

Detecção de ácido ocadaico em cultivo de mexilhões *Perna perna*, Angra dos Reis, RJ

Okadaic acid detection in mussel cultivation *Perna perna*, Angra dos Reis, RJ

Geisi Ferreira Mariné^{I*} Pedro Paulo Oliveira Silva^{II} Gesilene Mendonça de Oliveira^{III}
Vanessa de Magalhães Ferreira^I

RESUMO

A ficotoxina ácido ocadaico (AO) é produzida por um grupo de microalgas conhecidas como dinoflagelados. Os mexilhões, ao se alimentarem dessas microalgas, acumulam a toxina em sua glândula digestiva, desencadeando a Síndrome ou Envenenamento Diarreico por Moluscos (EDM) no ser humano. Os sintomas se apresentam em torno de 30 minutos após o consumo do molusco contaminado, variando entre náuseas, dores abdominais, vômitos e diarreia. Quando a ingestão da toxina acontece em quantidades inferiores a $48\mu\text{g g}^{-1}$, os sintomas não se desenvolvem, porém seu consumo continuado favorece o surgimento de tumores no trato gastrointestinal em razão do poder carcinogênico do AO. Este estudo pretendeu detectar e quantificar a toxina diarreica AO em mexilhões *Perna perna* coletados entre os meses de maio e outubro de 2006. A detecção do AO nos mexilhões foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Fluorimétrica (CLAE-DF). Os resultados cromatográficos indicaram a presença da toxina AO em baixas concentrações, em todas as amostras de mexilhões obtidas de maio a outubro de 2006. Os resultados indicam a necessidade da elaboração e aplicação efetiva de um programa de controle higiênico-sanitário dos moluscos, assim como o monitoramento do ambiente aquático, objetivando, acima de tudo, a segurança da saúde pública.

Palavras-chave: toxina diarreica, bivalves, ficotoxinas, envenenamento diarreico por moluscos (EDM).

ABSTRACT

Okadaic acid (OA) is a phycotoxin produced by a group of microalgae known as Dino-flagellates. When mussels feed themselves from this micro seaweed the toxin accumulates in their hepatopancreas, triggering the Syndrome or Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) in the human being. The symptoms appear around 30 minutes after the consumption of contaminated mussels and include abdominal nausea, pains, vomits and diarrhea. When the toxin ingestion happens in amounts lower than $48\mu\text{g g}^{-1}$, the above described symptoms do not develop. However, the continued consumption favors the emergence of tumors in the gastrointestinal tract because of the high carcinogenic power of OA. This study aimed to detect and quantify the diarrhetic toxin OA in *Perna perna* mussels collected between May and October 2006. The detection of OA in the mussels was carried out through High Performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection (HPLC-FD). The chromatographic results indicate the presence of OA toxin in low concentrations in all the mussel samples gathered from May until October 2006. The results suggest the necessity of elaboration and effective application of a hygienic-sanitary mussel control program as well as environment monitoring, with the main aim of enhancing public health safety.

Key words: diarrhetic toxin, bivalves, phycotoxin, diarrhetic shellfish poisoning (DSP).

^IPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil. Endereço para correspondência: Rua C, nº 238, Rec. Lagoa, Jd. Belvedere, 27258510, Volta Redonda, RJ, Brasil. E-mail: gfmarine@ufrj.br.

^{II}Instituto de Tecnologia, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

Em muitos locais ao redor do mundo, as águas marinhas costeiras estão sofrendo com o aumento do índice de poluição por meio de efluentes industriais e domésticos, podendo configurar o gatilho para florações recorrentes de algas nocivas (SMAYDA, 1990). As Florações de Algas Nocivas (FAN) representam um risco em potencial aos maricultores, levando a perdas econômicas, e à saúde do consumidor, possibilitando a ocorrência de envenenamentos por toxinas produzidas pelas microalgas por meio da ingestão de mariscos contaminados. Embora existam estudos sobre a ecologia e distribuição do fitoplâncton no Brasil, pouco se conhece sobre os produtores de toxinas e os efeitos dessas toxinas nos consumidores de moluscos contaminados (PROENÇA et al., 1998).

Os moluscos bivalves (ostras, mexilhões e coquiles) são filtradores e concentram as toxinas produzidas pelo fitoplâncton (ou microalgas) em seus tecidos. No entanto, enquanto a toxina afeta muitos seres marinhos e o homem, os moluscos bivalves são imunes aos seus efeitos diretos (SCHANTZ, 1984).

No homem, a ingestão desses alimentos contendo ficotoxinas pode provocar diversos sintomas, desde gastrointestinais a neurológicos, sendo denominado envenenamento por moluscos. De acordo com a sua ação ou seus sintomas, o envenenamento por moluscos é classificado em grupos, e no envenenamento diarreico por moluscos (EDM) ou (*diarrhetic shellfish poisoning* - DSP) (YASUMOTO e MURATA, 1993) as toxinas envolvidas são o ácido ocaídoico (AO) e as dinofisistoxinas (DTX).

Diante da problemática apresentada, o presente trabalho objetivou detectar e quantificar a toxina diarreica AO em mexilhões *Perna perna* oriundos de cultivo localizado na enseada de Maciéis, baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro (RJ). As coletas foram realizadas em uma Fazenda de Maricultura, situada na baía da Ilha Grande, enseada de Maciéis. Essa área foi escolhida por vários fatores relevantes a este estudo: a região sofre influência da convergência das águas oceânicas, que entram pelo lado oeste da Ilha Grande, com as águas vindas do leste da baía de Sepetiba (SIGNORINI, 1980), possibilitando a contaminação dos mexilhões por microalgas nocivas. Outro fator foi a constatação que, nos últimos anos, o fluxo de navios se intensificou nas baías da Ilha Grande e de Sepetiba, aumentando o risco de introdução de espécies nocivas de microalgas via água de lastros de navios transoceânicos (RUIZ et al., 2000).

Durante os meses de maio a outubro de 2006, foram realizadas oito coletas, quando foram retiradas cordas de mexilhões do cultivo (uma corda por coleta)

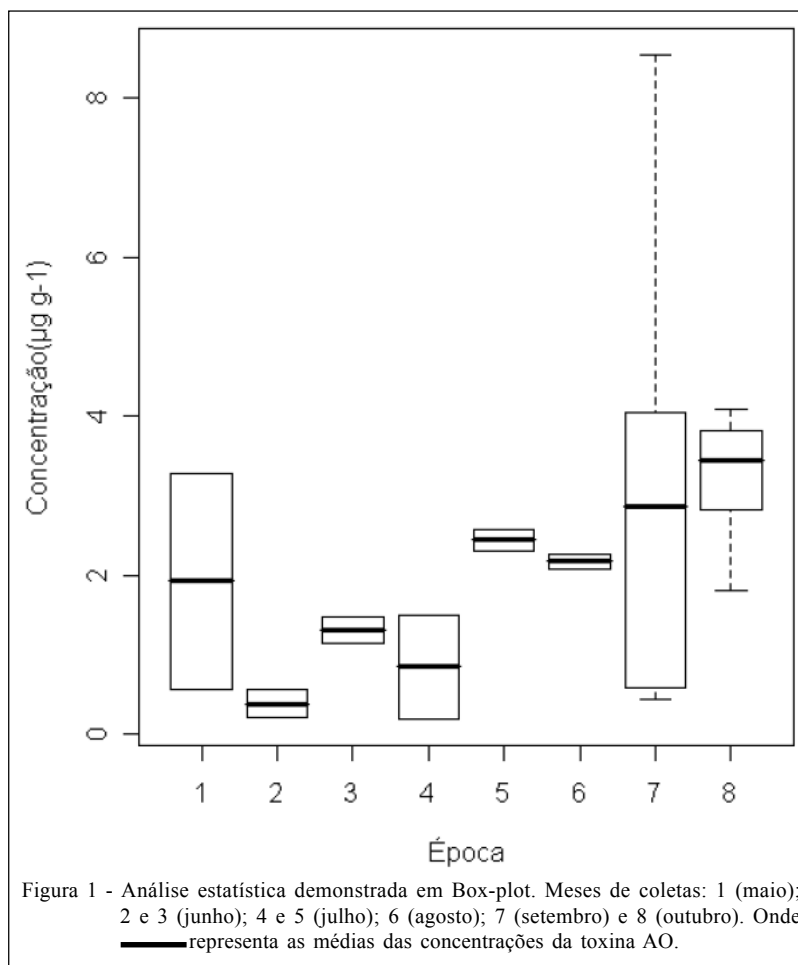
contendo em média 150 indivíduos adultos. Foram retirados 50 animais de cada corda, aleatoriamente, dos quais foram separadas as glândulas digestivas, totalizando 20 gramas, para a realização das análises. Após terem sido homogeneizadas, foi pesado um grama para a realização do método de extração da toxina AO (QUILLIAM, 1995). Para cada extração, foi feita uma réplica e realizada uma injeção de 20µl no sistema CLAE-DF. A toxina foi extraída segundo o procedimento recomendado pelo manual do *kit* comercial *SIGMA Culture Company* (1993) modificado por SILVA et al. (2003). Basicamente essa metodologia é composta por extração, derivação e detecção da toxina AO por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a análise cromatográfica, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com uma bomba Waters, modelo 510, detector de fluorescência Agilent, modelo 1100 Series e injetor de loop fixo de 20µL (Rheodyne).

Durante os meses de maio a outubro de 2006, todas as amostras analisadas apresentaram contaminação pela toxina AO em concentrações que variaram entre 0,20µg g⁻¹ e 8,54µg g⁻¹ de glândula digestiva. Esses valores situam-se acima do limite permitido para comercialização e consumo, segundo a União Europeia, que estipulou o nível máximo em 0,16µg g⁻¹ (do corpo todo ou alguma parte específica do molusco separadamente) (Decisão 2002/225/EC). Devido ao fato de as amostras terem sido analisadas em réplicas, os resultados foram demonstrados em médias durante os meses de coleta (Figura 1).

Apesar de as concentrações estarem abaixo do necessário para o desenvolvimento do envenenamento diarreico por moluscos, cerca de 48µg g⁻¹ de glândula digestiva, há o risco iminente da ocorrência de um evento tóxico. Além disso, outro fator relevante é o potencial carcinogênico associado à ingestão em baixas concentrações durante longo período, caracterizando assim o efeito crônico da toxina AO no trato gastrointestinal e em tecido hepático, como afirmam DARANAS et al. (2001).

A análise estatística demonstrada na figura 1 (*box-plot*) indica que as maiores concentrações da toxina AO ocorreram nos meses de setembro e outubro, meses pertencentes à estação da primavera, quando provavelmente houve alteração na temperatura da água do mar na região do cultivo, o que pode ter aumentado a concentração de microalgas e conseqüentemente a quantidade de toxinas acumuladas nos tecidos dos mexilhões.

MOURATIDOU et al. (2006) detectaram por CLAE os maiores níveis da toxina AO durante os meses de primavera, nos quais a temperatura pode ter sofrido



um acréscimo considerável e provavelmente esse fator contribuiu com o aumento da produção de toxinas por espécies fitoplancônicas, contaminando mexilhões do Golfo Thermaikos na Grécia.

LOURENÇO et al. (2007), durante os meses de março a maio de 2004, investigaram a possível presença da toxina AO em mexilhões *Perna perna* da enseada de Maciéis. Os autores detectaram o AO em apenas uma amostra no mês de março, quantificado em 2,65ng⁻¹ de glândula digestiva. Dessa forma, os mexilhões cultivados em Maciéis estariam aptos ao consumo humano, segundo as normas supracitadas. Em nosso país, no entanto, ainda não existe nenhum tipo de normatização em relação às toxinas produzidas por microalgas.

Na presente pesquisa, apesar de ser a mesma região do estudo realizado por LOURENÇO et al. (2007), o período observado foi maior, durante os meses de maio a outubro de 2006, totalizando oito coletas. Enquanto LOURENÇO et al. (2007) encontraram a toxina AO em somente um dos três meses estudados e na

unidade de ng g⁻¹ de glândula digestiva, no presente trabalho foi detectado o AO em todos os oito meses analisados e na unidade de µg g⁻¹ de glândula digestiva. Essa diferença indica que possivelmente tenham ocorrido florações nos dias próximos as coletas, causando uma maior concentração da toxina nos tecidos dos mexilhões em relação àquela observada anteriormente pelos autores em março de 2004.

Apesar dos resultados, a maricultura pode ser desenvolvida na região e ser uma atividade alavancadora ao desenvolvimento econômico devido ao potencial marinho da cidade; entretanto, há de se atentar para a necessidade de uma legislação vigente e um eficiente monitoramento por meio de análises periódicas, tanto da água do mar, quanto dos animais.

Nos Estados de Santa Catarina e do Rio de Janeiro, ocorreram florações de Algas Nocivas (FAN), inviabilizando temporariamente a comercialização de moluscos. Em Florianópolis, várias pessoas foram hospitalizadas com sintomas gastrointestinais e, por meio de bioensaio com ratos, foi identificada a toxina

AO, confirmando assim a ocorrência do Envenenamento Diarreico por Moluscos (EDM). Em Mangaratiba, diante do evento, a Secretaria Estadual do Ambiente suspendeu temporariamente o consumo de mexilhões até que se confirmem as espécies de fitoplâncton envolvidas na floração (PROENÇA et al., 2007; MOTTA, 2009). Esses exemplos justificam a necessidade de uma legislação nacional que, dentre outros fatores, determine quais são as análises fundamentais ao monitoramento.

Conclui-se, a partir dos resultados, que o EDM pode ocorrer na região estudada desde que haja um aumento na concentração de AO nos mexilhões cultivados pela multiplicação de células fitoplanctônicas ou pelo aumento da produção da toxina por cada célula destes organismos. Além do risco da ocorrência do EDM, há o risco da ação carcinogênica da toxina AO nos consumidores regulares, principalmente nos próprios maricultores que consomem o excedente da produção.

REFERÊNCIAS

- DARANAS, A. et al. Toxic Marine Microalgae. **Toxicon**, v.39, n. 8, p.1101-1132, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6TCS-42SGGF512K&_cdi=5178&_user=687350&_orig=browse&_coverDate=08%2F31%2F2001&_sk=999609991&view=c&wchp=dGLbVtzZSkWz&md5=6cc93a48e0e170a6dbe485640fa50431&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 2005. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.03.002.
- LOURENÇO, A.J. et al. Evidência de depuração natural da toxina diarreica ácido ocaidaico em mexilhões Perna perna (LINNÉ, 1758) cultivados em fazenda de maricultura na baía de ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.14, n.2, p.91-94, 2007. Disponível em: <<http://www.uff.br/rbcv/site/index.php/artigos/buscar>>. Acesso em: 2007.
- MOTTA, C. **Consumo de moluscos de Mangaratiba deve ser evitado**. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/rio/mat/2009/05/31/consumo-de-moluscos-de-mangaratiba-deve-ser-evitado-756119446.asp>. Acesso em: 25 jun. 2009.
- MOURATIDOU, T. et al. Detections of the marine toxin acid in mussels during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Thermaikos Gulf Greece, using biological, chemical and immunological methods. **Science of the total environment**, v.366, n.2, p.894-904, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6V78-4KB110G-R&_cdi=5836&_user=687350&_orig=search&_coverDate=08%2F01%2F2006&_sk=996339997&view=c&wchp=dGLzVlZSkzV&md5=55b1dddc4020f18675e1b8a144749f10&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 2007. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.03.002.
- PROENÇA, L.A.O. et al. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. **Harmful algae news, IOC/UNESCO**, n.33, p.19-20, 2007. Disponível em: <<http://unesdoc.unesco.org/images/0015/001528/152834e.pdf>>. Acesso em: 2008.
- PROENÇA, L.A.O. et al. Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.50, n.6, p.458-462, 1998.
- QUILLIAM, M.A. Analysis of DSP in shellfish for liquid chromatography with fluorimetric and detection mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v.78, n.2, p.555-570, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7756869>>. Acesso em: 2007.
- RUIZ, G.M. et al. Global spread of microorganisms by ships. **Nature**, v.408, p.49-50, 2000.
- SCHANTZ, E.J. Historical perspective on paralytic shellfish poison. **Reagilis**, v.262, p.99, 1984. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1984-0262.ch009>>. Acesso em: 2005. doi: 10.1021/bk-1984-0262.ch009.
- SIGMA CELL CULTURE COMPANY. **Okadaic acid detection kit**. USA – Canada, 1993. 10 p.
- SIGNORINI, L.C. A study of the circulation in Bay of Ilha Grande and of Sepetiba. Part I. A survey of the circulation based on experimental field data. **Boletim do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo**, v.29, n.1, p.41-55, 1980.
- SILVA, P.P.O. et al. Otimização de metodologia para detecção de ácido ocaidaico por cromatografia líquida de alta eficiência em moluscos bivalvos. **Higiene Alimentar**, v.17, n.114, p.29-33, 2003.
- SMAYDA, T.J. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic. **Toxic Marine Phytoplankton**, v.4, p.29-40, 1990.
- THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Official Journal of the European Communities**. Luxemburgo, 2002. 3p. (COMMISSION DECISION (2002/225/EC).
- YASUMOTO, T.; MURATA, M. Marine toxins. **Chemical Reviews**, n.93, p.1897-1909, 1993. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00021a011>. Acesso em: 2005. doi: 10.1021/cr00021a011.