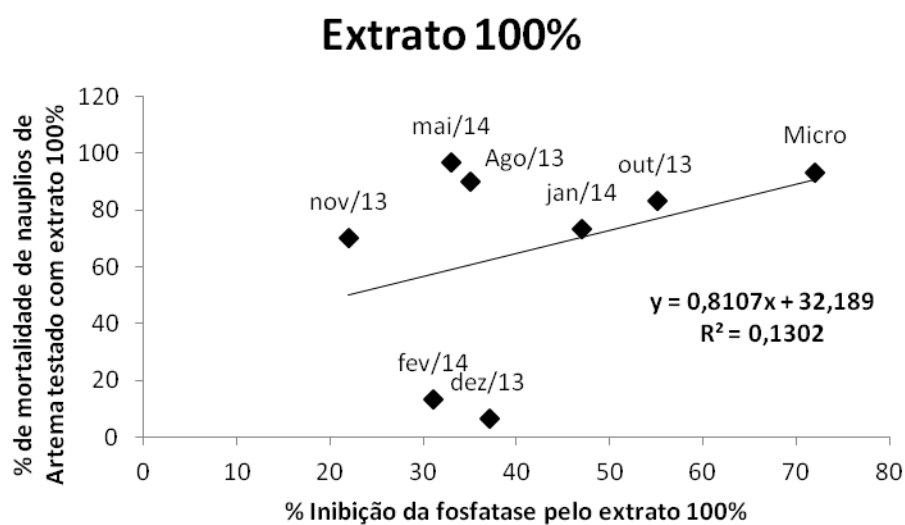
Na comparação das atividades enzimáticas as obteve-se maiores inibições nas incubações com extratos de hepatopâncreas extraídas com metanol 10% (Figura 3).

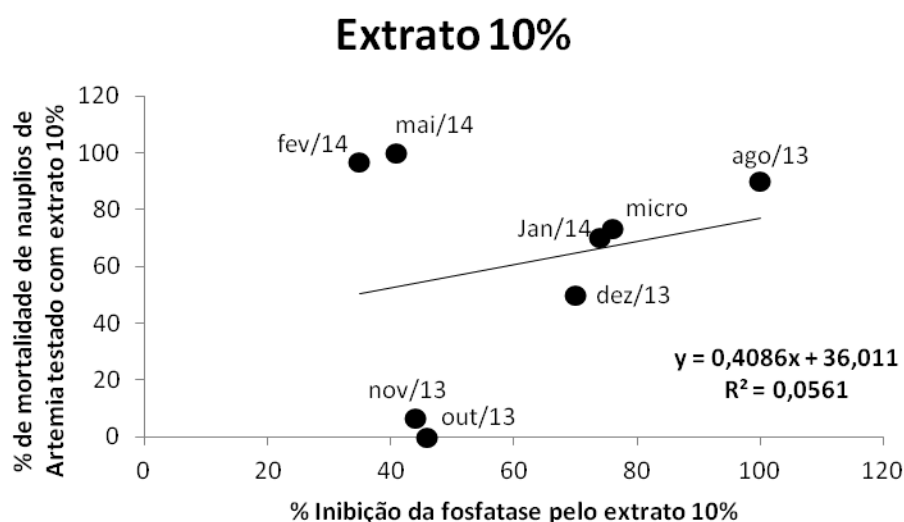


**Figura 3** – Atividade fosfatásica de náuplios de artemia em presença de extratos metanólicos de hepatopâncreas de *Perna perna*.<sup>a</sup> diferenças entre as médias de inibição de atividade fosfatásica com extratos metanólicos 10% em relação ao controle sem incubação com extrato. <sup>b</sup> diferenças entre as médias de inibição de atividade fosfatásica com extratos metanólicos 100% em relação a atividade do controle sem incubação com extrato. <sup>c</sup> diferença entre a média de inibição do extrato 10% em relação ao controle de maio. <sup>d</sup> diferença entre a média de inibição do extrato 100% em relação ao controle de maio. (ANOVA, complementado com teste Tukey,  $p < 0,05$ )

### Correlação entre os dois métodos

A correlação entre inibição de fosfatase e mortalidade não foi percebida. Entretanto, quando comparadas as correlações entre os extratos, o de 100% apresentou melhor correlação entre inibição de fosfatase e letalidade em nauplio de artemia (figura 4).





**Figura 4** – Correlações entre inibição de atividade fosfatásica de náuplios de artemia e letalidade para os náuplios de artemia com os extratos metanólicos 100% e 10%.

A inibição da atividade de fosfatases totais o extrato metanólico 10% foi mais efetiva do que dos extratos 100%.

#### ***Comparação dos métodos com análise taxonômica***

Os resultados dos testes toxicológicos e enzimáticos obtidos neste estudo foram confrontados com resultados de análise taxonômica de presença de microalgas potencialmente produtoras de ficotoxinas realizados por Souza (2014) no mesmo período em que foram realizadas as coletas dos mexilhões testados. Dessa comparação, observamos que apenas no mês de fevereiro de 2014 não foram encontradas microalgas potencialmente tóxicas nas amostras de fitoplâncton e que a mortalidade do extrato 100% foi baixa, assim como as inibições de fosfatase no referido mês. *Dinophysis acuminata* apareceu regularmente nas amostras de outubro, novembro, dezembro de 2013 e no mês de janeiro de 2014. Entretanto aparece numa quantidade extremamente grande no mês de maio de 2014. O gênero *Gymnodinium* também apareceu no estudo taxonômico, entretanto somente no mês de agosto de 2013 e janeiro de 2014 (tabela 1).

**Tabela 1: Associação dos resultados obtidos nos ensaios de inibição de fosfatase e bioensaios com artêmia a 10% e 100% com a microalga detectada nos meses de coleta;**

Período coleta	Micro-Organismo Detectado	Taxa (cel.L <sup>-1</sup> )	Bioensaio artemia 10% (% letalidade)	Bioensaio artemia 100% (% letalidade)	Ensaio fosfatase 10% (% Inibição)	Ensaio fosfatase 100% (% inibição)
-	<b>Liofilizado de <i>M. aeruginosa</i> (NPLJ-4)*</b>	-	73	93	76	72
Agosto 2013	<i>Gymnodinium</i> spp	120	90	90	100	35
Outubro 2013	<i>Dinophysis acuminata</i>	80	0	83	42	55
Novembro 2013	<i>Dinophysis acuminata</i>	40	7	70	42	20
Dezembro 2013	<i>Dinophysis acuminata</i>	40	50	7	70	37
Janeiro 2014	<i>Dinophysis acuminata</i>	120	70	74	74	48
	<i>Gymnodinium</i> spp	5200				
Fevereiro 2014	Sem espécies potencialmente tóxicas	0	96	13	15	20
Maio 2014	<i>Dinophysis acuminata</i>	7040	100	96	33	42

\*Liofilizado de *Microcystis aeruginosa*, cepa NPLJ-4, material usado como fonte de microcistina-LR (controle positivo).

## 4 DISCUSSÃO

### *Teste com artemia*

O nosso estudo com náuplios de *Artemia franciscana* demonstrou toxicidade alta em extratos 100% de metanol, em amostras com presença do dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, produtor de toxinas lipofílicas, exceto em dezembro de 2013. O extrato metanólico 10% também mostrou toxicidade, entretanto em uma situação o efeito e toxicidade não corresponderam com presença de alga nociva, em fevereiro de 2014, e em outra não se observou efeito tóxico mesmo com presença de *D. acuminata* na amostra, caso de outubro de 2013. Com relação a amostra de fevereiro, após as 24 h do teste foi observado o formação de

e acúmulos depósitos de substância de aparência lipídica na região central do poço da placa de cultura, que pode ter provocado a morte dos náuplios por aprisionamento.

O uso de testes com artêmia se mostrou útil e foi avaliado de boa sensibilidade para se determinar a toxicidade de espécies nocivas num estudo realizado no Norte do Mar Jônico (Mar Mediterrâneo) quando testes com náuplios de artêmia foram aplicados comparativamente em conjunto com avaliações de interferência de ficotoxinas no desenvolvimento larvar de ouriço do mar (*Paracentrotus lividus*) e em testes de hemólise em eritrócitos humanos para se avaliar a toxicidade das seguintes espécies de dinoflagelados *Amphidinium carterae*, *Coolia monotis* e *Ostreopsis ovata* (PAGLIARA e CAROPPO, 2012). Estudos comparativos de toxicidade dos efeitos de diferentes concentrações de *Ostreopsis ovata* sobre náuplios de artêmia e larvas de peixes foram feitos e os resultados apontaram que os náuplios de artêmias são um organismo teste adequado por serem bastante sensíveis (FAIMALI et al., 2012). O teste com náuplius de artemia foi eficiente na avaliação de toxicidade de diatomáceas (*Skeletonema costatum* e *Nitzschia commutata*) e aldeídos de cadeia curta, neste caso também foi usado como teste o sucesso de eclosão dos cistos como forma de avaliar a toxicidade (CALDWELL et al., 2003). Entretanto, foi observada baixa toxicidade aguda em náuplios de artemia quando os mesmos foram submetidos a cepas de *Pseudochattonella* e *Chattonella marina*, que são Ictiotóxicas (SKJELBRED et al., 2011; MARSHALL et al., 2000).

### **Ensaio enzimático com fosfatase total de náuplios de artemia**

O ensaio de enzima fosfatase é classicamente utilizado para a detecção de microcistinas de cianobactérias e ácido ocaidaico de algumas espécies de dinoflagelados (TRANTIS et al., 2010; EBERHART et al., 2013). Comparando-se o ensaio de inibição de fosfatase (PP2A) de um kit comercial com métodos de referência, tais como: bioensaio com camundongos e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorimétrica (HPLC-FLD), utilizando BAP como reagente de derivação pré-coluna, não foram observados resultados contraditórios (PRASSOPOULOU et al., 2009). Em nosso trabalho, não foi observado nenhuma grande inibição destas enzimas nas amostras testadas com extrato 100%. Observou-se um padrão de inibição em torno de 50% nas amostras que continham *D. acuminata*. Este resultado, apesar de não ser conclusivo, confere com a literatura: Garibo et al. (2012) analisando mexilhões e ostras coletadas na Catalúnia e na Galícia também não obteve mais que 50% de inibição das fosfatases 2A obtidas por engenharia genética e das

purificadas de hemácias humanas em amostras que possuíam acumuladas toxinas lipofílicas. Um dos possíveis motivos para que a inibição não seja tão alta, talvez esteja na solubilização da amostra que não utilizou um solvente adequado, apenas solução tampão para ressuspender o extrato 100% de metanol. Algo que não ocorreu no teste com artêmia, na qual o extrato foi ressuspensionado em água de artêmia com 0, 1% de etanol. Entretanto não se pode descartar a possibilidade da existência de alguma outra toxina presente nos tecidos e que cuja ação não seja inibir a fosfatase, mas tenha outro mecanismo de ação deletério. Esta toxina poderia ter se acumulado nestes tecidos em alguma floração anterior ao período das coletas e avaliações taxonômicas e ainda não ter sido totalmente depurada dos mexilhões.

Nos testes de inibição com extrato 10% não foi observado um padrão definido com presença de determinada espécie de fitoplâncton. Entretanto, amostras com presença de *Gymnodinium* spp as inibições foram mais altas. Este fato levanta a hipótese destas amostras conterem algum inibidor fosfatásico com características hidrofílicas. Espécies do gênero *Gymnodinium* podem produzir saxitoxinas, brevetoxinas que causam NSP, bem como a Gymnodimina (gymnodimine – GYM), um composto tóxico do qual se conhece quatro variantes (HARJU et al., 2016) e que apesar de não estar relacionada às síndromes mais estudadas, é capaz de induzir resultados falsos positivos para as toxinas causadoras de DSP e NSP em bioensaios com camundongos (RHODES et al., 2001). No México há registros de intoxicações e mortes causadas por florações de espécies de *Gymnodinium* desde a década de 1970, relatadas por Mee et al. (1986), sendo *Gymnodinium catenatum* uma das espécies cujas florações são responsáveis por provocar mortes devido a PSP na costa oeste daquele país (LEWITUS et al., 2012).

Embora as correlações entre os testes de inibição de fosfatase e o bioensaio com náuplios de artêmia não tenham sido altas, vislumbramos um amplo campo de ajustes metodológicos que possam ser aplicados nos assim chamados testes de alarme, bastando que se ajuste a técnica de forma a evitar falsos positivos, como o que possivelmente tenha ocorrido com os resultados de fevereiro de 2014. No tocante ao desenvolvimento ou aprimoramento de métodos alternativos, aumenta-se a percepção na qual, métodos de referência, podem em alguns casos, ser totalmente substituídos em sua aplicação por métodos alternativos. Um exemplo disso foi a constatação de 100% de concordância entre os resultados do método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorométrica (HPLC-FLD) usando ADAM como reagente de derivação pré-coluna com o método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS / MS) para

detecção de ácido ocadaico e a concordância dos resultados cada um destes métodos em 97,1% com o bioensaio de camundongos (LOUPPIS et al., 2010).

A presença de *D. acuminata* pode estar associada a altas taxas mortalidade de náuplios de artêmia (principalmente no extrato 100%) em 4 dos 5 meses em que estava presente na amostra, podendo também ser responsável pela inibição da atividade de fosfatase em torno de 50% em 3 dos 5 meses em que fora detectada sua presença. Foi observada alta taxa de mortalidade de náuplios de artêmia tanto nos extratos de 10% quanto nos de 100% quando detectada a presença do gênero *Gymnodinium* nos estudos de identificação de fitoplâncton, havendo também alta taxa de inibição de atividade de fosfatase quando este gênero estava presente.

Vislumbra-se a possibilidade de que os dois métodos aplicados neste estudo possam se tornar métodos de alarme para auxiliar a tomada de decisão dos responsáveis pela atividade de maricultura, seja o próprio maricultor ou o órgão fiscalizador da atividade. Hess (2010) ressalta que um eficiente teste de alarme (screening) deve ser capaz de detectar grande número de compostos e em níveis baixos o suficiente para alertar o produtor de potencial problema para que se faça a opção de encaminhar as amostras para testes confirmativos. Nesta revisão ainda, o autor faz uma crítica sobre a utilização de testes que são limitados na detecção de amplo grupo de compostos químicos com potencial tóxico, como por exemplo, o bioensaio com camundongos (MBA).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado com objetivo de aplicar métodos alternativos que possam ser incorporados na rotina de programas de monitoramento de ficotoxinas em moluscos bivalves cultivados em fazendas marinhas apontou para algumas direções. O teste toxicológico com *Artemia franciscana* foi eficiente na demonstração de letalidade de extratos de hepatopâncreas de mexilhões extraídos com metanol 100%, sendo condizente com a presença de espécies produtoras de ficotoxinas lipofílicas. Entretanto com os extratos metanólicos 10%, os náuplios de artêmia não seguiram este mesmo padrão, sendo esperado que sua aplicabilidade em relação a toxinas hidrofílicas fosse de fato mais adequada.

O ensaio com fosfatases extraídas de náuplios de artêmia não apresentou altas inibições com extratos de hepatopâncreas de mexilhões a metanol 100%. Contudo, as inibições apresentadas foram condizentes com presença de *D. acuminata*, espécie produtora de ficotoxinas lipofílicas. Já as inibições de fosfatase com extratos de hepatopâncreas de mexilhões extraídos

com metanol 10% foram mais altas, com aparente (mas não confirmada) ligação com *Gymnodinium* spp.

As correlações entre as duas metodologias não foram adequadas quando se parte do pressuposto de se objetivar o uso consorciado destas como metodologias complementares para detecção de ficotoxinas. Entretanto, são necessários novos estudos de ajuste das metodologias de extração de ficotoxinas e do ensaio enzimático, visto que tais métodos, mesmo que em usos não consorciados, mostram-se potencialmente úteis e promissores como metodologias de alarme na detecção de potencial contaminação de carne de moluscos, podendo estes vir a ser ferramentas importantes na prevenção de ocorrências de intoxicações e prejuízos ainda maiores nas indústrias pesqueiras e do turismo.

## 6 BIBLIOGRAFIA

AMARANTE, C. B.; MOURA, P. H. B.; UNO, W. S.; PRADO, A. F. P. 2011. Toxicity in *Artemia salina* of fractions derived from dichloromethane extract obtained from leaves of *Montrichardia linifera* (Arruda) schott, Araceae. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7 (12);

ANSELMO, H. M. R.; KOERTING, L.; DEVITO, S.; VAN DEN BERG, J. H.J.; DUBBELDAM, M.; KWADIJK, C.; MURK, A. J. Early life developmental effects of marine persistent organic pollutants on the sea urchin *Psammechinus miliaris*, Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, Issue 8, p.2182-2192, 2011..

AOAC. 2000. Paralytic shellfish poison. Official Methods 959.08. Association of Official Analytical Chemists. USA. Arlington. p. 59-61.

ASTUYA, A.; RAMÍREZ, A. E.; ABALLAY, A. ARAYA, J.; SILVA, J.; ULLOA, V.; FUENTEALBA, J. 2015. Neurotoxin-like compounds from the ichthyotoxic red tide alga *Heterosigma akashiwo* induce a TTX-like synaptic silencing in mammalian neurons, Harmful Algae, v. 47, p.1-8.

AZEVEDO, S. M. F. O.; VASCONCELOS, V. M. 1998. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina on line**, 3(1), 1-19.

BARBIERI, E. 2009. **O Perigo das Biotoxinas Marinhas**. Instituto de Pesca, São Paulo.

BAINY, A.C.D. 2013. Toxicidade de ficotoxinas em organismos aquáticos. Reunião latino-americana sobre algas nocivas. Florianópolis, 7 a 9 de outubro de 2013.

BEMAN, J.M., ARRIGO, K.R., MATSON, P.A., 2005. Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature* 434, 211–214.



BIALOJAN, C.; TAKAI, A., 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. **Biochemical Journal**, v. 256, n. 1, p. 283-290.

BRASIL, 2012. Instrução normativa interministerial nº 7, de 8 de maio de 2012 - Ministério da Pesca e Aquicultura e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil de 09/05/2012**. Seção 1, p. 55-59.

BOUAÏCHA, N.; MAATOUK, I.; VINCENT, G.; LEVI, Y. 2002. A colorimetric e fluorimetric microplate assay for the detection of microcystin LR in drinking water without preconcentration. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1677-1683.

BRICELJ, V.M.; SHUMWAY, S.E. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and bio-transformation. *Rev Fish Sci* 6, p. 315–383.

BUTRON, A.; ORIVE, E.; MADARIAGA, I. 2011. Potential risk of harmful algae transport by ballast waters: The case of Bilbao Harbour. *Marine Pollution Bulletin*. v. 62, n. 4, p. 747-757.

CALDWELL, G.S.; BENTLEY, M.G.; OLIVE, P.J.W. 2003. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes, *Toxicon*, v. 42, n. 3, p. 301-306.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol* v.2 p. 1-5.

CASTRO, N. O.; MOSER, G. A. O. 2012. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. *Oecologia Australis*. 16(2): 235-264, Junho 2011.

CHANG, F. H.; GALL, M. 2013. Pigment compositions and toxic effects of three harmful *Karenia* species, *Karenia concordia*, *Karenia brevisulcata* and *Karenia mikimotoi* (Gymnodiniales, Dinophyceae), on rotifers and brine shrimps, *Harmful Algae*, v. 27, p. 113-120.

CHOUTEAU, C.; DZYADEVYCH, S.; DURRIEU, C.; CHOVELON, J-M. 2005. A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 21, Issue 2, p. 273-281.

DAWSON, R.M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* v. 36, n. 7, p. 953-962.

DOUCET, E.; ROSS, N. N.; QUILLIAM, M. A. 2007. Enzymatic hydrolysis of esterified diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v.389 (1), 335-342.

D'ORS, A.; BARTOLOMÉ, M. C.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. 2014. Risk associated with toxic blooms of marine phytoplankton functional groups on *Artemia franciscana*. *Journal of Coastal Life Medicine* 2014; 2(8): 625-631.

DYSON, K; HUPPERT, D. D. 2010. Regional economic impacts of razor clam brach closures due to harmful algal bloom (HABs) on the Pacific coast of Washington. *Harmful algae*. V. 9, n.13, p. 264–271.

EBERHART, B.T.L.; MOORE, L.K.; HARRINGTON, N.; ADAMS, N.G.; BORCHERT, J.; TRAINER, V.L. Screening Tests for the Rapid Detection of Diarrhetic Shellfish Toxins in Washington State. **Marine Drugs** v.11, n.10, p. 3718 -3734, 2013

FAIMALI, M., GIUSSANI, V., PIAZZA, V., GARAVENTA, F., CORRÀ, C., ASNAGHI, V., PRIVITERA, D., GALLUS, L., CATTANEO-VIETTI, R., MANGIALAJO, L., CHIANTORE, M. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. **Mar. Environ. Res.** 76, 97–107, 2012.

FAO, 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Disponible em: <<http://www.aqua.cl/wp-content/uploads/sites/3/2016/07/a-i5555s.pdf>> Acceso em: 23/08/2016.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E. T.; CONTE JUNIOR, C. A.; MARQUES JÚNIOR, A. N.; MANO, S. B.; SÃO CLEMENTE, S. C. 2013. Contaminação por metais traço em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. *Ciência Rural*, 43(6), junho. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782013000600011](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000600011)> Acesso em: 09/11/2015.

GARCÉS, E.; MASÓ, M.; VILA, M. & CAMP, J. HABs events in the Mediterranean Sea: Are they increasing? A case study the last decade in the NW Mediterranean and the genus *Alexandrium*. **Harmful Algal News**, 20: 1-11, 2000.

GARIBO, D.; DÀMASO, E.; EIXARCH, H.; LA IGLESIA, P.; FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M.; DIOGÈNE J.; PAZOS, Y.; CAMPÀS, M. Protein phosphatase inhibition assays for okadaic acid detection in shellfish: Matrix effects, applicability and comparison with LC–MS/MS analysis. **Harmful Algae**, v. 19, p. 68-75, 2012.

GILBERT, P.M. & PITCHER, G. 2001. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms Science Plan. SCOR & IOC, Baltimore & Paris. 100p. Disponível em <<http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/3987/GEOHAB+1+SciPlan+01.pdfsequence=1>> Acesso em 01/09/2016.

HALLEGRAEFF, G.M. 2003. Harmful algal blooms: a global overview. In: ALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA A.D. (eds.). **Manual on Harmful Marine Microalgae**. IOC Manuals and Guides, UNESCO, Paris, France 33p.

HALLEGRAEFF, G.M. 2010. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology*, 46(2): 220- 235.

HAYAT, A.; BARTHELMEBS, L.; MARTY, J-L. . A Simple Colorimetric Enzymatic-Assay for Okadaic Acid Detection Based on the Immobilization of Protein Phosphatase 2A in Sol-Gel. *Appl Biochem Biotechnol* 166:47–56, 2012.

HEGARET, H. et al. Potential transport of harmful algae via relocation of bivalve molluscs. *Marine Ecology-Progress Series*. V. 361, p. 169-179, 2008.

HESS, Philipp. Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1683-1694, 2010.

IKEHARA, T.; IMAMURA, S.; YOSHINO, A.; YASUMOTO, T. PP2A Inhibition Assay Using Recombinant Enzyme for Rapid Detection of Okadaic Acid and Its Analogs in Shellfish. *Toxins (Basel)*. v. 2(1), p. 195-204, 2010.

KRISHNAKUMAR, P. K.; SASIKUMAR, G.; BHAT, G. S.; ASOKAN, D. P. K. Biomarkers of environmental contaminants in field population of green mussel (*Perna viridis*) from Karnataka–Kerala coast (South West coast of India). **Ecotoxicology** 15: 347-352, 2006.

LAUCKNER, G. Diseases of mollusca: bivalvia. In: KINNE, O. (Ed.). *Diseases of Marine Animals*. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland. Vol 2, p. 1028, 1983.

LEWITUS, A. J.; HORNER, R. A.; CARON, D. A.; GARCIA-MENDOZA, E.; HICKEY, B. M.; HUNTER, M.; HUPPERT, D. D.; KUDELA, R. M.; LANGLOIS, G. W.; LARGIER, J.L.; LESSARD, E.J.; RALONDE, R.J.; JACK RENSEL, J.E.; STRUTTON, P.G.; TRAINER, V.L.; TWEDDLE, J.F. Harmful algal blooms along the North American west coast region: History, trends, causes, and impacts. *Harmful Algae* 19: 133–159, 2012.

LOPES, V. R.; FERNÁNDEZ, N.; MARTINS, R. F.; VASCONCELOS, V. Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Marine Drugs*, 8(3): 471-482, 2010.

LOUPPIS; A.P.; BADEKA, A.V.; KATIKOU, P.; PALEOLOGOS, E.K.; KONTOMINAS, M.G. Determination of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and related esters in Greek mussels using HPLC with fluorometric detection, LC-MS/MS and mouse bioassay. *Toxicon* 55(4), p.724-33, 2010.

MACKENZIEA, L.; HOLLANDA, P.; McNABBA, P.; BEUZENBERGA, V.; SELWOODA, A.; SUZUKIB, T. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC–MS/MS analysis. *Toxicon* 40, p. 1321–1330, 2002.

MARSHALL, J.-A.; MUNDAY, B.; YOSHIZAWA, Y.; HALLEGRAEFF, G. Effect of irradiance on superoxide production by *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australia and Japan. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J.S., Lewis, R. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 316–319, 2000.

MASÓ, M.; GARCÉS, E.; PAGES, F. & CAMP, J. Drifting plastic debris as potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. *Scientia Marina*, 67: 107-111, 2003.

MEE, L.D.; DIAZ-GONZALEZ, G.; ESPINOSA-DAMIAN, M. Paralytic shellfish poisoning with *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Marine Environment Research*. 19: 77-92, 1986.

MELO JÚNIOR, M.; MARTINELLI FILHO, J. E. Larvas do Plâncton Marinho. In III Semana de Oceanografia, Minicurso: Formas Larvais do Plâncton. São Paulo, 26 a 28 de agosto de 2008. Universidade de São Paulo. Instituto Oceanográfico, 2008.

MESTROVIC, V.; PAVELA-VRANCIC, M. Inhibition of alkaline phosphatase activity by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor. *Biochimie* v.85, n.7, p. 647-650, 2003.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MACLAUGHLIN, J.L. Camarão de água salgada: um conveniente bioensaio geral para os componentes de plantas ativas. *J Med Planta Res*. 45:31-34, 1982.

OCHOA, V.; RIVA, C.; FARIA, M.; BARATA, C. Responses of B-esterase enzymes in oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted to pesticide contaminated bays from the Ebro Delta (NE, Spain). *Marine Pollution Bulletin* v 66, Issues 1–2, 15, p. 135-142, 2013.

MPA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. 2013, 60p.

PAGLIARA, P.; CAROPPO, C. Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia* cfr. *monotis* and *Ostreopsis* cfr. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon*, v. 60, n. 6, p. 1203-1214, 2012.

PRASSOPOULOU, E.; KATIKOU, P.; GOERGANTELIS, D.; KYRITSAKIS, A. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection. *Toxicon* v. 53, (2), p. 214–227, 2009.

PROENÇA, L. A. O.; MAFRA, L. L. Ocorrência de ficotoxinas na costa brasileira. In: SBFIC. (Org.). Formação de Ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos. Rio de Janeiro, p. 57-77, 2005.

PROENÇA, L. A. O.; FONSECA, R. S.; PINTO, T. O. Microalgas em área de cultivo do litoral de Santa Catarina. São Carlos: *RiMa*. 90 p, 2011.

RAMOS, V., VASCONCELOS, V. Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. *Mar. Drugs* 8, 2021–2037, 2010.

REGUERA, B., PIZARRO, G. Planktonic dinoflagellates that contain polyether toxins of the old “DSP complex”. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology Physiology, and Detection*. CRC Press, Boca Raton, pp. 257–284, 2008.

RESGALLA JR., C.; MORAES, R. B. C. Uso em ensaios ecotoxicológicos. In: RESGALLA JR., C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. (eds). *O Mexilhão *Perna perna* (L.)*. *Biologia, ecologia e aplicações*. Interciência, Rio de Janeiro, 2008. p. 253-267.

REYNOLDS, C.S. *Ecology Of Phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press. 2006.536p. RIVASSEAU, C.; RACAUD, P.; DEGUIN, A.; HENNION, M.C.. Development

of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* v.394, p. 243-257, 1999

RIVASSEAU, C.; RACAUD, P.; DEGUIN, A.; HENNION, M.C. Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 394: 243-257, 1999.

RHODES, L. L.; MACKENZIE, A. L.; KASPAR, H. F. TODD, K. E. Harmful algae and mariculture in New Zealand. *ICES Journal of Marine Science* 58: 398-403, 2001.

SASSOLAS, A.; CATANANTE, G.; HAYAT, A.; MARTY, J-L. Development of an efficient protein phosphatase-based colorimetric test for okadaic acid detection. *Analytica Chimica Acta* 702. p. 262– 268, 2011.

SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, Béatrice D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances*, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SASSOLAS, A.; HAYAT, A.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L. Detection of the marine toxin okadaic acid: Assessing seafood safety. *Talanta*, 105, p. 306-316, 2013.

SIMÕES, E. Impacto da floração da alga Nociva *Dinophysis acuminata* sobre o sistema imune de ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Perna perna* cultivados em Santa Catarina. 2011. 84p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Florianópolis, SC. 2011.

SKJELBRED, B.; HORSBERG, T.E.; TOLLEFSEN, K.E.; ANDERSEN, T.; EDVARDBSEN, B. Toxicity of the ichthyotoxic marine flagellate *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae, Heterokonta) assessed by six bioassays, *Harmful Algae*, V. 10, n. 2, p.144-154, 2011.

SOUZA, D. A. **Avaliação da toxicidade de mexilhões *Perna perna* (Linnaeu, 1758) e monitoramento fitoplanctônico em fazenda de maricultura da Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ** / Daniela Almeida de Souza. – Macaé, RJ: [s.n.], 2014. In Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, *campus Macaé*, 2014.

STEIDINGER, K.A., 1993. Some taxonomic and biological aspects of toxic dinoflagellates. In: Falconer, I.R. (Ed.), **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**. Academic Press, London, pp. 1–28.

STIRLING, D. Survey of historical New Zealand shellfish samples for accumulation of gymnodimine. *NZ J. Mar. Freshwat. Res.* 35, 851–857, 2001.

STRYER, L. *Bioquímica*, 4ª Edição. Editora Guanabara, 1996.

SUZUKI, T.; MIYAZONO, A.; BABA, K.; SUGAWARA, R.; KAMIYAMA, T.. LC–MS/MS analysis of okadaic acid analogues and other lipophilic toxins in single-cell isolates of several *Dinophysis* species collected in Hokkaido, japan. **Harmful Algae**, v. 8, n. 2, p. 233-238, 2009.

SUZUKI, T.; QUILLIAM, M.A. LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins. *Anal Sci.* 27(6) p. 571, 2011.

TRIANANTIS, T.; TSIMELI, K.; KALOUDIS, T.; THANASSOULIAS, N.; LYTRAS, E.; HISKIA, A. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters, *Toxicon*, V. 55, n. 5, p. 979-989, 2010.

VIEGAS, S. J. **Alterações do estado de saúde associadas a alimentação:** contaminação microbiológica dos alimentos. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância, 2009.

WU, S., DUAN, N., ZHANG, H., & WANG, Z.. Simultaneous detection of microcystin-LR and okadaic acid using a dual fluorescence resonance energy transfer aptasensor. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(5), 1303-1312, 2015.

YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; YAMAGUCHI, M.. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44(11): 1249-1255, 1978.

YASUMOTO, T., MURATA, M., 1993. Marine toxins. *Chemical Reviews* 93 (5), 1897–1909.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSADOURIAN, E.; PRUGH, T. "Estado do mundo 2013: a sustentabilidade ainda é possível." *Worldwatch Institute* (2013).

BARBIERI, E. **O Perigo das Biotoxinas Marinhas**. Instituto de Pesca, São Paulo, 2009.

CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 117-134, 2008.

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

DIAS, G. F.. Pegada ecológica e sustentabilidade humana. São Paulo: Gaia, 2006.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. 2004. Cultivo de mexilhões. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E. BELTRAME, E. *Aquicultura: Experiências Brasileiras*. Multitarefa Editora, Florianópolis, p. 221-250.

GASPARONI, G. A. X. O desenvolvimento sustentável ambiental: suas nuances economicas, políticas e sociais no Brasil. (2014).

GONÇALVES A. A. (Org.). Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

SASSOLAS, A.; HAYAT, A.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L. Detection of the marine toxin okadaic acid: Assessing seafood safety. *Talanta*, 105, p. 306-316, 2013.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A- CARTAS CONTROLE USANDO DODECIL SULFATO (SDS) PARA O BIOENSAIO COM *Artemia franciscana*.

→ 19/02/2016:

Amostra	Qt. Artêmia				Qt. de mortes 24h			
	A	B	C	T	A	B	C	T
Controle	10	10	10	30	1	0	2	3
12%	10	10	10	30	2	4	6	12
16%	10	10	10	30	6	6	7	21
21%	10	10	10	30	8	8	9	25
27%	10	10	10	30	8	10	8	26
35%	10	10	10	30	10	10	10	30

→ 11/03/2016:

Amostra	Qt. Artêmia				Qt. de mortes 24h			
	A	B	C	T	A	B	C	T
Controle	10	10	10	30	1	0	1	2
12%	10	10	10	30	5	4	4	13
16%	10	10	10	30	6	9	8	23
21%	10	10	10	30	10	10	10	30
27%	10	10	10	30	10	10	10	30
35%	10	10	10	30	10	10	10	30

→ 25/03/2016:

Amostra	Qt. Artêmia				Qt. de mortes 24h			
	A	B	C	T	A	B	C	T
Controle	10	10	10	30	1	1	1	3
12%	10	10	10	30	2	3	1	6
16%	10	10	10	30	4	4	4	12
21%	10	10	10	30	7	8	8	23
27%	10	10	10	30	9	8	10	27
35%	10	10	10	30	10	9	10	29