

LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR

**MICROALGAS NOCIVAS E FICOTOXINAS NO COMPLEXO
ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PR: SUBSÍDIOS PARA O
MONITORAMENTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano F. Fernandes
Co-orientador: Prof. Dr. Luis A. O. Proença

**CURITIBA
FEVEREIRO/2005**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Mafra Júnior, Luiz Laureno
Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de
Paranaguá, PR subsídios para o monitoramento / Luiz Laureno
Mafra Júnior – Curitiba, 2005
xii, 159f il , 30cm

Orientador Luciano F Fernandes
Co-orientador Luiz A O Proença

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas **Programa de Pós-Graduação em
Botânica.**

1 Alga - Toxicologia 2 Fitoplâncton 3 Monitoramento
biológico I Título II Fernandes, Luciano Felício III Proença,
Luis Antonio de Oliveira IV Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas

CDD(20 ed) 581



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica
Centro Politécnico - Jardim das Americas – Caixa Postal 19031
Tel (41) 361-1625 - Fax (41) 266 2042
Curitiba - PR

“MICROALGAS NOCIVAS E FICOTOXINAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PR: SUBSÍDIOS PARA O MONITORAMENTO”.

por

LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR

**Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores**

Prof. Dr. Luís Antônio de Oliveira Proença (Co-Orientador-UNIVALI-SC)

Prof. Dr. Maria Céla Villac (Universidade de Taubaté-SP)

Prof. Dr. Frederico Pereira Brandini (UFPR)

Curitiba, 25 de fevereiro de 2005

LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR

**MICROALGAS NOCIVAS E FICOTOXINAS NO COMPLEXO
ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PR: SUBSÍDIOS PARA O
MONITORAMENTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano F. Fernandes
Co-orientador: Prof. Dr. Luis A. O. Proença

**CURITIBA
FEVEREIRO/2005**

*Dedico este trabalho ao mar e a todos
aqueles que, de alguma forma,
fazem dele sua fonte de
sustento e inspiração.*

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pelo provimento da bolsa de estudos que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho durante os dois últimos anos.

Ao Fundo Nacional do Meio Ambiente, financiador do Projeto ALARME, por custear as despesas de coleta e parte do material de laboratório utilizado nesta investigação. A todos os integrantes do projeto – Dr. Luciano Fernandes, Dr. Luís Proença, Dr. Rubens Lopes, MSc. Letícia Procopiak, MSc. Márcio Tamanaha, Patrícia Garbin, Patrícia Anderle e Rian Müller – pela integração e cooperação.

Aos meus orientadores, pela amizade, exemplos, ensinamentos e discussões que contribuíram para meu crescimento como profissional e ser humano. Ao Luís Proença, o Lux, por ter aberto uma série de oportunidades, ter compartilhado todo o seu conhecimento e sinceridade, por sua dedicação à Oceanografia e pelo clima de amizade, descontração e profissionalismo com que encara a relação com seus orientandos. Ao Luciano Fernandes, pela condução do Projeto ALARME mesmo sob constantes ventos contrários, por ter acolhido um *catarina* na UFPR, pelos ensinamentos, pelas longas e produtivas conversas e pelas inúmeras sugestões e valiosas críticas na elaboração da dissertação.

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Maria Célia Villac e Dr. Frederico Pereira Brandini, pelo profissionalismo, pelas produtivas discussões e valiosas contribuições à versão final do trabalho.

Ao Centro de Ciências Tecnológicas, da Terra e do Mar, da Universidade do Vale do Itajaí, por ter cedido o espaço físico, equipamentos e materiais em diversos laboratórios, imprescindíveis ao desenvolvimento deste trabalho. À Dr^a. Kátia Kuroshima, Dr. Charrid Resgalla Jr. e demais integrantes dos laboratórios de Oceanografia Química e Cultivo de Organismos Marinhos da UNIVALI, que apoiaram o desenvolvimento dos experimentos.

À Dr^a. Thelma Ludwig, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Botânica, pelos conselhos, sugestões e *puxões de orelha*; aos ensinamentos do restante do corpo docente do mestrado; e ao secretário Zé Carlos, pela eficiência e amizade.

A todos os alunos e estagiários que durante esse período passaram pelos laboratórios de Estudos sobre Algas Nocivas da Universidade do Vale do Itajaí e de Ficologia da Universidade Federal do Paraná, por sua amizade e contribuições pessoais ao trabalho. Ao Márcio Tamanaha, pelos auxílios nas coletas e nos experimentos de laboratório. À Letícia Procopiak, companheira de Projeto ALARME, pelo paciente trabalho de contagem das amostras bimestrais de plâncton e por dividir os trabalhos de campo e de microscopia eletrônica. À Renata Fonseca, pela colaboração nas análises de ASP e nas intermináveis sessões de cromatografia. À Rafaela, Robson e Marcus, por terem me auxiliado com os testes de toxicidade. Ao

Thiago e Tatiana, pela ajuda nas análises de clorofila-*a* e nutrientes. À Patrícia, do LOQ, pelo apoio prestado durante dias inteiros de análise dos nutrientes. À Dr^a. Cláudia Omachi, pelas valiosas discussões e sugestões para o trabalho e, sobretudo, pelas dicas como pesquisadora.

Ao LACTEC e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFPR, especialmente ao Prof. Nei, pelo exaustivo trabalho e pelas fotos de excelente qualidade tiradas durante as várias sessões de microscopia eletrônica, quando o material permitia... Ao Biol. Lício Domitch do IBAMA de Paranaguá e ao Eng. Evanildo da EMATER, pelo valioso apoio nas coletas de plâncton e sururu nos mangues da Baía de Paranaguá. Aos pescadores das comunidades ribeirinhas que participaram de tais coletas.

Ao pessoal do CEM, especialmente Dr. Frederico Brandini, Dr^a. Eunice Machado e MSc. Nilva Brandini, pela experiência repassada em estudos na Baía de Paranaguá e pela colaboração na coleta realizada em conjunto com o Projeto Milenium, em abril de 2003. A todos os colegas que me acolheram em Pontal do Sul durante minhas estadas, principalmente aos do Laboratório de Ictiologia, Robert, Helen e Paulista.

Ao Sr. Hamilson e equipe da Marina Pontal do Sul, pelo apoio nas coletas do Projeto ALARME e por terem possibilitado a instalação de um mini-laboratório para o processamento rápido das amostras.

À Dr^a. Edna Granéli e Dr. Paulo Salomon, da Universidade de Kalmar, Suécia, pelas valiosas sugestões para os testes de toxicidade, pela pronta atenção e envio de vasto material bibliográfico.

Ao Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo fornecimento das pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* para os testes de toxicidade com *Heterosigma akashiwo*.

À SCOR e à ISSHA, nas pessoas do Dr. Ed Urban e Henrik Enevoldsen, pelo suporte financeiro que permitiu a divulgação deste trabalho na XI International Conference on Harmful Algal Blooms, de grande valia para as discussões aqui levantadas.

Aos companheiros de mestrado que atravessaram (quase) ilesos essa etapa juntos, principalmente Luís Henrique, Cris, Renata, Rodrigo e Igor, pelas horas de descontração. À minha família e amigos, pelo apoio, companheirismo e compreensão nos instantes de ausência; por terem proporcionado muitos momentos de alegria, não permitindo que eu desanimasse nunca. À minha irmã e aos meus pais, pelos exemplos de vida, pelo incentivo, carinho e por terem entendido e suportado em casa um estudante até os 25. À minha noiva Fran, pelo apoio nos momentos mais difíceis, por compartilhar tanto as alegrias e realizações, como as frustrações e incertezas com o mesmo amor e dedicação. A Deus. Obrigado a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3 ÁREA DE ESTUDO	9
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Plano amostral	11
4.2 Variáveis ambientais	12
4.2.1 Dados pluviométricos	12
4.2.2 Variáveis físicas	13
4.2.3 Nutrientes	14
4.3 Clorofila-a	14
4.4 Microalgas nocivas	15
4.4.1 Amostras preservadas: análise qualitativa e quantitativa	15
4.4.2 Amostras vivas: estabelecimento de cultivos	16
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.....	18
Análise de ácido domóico por cromatografia líquida	18
<i>Gymnodinium catenatum</i>	20
Análise de toxinas paralisantes por cromatografia líquida	20
Teste de toxicidade aguda em camundongos.....	22
<i>Heterosigma akashiwo</i>	22
Teste de toxicidade com juvenis de <i>Mysidopsis juniae</i>	23
Teste de toxicidade embrio-larval com <i>Perna perna</i>	24
Teste de toxicidade com pós-larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	25
Tratamento dos dados	26
4.5 Ficotoxinas no molusco <i>Mytella guyanensis</i>	27
4.5.1 Detecção de toxinas do PSP.....	28
4.5.2 Detecção de toxinas do DSP	29
Teste de toxicidade aguda com camundongos	29
Confirmação por cromatografia líquida	30
4.5.3 Detecção de toxinas do ASP.....	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Oscilações espaciais e temporais nas variáveis ambientais e clorofila-a ...	33
5.2 Microalgas nocivas e ficotoxinas	42
5.2.1 Microalgas produtoras do ASP	42
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.....	42
5.2.2 Microalgas produtoras do PSP	48
<i>Gymnodinium catenatum</i>	48
5.2.3 Microalgas produtoras do DSP	56
<i>Dinophysis acuminata</i>	56

5.2.4	Microalgas envolvidas em mortalidades de animais marinhos.....	59
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	59
	<i>Chattonella</i> spp.....	64
	<i>Prorocentrum minimum</i>	65
	<i>Phaeocystis</i> spp.	66
5.2.5	Outras microalgas nocivas	67
	<i>Coscinodiscus wailesii</i>	67
	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	67
6	DISCUSSÃO	69
6.1	Oscilações espaciais e temporais nas variáveis ambientais e clorofila-a... 69	69
6.2	Microalgas nocivas e ficotoxinas	71
6.2.1	Microalgas produtoras do ASP	71
	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.....	71
6.2.2	Microalgas produtoras do PSP	84
	<i>Gymnodinium catenatum</i>	84
6.2.3	Microalgas produtoras do DSP	92
	<i>Dinophysis acuminata</i>	92
6.2.4	Microalgas envolvidas em mortalidades de animais marinhos.....	99
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	99
	<i>Chattonella</i> spp.....	107
	<i>Prorocentrum minimum</i>	111
	<i>Phaeocystis</i> spp.	115
6.2.5	Outras microalgas nocivas	120
	<i>Coscinodiscus wailesii</i>	120
	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	122
7	BASES PARA O MONITORAMENTO DE MICROALGAS NOCIVAS E FICOTOXINAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ.....	125
8	CONCLUSÕES	139
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
	ANEXOS	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do local de estudo, o complexo estuarino de Paranaguá, PR.....	10
Figura 2 - Fluxograma mostrando a seqüência de atividades desenvolvidas após a coleta em uma estação amostral no complexo estuarino de Paranaguá	13
Figura 3 - Fotomicrografia da larva-D do molusco bivalve <i>Perna perna</i> cerca de 48 horas após sua fecundação	25
Figura 4 - Pluviosidade mensal no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.	33
Figura 5 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 1, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.	35
Figura 6 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 2, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.	36
Figura 7 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 3, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.	37
Figura 8 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 4, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.	39
Figura 9 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 5, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.	40
Figura 10 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 6, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.	41
Figura 11 - Densidade celular de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.	43
Figura 12 - Fotomicrografia eletrônica de varredura evidenciando a alteração na frústula de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp. (cepa Pnz-2), após cerca de 4 meses de cultivo em laboratório	44
Figura 13 - Curva de crescimento celular de uma cepa de <i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>multiseriis</i> (cepa Pnz-4) isolada do complexo estuarino de Paranaguá, PR	45
Figura 14 – Cromatogramas de fluorescência para a detecção de ácido domóico (padrão e controle)	46
Figura 15 - Cromatogramas de fluorescência para a detecção de ácido domóico em amostras de cepas cultivadas da diatomácea <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.....	46
Figura 16 - Espectro de absorção em luz ultra-violeta do ácido domóico derivatizado (AD-FMOC) no padrão e na cepa de <i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>multiseriis</i>	47

Figura 17 - Densidade celular e concentração intracelular e extracelular de ácido domóico em uma cepa cultivada da diatomácea <i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>multiseriis</i>	48
Figura 18 - Densidade celular de <i>Gymnodinium catenatum</i> em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.....	49
Figura 19 - Curva de crescimento celular de uma cepa de <i>Gymnodinium catenatum</i> isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC.....	50
Figura 20 - Cromatogramas de fluorescência para a detecção de padrões de toxinas paralisantes pelo método de derivatização pós-coluna.....	51
Figura 21 - Cromatogramas de fluorescência para a detecção de toxinas paralisantes em amostras de <i>Gymnodinium catenatum</i> , cepa isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, em diferentes fases do crescimento em cultivo.....	52
Figura 22 - Produção de toxinas paralisantes por célula em uma cepa de <i>Gymnodinium catenatum</i> isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, em diferentes fases do crescimento em cultivo.....	54
Figura 23 - Toxicidade de uma cepa de <i>Gymnodinium catenatum</i> , em diferentes fases do crescimento em cultivo, medida sob diferentes métodos de análise – cromatografia e teste de toxicidade com camundongos.....	56
Figura 24 - Densidade celular de <i>Dinophysis acuminata</i> em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.....	57
Figura 25 – Cromatogramas de fluorescência para a detecção de ácido ocadáico – padrão, controle e amostra de hepatopâncreas de sururu (<i>Mytella guyanensis</i>).....	58
Figura 26 - Curva de crescimento celular de uma cepa de <i>Heterosigma akashiwo</i> isolada do complexo estuarino de Paranaguá, PR.....	60
Figura 27 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações da rafidofícea <i>Heterosigma akashiwo</i> sobre juvenis de misidáceo <i>Mysidopsis juniae</i>	61
Figura 28 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações da rafidofícea <i>Heterosigma akashiwo</i> sobre larvas do molusco <i>Perna perna</i>	62
Figura 29 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações da rafidofícea <i>Heterosigma akashiwo</i> sobre pós-larvas (PL-22) de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	63
Figura 30 - Densidade celular de <i>Chattonella</i> spp. em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.....	65
Figura 31 - Densidade celular de <i>Prorocentrum minimum</i> em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.....	66

- Figura 32 - Densidade celular de *Phaeocystis* spp. em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003. 67
- Figura 33 - Densidade celular de *Coscinodiscus wailesii* em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003. 68
- Figura 34 - Densidade celular de *Trichodesmium erythraeum* em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos principais envenenamentos humanos causados por toxinas de microalgas.....	3
Tabela 2 - Localização das estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR, mostrando as coordenadas geográficas e pontos de referência.....	11
Tabela 3 - Concentração de toxinas paralisantes e percentual de representatividade de cada toxina em uma cepa de <i>Gymnodinium catenatum</i> isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC.....	53
Tabela 4 – Toxicidade absoluta e relativa das toxinas paralisantes em uma cepa de <i>Gymnodinium catenatum</i> isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, em diferentes fases do crescimento em cultivo	53
Tabela 5 - Resultados dos testes de toxicidade aguda com uma cepa de <i>Gymnodinium catenatum</i> isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, sobre camundongos do tipo suíço	55
Tabela 6 - Valores de pH e oxigênio dissolvido em diferentes tratamentos aplicados no teste de toxicidade de <i>Heterosigma akashiwo</i> em juvenis de <i>Mysidopsis juniae</i>	61
Tabela 7 - Valores de pH e salinidade em diferentes tratamentos aplicados no teste de toxicidade de <i>Heterosigma akashiwo</i> em larvas de <i>Perna perna</i>	62
Tabela 8 - Valores de oxigênio dissolvido e pH, em cada uma das réplicas dos diferentes tratamentos aplicados no teste de toxicidade de <i>Heterosigma akashiwo</i> em pós-larvas (PL-22) de <i>Litopenaeus vannamei</i>	64
Tabela 9 - Quadro comparativo entre a produção de ácido domóico por cepas das 11 espécies tóxicas de <i>Pseudo-nitzschia</i> , em diferentes investigações e locais de origem	77
Tabela 10 – Quadro comparativo entre perfis de toxinas paralisantes de diferentes cepas de <i>Gymnodinium catenatum</i>	90
Tabela 11 - Microalgas potencialmente nocivas encontradas no complexo estuarino de Paranaguá, períodos de maior abundância, concentrações celulares máximas, data de registro e potenciais efeitos deletérios - agosto de 2002 a outubro de 2003	126
Tabela 12 - Plano de ações proposto para o monitoramento de ASP, DSP e PSP no complexo estuarino de Paranaguá, com base na contagem de algas potencialmente nocivas e concentração de toxinas em moluscos bivalves.....	129

RESUMO

As microalgas desempenham um importante papel ecológico atuando como produtores primários nos ecossistemas aquáticos. Entretanto, algumas espécies podem crescer intensivamente e formar florações com efeitos deletérios. No ambiente marinho, florações dessas microalgas nocivas podem causar a morte de organismos por depleção de oxigênio, danos físicos ou liberação de substâncias tóxicas. Podem, ainda, prejudicar o homem por causarem prejuízos econômicos às atividades da pesca, aquicultura e turismo, ou problemas de saúde pela contaminação de alimentos com suas toxinas, as ficotoxinas. Este trabalho integrou o Projeto ALARME (FNMA/PROBIO CVI 008/2002) e buscou quantificar a abundância de microalgas potencialmente nocivas no complexo estuarino de Paranaguá (CEP), PR, detectar a presença de ficotoxinas em moluscos filtradores e testar a toxicidade de algumas microalgas em laboratório. Para tanto, entre agosto de 2002 e outubro de 2003 foram realizadas dez amostragens aproximadamente bimestrais em seis estações de coleta dentro das baías de Paranaguá e Antonina. Foi coletada água em três estratos - superfície, meio e fundo - para a análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton, de variáveis ambientais e clorofila-*a*. O molusco filtrador “sururu” (*Mytella guyanensis*) foi amostrado em três locais para a análise do acúmulo de ficotoxinas paralisantes, diarréicas e amnésicas por meio de bioensaios e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Algumas cepas de microalgas potencialmente tóxicas foram isoladas de amostras do ambiente e cultivadas em laboratório. Seu crescimento foi medido e a toxicidade analisada por cromatografia líquida e testes com invertebrados marinhos e camundongos. Foram encontradas, durante o estudo, as seguintes microalgas que integram a lista de espécies potencialmente tóxicas da IOC/UNESCO – *Chattonella* spp., *Dinophysis acuminata*, *Gymnodinium catenatum*, *Heterosigma akashiwo*, *Phaeocystis* spp., *Prorocentrum minimum* e *Pseudo-nitzschia* spp. – além de outras microalgas potencialmente nocivas de importância local, como *Coscinodiscus wailesii* e *Trichodesmium erythraeum*. Em geral, a abundância e diversidade das algas nocivas foram maiores durante a primavera (outubro a dezembro) e entre o final do verão e início do outono (fevereiro a abril). Suas ocorrências foram mais importantes nas estações localizadas na foz do estuário e na região que divide as baías de Paranaguá e Antonina. Em dezembro de 2002, o teste para detecção de toxinas diarréicas (DSP) no molusco *M. guyanensis* teve um resultado positivo, associado à presença do dinoflagelado *D. acuminata* na água, em concentrações de até 4.566 cels.L⁻¹. Em cultivo, *H. akashiwo* foi tóxica para juvenis do misidáceo *Mysidopsis juniae* (CL₅₀: 1.821 ± 545 cels.mL⁻¹) e inibiu o desenvolvimento larval do molusco *Perna perna* (CE₅₀: 3.567 ± 294 cels.mL⁻¹). Confirmou-se, em cultivo, a produção de toxinas paralisantes (PSP), principalmente as do tipo N-sulfocarbamoil C-1 e C-2, em uma cepa de *G. catenatum*. A toxicidade máxima medida foi de 19,440 ± 3,094 µg STXeq. cel⁻¹. Das quatro cepas cultivadas de *Pseudo-nitzschia* spp., uma produziu a toxina amnésica (ASP) ácido domóico numa concentração de até 0,152 ± 0,022 µg.cel⁻¹. Esta investigação forneceu um panorama preliminar acerca da presença e distribuição das algas nocivas no CEP e confirmou a produção de toxinas amnésicas, diarréicas e paralisantes por microalgas que lá são encontradas. O trabalho apresentou, ainda, diretrizes para a elaboração e desenvolvimento de um programa de monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas no CEP.

PALAVRAS-CHAVE: algas nocivas, toxina, monitoramento, Paranaguá, fitoplâncton.

ABSTRACT

Microalgae have an important ecological role as primary producers in the aquatic environments. However, some species may grow intensively and form a harmful bloom. In marine environments, these blooms may kill animals by oxygen depletion, physical damages, or release of toxic substances. Furthermore, harmful algal blooms may also cause losses to economic activities such as fishing, aquaculture and tourism, and damage the public health by seafood contamination with phycotoxins. This work was part of the ALARME Project (FNMA/PROBIO CVI 008/2002). It aimed to quantify the abundance of harmful algae in the estuarine complex of Paranaguá (ECP), Paraná State; to detect phycotoxins in shellfish and; to check the toxicity of some microalgae in culture. Therefore, ten nearly bimonthly samplings were made between August 2002 and October 2003, in six points in the Paranaguá Bay and Antonina Bay. Water samples were taken in three depths - surface, middle and bottom - for analyses of phytoplankton, chlorophyll-a and physical and chemical parameters. Shellfish samples ("sururu" - *Mytella guyanensis*) were taken in three points for analyses of amnesic, paralytic and diarrhetic toxins by high performance liquid chromatography (HPLC) and mice bioassays. Finally, some strains of potentially toxic algae were cultivated for both growth and toxicity tests. During the work, some algae that integrate the list of toxic species of the Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO were found – *Chattonella* spp., *Dinophysis acuminata*, *Gymnodinium catenatum*, *Heterosigma akashiwo*, *Phaeocystis* spp., *Prorocentrum minimum*, and *Pseudo-nitzschia* spp. – besides other potentially harmful species with regional importance, such as *Coscinodiscus wailesii* and *Trichodesmium erythraeum*. In general, the harmful algae abundance and diversity were higher during the spring (October to December) and between the late summer and beginning of autumn (February to April). The presence of these species was more conspicuous near the estuary mouth and at the transitional region between Paranaguá Bay and Antonina Bay. In December of 2002, the test for detection of diarrhetic toxins (DSP) in one shellfish *M. guyanensis* sample was positive. The sample was taken in the same place where the dinoflagellate *D. acuminata* was found in concentrations up to $4.6 \cdot 10^3$ cells.L⁻¹. In culture, *H. akashiwo* was toxic to misidacean *Mysidopsis juniae* juveniles (LC₅₀: $1.8 \pm 0.5 \cdot 10^6$ cells.L⁻¹) and inhibited the larval development of the mussel *Perna perna* (LE₅₀: $3.6 \pm 0.3 \cdot 10^6$ cells.L⁻¹). Also in culture, the production of paralytic toxins (PSP), mainly C-1 and C-2, was confirmed in one strain of *G. catenatum*, in concentrations up to 19.44 ± 3.1 µg STXeq. cell⁻¹. At least one of the strains cultivated of *Pseudo-nitzschia* spp. produced domoic acid, an amnesic toxin (ASP), in concentrations up to 0.152 ± 0.022 µg. cell⁻¹. This investigation gave a preliminary prospect about the presence and distribution of the harmful algae in the ECP, and confirmed the production of amnesic, paralytic and diarrhetic toxins by algae locally found. The work also provided basic support for the elaboration and development of a monitoring program of harmful algae and toxins in the ECP.

KEY WORDS: harmful algae, toxins, monitoring, Paranaguá, phytoplankton.

1 INTRODUÇÃO

As algas são um grupo polifilético, formado por plantas fotossintetizantes muito diversificadas, que não possuem raízes, folhas e tecido vascular. Algumas algas não realizam fotossíntese, mas são classificadas como tais devido à sua estreita semelhança com as formas fotossintetizantes (HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Nos ambientes aquáticos, as microalgas compõem o fitoplâncton, um conjunto de organismos adaptados à vida na coluna d'água, e cuja capacidade de locomoção não é suficiente para superar os deslocamentos da mesma (HARRIS, 1986). O fitoplâncton desempenha a função de produtor primário e, por meio de relações tróficas, a matéria orgânica e a energia contida nestes organismos são transferidas aos demais.

Apesar desse importante papel ecológico, as microalgas podem se tornar deletérias ao ambiente, através de eventos conhecidos como “*blooms*” ou florações de algas nocivas. Uma floração é um fenômeno natural, comumente caracterizado pelo elevado crescimento de determinadas microalgas em um curto espaço de tempo, motivado por um conjunto de condições favoráveis e que resultam em grandes abundâncias celulares na água. Contudo, em alguns casos, mesmo baixas concentrações de microalgas já são suficientes para manifestar um efeito danoso, o que caracteriza o evento como uma floração (Van DOLAH, 2000). Como exemplo, os dinoflagelados *Pfiesteria piscicida* Steidinger *et* Burkholder (BURKHOLDER; GLASGOW JUNIOR, 1997) e *Dinophysis* spp. (SMAYDA, 1997b) podem conferir nocividade mesmo estando presentes em concentrações menores do que mil células por litro de água. No ambiente marinho, as florações de algas nocivas têm ocorrido com frequência crescente nos últimos anos, prejudicando os ecossistemas aquáticos, os organismos que nele habitam ou ainda ao homem (HALLEGRAEFF, 2003).

Embora todas as florações nocivas sejam conhecidas popularmente como “marés vermelhas”, por causa da coloração que a água assume com a presença de elevada concentração de microalgas, algumas florações podem adquirir uma coloração marrom, amarelada ou esverdeada, ou ainda, não causarem descolorações perceptíveis na água (BUSHAW-NEWTON; SELLNER, 1999). A

coloração produzida depende da composição e concentração de pigmentos na alga que forma a floração. As cianofíceas geralmente formam florações que são vistas como espumas verdes flutuantes (AZEVEDO; CARMOUZE, 1994); *Aureococcus* spp. e *Aureoumbra* spp. podem formar as “marés marrons” em lagunas costeiras (BRICELJ; LONSDALE, 1997); ao passo que os dinoflagelados *Alexandrium* spp., *Gymnodinium breve* Davis (= *Karenia brevis* G. Hansen et Moestrup) e *Noctiluca* spp. formam florações verdadeiramente vermelhas. Contudo, o dinoflagelado heterótrofo *Pfiesteria piscicida*, várias espécies de *Dinophysis* e a microalga bentônica *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo podem exercer efeitos deletérios sem que se perceba alguma alteração na coloração da água (BUSHAW-NEWTON; SELLNER, *op cit.*).

Conforme Hallegraeff (2003), as microalgas nocivas de ambientes marinhos podem causar danos distintos, tais como: a depleção de oxigênio decorrente da decomposição da matéria orgânica morta gerada no final da floração; a mortalidade de organismos aquáticos através da liberação de substâncias prejudiciais na água ou de danos físicos ocasionados pela elevada concentração das microalgas; e a produção de ficotoxinas, que podem afetar os animais e intoxicar seres humanos por ingestão de frutos do mar contaminados. Além disso, as florações de algas nocivas são capazes de exercer expressivos impactos econômicos, principalmente sobre as atividades da pesca, aqüicultura e turismo.

As ficotoxinas marinhas que afetam a saúde humana estão agrupadas segundo os sintomas gerados no organismo receptor e o tipo de biomolécula de que são formadas (Tabela 1). Os grupos recebem o nome da intoxicação que causam: ASP (envenenamento amnésico por consumo de mariscos), DSP (envenenamento diarréico por consumo de mariscos), NSP (envenenamento neurotóxico por consumo de mariscos), PSP (envenenamento paralisante por consumo de mariscos) e CFP (envenenamento por consumo de peixes – Ciguatera). Mais recentemente, uma nova síndrome foi descrita na Irlanda, a AZP (envenenamento por azaspirácido). A principal via de intoxicação humana é através do consumo de moluscos filtradores, que acumulam toxinas durante sua atividade alimentar. Todas as toxinas produzidas por microalgas que afetam a saúde humana são termoestáveis, ou seja, o cozimento de frutos-do-mar contaminados não ameniza a toxicidade dos mesmos (Van DOLAH, 2000).

Tabela 1 - Características dos principais envenenamentos humanos causados por toxinas de microalgas.

Síndrome	ASP Envenenamento amnésico por consumo de mariscos	DSP Envenenamento diarréico por consumo de mariscos	PSP Envenenamento paralisante por consumo de mariscos
Algas produtoras	Diatomáceas do gênero <i>Pseudo-nitzschia</i> ⁽¹⁾ , <i>Amphora coffeaeformis</i> ⁽²⁾ , <i>Nitzschia navis-varingica</i> ⁽³⁾	Os dinoflagelados <i>Prorocentrum lima</i> e diversas espécies do gênero <i>Dinophysis</i> ⁽¹²⁾	Os dinoflagelados <i>Gymnodinium catenatum</i> e algumas espécies dos gêneros <i>Alexandrium</i> e <i>Pyrodinium</i> ⁽²²⁾
Vetores de intoxicação	Moluscos bivalves e peixes filtradores	Moluscos bivalves	Moluscos bivalves
Sintomas em casos leves	Náuseas, vômitos, diarréias e cólicas abdominais ⁽⁴⁾	Náuseas, vômitos, diarréias e cólicas abdominais ⁽⁶⁾	Formigamento em torno dos lábios, face e pescoço, fisgadas nas pontas dos dedos, cefaléia, vômitos, náuseas e diarréias ⁽⁶⁾
Sintomas em casos graves	Diminuição do reflexo à dor, tontura, desorientação e perda de memória de curto prazo ⁽⁴⁾	A exposição crônica pode gerar tumores gástricos ⁽¹³⁾	Paralisia muscular, dificuldade em respirar, sensação de choque, paralisia respiratória ⁽⁶⁾
Tratamento dos enfermos	Não há tratamento, pode ser fatal e podem ocorrer ataques ou acessos ⁽⁵⁾	Apenas evitar desidratação, a recuperação se dá em 2 a 3 dias; não é fatal ^(6,14)	Aplicar lavagem estomacal e respiração artificial, aguardando terminar o efeito; pode matar ^(6,23)
Principais toxinas envolvidas	Ácido domóico (AD) e os isômeros ácido isodomóico D2, D3 e F4 ⁽⁶⁾	Ácido ocadáico (AO) e as dinofisis-toxinas (DTX) ⁽¹⁵⁾	Saxitoxina (STX), neo-saxitoxina (neo-STX), goniautoxinas (GTX) e toxinas sulfocarbamoil (C) ⁽²⁴⁾
Características químicas	Aminoácido tricarbóxico hidrossolúvel	Poliéteres ácidos lipossolúveis	Guanidinas heterocíclicas
Mecanismo de ação	Atua como análogo do neurotransmissor glutamato; causa ativação persistente dos canais de cálcio, levando à depleção de energia, expansão celular e morte dos neurônios ⁽⁷⁾	Inibe a enzima fosfatase e causa a hiperfosforilação das proteínas e canais iônicos no epitélio intestinal, provocando um balanço hídrico anômalo e a perda de fluidos ^(16,17)	Liga-se ao sítio 1 do canal de sódio, inibindo a condutividade e causando um bloqueio da atividade neuronal; o primeiro local de ação é o sistema nervoso periférico ⁽¹⁴⁾
Histórico	Único caso de envenenamento humano no Canadá, em 1987: 107 enfermos e 3 pessoas de saúde debilitada morreram ^(8,9)	Primeiros casos registrados na Holanda em 1961 ⁽¹⁸⁾ ; mas a descrição somente ocorreu no Japão, na década de 70 ⁽¹⁹⁾	Acredita-se que o primeiro caso registrado seja a intoxicação que matou navegadores no Canadá, em 1793 ⁽²⁵⁾
Particularidades e curiosidades	O termo ácido domóico deriva de "domoi", o nome em japonês para a macroalga <i>Chondria armata</i> , de onde se extraiu a toxina pela primeira vez ⁽¹⁰⁾ ; Antes de intoxicar humanos, o ácido domóico já era conhecido como um remédio popular para matar vermes em crianças japonesas ⁽¹¹⁾	Antigamente, incluíam-se as pectenotoxinas (PTX) e iessotoxinas (YTX) entre as toxinas diarréicas. Apesar de extraídas em conjunto, elas não causam distúrbios gastro-intestinais, mas sim efeitos hepatotóxicos ⁽²⁰⁾ e cardiotoxicos ⁽²¹⁾ , respectivamente	As saxitoxinas podem ser fatais ao homem em doses pequenas como 0,5 mg ⁽⁶⁾ ; sabendo que moluscos podem conter, em raras ocasiões, doses de 10 mg em 100 g de carne, a ingestão de um único marisco pode matar um homem ⁽¹⁴⁾

Referências: ⁽¹⁾ Bates, 2000; ⁽²⁾ Shimizu et al., 1989; ⁽³⁾ Kotaki et al., 2000; ⁽⁵⁾ Pocklington et al., 1990; ⁽⁶⁾ Hallegraeff, 2003; ⁽⁷⁾ Premazzi e Volterra, 1993; ⁽⁸⁾ Xi e Ramsdell, 1996; ⁽⁹⁾ Perl et al., 1990; ⁽¹⁰⁾ Todd, 1993; ⁽¹¹⁾ Daigo, 1959; ⁽¹²⁾ Takemoto e Daigo apud Bates, 1998; ⁽¹³⁾ Lee et al., 1989; ⁽¹⁴⁾ Landsberg, 1996; ⁽¹⁵⁾ Van Dolah, 2000; ⁽¹⁶⁾ Reguera, 2003; ⁽¹⁷⁾ Cohen, Holmes e Tsukitani, 1990; ⁽¹⁸⁾ Gauss et al., 1997; ⁽¹⁹⁾ Korringa e Roskan, 1961; ⁽²⁰⁾ Yasumoto et al., 1978; ⁽²¹⁾ Hamano, Kinoshita e Yasumoto, 1985; ⁽²²⁾ Terão et al., 1990; ⁽²³⁾ IOC, 2003; ⁽²⁴⁾ Gessher et al., 1997; ⁽²⁵⁾ Oshima, 1995; Dale e Yentsch, 1978.

A toxina responsável por envenenamentos do tipo ASP, o ácido domóico, foi isolada pela primeira vez em alguns gêneros de macroalgas (DAIGO, 1959). Com o passar do tempo, descobriu-se que diversas espécies de diatomáceas do gênero *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo também eram capazes de produzir a toxina (BATES, 2000). Além destas espécies, que possuem ampla distribuição e atualmente se constituem nas mais conhecidas e importantes produtoras de ácido domóico, outras duas espécies de diatomáceas, *Amphora coffeaeformis* (C.A. Agardh) Kützing e *Nitzschia navis-varingica* Lundholm et Moestrup (SHIMIZU et al. 1989; KOTAKI et al. 2000) também podem produzir a toxina.

As toxinas paralisantes, por sua vez, são produzidas por dinoflagelados que ocorrem em águas temperadas e tropicais (Van DOLAH, 2000). Antes de 1970, eventos de PSP aconteciam exclusivamente na América do Norte, Europa e Japão. Duas décadas mais tarde eles já eram documentados também na América do Sul, Austrália, sudeste da Ásia e Índia (HALLEGRAEFF, 1993). Atualmente, estes eventos atingiram uma distribuição global, com relatos na América Central, África, China e toda a região da Australásia (HALLEGRAEFF, 2003). Entre os organismos produtores de toxinas paralisantes estão *Gymnodinium catenatum* Graham e algumas espécies dos gêneros *Alexandrium* Halim e *Pyrodinium* Plate (IOC, 2003).

Por fim, as toxinas diarréicas são produzidas pelos dinoflagelados *Prorocentrum lima* Dodge e várias espécies de *Dinophysis* Ehrenberg (LEE et al., 1989). Diversas espécies tóxicas de *Dinophysis* já foram encontradas ao longo da costa brasileira, como *D. acuminata* Clapadère et Lachmann (PR, SC e RS), *D. acuta* Ehrenberg (SC), *D. caudata* Saville-Kent (litorais nordeste, sudeste e sul), *D. fortii* Pavillard (RS), *D. mitra* (Schutt) Abe (RS), *D. rotundata* Clapadère et Lachmann (SC e RS) e *D. tripos* Gourret (SC e RS) (CARDOSO, 1993; RÖRIG et al., 1998; SEELIGER; ODEBRECHT; CASTELLO, 1998; YONEDA, 1999; SCHMITT; PROENÇA, 2000; MAFRA JUNIOR et al., 2004). Tendo em vista a diversidade e a ampla distribuição de espécies tóxicas, o DSP representa um problema em potencial para a costa brasileira. Além dessas, várias outras espécies de *Dinophysis* já foram encontradas no Brasil e, atualmente, existe uma tendência a se considerar todas as espécies deste gênero como potencialmente promotoras de DSP.

Mesmo não produzindo as referidas toxinas, algumas espécies de rafidofíceas (*i.e.* *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, *Chattonella antiqua* (Hada) Ono), de

primnesiofíceas (*Chrysochromulina polylepis* Manton et Parke, *Primnesium parvum* N. Carter) e de dinoflagelados (*Karenia mikimotoi* (Miyake et Kominami ex Oda) G. Hansen et Moestrup), entre outras, podem promover a morte de organismos aquáticos. Eventos de mortalidade de animais marinhos passaram a ser mais evidentes com o crescimento da atividade de cultivo de peixes em sistemas de tanque-rede, onde os peixes permanecem confinados dentro de estruturas que permitem a passagem de água, mas limitam sua locomoção. As populações naturais de peixes são menos suscetíveis a este problema, já que são capazes de se deslocar livremente, evitando o contato com a floração da alga nociva. Conforme HALLEGRAEFF (2003), um dos problemas mais comuns nas fazendas de peixes é a produção de ácidos graxos e galactolipídeos por microalgas. Os peixes podem morrer também pela diminuição na concentração de oxigênio dissolvido na água ou por danos ao sistema branquial, tais como hemorragia nos capilares, asfixia por superprodução de muco, infecções secundárias no tecido danificado e disfunção da troca gasosa nas brânquias (RENSEL, 1993), podendo gerar aumento na concentração do íon cloreto no sangue (ROSEMBERG; LINDAHL; BLANCK, 1988). A ingestão, acidental ou voluntária, de uma grande quantidade de células também pode provocar a morte de organismos marinhos por entupimento das brânquias e conseqüente asfixia. Outros mecanismos, como a produção de toxinas similares à brevetoxina por rafidofíceas (KHAN; ARAKAWA; ONOUE, 1997), possivelmente estão envolvidos na morte de animais em contato com algas nocivas.

Dependendo do caso, as ficotoxinas que causam intoxicações humanas podem ser bastante potentes. Comparado ao cianeto de potássio, um veneno bem conhecido, o ácido ocadáico, uma das toxinas responsáveis pelo DSP, é cerca de 50 vezes mais tóxico, o ácido domóico (ASP) 80 vezes, a saxitoxina (PSP) 1.100 vezes, e a ciguatoxina (CFP) 22.000 vezes (ZINGONE; ENEVOLDSEN, 2000).

Acredita-se que a primeira referência documentada a uma floração de alga nociva tenha acontecido no ano 1000 a.C. e esteja expressa na Bíblia, relatando que a água que estava no rio Nilo virou sangue, os peixes que estavam na água morreram e o rio ficou tão fétido que os egípcios não puderam beber a sua água (BÍBLIA, A.T. Êxodo, 7: 20-21). Um dos primeiros registros fatais de intoxicação humana por consumo de moluscos contaminados com toxinas de algas foi feito em 1793 pelo capitão George Vancouver, ao desembarcar na Columbia Britânica,

Canadá. Vancouver percebeu que os nativos eram proibidos de comer os moluscos enquanto a água do mar se encontrasse fosforescente devido à floração de dinoflagelados (DALE; YENTSCH, 1978).

No Brasil, um caso de DSP foi considerado como o único registro oficial de intoxicação humana causada pela ingestão de frutos do mar contaminados com ficotoxinas (ZENEBO; PREGNOLATTO, 1992). Foi relatado: “Em 1990, fomos surpreendidos com vários casos de intoxicação de pessoas que consumiram mariscos do litoral do estado de Santa Catarina. Embora o quadro sintomático fosse semelhante ao de toxi-infecção alimentar, não foi isolada nenhuma bactéria patogênica. As análises biológicas efetuadas revelaram a presença da toxina diarréica de moluscos, cuja confirmação foi reforçada pela identificação de algas do gênero *Dinophysis*...”. Em 1997, houve a confirmação da ocorrência de DSP em Santa Catarina através da detecção do ácido ocadáico em amostras de moluscos *Perna perna*, cultivados no litoral centro-norte do estado (PROENÇA et al. 1998).

Nas últimas décadas, os eventos de florações de algas nocivas se tornaram bastante freqüentes e geraram gastos superiores a um bilhão de dólares, somente nos EUA. Esta quantia esteve envolvida na implementação de programas de monitoramento, proibição da captura de moluscos e pescarias costeiras, redução na atividade turística e de indústrias associadas, saúde pública, tratamentos e consultas médicas (BUSHAW-NEWTON; SELLNER, 1999). Cerca de 20% das intoxicações alimentares humanas que acontecem nos EUA são provenientes do consumo de alimentos marinhos, sendo que em grande parte dos casos as ficotoxinas são responsáveis por tais intoxicações (AHNRED, 1991). Em nível mundial, as ficotoxinas marinhas causam mais de 60.000 casos de intoxicação por ano, ocorrendo a morte do paciente em cerca de 1,5% deles (LANDSBERG, 1996).

As razões apontadas para o recente aumento na ocorrência de florações de algas nocivas são várias e incluem: a intensificação e qualificação das investigações científicas; a eutrofização dos ambientes costeiros; alterações climáticas de larga escala; ineficiência do controle biológico; e o transporte de algas nocivas, seja de forma natural através de correntes oceânicas, ou como consequência de atividades humanas, como a aquicultura e a água de lastro de navios (BUSHAW-NEWTON; SELLNER, 1999; HALLEGRAEFF, 2003). O número existente de espécies de microalgas potencialmente nocivas nos oceanos pode variar bastante conforme o autor consultado e, supostamente, esta quantia tem sido subestimada, visto o

número relativamente grande de espécies adicionadas à lista todos os anos (ANDERSON; GARRISON, 1997). HALLEGRAEFF (2003) estima que das cerca de 5.000 espécies componentes do fitoplâncton marinho (SOURNIA; CHRETIENNOT-DINET; RICARD, 1991), aproximadamente 300 espécies podem atingir concentrações que caracterizem florações, mas somente cerca de 40 delas têm capacidade de produzir toxinas potentes o bastante para afetar a saúde humana. Um número maior é estimado por SOURNIA (1995), 80 espécies tóxicas e 200 capazes de promoverem condições de déficit de oxigênio dissolvido. Já SMAYDA (1997a), afirma que cerca de 2% (60 a 80) das 3.400 a 4.000 espécies de microalgas que se estima conhecer são tóxicas. Muitas dessas espécies estão presentes nas águas brasileiras.

Além de determinar a presença e abundância das microalgas potencialmente nocivas no complexo estuarino de Paranaguá (CEP), o presente estudo buscou detectar o acúmulo de ficotoxinas no molusco bivalve *Mytella guyanensis* Lamarck, 1819 (= *charruana*). Conhecido localmente como “sururu”, este organismo filtrador é encontrado em vários pontos do CEP, vivendo enterrado em um substrato caracteristicamente fino e com elevado teor orgânico. Habita as margens dos rios e baías na zona de entre-marés, de modo que permanece uma parte do tempo submerso e se alimentando por filtração e, em outros momentos, fora da água, totalmente enterrado no substrato emerso.

Esta dissertação integrou o Projeto ALARME – Água de Lastro: Análise de Risco, Plano de Manejo Ambiental e Monitoramento de Espécies Exóticas no Porto de Paranaguá, Paraná – aprovado pelo Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA) por meio do Edital FNMA/PROBIO n. CVI 008/2002. Sua contribuição para o referido projeto foi o conhecimento das espécies de microalgas nocivas e ficotoxinas e sua variação no ambiente, além da investigação dos efeitos prejudiciais das microalgas em laboratório. Esses aspectos são de fundamental importância para a compreensão de eventos de natureza nociva, e imprescindíveis para se mitigar futuras ocorrências.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Verificar a ocorrência de microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá (CEP), PR e comprovar em laboratório a toxicidade de espécies selecionadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a distribuição e abundância de microalgas potencialmente nocivas no CEP, relacionando-as com a variação de fatores ambientais;
- Caracterizar e quantificar as toxinas produzidas por microalgas cultivadas, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Testar a toxicidade das microalgas cultivadas utilizando invertebrados marinhos e camundongos;
- Verificar o acúmulo de toxinas dos grupos ASP, DSP e PSP no molusco filtrador “sururu” (*Mytella guyanensis*) coletado no CEP;
- Fornecer subsídios para a implementação de um futuro programa de monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas no CEP, com base nos dados gerados.

3 ÁREA DE ESTUDO

O complexo estuarino de Paranaguá (CEP), PR (25°30'S, 48°30'W, Figura 1) é composto por quatro baías principais, Laranjeiras, Guaraqueçaba, Antonina e Paranaguá, ocupando uma superfície líquida de 612 Km². Conforme o sistema de classificação climática de Köppen, o clima na região é do tipo Cfa (pluvial, úmido com chuvas em todos os meses e com temperatura média dos meses mais quentes superior a 22°C). Conforme LANA *et al.* (2001), a região é caracterizada pela ocorrência de um período chuvoso e outro seco. O período chuvoso se inicia no final da primavera e dura a maior parte do verão, enquanto que o período seco começa no final do outono permanecendo até o final do inverno. Os meses mais chuvosos são os de janeiro, fevereiro e março, enquanto junho, julho e agosto representam os meses mais secos, sendo comum neste período a entrada de massas polares frias. A pluviosidade média anual é de 2500 mm com máximos de até 5300 mm, e a descarga média anual de água doce na Baía de Paranaguá é de 150 m³.s⁻¹. Os ventos predominantes na região são os incidentes de Leste e Sudeste, com intensidade que varia entre 4 e 25 m.s⁻¹. A temperatura do ar oscila de 1 a 34°C, com média anual de 21°C (LANA *et al.*, *op cit.*).

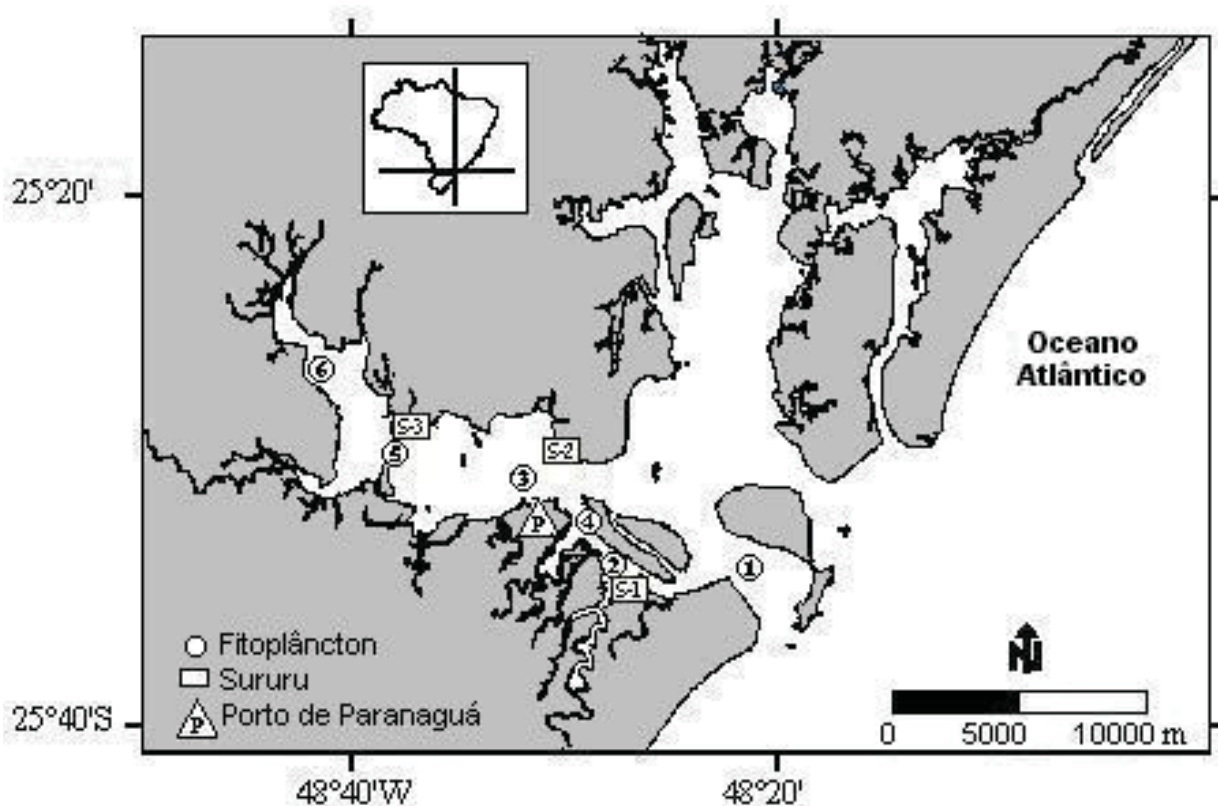
A hidrodinâmica local é dominada pelo regime de marés, que são do tipo semidiurno, com amplitude média anual de 2,23 metros. A temperatura da água varia de 18 a 25°C no inverno, e de 23 a 30°C no verão. A salinidade varia entre 20 a 34 no inverno e 12 a 29 no verão. Máximos de até 36 ocorrem na entrada dos canais de acesso e valores próximos a zero nos setores mais internos principalmente em períodos de maior pluviosidade (MACHADO *et al.*, 1997; LANA *et al.*, 2001). Em função da salinidade da água, o CEP está dividido em setores, os oligohalinos (mais internos), mesohalinos e polihalinos (intermediários) e euhalinos (mais externos).

A pesca artesanal representa a principal atividade econômica em mais de 50 comunidades que vivem no CEP (ANDRIGUETTO-FILHO, 1993). Os estoques de ostras (*Crassostrea* spp.) e mariscos (*Mytella guyanensis* e *Perna perna* Linnaeus 1758) estão subestimados e se encontram em estágio de sub-exploração (LANA *et al.*, 2001). A extração do molusco conhecido localmente como “sururu” (*Mytella*

guyanensis) é efetuada pelos moradores ribeirinhos e destinada ao consumo e a um pequeno comércio. Além disso, as atividades de cultivo de moluscos marinhos, camarão e peixes vêm se expandido rapidamente a partir de programas ambientais apoiados pelo governo do Estado do Paraná em iniciativas como o Programa Baía Limpa.

Na cidade de Paranaguá, está situado o Porto de Paranaguá (Figura 1), que é o segundo porto brasileiro em movimentação de cargas e recebe navios de diversos países, potencializando a introdução de espécies de microalgas nocivas exóticas, via água de lastro.

Figura 1 - Mapa do local de estudo, o complexo estuarino de Paranaguá, PR, contemplando a localização das estações de coleta de fitoplâncton (círculos) e os bancos de coleta do molusco sururu, *Mytella guyanensis* (retângulos), em torno do Porto de Paranaguá (triângulo).



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Plano amostral

A amostragem teve início no dia 31 de agosto de 2002 e seguiu o planejamento do Projeto ALARME¹. As coletas tiveram uma periodicidade bimestral, sendo realizadas em agosto, outubro e dezembro de 2002; fevereiro, abril, junho e início de setembro de 2003. O desenho amostral compreendeu seis estações de coleta (Tabela 2) dispostas ao longo das baías de Paranaguá e Antonina de modo a contemplar um gradiente de salinidade nas regiões adjacentes ao Porto de Paranaguá (Figura 1). Cada estação foi dividida em um estrato superficial, um de fundo e, quando a profundidade permitiu, um estrato intermediário, localizado na camada correspondente à base da zona fótica da água.

Tabela 2 - Localização das estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR, mostrando as coordenadas geográficas e pontos de referência.

ESTAÇÕES	LATITUDE S	LONGITUDE W	LOCALIZAÇÃO
1	25° 33' 63,3"	48° 20' 53,0"	Entrada do estuário, bóia 12
2	33' 69,2"	25' 48,5"	Desembocadura do Rio Maciel
3	29' 05,0"	31' 39,1"	Em frente ao Porto de Paranaguá
4	30' 92,9"	29' 88,5"	Foz do Rio Itiberê
5	33' 96,6"	38' 02,6"	Localidade Europinha
6	25' 17,9"	42' 24,1"	Interior da Baía de Antonina

Em cada estação, foram analisadas as variáveis físicas e químicas da água, a concentração de clorofila-*a* e amostras de fitoplâncton e do molusco bivalve sururu (*Mytella guyanensis*). As amostras de fitoplâncton foram separadas em alíquotas vivas e preservadas. Além das coletas bimestrais já descritas, foram realizadas três coletas extras de sururu para intensificar a investigação (setembro de 2002, março e outubro de 2003). Nestas oportunidades, procedeu-se com uma coleta de

¹ Para detalhes sobre o significado da sigla e os objetivos do projeto, ver Introdução, sessão 1, página 7.

fitoplâncton nas estações próximas à coleta do molusco (estações 2, 3 e 5), porém apenas no estrato superficial devido a limitações logísticas.

As análises que seguiram a etapa de coleta e os resultados derivados de cada uma delas, estão sumarizados e esquematizados na Figura 2. As variáveis ambientais foram monitoradas, no local de coleta e em laboratório, visando avaliar suas variações temporais e espaciais. Estes padrões de variação foram confrontados com as distribuições espacial e temporal das algas nocivas, obtidas após a contagem das amostras preservadas de fitoplâncton. As amostras vivas de fitoplâncton foram observadas logo depois de coletadas e, quando havia espécies potencialmente nocivas, estas foram isoladas e cultivadas em laboratório para testar sua toxicidade por meio de análises de cromatografia líquida e/ou testes de toxicidade. Paralelamente, ocorreu a análise de toxinas de microalgas no tecido do molusco filtrador sururu por cromatografia líquida e bioensaios. Quando a toxina esteve presente na amostra e, conseqüentemente, no ambiente, a observação das amostras vivas de fitoplâncton apontou para o provável agente causador. Posteriormente, a contagem das amostras preservadas de fitoplâncton fortaleceu esta relação. Conhecendo a toxicidade de algumas microalgas selecionadas e a detecção de intoxicações em moluscos, pôde-se inferir sobre os níveis de ficotoxinas presentes no complexo estuarino de Paranaguá (Figura 2).

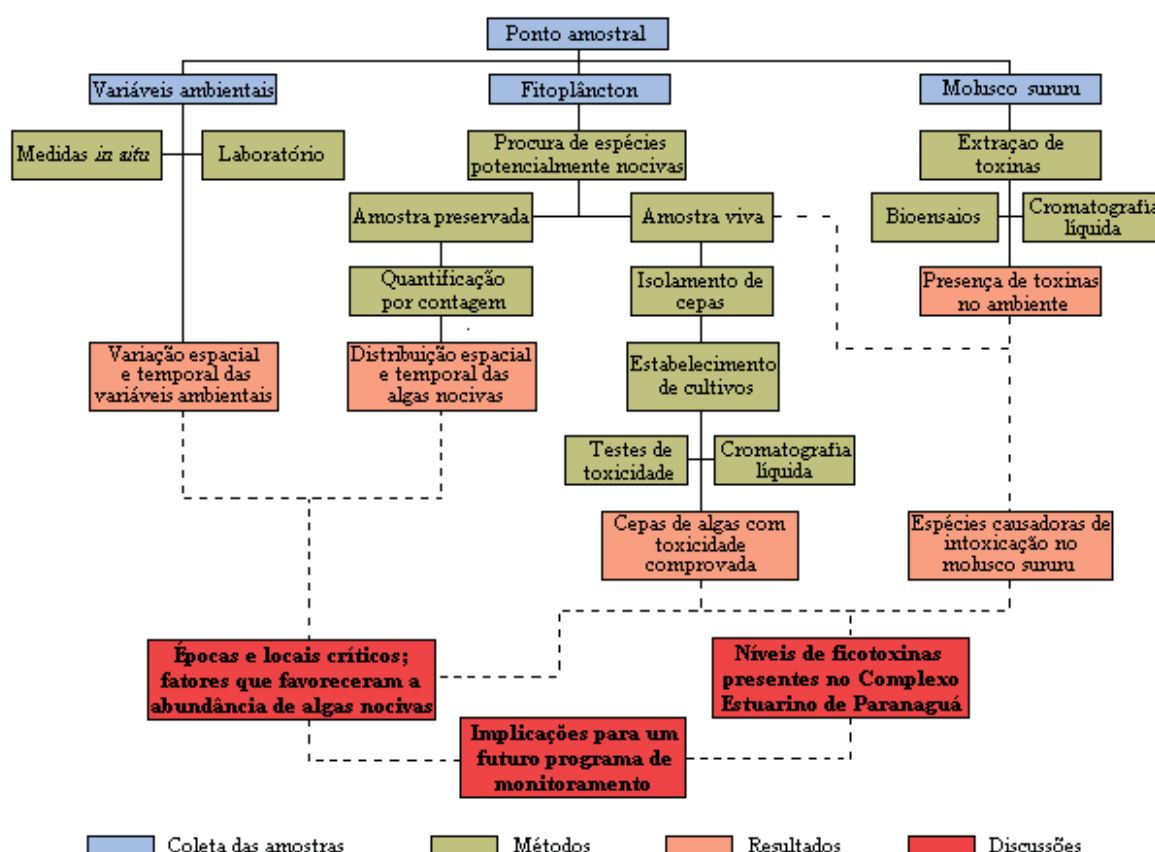
A primeira coleta, em agosto de 2002, contemplou somente os pontos 2, 3 e 5. A partir de então, todos os seis pontos foram coletados regularmente, com exceção do ponto 5, que na coleta de abril de 2003 não pôde ser amostrado.

4.2 Variáveis ambientais

4.2.1 Dados pluviométricos

Os dados pluviométricos correspondentes ao período entre agosto de 2002 e outubro de 2003 foram cedidos pelo Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (CEM/UFPR). As precipitações foram acumuladas mensalmente e expressas em milímetros.

Figura 2 - Fluxograma mostrando a seqüência de atividades desenvolvidas após a coleta em uma estação amostral no complexo estuarino de Paranaguá. Os quadros azuis simbolizam a coleta das amostras, divididas conforme o material a ser analisado em variáveis ambientais, fitoplâncton e molusco sururu. Os quadros verdes expressam as metodologias utilizadas, os quadros alaranjados representam os resultados obtidos em cada etapa e os quadros vermelhos, as discussões geradas. As linhas cheias que conectam os quadros simbolizam a seqüência dos acontecimentos, ordenados de cima para baixo. As linhas pontilhadas mostram as interações entre as análises dos diferentes materiais coletados.



4.2.2 Variáveis físicas

A profundidade foi medida através da eco-sonda da embarcação e a localização geográfica por um aparelho de posicionamento por satélites – GPS.

O estrato intermediário de cada estação foi localizado na profundidade correspondente à base da zona fótica da água, ou seja, aproximadamente três vezes o valor de transparência da água (PARSONS; TAKAHASHI; MARGRAVE, 1984). A transparência, por sua vez, foi medida com um disco de Secchi e expressa em metros.

A temperatura foi mensurada com um termômetro de mercúrio e a salinidade com o auxílio de um condutivímetro ThermoOrion[®], modelo 162A, em laboratório.

4.2.3 Nutrientes

Os nutrientes inorgânicos dissolvidos analisados foram o silicato, fosfato, nitrito (nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₂), nitrato (N-NO₃) e amônio (N-NH₄). Para tanto, alíquotas de água coletadas com garrafa de Van Dorn, provenientes de cada estrato das diferentes estações, foram acondicionadas em frascos plásticos com capacidade de 250 mL, guardadas em caixa térmica e filtradas no momento do desembarque. Filtrou-se 200 mL de cada amostra, usando filtro de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro e porosidade de 1,2 µm (tipo Whatman[®] GF/C), em sistema de filtração a vácuo. O filtro foi reservado e o líquido filtrado foi utilizado na determinação da concentração de nutrientes dissolvidos. De cada amostra, foram separados 100 mL para análise da concentração de nitrito e nitrato, 50 mL para análise da concentração de silicato e fosfato, e ainda 15 mL para análise da concentração de amônio, sendo este último volume acrescido de 0,5 mL de solução de fenol 10% (em etanol). As alíquotas filtradas foram mantidas congeladas em freezer até o processamento.

A concentração de nutrientes foi determinada no Laboratório de Oceanografia Química da Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, pelo método de espectrofotometria. A análise de amônio e fosfato dissolvidos foi realizada conforme o método de STRICKLAND e PARSONS (1972) e a de silicato, nitrito e nitrato seguiu as recomendações da APHA (1999).

4.3 Clorofila-a

Os filtros obtidos na etapa anterior foram congelados logo em seguida e mantidos fora do contato com a luz. A determinação da concentração de clorofila-a foi efetuada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

No momento da análise, foram adicionados 3 mL de metanol grau HPLC ao filtro que continha a amostra. O filtro foi então submetido ao contato com uma sonda de ultra-som Sonics[®] durante 40 s. Durante este procedimento, feito no escuro, a temperatura foi mantida baixa por imersão do tubo em água gelada. Em seguida, o extrato foi clarificado por filtração em filtro de fibra vidro. A cromatografia foi feita

usando uma coluna Shimadzu[®] SHIM-PACK (4,6 mm de diâmetro interno e 40 mm de comprimento), empacotada com partículas ODS de 3 µm de diâmetro. A clorofila-a foi detectada por um fluorímetro Shimadzu[®] modelo RF51, ajustado para 435 nm de excitação e 660 nm de emissão. O registro foi feito em um integrador 6-R6A também da marca Shimadzu[®]. A fase móvel da cromatografia consistiu em uma solução de metanol e acetona (8:2), sob um fluxo de 0,7 mL.min⁻¹. Logo antes da análise, 160 µL de amostra foram adicionados a 40 µL de solução de acetato de amônia 1M. A solução foi misturada e injetada manualmente em um injetor Rheodine[®], equipado com um *loop* de 100µL (PROENÇA, 2002).

A calibração foi feita pela injeção de uma quantidade conhecida de clorofila-a pura (marca Sigma[®]), padronizada por espectrofotometria. A concentração final foi conhecida aplicando-se um conjunto de equações descritas em PARSONS, TAKAHASHI e HARGRAVE (1984).

4.4 Microalgas nocivas

Foi realizada a coleta de fitoplâncton no ambiente, buscando caracterizar a presença, abundância e distribuição das espécies potencialmente nocivas de microalgas e, ainda, estabelecer cultivos em laboratório para comprovar a toxicidade de espécies selecionadas. Para tanto, as amostras foram separadas em frações preservadas e vivas.

4.4.1 Amostras preservadas: análise qualitativa e quantitativa

A coleta para a análise qualitativa do fitoplâncton foi feita por intermédio de arrastos oblíquos em cada estação de coleta, usando uma rede de fitoplâncton com malha de 20 µm. O conteúdo retido na rede foi armazenado em frascos plásticos e fixado com solução de formol 4%. Este material serviu para caracterizar quais espécies de microalgas potencialmente nocivas estavam presentes em cada ponto amostral.

Já o material destinado à análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton foi obtido com auxílio da garrafa de Van Dorn. Foram separadas alíquotas de 200 mL, acondicionadas em frascos de vidro tipo âmbar e fixadas com solução de lugol

acético numa concentração final de cerca de 1%, visando ao posterior procedimento de contagem.

Aplicou-se a técnica de contagem de células de Ütermohl. Inicialmente, sedimentou-se um volume conhecido da amostra em câmaras, concentrando e distribuindo de modo aleatório as células. O volume sedimentado dependeu da densidade celular da amostra, previamente observada. A análise de tais amostras foi feita em microscópio óptico invertido OLYMPUS® IX 70, por meio da contagem de faixas (“*transects*”), até que se tivesse registrado duas espécies com cerca de trezentas células contadas para cada uma delas. Este procedimento buscou reduzir o erro estatístico do método para cerca de 10% (VENRICK, 1978).

Para a contagem de *Phaeocystis* spp., foi estabelecida uma correlação prévia entre o diâmetro das colônias esféricas e o número de células. A partir desse momento, depois que as células de um número significativo de colônias foram contadas, a relação se estabilizou e o restante da contagem foi feito por estimativa, através da medida do diâmetro da colônia.

4.4.2 Amostras vivas: estabelecimento de cultivos

Além das coletas para análises quantitativas e qualitativas de fitoplâncton, foram realizadas coletas de material vivo. Para isso, 5 litros de amostra superficial de água foram coletados nas estações de amostragem, e conduzidos ao laboratório. Em seguida, as amostras foram concentradas por filtração reversa e observadas em microscópio invertido, buscando encontrar espécimes de microalgas potencialmente nocivas. Este foi um procedimento importante que possibilitou a visualização daquelas algas que não têm resistência à fixação e que teriam a presença subestimada.

Quando se detectou a presença de algas potencialmente nocivas nas amostras de fitoplâncton vivo, tentou-se estabelecer um cultivo em laboratório com as mesmas. Este processo foi realizado no Laboratório de Estudos sobre Algas Nocivas (LEAN) da UNIVALI, em um microscópio invertido OLYMPUS® IX 50.

As algas encontradas foram isoladas por meio de manipulação com um capilar de vidro, lavadas e dispostas em uma placa de cultivo celular de polietileno em meio de cultura enriquecido do tipo K (KELLER et al., 1987) ou F/2 (GUILLARD,

1975). Sob esta condição foram mantidas em incubadora a uma temperatura de 20 a 25°C, expostas a uma intensidade média de luz entre 50 e 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 12:12 ou 14:10 horas (claro:escuro) e salinidade entre 25 e 35, adequados a cada espécie.

As algas cresceram em cultivos estanques, sendo que a manutenção foi realizada semanalmente através da inoculação de uma fração de 1 mL em *erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura novo. Inoculando em diversos frascos, gerou-se uma quantidade significativa de biomassa, necessária às análises de cromatografia e aos testes de toxicidade.

A estimativa da concentração celular foi obtida pela contagem sob microscópio óptico, usando uma câmara tipo Sedgewick-Rafter[®]. Em intervalos de dois a três dias, 1 mL de cada frasco foi retirado e fixado em solução de lugol acético. O valor de cada concentração celular foi calculado pela média e desvio-padrão da contagem de três réplicas, sendo expresso em células por mililitro ($\text{cels}\cdot\text{mL}^{-1}$). O período de duração dos cultivos contemplou as diferentes fases da curva de crescimento, ou seja, a fase de aclimação, de crescimento exponencial, de estabilização (estacionária) e de decaimento. A constante de crescimento exponencial (μ), expressa em dia^{-1} , foi calculada pela fórmula:

$$\mu = \frac{\ln(N_1 / N_0)}{T_1 - T_0};$$

onde N_1 : número de células no final da fase exponencial de crescimento; N_0 : número de células no início da fase exponencial; T_1 : dias de cultivo no final do intervalo; T_0 : dias de cultivo no início do intervalo (REYNOLDS, 1984).

O tempo de duplicação (d), expresso em dias, é uma variável do cultivo que representa o tempo que uma população leva para duplicar sua concentração celular (REYNOLDS, *op cit.*), e foi calculado pela fórmula:

$$d = \frac{\log_e 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

Quatro cepas de espécies diferentes da diatomácea *Pseudo-nitzschia*, uma do dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* e uma da rafidofícea *Heterosigma akashiwo* foram mantidas em cultivos. Com outras espécies, por uma série de razões, não se obteve o mesmo sucesso.

Pseudo-nitzschia spp.

Buscou-se mensurar a produção de ácido domóico, uma toxina amnésica, em quatro cepas diferentes da diatomácea *Pseudo-nitzschia*. Para tanto, os cultivos de cada cepa foram preparados em triplicata, com um volume inicial de 500 mL e mantidos em meio F/2 (GUILLARD, 1975), salinidade 25, temperatura 20°C, fotoperíodo de 14:10 horas (claro:escuro) e intensidade luminosa de 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Em intervalos de três em três dias, durante 33 dias, 1 mL de cada frasco foi retirado e fixado em lugol, para posterior estimativa da concentração celular dos cultivos. Simultaneamente, foram retiradas alíquotas de 5 mL para serem filtradas a vácuo em filtros de fibra de vidro de 25 mm de diâmetro (tipo Whatman GF/C). Tanto os filtros como os líquidos filtrados foram congelados. Desta forma, pôde-se quantificar a concentração de toxinas nas algas e a concentração que foi liberada no meio, ao longo do crescimento do cultivo.

Foram realizadas medidas das algas em microscopia ótica e confrontadas com as existentes na literatura. Entretanto, a correta identificação de algumas das espécies deste gênero é fortemente dependente da análise em microscopia eletrônica e, para isso, foram realizadas diversas sessões no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME/UFPR). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi feita em um microscópio Phillips® XL 30, e a de transmissão (MET) em um microscópio Jeol® JMI200 EXII. Nesta etapa, diversos aspectos morfológicos com importância taxonômica foram observados nas frústulas, mas principalmente a existência de um interespaço central, o número de fileiras de aréolas e a forma e disposição das mesmas.

Análise de ácido domóico por cromatografia líquida

O procedimento de análise do ácido domóico por cromatografia líquida requer que a toxina esteja solúvel em água. Desta forma, submeteu-se os filtros ao contato com uma sonda de ultrassom para que as células fossem rompidas e o material intracelular dissolvido em água miliQ .

A análise foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu® LC10 equipado com um aparato de desgassificação por bolhas

de hélio. O método seguido foi adaptado de POCKLINGTON *et al.* (1990), que é bastante sensível e permite a detecção de quantidades ínfimas da toxina.

As amostras passaram por uma etapa prévia de derivatização (pré-coluna) que consistiu em promover a ligação da toxina a um agente derivatizante para possibilitar a sua detecção por fluorescência. Para isso, separou-se 200 μL de amostra e adicionou-se 50 μL de solução tampão borato (pH 6,2). Depois de agitar por 10 s, acrescentou-se 250 μL do agente derivatizante 9-clorofornato de fluorenilmetil (FMOC-Cl) e agitou-se por 45 s para a formação do AD-FMOC, que pode ser detectado por um fluorímetro. Por último, a mistura sofreu uma partição com a adição de 500 μL de acetato de etila, seguida de uma agitação por 45 s. Esperou-se as duas fases se separarem e descartou-se a fase superior. Com a fase inferior, repetiu-se por duas vezes o procedimento de partição e então a amostra estava pronta para ser analisada.

As amostras foram injetadas manualmente por meio de uma micro-seringa em um injetor Rheodine[®] 7725i, equipado com uma alça (*loop*) com capacidade para 20 μL . A fase móvel consistiu em um gradiente de duas soluções: (a) ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em acetonitrila e; (b) TFA 0,1% em água filtrada em sistema mili-Q. Para a cromatografia, foi utilizada uma coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (250 mm comprimento e 4,6 mm diâmetro interno). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a uma temperatura de 55°C. A toxina foi detectada por um fluorímetro Shimadzu[®] modelo RF51, ajustado para 264 nm de excitação e 313 nm de emissão. Os dados gerados durante os 20 minutos de duração de cada corrida cromatográfica foram armazenados e processados em microcomputador, utilizando um programa de aquisição LC10, também da Shimadzu[®]. Entre uma amostra injetada e outra, aguardou-se por um período de 10 minutos.

O tempo de retenção e o espectro de absorvância em luz visível do ácido domóico foram obtidos pela análise de um padrão (Calbiochem[®] #324378) com concentração de 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, confrontada à análise de um controle, composto somente de água do mar filtrada. Foi calculada uma relação de regressão linear entre diferentes diluições do padrão e a área do pico de absorção detectado.

No total, foram analisados 132 filtros para avaliar a presença de ácido domóico intracelular e 132 amostras de meio de cultivo filtrado para detectar a

presença de ácido domóico extracelular. A concentração de toxina nas amostras foi resultante de uma média dos valores encontrados nas três réplicas. Foram calculados: (a) a concentração de ácido domóico extracelular, expressa em $\eta\text{g.mL}^{-1}$ e; (b) a concentração intracelular, expressa em pg.cel^{-1} .

Gymnodinium catenatum

As células de *G. catenatum* foram cultivadas em frascos contendo 100 mL de meio F/2 com adição de 0,1 mL de solução de extrato de solo. A salinidade do meio foi 33 e os frascos foram mantidos em incubadora a 25°C, $60\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância e fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro). Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada dois ou três dias, durante 33 dias, e fixadas em lugol para o procedimento de contagem e estimativa da concentração celular.

Para mensurar a produção de toxinas paralisantes em diferentes fases do cultivo de *G. catenatum*, foram retirados três extratos, representativos da fase exponencial de crescimento, início da fase estacionária e início da fase de decaimento do cultivo. Para tanto, filtraram-se as células cultivadas em sistema de filtração a vácuo, utilizando filtro de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro, do tipo Whatman GF/C. O volume filtrado para cada extrato variou entre 338 e 500 mL, e foi o maior possível visando ao acúmulo de um grande número de células.

Os filtros foram imediatamente secos com auxílio de nitrogênio gasoso e congelados em freezer. A extração das toxinas foi realizada somente nos momentos precedentes às análises. Nesta etapa, os filtros foram cortados em pedaços pequenos, adicionados 4mL de ácido acético 0,1M e expostos à ação de ultrassom. Uma última filtragem em filtro de fibra de vidro eliminou todo o resíduo particulado.

Análise de toxinas paralisantes por cromatografia líquida

A exemplo da análise de ácido domóico em *Pseudo-nitzschia* spp., a análise de toxinas paralisantes em *G. catenatum* foi efetuada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® LC10 equipado com sistema de desgassificação por bolhas de hélio. O método utilizado foi uma adaptação do procedimento descrito por OSHIMA (1995), que consiste na separação iônica por CLAE, uma derivatização pós-coluna e a detecção por fluorescência.

A coluna cromatográfica usada foi uma LichroCart[®] 4,6 x 125mm, preenchida com partículas PARTISIL C-8 de 10 μ m. As fases móveis empregadas foram ácido 1-heptanossulfônico 2 mM em fosfato de amônio 10 mM (pH 7,1) nas análises de goniautoxinas (GTX-1, GTX-2, GTX-3 e GTX-4) e uma mistura de ácido 1-heptanosulfônico 2 mM em fosfato de amônio 30 mM (pH 7,1) e acetonitrila (100:6) nas análises de saxitoxinas e neosaxitoxinas (STX e neoSTX). A coluna foi mantida a 30°C e a fase móvel num fluxo isocrático de 0,6 mL.min⁻¹. As amostras foram previamente misturadas à fase móvel (1:1), homogeneizadas e em seguida inseridas em um injetor Rheodine[®] 7725i, equipado com um *loop* de 20 μ L.

As reações pós-coluna ocorreram em um tubo de 0,5 mm de diâmetro e 10 m de comprimento, aquecido a 85°C. As reações consistiram em uma oxidação com ácido periódico 7 mM em fosfato de potássio (pH 9,0) e uma acidificação com ácido acético 500 mM, sob um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹.

A detecção das toxinas foi feita em um fluorímetro Shimadzu[®] modelo RF51, ajustado para 330 nm de excitação e 390 nm de emissão. A análise de cada amostra durou 20 minutos, adicionados de 5 a 10 minutos de espera antes da próxima corrida cromatográfica. Os dados gerados foram armazenados e processados em microcomputador, utilizando-se um programa de aquisição Shimadzu[®] LC10. As amostras foram comparadas aos padrões de GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-4, SXT e neoSTX, obtidos junto a CNRC/Canadá.

Para um outro grupo de toxinas paralisantes, C-1, C-2, C-3, C-4, GTX-5 e GTX-6, não existia um padrão disponível. Mesmo assim, foi possível analisar suas presenças depois que os extratos foram submetidos a uma hidrólise ácida. Este procedimento consistiu em adicionar a um volume do extrato já dissolvido em ácido acético 0,1 M, uma quantidade igual de ácido clorídrico 0,4 N, e aquecer a mistura a 100°C durante 15 minutos. Com isso, ocorrem as seguintes conversões moleculares: C-1 em GTX-2; C-2 em GTX-3; C-3 em GTX-1; C-4 em GTX-4; GTX-5 em STX; e GTX-6 em neoSTX. Logo após a hidrólise, as amostras foram analisadas novamente, seguindo as mesmas condições já descritas. Desta forma, os tipos moleculares de toxina que não tinham padrões, puderam ser comparados aos padrões das suas formas hidrolisadas. A análise completa foi apta a detectar 12 tipos distintos de toxinas paralisantes.

Teste de toxicidade aguda em camundongos

Foram separadas alíquotas de 1 mL dos mesmos extratos analisados por cromatografia para testar a toxicidade em camundongos. A cada extrato, adicionou-se 2 mL de ácido clorídrico 0,1 N. Essa mistura foi homogeneizada e injetada, intraperitonealmente, em três camundongos do tipo suíço, machos, com peso entre 17 e 22 g, sendo 1 mL por animal. Um quarto indivíduo serviu como controle do procedimento. Neste, injetou-se 1 mL de uma mistura entre ácido acético 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 N (1:2).

Depois de injetados os extratos, o tempo de morte de cada camundongo foi quantificado. Como o tempo decorrido desde a injeção até a morte do animal é proporcional à quantidade de toxinas presentes na amostra (Anexo 1), pôde-se obter a toxicidade de cada uma delas, expressa em MU², ou “*mouse unit*”. Para que a conversão tivesse maior eficiência, fizeram-se necessárias diluições dos extratos com maior toxicidade para que os tempos de morte dos camundongos se compreendessem entre 6 e 8 minutos, momento em que a relação entre o tempo e a toxicidade é mais robusta. Quando o tempo de morte foi superior a 60 minutos, adotou-se um mesmo valor de MU, o último da tabela de conversão e que corresponde ao tempo de morte de uma hora (Anexo 1). Ainda, quando o peso do camundongo foi diferente de 20 g, multiplicou-se o valor de toxicidade obtida por um fator de correção (Anexo 2).

Sabendo-se que 1 MU equivale à cerca de 0,2 µg de saxitoxina (PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001), a principal toxina paralisante, calcularam-se os valores obtidos em equivalentes de saxitoxina - STXeq. Como o número de células filtradas de *G. catenatum* era conhecido, pôde-se calcular, ainda, a quantidade de toxinas presentes por célula nas diferentes fases do cultivo, expressa em µg STXeq .cel⁻¹.

Heterosigma akashiwo

A alga foi mantida em incubadora a uma temperatura de 20°C, intensidade de luz de 48 µE.m².s⁻¹, fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro) e salinidade de 32 a

² MU: *mouse unit*: quantidade de toxina suficiente para provocar a morte de um camundongo de 20 g em 15 minutos, por meio de injeção intraperitoneal.

35 em meio de cultivo F/2. A partir daí, as culturas foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL e acompanhou-se o crescimento através de contagens em intervalos de dois a três dias. Para tanto, três alíquotas de 1 mL eram retiradas do meio e fixadas com lugol acético (0,075%) em cada intervalo de tempo. Devido à fragilidade da parede celular dessa alga, a concentração da solução fixadora foi bastante baixa para evitar o rompimento das células, e a contagem teve que ser realizada imediatamente.

Como o mecanismo tóxico desta alga não é bem claro e não existe uma metodologia para determinação de toxinas por cromatografia, buscou-se medir seu potencial nocivo por testes de toxicidade em organismos marinhos. Os organismos testados foram juvenis do misidáceo *Mysidopsis juniae* Silva, 1979, larvas do molusco *Perna perna* e pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931.

Teste de toxicidade com juvenis de *Mysidopsis juniae*

O teste com *M. juniae* seguiu a metodologia proposta pela CETESB (1992). Misidáceos são microcrustáceos onívoros componentes do zooplâncton e constituem um importante elo nas cadeias tróficas marinhas costeiras. Esses organismos têm sido bastante usados em testes de toxicidade envolvendo poluentes, assim como em testes com algas nocivas.

Os organismos foram obtidos junto ao Laboratório de Ecotoxicologia (LETOX) da UNIVALI. Os indivíduos adultos (matrizes) foram mantidos em aquários com água do mar filtrada a uma temperatura de 20°C, salinidade 32 e aeração constante, e receberam diariamente náuplios de *Artemia salina* Linnaeus, 1758 como alimento. Depois de realizada a limpeza do aquário, retirou-se indivíduos juvenis para serem usados no teste.

O teste iniciou quando o cultivo de *Heterosigma akashiwo* atingiu o final da fase exponencial de crescimento. Testou-se a exposição de juvenis de misidáceos à concentração total do cultivo (100%) e a diluições em água do mar filtrada que equivaleram a 50, 10, 1, 0,1 e 0,01% da concentração inicial de microalgas. Um controle contendo somente água do mar filtrada também foi adotado. Tanto o controle, como as concentrações celulares, foram testados com três réplicas.

Para a realização do teste, foram separados 210 misidáceos juvenis com 4 dias de idade. Cada grupo de dez indivíduos foi disposto em frascos de vidro contendo 200 mL das concentrações de *H. akashiwo* ou do controle. Em seguida, adicionou-se cerca de 300 náuplios recém-eclodidos de *A. salina* para a alimentação. O teste durou 96 horas, sendo que a cada 24 horas foi feita a contagem e a retirada de indivíduos mortos dos frascos, bem como a administração de nova dose de alimento. Os misidáceos foram considerados mortos quando estavam visivelmente imóveis e não respondiam a estímulos mecânicos suaves durante cerca de 30 segundos.

Durante o teste, as condições de luz, temperatura e salinidade mantiveram-se as mesmas a que os organismos estavam submetidos, ou seja, temperatura de 20°C, intensidade luminosa de 51 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 horas (claro: escuro) e salinidade de 32. O pH e a concentração de oxigênio dissolvido foram monitorados durante o experimento, por meio das sondas específicas Thermo Orion® 370 e YSI® 58, respectivamente.

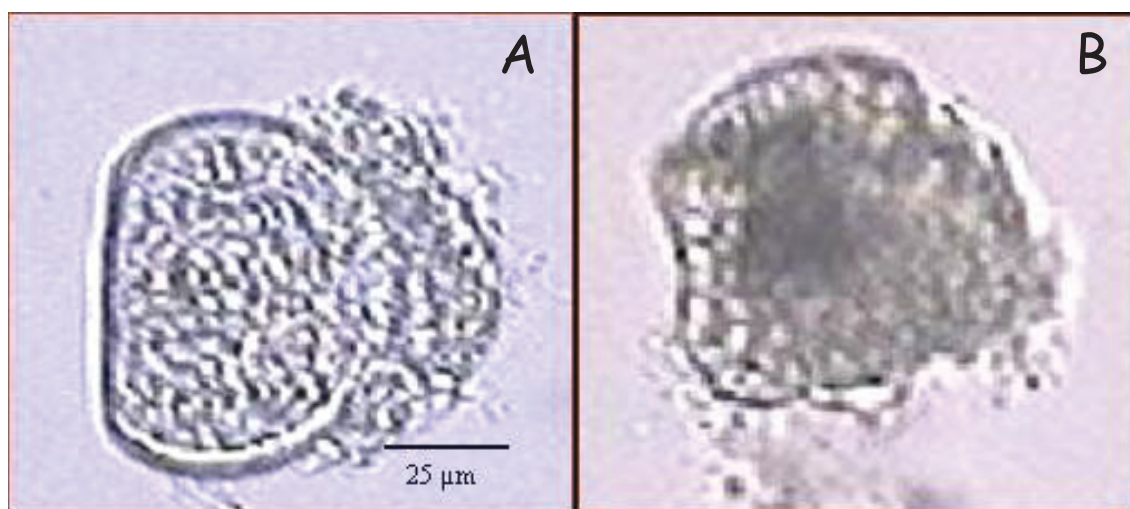
Teste de toxicidade embrio-larval com *Perna perna*

Antes da realização deste teste, a cepa de *Heterosigma akashiwo* foi aclimatada em meio de cultivo F/10, ou seja, os mesmos nutrientes presentes no meio F/2, porém cinco vezes menos concentrado. O método adotado neste teste seguiu as recomendações de REIS FILHO (1999). Foram adicionados 10 mL do cultivo de *H. akashiwo* em frascos plásticos de 15 mL, nas concentrações correspondentes a 100, 50, 10, 5, 1, 0,1 e 0,01% da concentração celular do cultivo. Um tratamento controle com água do mar filtrada também foi aplicado, a exemplo das concentrações, com 4 réplicas. A seguir, foram inoculados 200 μL de uma solução contendo um número mínimo de 300 ovos de *Perna perna* por frasco. A solução foi obtida após a desova induzida dos mexilhões e a mistura de espermatozóides e óvulos em um frasco, agitando moderadamente e observando em microscópio, até ocorrer a fecundação.

Esse foi um teste crônico, caracterizado por detectar um efeito sub-letal no organismo testado, ou seja, o atraso no seu desenvolvimento. Tal atraso foi medido por meio da contagem dos percentuais de larvas desenvolvidas e deformadas

depois de decorridas 48 horas de teste (Figura 3). A contagem das larvas foi realizada em câmara de sedimentação do tipo Sedgewick-Rafter, sob microscópio óptico. As condições de temperatura e luz foram mantidas constantes durante o teste e o pH e salinidade foram monitorados com o auxílio de sondas específicas.

Figura 3 - Fotomicrografia da larva-D do molusco bivalve *Perna perna* cerca de 48 horas após sua fecundação. (A) Larva com desenvolvimento normal; (B) larva com desenvolvimento anômalo.



Teste de toxicidade com pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*

O camarão *L. vannamei* é uma espécie exótica, mas que está amplamente difundida no litoral brasileiro em sistemas de cultivo em tanques costeiros fechados, inclusive em regiões adjacentes ao complexo estuarino de Paranaguá e Baía de Guaratuba, PR. Procurou-se estimar, através do experimento, qual seria o efeito de uma floração de *H. akashiwo* em um tanque deste importante recurso econômico.

As pós-larvas de *L. vannamei* que serviram de organismo-teste foram fornecidas pelo Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde é feita a reprodução desta espécie. As cerca de 1000 pós-larvas com idade de 21 dias (PL-21) foram transportadas em sacos plásticos com a água do tanque, adicionando oxigênio pressurizado e uma porção do microcrustáceo *Artemia salina* como alimento.

As pós-larvas foram acondicionadas em aquários contendo água do mar filtrada, com temperatura em torno de 20°C e salinidade de 35, sob aeração

moderada e constante. Foi administrado, durante o período de manutenção em laboratório, o uso de ração específica para este organismo, oferecida de 2 a 3 vezes ao dia. Foi necessária a troca diária de parte da água de manutenção.

Quando foram utilizadas no teste, as pós-larvas tinham 22 dias de idade (PL-22). O teste durou 48 horas e buscou avaliar o efeito letal de três densidades diferentes da alga, comparando a um controle. As concentrações celulares distintas foram conseguidas a partir de diluições do cultivo de *H. akashiwo* em água do mar filtrada, correspondendo a 100, 50 e 20% da densidade original. A concentração celular foi estimada através de contagem microscópica em câmara de contagem tipo Sedgewick-Rafter. O controle foi feito com água do mar filtrada e de mesma salinidade e, a exemplo dos tratamentos, possuiu três réplicas.

Em cada frasco de 1 litro, foram adicionados 500 mL do meio com as diferentes concentrações de células ou do controle, e acrescentadas cerca de 20 pós-larvas. As pós-larvas foram todas medidas sob lupa, adotando-se o comprimento como sendo a medida entre as extremidades do rostro e do telso, expresso em milímetros. Durante o experimento, a temperatura foi controlada em torno de 20°C, com fotoperíodo de 12:12 horas, iluminação de cerca de 50 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$, aeração suave constante e não foi fornecida alimentação. A concentração de oxigênio dissolvido e o pH foram monitorados.

A taxa de mortalidade (%) foi verificada após 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas. Foi atribuída mortalidade aos indivíduos que visivelmente estavam imóveis e não respondiam a estímulos mecânicos suaves durante cerca de 30 segundos.

Tratamento dos dados

Os testes aplicados com juvenis de misidáceos *Mysidopsis juniae* e pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* foram testes de toxicidade aguda, que buscaram medir o efeito letal da alga nociva *Heterosigma akashiwo* sobre os organismos. Quando esse efeito existiu, ele pôde ser expresso sob a forma de uma concentração letal mediana (CL_{50}), ou seja, a concentração celular capaz de provocar a morte de metade dos organismos-teste durante o experimento.

Já o teste de desenvolvimento larval no molusco *Perna perna* foi um teste de toxicidade crônica, onde se mediu um efeito sub-letal, o retardo no desenvolvimento

provocado pelo contato dos organismos-teste com diferentes concentrações da alga. Neste caso, quando há um efeito positivo, pode-se calcular a CE_{50} , que é a concentração capaz de atrasar o desenvolvimento de metade dos ovos testados durante o período.

Quando a concentração testada não foi suficiente para matar ou manifestar o efeito em pelo menos metade dos organismos-teste, buscou-se determinar se o efeito das diversas concentrações celulares testadas diferiu do controle, através do teste de Willians. Como resultado deste teste, determina-se a concentração de efeito não-observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO). A primeira é a maior concentração testada que não provoca efeito estatisticamente diferente do controle, e a outra é a menor concentração capaz de provocar um efeito distinto do controle.

Para auxiliar o cálculo e avaliação dos resultados foram aplicados o pacote estatístico ToxStat[®] e o *software* TSK Spearman-Kärber. Essas ferramentas geraram valores de CL_{50} ou CE_{50} , CENO e CEO a partir dos dados de mortalidade por concentração, ao longo do teste.

4.5 Ficotoxinas no molusco *Mytella guyanensis*

O sururu (*Mytella guyanensis*) foi usado como organismo-teste para a detecção de ficotoxinas no ambiente. O material foi coletado em parceria com o IBAMA/Paranaguá e a EMATER e as amostragens foram realizadas em agosto, setembro, outubro e dezembro de 2002, fevereiro, março, abril, junho, setembro e outubro de 2003, totalizando dez coletas num período de quinze meses.

As estações de coleta foram localizadas ao lado de colônias de pescadores, em bancos de extração costumeiramente utilizados pelos moradores. Em cada local, foram coletados entre um e dois quilogramas de sururu. A estação S-1 situou-se na região de desembocadura do rio Maciel (25°33'16.0" S, 48°24'52.9" W); a estação S-2 encontrou-se mais próxima ao Porto de Paranaguá, junto à localidade de Piassaguera (25°28'19.0" S, 48°26'08.9" W); e a estação S-3 esteve localizada na comunidade de pescadores de Europinha (25°27'17.8" S, 48°36'00.8" W). Alguns locais de coleta de fitoplâncton foram propositalmente dispostos próximos às

estações de coleta de sururu³, havendo relação entre a estação 2 e a S-1, a estação 3 e a S-2 e entre a estação 5 e a S-3. Por problemas operacionais, a coleta de moluscos na estação S-3 deixou de ser realizada a partir de abril de 2003.

Os moluscos coletados foram transportados ao Laboratório de Estudos sobre Algas Nocivas, na UNIVALI, em Itajaí, SC. Foram realizados testes para a detecção de ficotoxinas causadoras de envenenamento paralisante (PSP), diarréico (DSP) e amnésico por moluscos (ASP). Os testes de toxicidade aguda com camundongos do tipo suíço foram realizados para a detecção de toxinas do PSP e DSP. Em caso de resultado positivo, procurou-se confirmar a presença das toxinas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Por último, a investigação de toxinas do ASP foi realizada diretamente por CLAE. As metodologias envolvidas em cada análise serão detalhadas a seguir.

4.5.1 Detecção de toxinas do PSP

O método para a detecção de toxinas paralisantes foi baseado na norma da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990), com utilização da tabela de Sommer (FERNÁNDEZ; CEMBELLA, 1995) para a expressão dos resultados.

Os sururus foram limpos externamente e abertos com a secção dos músculos adutores. Em seguida, retirou-se das conchas todos os tecidos e vísceras, escorrendo o líquido em excesso, até somar cerca de 150 g de carne. Triturou-se a carne com o auxílio de um triturador de tecidos, obtendo-se uma pasta homogênea.

Foram pesados 100 g da pasta e adicionados 100 mL de ácido clorídrico 0,1 N. Quando necessário, o pH foi corrigido com algumas gotas de ácido clorídrico 5 N, para que o seu valor estivesse entre 2,5 e 4. A mistura foi fervida por 5 minutos. Depois de esfriar, o pH foi conferido e, caso necessário, corrigido. A mistura foi aferida a 200 mL usando a adição de água acidificada (pH 4), para repor a perda de líquido evaporado. Centrifugou-se o extrato a 3000 rpm durante 3 minutos. O líquido sobrenadante foi separado para o teste.

Em um camundongo macho do tipo suíço, pesando 20 g, injetou-se 1 mL do extrato e observou-se o efeito durante 30 minutos. Em caso de amostras com

³ Ver Figura 1 - mapa da área de estudo - em Material e Métodos, sessão 4.1, página 10.

moluscos intoxicados por toxinas paralisantes, o efeito é letal e o tempo decorrido desde a injeção até a morte é proporcional a sua toxicidade. No caso do camundongo ter um peso diferente, mas próximo de 20 g, calcula-se um fator de correção. Os resultados são expressos em MU, ou “*mouse units*”.

4.5.2 Detecção de toxinas do DSP

Teste de toxicidade aguda com camundongos

Para a detecção de toxinas diarréicas, o método usado foi o descrito em YASUMOTO et al. (1984), que se aplica a tecidos de diversos moluscos. Os sururus foram limpos externamente e abertos com a secção dos músculos adutores. As glândulas digestivas (hepatopâncreas) foram dissecadas com cuidado para não haver rompimento e evitando ao máximo a inclusão de outros tecidos. Os hepatopâncreas foram secos em papel absorvente e pesados até perfazerem um total de 15 g. O material foi então homogeneizado com um triturador de tecidos biológicos. Ao homogeneizado, adicionou-se 37,5 mL de acetona e centrifugou-se a mistura a 3.000 rpm, durante 3 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro. Repetiu-se mais duas vezes a adição do mesmo volume de acetona, a centrifugação e a filtração, juntando todo o líquido filtrado em um balão rotatório. Este extrato acetônico foi seco em um rota-evaporador, a uma temperatura de 40°C. O resultado final foi um resíduo de consistência pastosa.

O resíduo sofreu uma partição em éter etílico e água para eliminar possíveis interferentes. Adicionou-se 15 mL de água destilada ao resíduo e extraiu-se o mesmo com 27 mL de éter etílico. Repetiu-se por mais duas vezes a extração com o mesmo volume de éter etílico. O extrato foi acondicionado em um funil de separação, aguardando a separação das fases aquosa e etílica. Descartou-se a fase inferior (aquosa) e promoveu-se a lavagem com mais 15 mL de água destilada. A mistura foi agitada com cuidado e aguardou-se novamente a separação para descartar a fração aquosa. Este procedimento foi repetido mais uma vez. O extrato etílico foi seco em rota-evaporador a 40°C e o resíduo ressuspenso em 3 mL de solução Tween 1%, representando o extrato final.

Quatro camundongos foram selecionados, todos do tipo suíço, machos e pesando entre 18 e 21 g. No camundongo controle, injetou-se intraperitonalmente 1

mL de solução Tween 1%. Nos outros três foi injetado 1 mL do extrato em cada. Os camundongos foram observados para perceber a presença de sintomas. Toma-se como positivo o ensaio que produz a morte de pelo menos dois camundongos em 24 horas. Os ensaios foram feitos em presença de água e alimento.

Confirmação por cromatografia líquida

Quando o teste de toxicidade aguda expressou resultado positivo, a presença de toxinas diarréicas teve que ser confirmada por análise de cromatografia líquida. O método usado foi desenvolvido por PEREIRA et al. (1995).

Em quatro alíquotas de 0,5 g de hepatopâncreas, foram adicionados 2 mL de metanol 80%, agitando por 2 minutos e centrifugando por mais 5 minutos. Transferiu-se 1,25 mL do sobrenadante (extrato metanólico) para um novo recipiente onde foram acrescentados 1,25 mL de hexano, agitando logo em seguida por um minuto e centrifugando por mais um minuto, a 3000 rpm. Reservou-se a fase inferior da mistura, correspondente ao extrato metanólico, e repetiu-se a lavagem com hexano. Ao extrato metanólico, acrescentaram-se 0,5 mL de água destilada e 2 mL de clorofórmio. A mistura foi agitada e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. Em seguida, a porção inferior (clorofórmica) foi transferida para uma proveta graduada. Repetiu-se este fracionamento mais uma vez, juntando a nova fração clorofórmica na proveta. A seguir, aferiu-se o extrato a 5 mL com clorofórmio puro. Para eliminar resíduos de água do extrato, adicionou-se uma pequena quantidade de sulfato de sódio, que sedimentou juntamente com a água. Por fim, transferiu-se 1 mL do extrato para um tubo e secou-se com auxílio de gás nitrogênio.

Numa segunda etapa, as quatro amostras foram derivatizadas, ou seja, foram misturadas a uma substância que se liga à toxina e cuja detecção pode ser obtida por fluorescência. Cada um dos extratos secos foi dissolvido em 200 μ L de solução derivatizante 9-antrildiazometano 1% (ADAM 1%). Foram produzidas outras três amostras para servir de controle negativo, consistindo em 200 μ L de água filtrada em sistema Mili-Q. Também foram gerados controles positivos (padrões), sendo três amostras compostas por 200 μ L de solução padrão de ácido ocadáico (OCA) 0,5 μ g.mL⁻¹ acrescidos de 200 μ L de ADAM. A eficiência da solução derivatizante foi testada pela ligação a uma solução de ácido deoxicólico (DEO), ao qual o derivatizante demonstra elevada afinidade. Obteve-se, desta forma, mais três

amostras compostas por 200 μL de ADAM somados a 10 μL de DEO. Finalmente, outras três amostras resultaram da mistura de 200 μL de solução padrão de ácido ocadáico, 200 μL de ADAM e 10 μL de DEO. Todas as 16 amostras foram incubadas em banho-maria a 40°C, durante uma hora, e depois secas na presença de nitrogênio gasoso.

A terceira etapa consistiu na limpeza das amostras, fazendo-as passar através de um cartucho de sílica. Cada amostra seca foi dissolvida em 200 μL de solução diclorometano e hexano (1:1) e injetada no cartucho de sílica. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida, forçou-se a passagem pelo cartucho de 3 mL de solução diclorometano e hexano (1:1). Descartou-se o líquido que passou pelo cartucho, já que os complexos OCA-ADAM e/ou DEO-ADAM permaneceram retidos nos grãos de sílica, no interior do cartucho. Em seguida, passou-se pelo cartucho 5 mL de solução diclorometano e acetona (95:5), também descartando o líquido. Por último, 5 mL de solução diclorometano e acetonitrila (1:1) foram injetados no cartucho para retirar o material retido. Esta última alíquota foi recolhida e seca com nitrogênio gasoso.

Cada amostra foi ressuspensa em 1 mL de metanol. Desta solução, retirou-se 100 μL e foram acrescentados 100 μL de acetonitrila 80%, misturando. Esta mistura foi injetada manualmente em um injetor Rheodine[®], equipado com um *loop* de 100 μL para ser analisada em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu[®] LC10. A fase móvel utilizada foi uma solução de acetonitrila e água (8:2) e, como fase estacionária, a coluna cromatográfica LiCrhospher[®] 100 RP-18 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno). A temperatura do forno que aqueceu a coluna foi mantida em 40°C e o fluxo de passagem da fase móvel foi de 1 mL.min⁻¹. A detecção foi feita por um fluorímetro Shimadzu[®] modelo RF51, ajustado para um comprimento de onda de excitação de 365 nm e de 412 nm de emissão. Cada análise durou 30 minutos.

4.5.3 Detecção de toxinas do ASP

O ácido domóico, toxina causadora de ASP, foi analisado diretamente por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, seguindo o método desenvolvido por QUILLIAM, XIE e HARDSTAFF (1995). Para tanto, reservou-se uma alíquota de

1 g de hepatopâncreas triturado e homogeneizado de cada uma das amostras de sururu. À amostra, foram adicionados 4 mL de uma solução de metanol e água (1:1). O conteúdo foi centrifugado por 10 minutos, a 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro de fibra de vidro com porosidade de 0,45 µm.

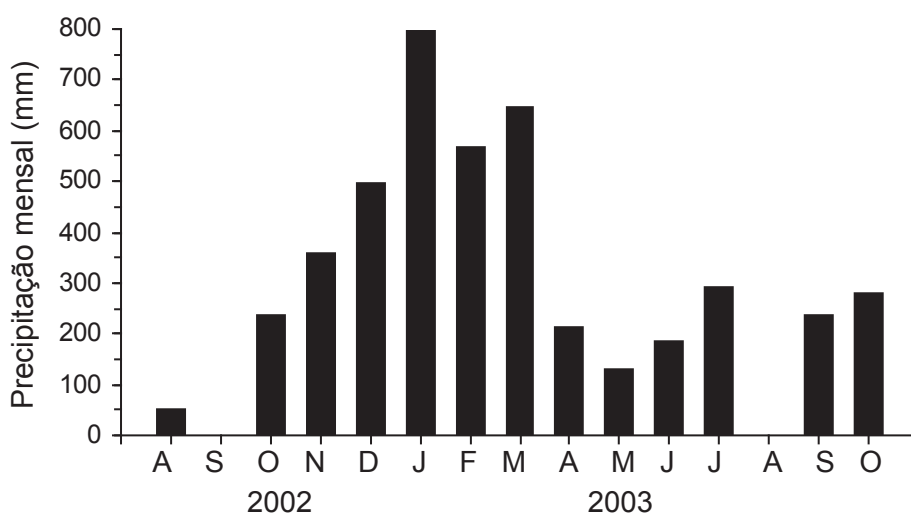
O filtrado foi limpo através da passagem por um cartucho com trocador aniônico forte (SAX). Este procedimento visou livrar a amostra de possíveis interferentes à cromatografia e concentrá-la, facilitando a análise de níveis traços de toxina. As amostras, diluídas em fase móvel, foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu[®] LC10, depois de injetadas manualmente em um injetor Rheodine[®] 7725i, equipado com um *loop* de 20 µL. A cromatografia ocorreu em uma coluna Supelcosil (Supelco[®]), empacotada com partículas de 4 µm de octadecilsilano (ODS). A fase móvel consistiu em solução de acetonitrila 10% acidificada com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA 0,1%). A temperatura da coluna foi mantida em 40°C e o fluxo da fase móvel em 1 mL.min⁻¹. Todos os reagentes utilizados foram de grau espectroscópico e a água filtrada em sistema Mili-Q. O tempo de retenção e o espectro de absorvância do ácido domóico foram obtidos por análise de padrão de ácido domóico (Sigma[®] #D6152). Os dados gerados durante a cromatografia foram armazenados e processados em microcomputador, utilizando um programa de aquisição LC10, também da marca Shimadzu[®].

5 RESULTADOS

5.1 Oscilações espaciais e temporais nas variáveis ambientais e clorofila-a

As maiores concentrações de chuvas ocorreram durante o verão (dezembro a março) e as menores durante o inverno (maio a setembro). O mês que registrou a maior pluviosidade foi janeiro de 2003, com 797,31 mm e os menos chuvosos foram agosto de 2003, quando não houve precipitação, e setembro de 2002, quando choveu somente o equivalente a 1,52 mm (Figura 4).

Figura 4 - Pluviosidade mensal (mm) no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.



Fonte: Centro de Estudos do Mar / Universidade Federal do Paraná

As variáveis físico-químicas da água e clorofila-a variaram bastante durante o período de estudo. Como os pontos de coleta foram dispostos propositalmente de forma a contemplar um gradiente no ambiente, principalmente de salinidade, os resultados neste item foram agrupados por local de amostragem.

Na estação 1, localizada na foz do complexo estuarino, a profundidade variou entre 12 e 15 m e a temperatura da água entre 19,8°C, em setembro de 2003 e 29,2°C em fevereiro do mesmo ano (Figura 5). Neste local foram obtidos os maiores

valores de salinidade do estudo, variando entre 25,1 em fevereiro e 34 em junho de 2003. A transparência da água oscilou entre 1,2 m em setembro de 2003 e 3,5 m em abril do mesmo ano. As concentrações de nutrientes dissolvidos neste local foram as menores encontradas durante a investigação, com valores mínimos e máximos de 0,03 e 0,33 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ N-NO₂; 0 e 11,59 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ N-NH₄; 0 e 3,13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ N-NO₃; 2,99 e 23,67 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de silicato; 0,29 e 0,60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato. As concentrações de clorofila-a variaram entre 0,58 e 5,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 5).

A estação 2, localizada próximo à foz do Rio Maciel, foi um dos dois locais de amostragem onde a baixa profundidade, entre 2 e 4,5 m, não viabilizou a coleta em um estrato intermediário. A temperatura da água na superfície sempre foi superior a do fundo (Figura 6). Os valores oscilaram entre 20,1°C em setembro de 2003 e 30,8°C em fevereiro do mesmo ano. As medidas de salinidade revelaram um padrão inverso ao da temperatura, variando de 18,5 em fevereiro de 2003 até 31 em agosto de 2002. A transparência da coluna d'água foi de 0,9 a 3 m. As concentrações de nitrito estiveram compreendidas entre 0,03 e 0,24 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de amônio entre 0,58 e 13,37 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de nitrato entre 0 e 1,65 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de silicato entre 6,28 e 48,55 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; e as de fosfato dissolvido variaram entre 0,13 e 0,61 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A menor concentração de clorofila-a foi de 1,18 e a maior de 3,75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 6).

A profundidade na estação 3 variou entre 6 e 12 m. Localizada defronte ao Porto de Paranaguá, a temperatura mínima da água nesta estação foi de 20,5°C em setembro de 2003 e a máxima de 30,1°C em fevereiro de 2003 (Figura 7). Os valores de salinidade variaram entre 18,6 em fevereiro de 2003 e 30,5 em agosto de 2002. A transparência da coluna d'água oscilou entre 0,80 e 2,20 m. A concentração de nitrito variou de 0,06 a 1,67 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; já a de amônio oscilou entre 0,30 e 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de nitrato entre 0,06 e 4,36 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de silicato entre 7,86 e 41,39 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; e de fosfato entre 0,16 e 1,06 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O conteúdo mínimo de clorofila-a foi de 0,96 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e o máximo observado foi de 18,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$, na superfície, em fevereiro de 2003 (Figura 7), quando havia uma concentração de $11,2 \cdot 10^6$ cels.L⁻¹ da diatomácea *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve.

Figura 5 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 1, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.

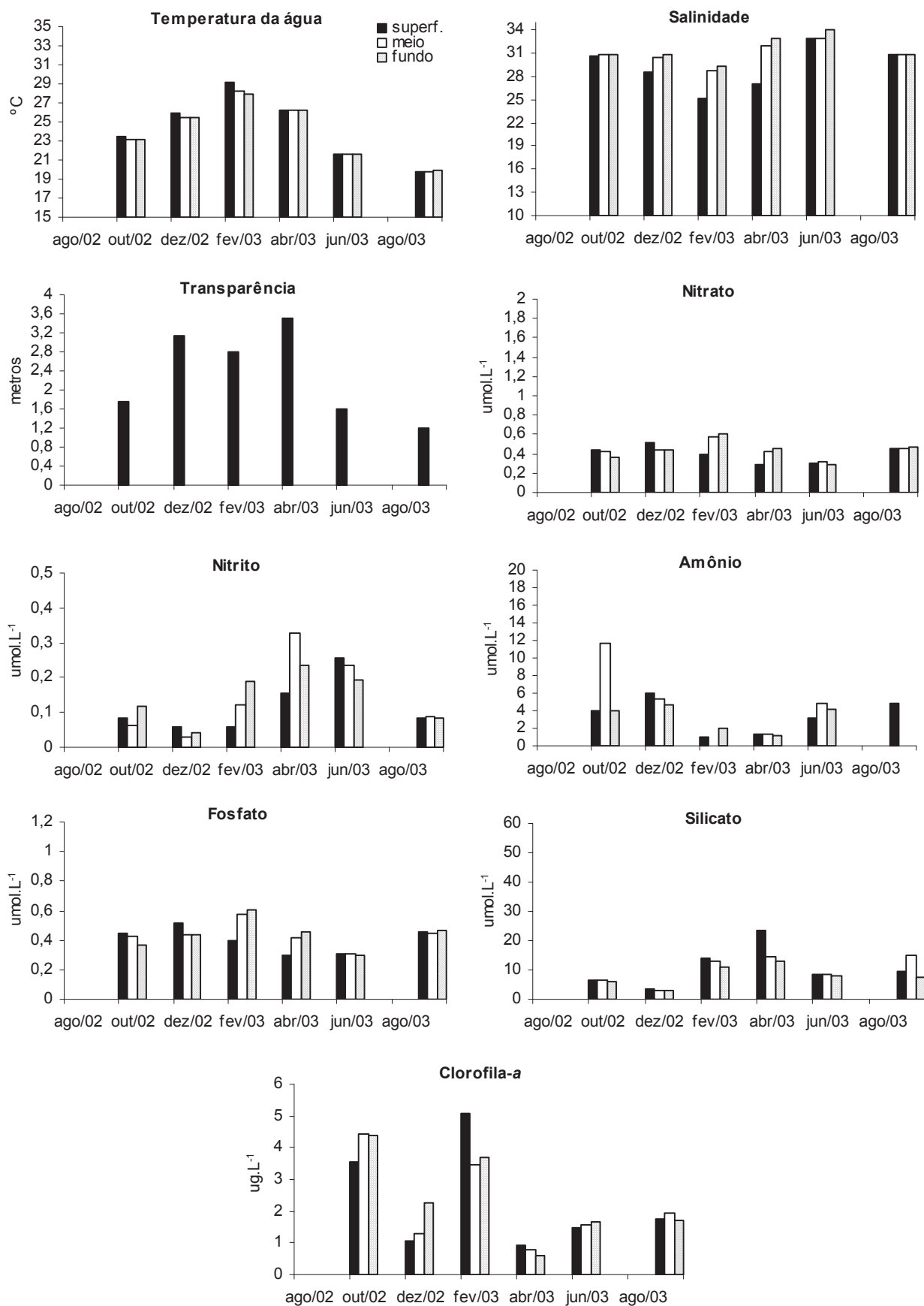


Figura 6 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 2, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.

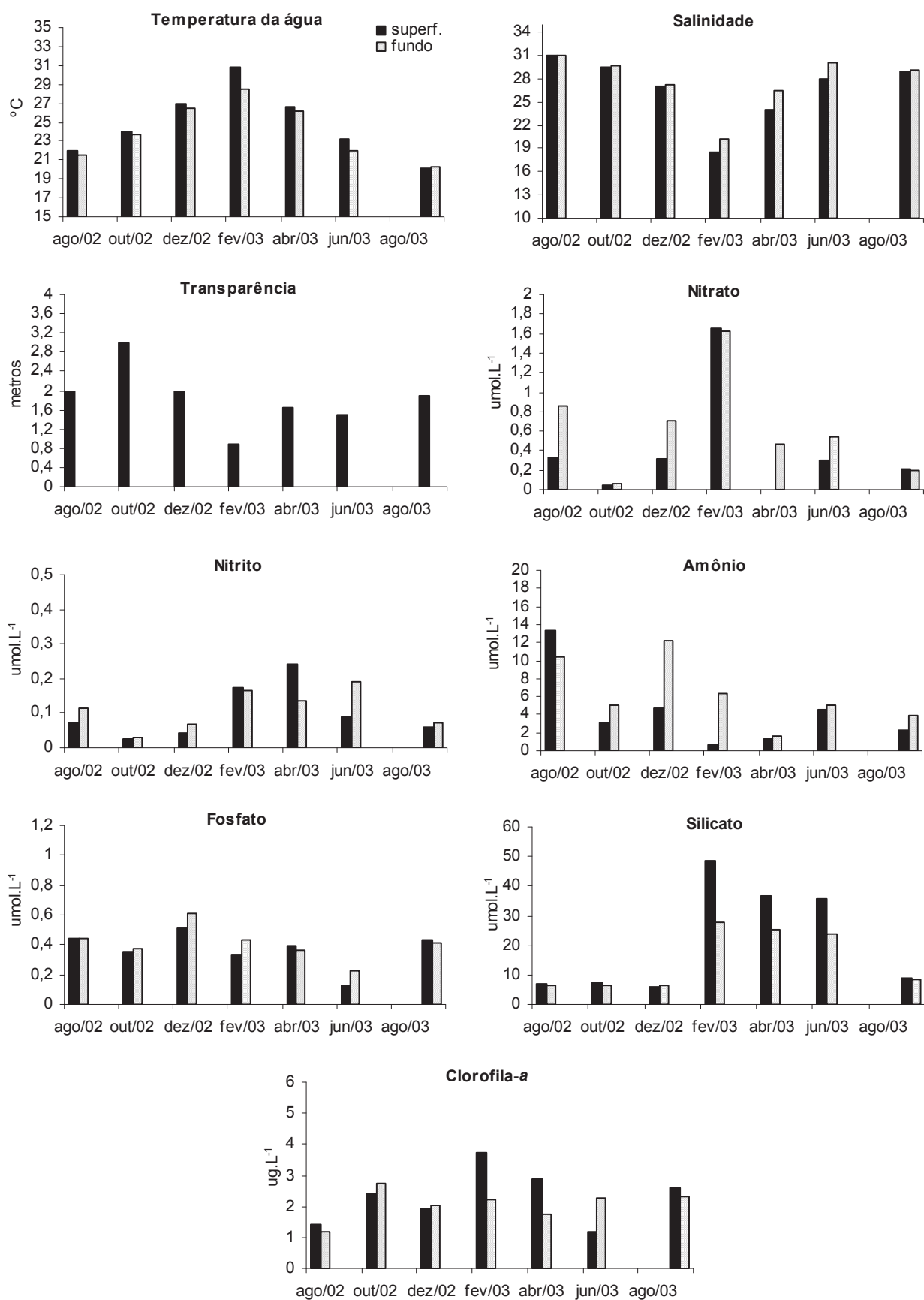
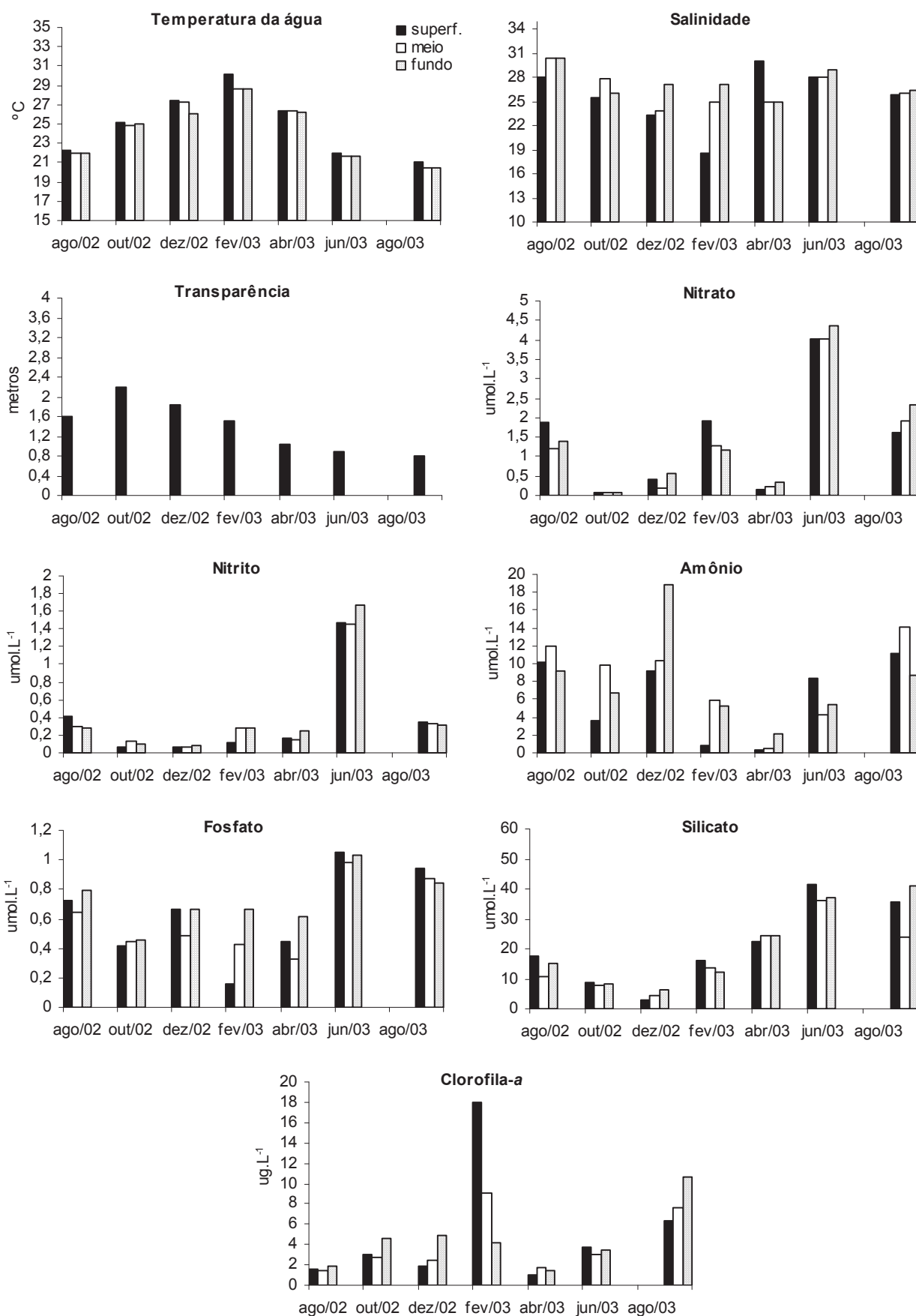


Figura 7 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 3, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.



A estação 4, na foz do Rio Itiberê e com profundidade variando entre 3 e 6 m, foi o outro caso em que a reduzida profundidade não permitiu a amostragem em um estrato intermediário da coluna d'água. Na superfície, registrou-se a maior temperatura da água, 32°C, em fevereiro de 2003. A temperatura mínima foi de 20,4°C em setembro de 2003 (Figura 8). A salinidade variou entre 18,8 e 25,8 e a transparência da água entre 1 e 2,3 m. A análise da concentração de nutrientes dissolvidos mostrou mínimo de 0,07 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e máximo de 0,47 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrito; 5,33 e 36,13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para amônio; 0,07 e 4,49 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrato; 8,93 e 31,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para silicato; e 0,35 e 10,05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para fosfato. A concentração de amônio, em junho de 2003 e a de fosfato, em outubro de 2002, foram as maiores registradas em toda a área de estudo. A concentração mínima de clorofila-*a* foi de 1,34 e houve um pico de 15,57 $\mu\text{g.L}^{-1}$ próximo ao fundo, em abril de 2003 (Figura 8), quando a concentração de *S. costatum* foi de $3,65 \cdot 10^6$ cels.L⁻¹.

A profundidade na estação 5 variou entre 6 e 9 m. A medida da temperatura da água revelou valores entre 19,8°C em setembro de 2003 e 29,8°C em fevereiro de 2003 (Figura 9). A salinidade mínima de 11,6 foi medida em fevereiro e a máxima de 27 em agosto. A transparência da água variou entre 0,4 e 1,2 m. Os valores de nutrientes foram 0,05 e 1,11 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrito; 5,42 e 17,48 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de amônio; 0,05 e 5,69 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrato; 5,22 e 85,26 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de silicato; e 0,44 e 1,19 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato. Neste ponto, registraram-se os maiores valores de clorofila-*a* durante o estudo, atingindo um máximo de 67,83 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no estrato profundo, em fevereiro de 2003, quando *S. costatum* atingiu a concentração de $19,77 \cdot 10^6$ cel.L⁻¹. O valor mínimo foi de 3,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 9).

A menor variação sazonal de temperatura da água foi observada na estação com localização mais interior (6), oscilando entre 19,9°C em setembro de 2003 e 26,8°C em abril de 2003 (Figura 10). De modo inverso, verificou-se a maior variação sazonal nos valores de salinidade, com um máximo de 22 em abril de 2003 e um valor mínimo tecnicamente nulo, de 0,2 em fevereiro do mesmo ano. Neste local, a transparência da água foi menor, variando entre 0,4 e 0,85 m. Quanto aos nutrientes dissolvidos, a concentração de nitrito variou entre 0,11 e 0,94 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de amônio entre 1,83 e 25,16 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de nitrato entre 0,26 e 9,68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; de silicato entre 14,45 e 113,67 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; e de fosfato entre 0,1 e 0,68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Este ponto apresentou as maiores concentrações de nitrato e de silicato dissolvidos. A concentração de clorofila-*a* oscilou entre 1,31 e 4,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 10).

Figura 8 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 4, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.

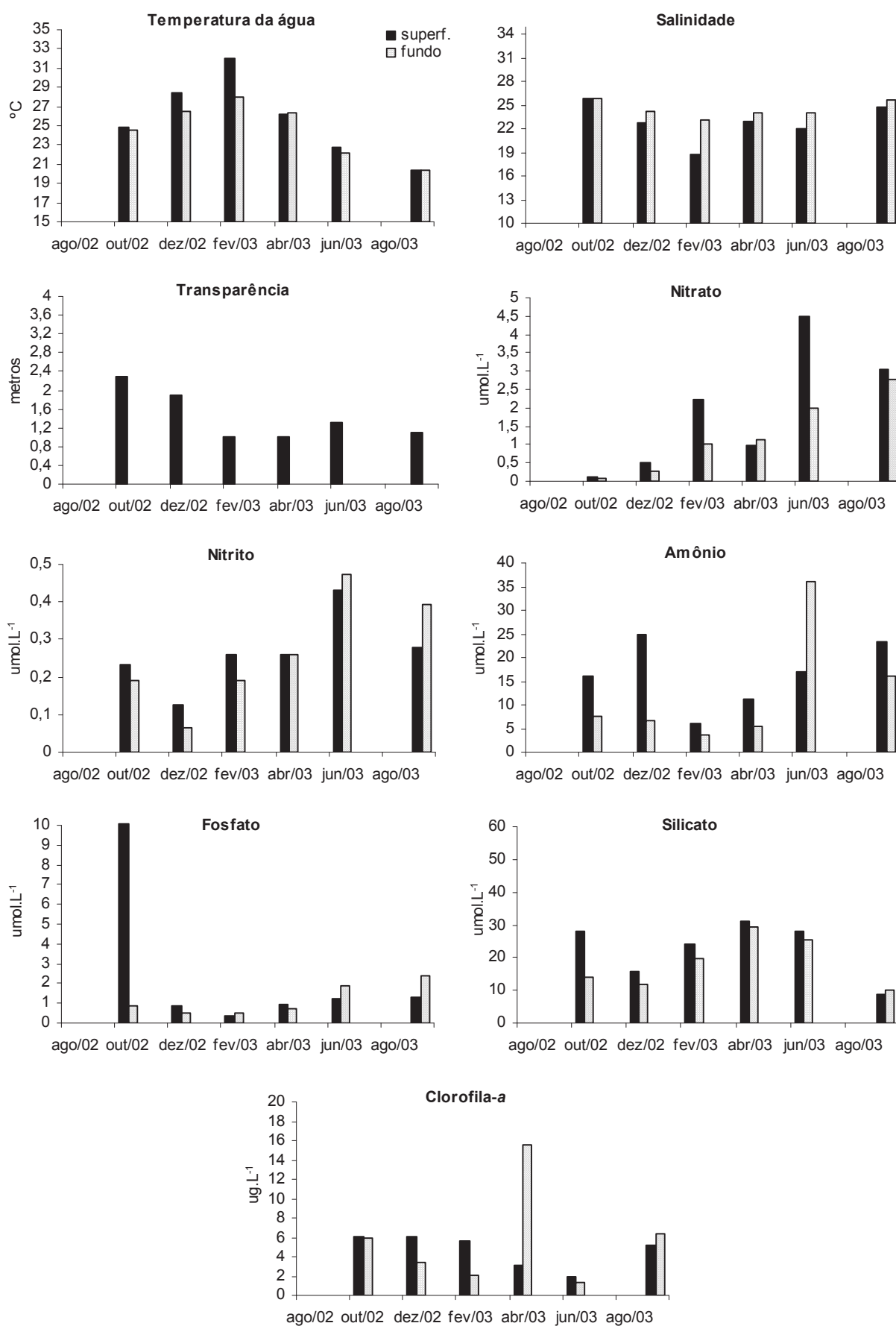


Figura 9 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 5, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.

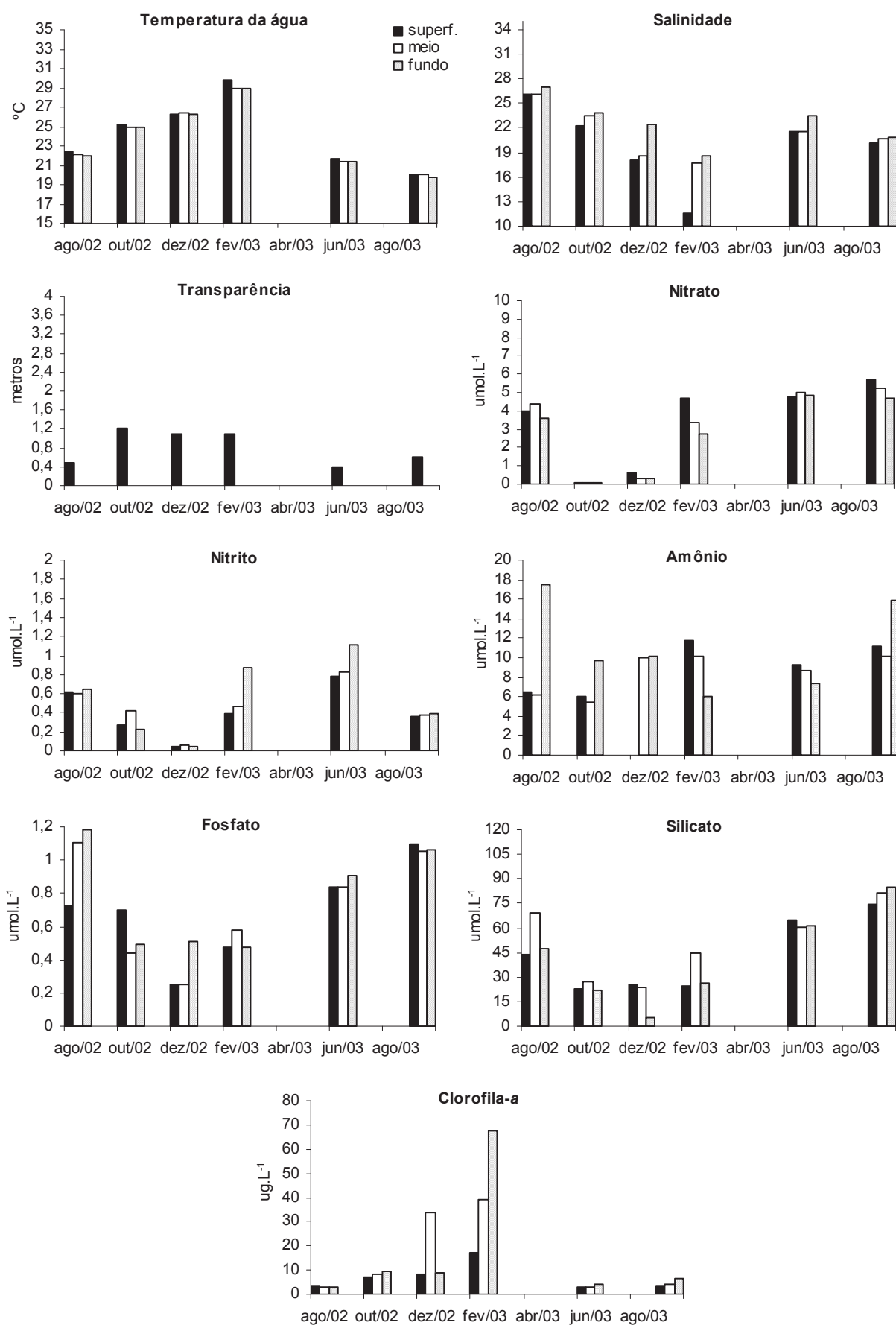
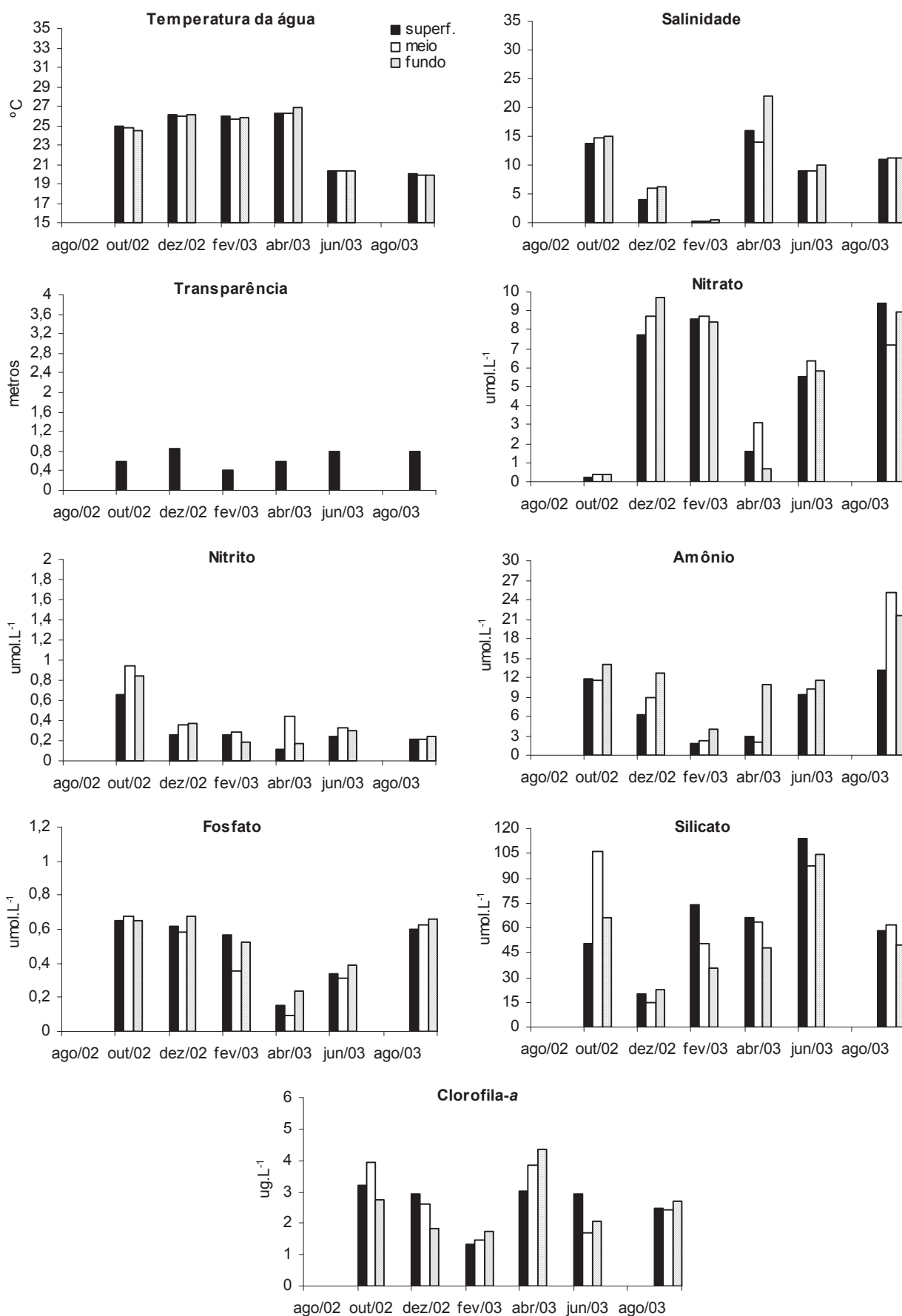


Figura 10 - Variáveis ambientais e clorofila-a medidas na estação de coleta 6, no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a setembro de 2003.



5.2 Microalgas nocivas e ficotoxinas

As algas potencialmente nocivas detectadas durante o período de estudo foram agrupadas segundo os efeitos deletérios que podem causar aos seres humanos, animais marinhos ou ao ecossistema. A maioria das espécies abordadas na presente investigação integra a lista de espécies tóxicas elaborada por um conjunto de especialistas e divulgada pela Comissão Intergovernamental Oceanográfica da UNESCO (IOC, 2003). Outras duas espécies que não estão incluídas na referida lista, *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg e *Coscinodiscus wailesii* Gran et Angst, foram adicionadas à investigação pela possibilidade de formarem florações associadas a danos econômicos e ecológicos e pelo histórico na região.

5.2.1 Microalgas produtoras do ASP

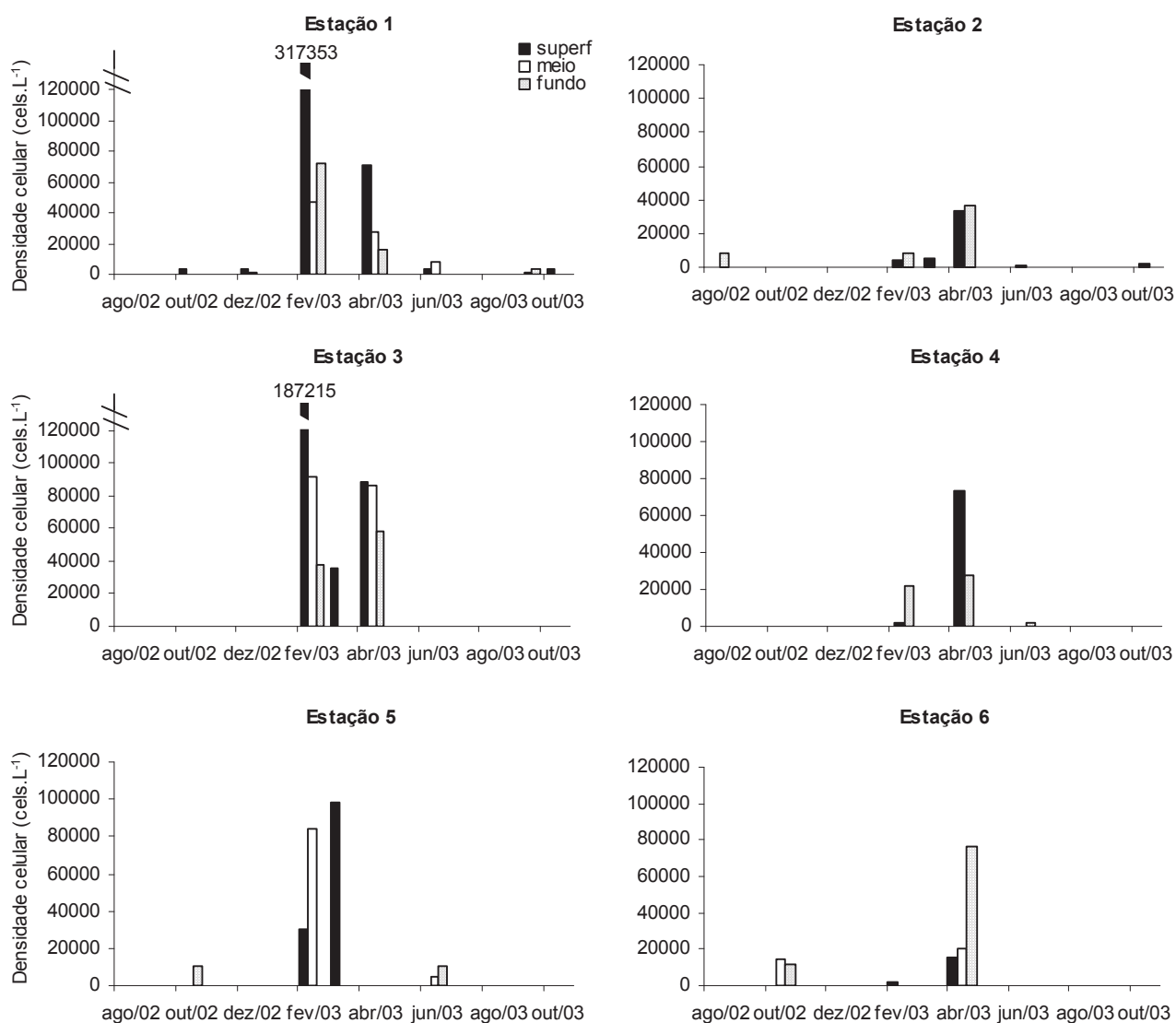
Pseudo-nitzschia spp.

Foram encontradas no complexo estuarino de Paranaguá três espécies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente produtoras de toxinas amnésicas: *P. pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle, *P. calliantha* Lundholm et al. e *P. multiseriis* (Hasle) Hasle. Devido à dificuldade de diferenciá-las em microscopia ótica, no momento das contagens das amostras de campo, todas as espécies foram consideradas em conjunto, sendo representadas como *Pseudo-nitzschia* spp. Elas foram detectadas no ambiente durante todos os períodos amostrados, mas foram predominantes no final do verão e início do outono, de fevereiro a abril (Figura 11). A máxima concentração celular ($317.353 \text{ cels.L}^{-1}$) foi encontrada no estrato superficial da estação 1, em fevereiro de 2003 (Figura 11).

Nas coletas de fevereiro e março de 2003, foram isoladas quatro cepas distintas de *Pseudo-nitzschia* spp. Os cultivos estabelecidos com as quatro cepas, chamadas de Pnz-1, Pnz-2, Pnz-3 e Pnz-4, foram bem sucedidos e possibilitaram a investigação da capacidade de produção de toxinas amnésicas por estas algas. Logo após a análise da toxicidade, o cultivo passou a apresentar problemas e foi perdido depois de alguns meses. A identificação das cepas cultivadas de *Pseudo-nitzschia* foi bastante problemática. Um processo erosivo atuou nas valvas, o que acarretou em perda de sílica e na impossibilidade de visualização das aréolas e outras estruturas importantes para a identificação das espécies, mesmo sob

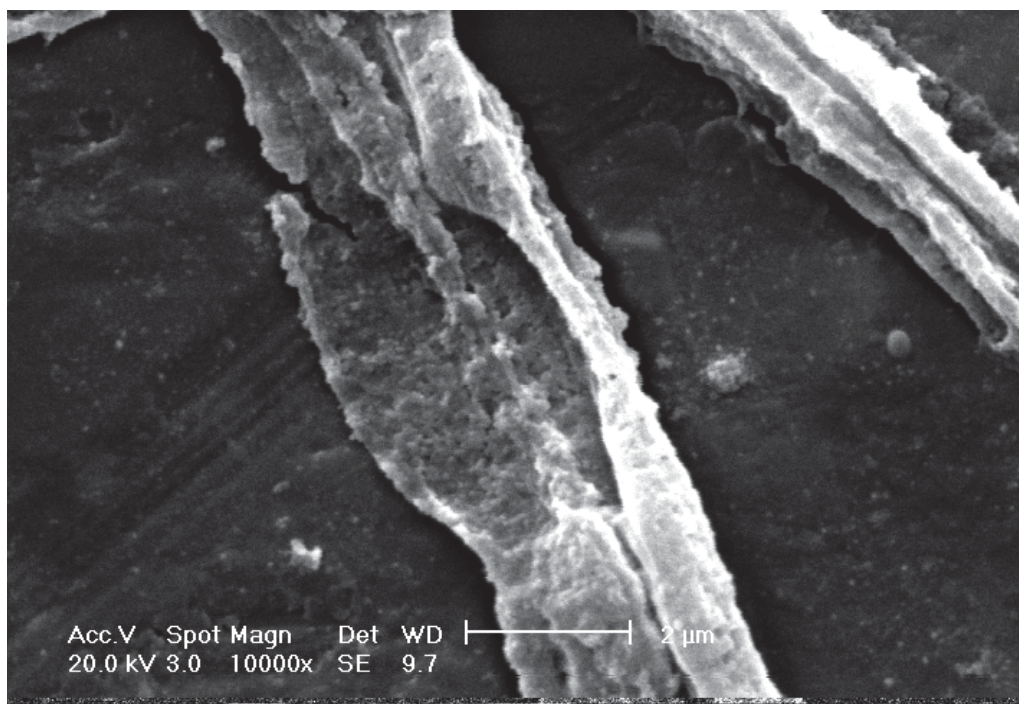
microscopia eletrônica de varredura (Figura 12) e transmissão. Todo o material examinado estava erodido e não se pôde determinar com certeza quais espécies foram cultivadas, exceto *P. pungens* (cepa Pnz-1), facilmente distinta das demais sob microscopia óptica. As cepas Pnz-2 e Pnz-3 provavelmente tenham sido espécies componentes do complexo *P. pseudodelicatissima / cuspidata*. As características de tamanho, forma e padrão de sobreposição das células da cepa Pnz-4 foram semelhantes às descritas para *P. multiseriata*⁴.

Figura 11 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Pseudo-nitzschia* spp. em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.



⁴ Os estudos que embasaram tais suposições estão listados na Discussão, sessão 6.2.1, página 79.

Figura 12 - Fotomicrografia eletrônica de varredura evidenciando a alteração na frústula de *Pseudo-nitzschia* sp. (cepa Pnz-2), após cerca de 4 meses de cultivo em laboratório. A alga foi isolada do complexo estuarino de Paranaguá, PR, em março de 2003. O aumento usado foi de 10.000x e a barra de escala representa 2 μ m.

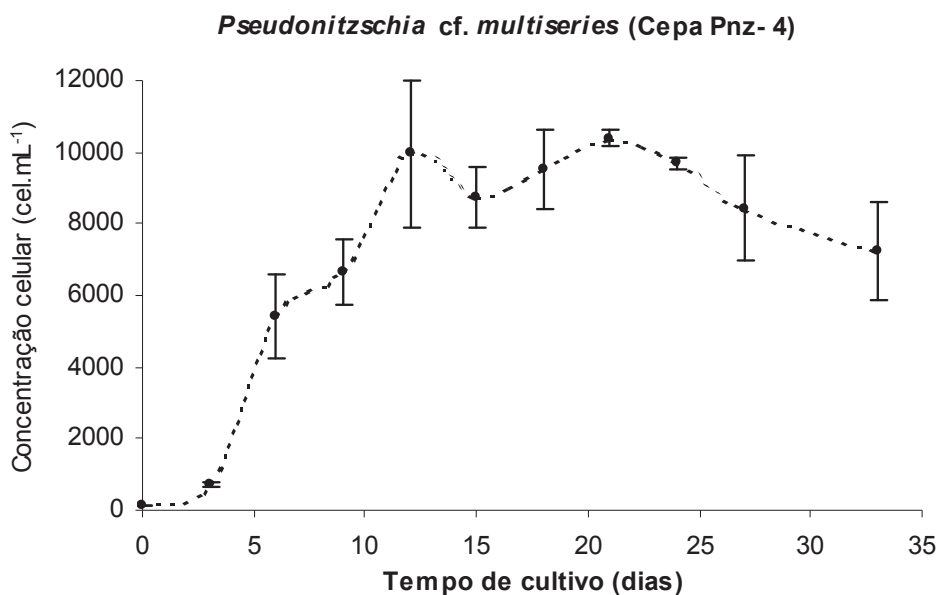


A cepa Pnz-1 media entre 80-90 μ m de comprimento por 4,5-5,0 μ m de largura, com células fortemente silicificadas e sobrepostas em cerca de 1/3 do comprimento, apresentando poróides visíveis em microscopia ótica. A cepa Pnz-2 media entre 65-75 μ m de comprimento por 2,0-3,0 μ m de largura, suas células estreitas formavam cadeias curtas, com sobreposição de 1/5 do comprimento total. A cepa Pnz-3 apresentava 40-45 μ m de comprimento por cerca de 3,0 μ m de largura, apresentando cadeias curtas de células sobrepostas em 1/4 a 1/5 do comprimento da valva. A cepa Pnz-4 media entre 105-120 μ m de comprimento por 4,5-5,0 μ m de largura, as células tinham as extremidades acentuadamente agudas e sobrepostas em cerca de 1/4 do seu comprimento.

O cultivo da cepa Pnz-4, identificada como *Pseudo-nitzschia* cf. *multiseriis*, passou por uma fase de aclimação que durou por volta de três dias, seguida por um período de crescimento exponencial até cerca de 12 dias de cultivo, uma fase estacionária de crescimento entre 12 e 21 dias para, a partir de então, entrar em declínio (Figura 13). O maior valor de concentração celular foi de 10.394 ± 376

cels.mL⁻¹ (média ± erro padrão) no 21º dia de cultivo. Registrou-se uma constante de crescimento exponencial (μ) de 0,30.dia⁻¹ e um tempo de duplicação de 2,3 dias.

Figura 13 - Curva de crescimento celular (média ± erro padrão; n = 3) de uma cepa de *Pseudonitzschia cf. multiseriis* (cepa Pnz-4) isolada do complexo estuarino de Paranaguá, PR e cultivada em meio F/2, 20°C de temperatura, luminosidade de 100 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, salinidade 25, e fotoperíodo 14:10hs (claro:escuro).



Antes de se avaliar a produção da toxina amnésica, o ácido domóico (AD), ao longo do cultivo da cepa Pnz-4, foi necessário se determinar o tempo de retenção do padrão da toxina nas análises de cromatografia líquida. O complexo formado pelo ácido domóico e seu agente derivatizante (AD-FMOC) foi detectado sob a forma de um pico de absorbância aos 15,6 minutos da análise cromatográfica. No controle do experimento, com água do mar, esse pico não foi registrado (Figura 14).

Dentre as quatro cepas cultivadas, somente na Pnz-4 detectou-se a produção de ácido domóico. Como o método adotado foi extremamente sensível, pôde-se inferir que, sob as condições testadas de cultivos, as demais cepas não produziram a toxina (Figura 15). A presença de ácido domóico na cepa Pnz-4 foi confirmada comparando-se o seu espectro de absorção em luz visível, com o obtido na análise do complexo AD-FMOC formado no padrão. Os espectros de ambos apresentaram picos de absorção próximos aos comprimentos de onda de 209 e 245 nm (Figura 16).

Figura 14 – Cromatogramas de fluorescência para a detecção de ácido domóico (padrão e controle). O controle foi composto por água do mar filtrada e a presença da toxina está sinalizada pela seta. AD-FMOC: complexo ácido domóico – derivatizante.

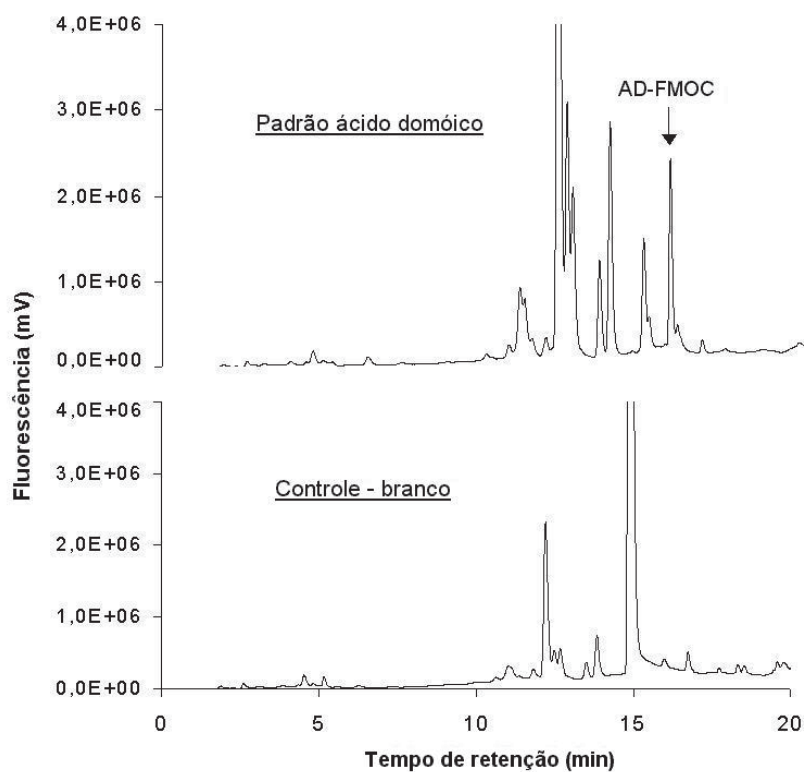


Figura 15 - Cromatogramas de fluorescência para a detecção de ácido domóico em amostras de cepas cultivadas da diatomácea *Pseudo-nitzschia* spp. A presença da toxina está sinalizada pela seta. AD-FMOC: complexo ácido domóico – derivatizante.

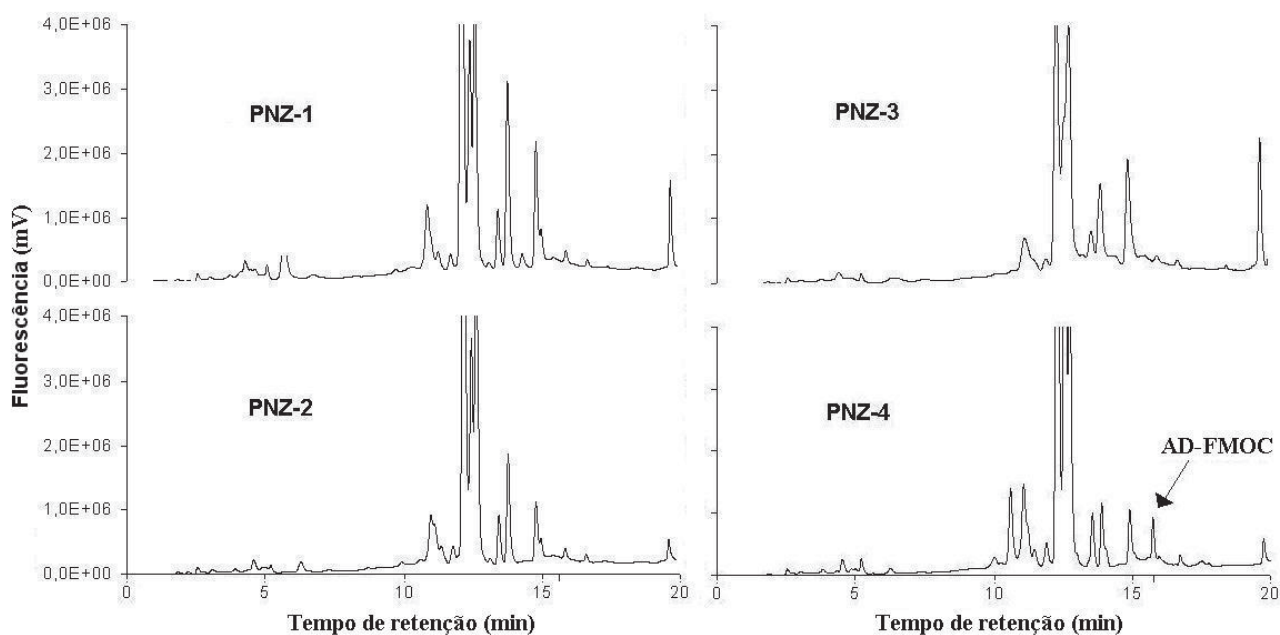
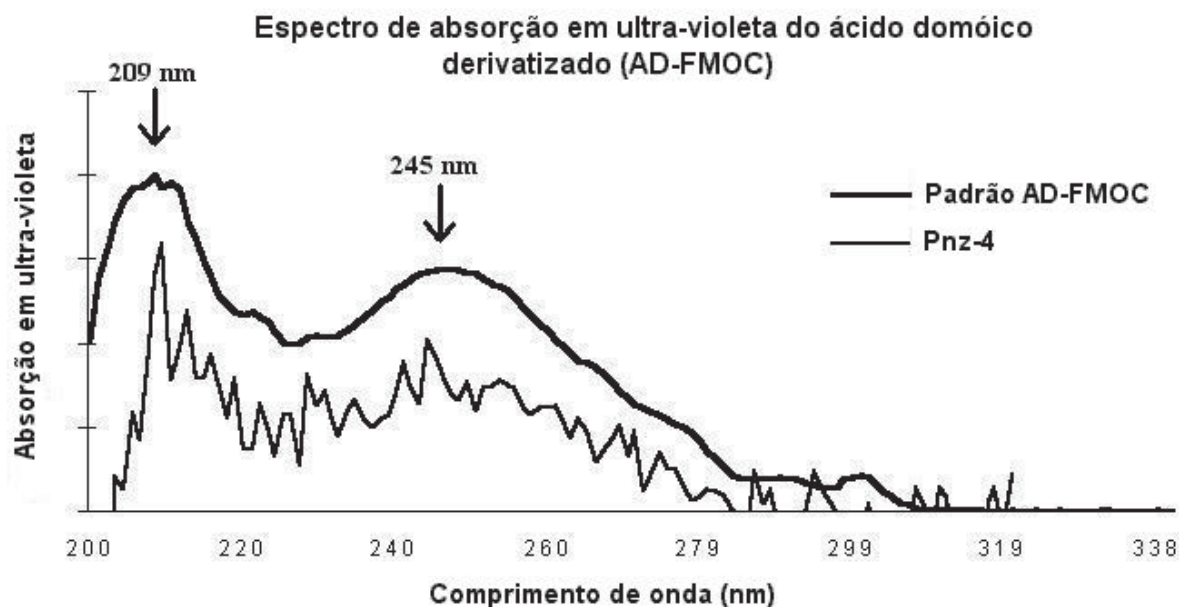


Figura 16 - Espectro de absorção em luz ultra-violeta do ácido domóico derivatizado (AD-FMOC) no padrão (linha escura) e na cepa de *Pseudo-nitzschia cf. multiseriis* (linha clara). As setas indicam os picos de absorção da luz ultra-violeta.



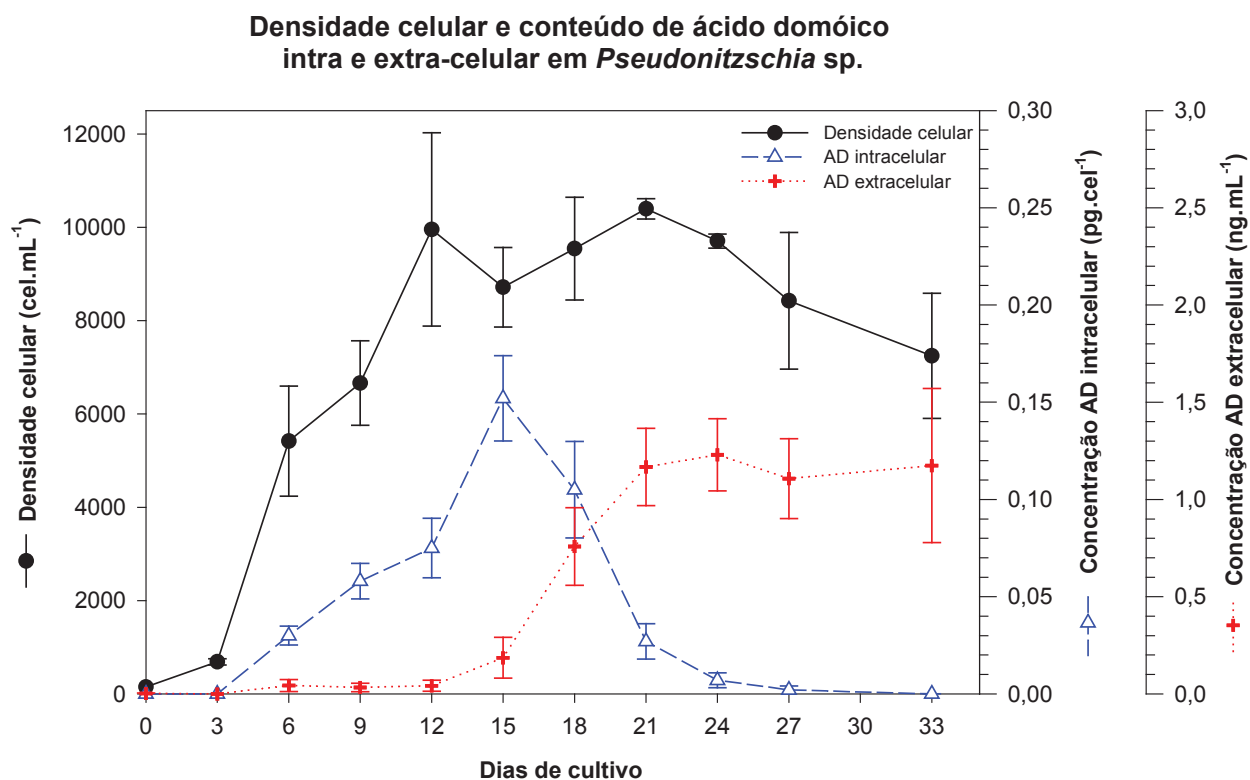
Quando se investigou a variação da produção de toxina ao longo do tempo, constatou-se a produção de ácido domóico nas células da cepa Pnz-4 em todas as fases de crescimento, exceto do primeiro ao terceiro dia de cultivo e no último dia amostrado. A concentração de ácido domóico intracelular foi maior no final da fase exponencial de crescimento e durante a fase estacionária, atingindo um máximo de $0,152 \pm 0,022 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1}$ no 15º dia de cultivo (Figura 17).

A liberação de ácido domóico no meio de cultura foi desprezível durante a fase de aclimatação do cultivo. Na fase exponencial de crescimento, a concentração de ácido domóico extracelular foi aumentando e se tornando bem mais significativa no final da fase estacionária e durante a fase de decaimento do cultivo. (Figura 17). A maior concentração medida foi de $1,23 \pm 0,19 \text{ } \eta\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ no 24º dia.

Ao se comparar as concentrações intra- e extracelulares de ácido domóico na cepa Pnz-4 com sua concentração celular, percebeu-se que logo que as células passaram a morrer numa taxa similar ou superior à velocidade com que se dividiam em novos indivíduos, aumentou a liberação de toxinas no meio. Ainda, o conteúdo

intra-celular de toxina tornou-se maior quando o crescimento celular estacionou (Figura 17).

Figura 17 - Valores médios e erro padrão (n = 3) da densidade celular (cels.mL⁻¹; círculo preto), concentração intracelular de ácido domóico (pg.cel⁻¹; triângulo azul) e concentração extracelular de ácido domóico (ng.cel⁻¹; cruz vermelha) em uma cepa cultivada da diatomácea *Pseudo-nitzschia cf. multiseriis*, ao longo de 33 dias de experimento.



Embora três espécies de *Pseudo-nitzschia* tenham sido encontradas nas amostras de campo, por vezes em concentrações celulares relativamente elevadas, e ao menos uma delas tenha produzido ácido domóico em cultivo, não se detectou a toxina amnésica em nenhuma oportunidade durante o monitoramento de ficotoxinas no molusco *Mytella guyanensis*.

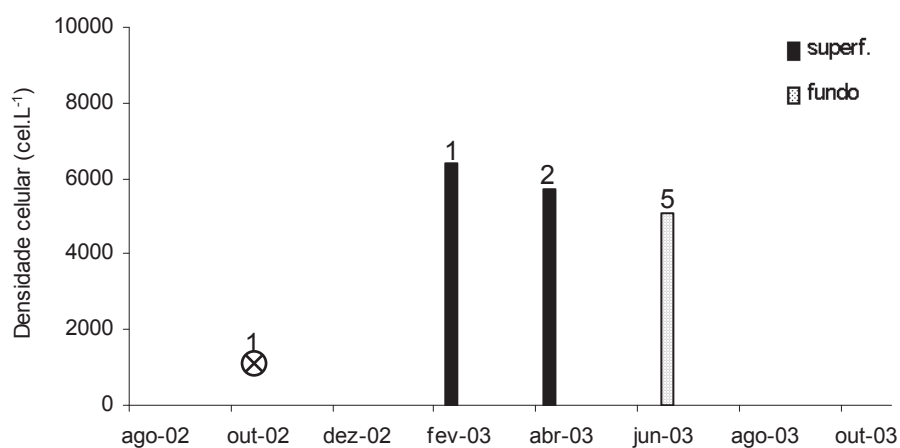
5.2.2 Microalgas produtoras do PSP

Gymnodinium catenatum

Em outubro de 2002, encontrou-se o dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* em uma amostra viva e concentrada de fitoplâncton. Entretanto, nesta oportunidade, este organismo não foi detectado nas contagens, possivelmente porque sua

concentração na água estivesse bastante baixa. A ocorrência deste dinoflagelado durante o período investigado foi esporádica, sendo diagnosticado predominantemente em amostras tomadas entre o fim do verão e o final do outono. A concentração máxima foi de 6.393 cels.L⁻¹, na superfície da estação 2, em fevereiro de 2003 (Figura 18).

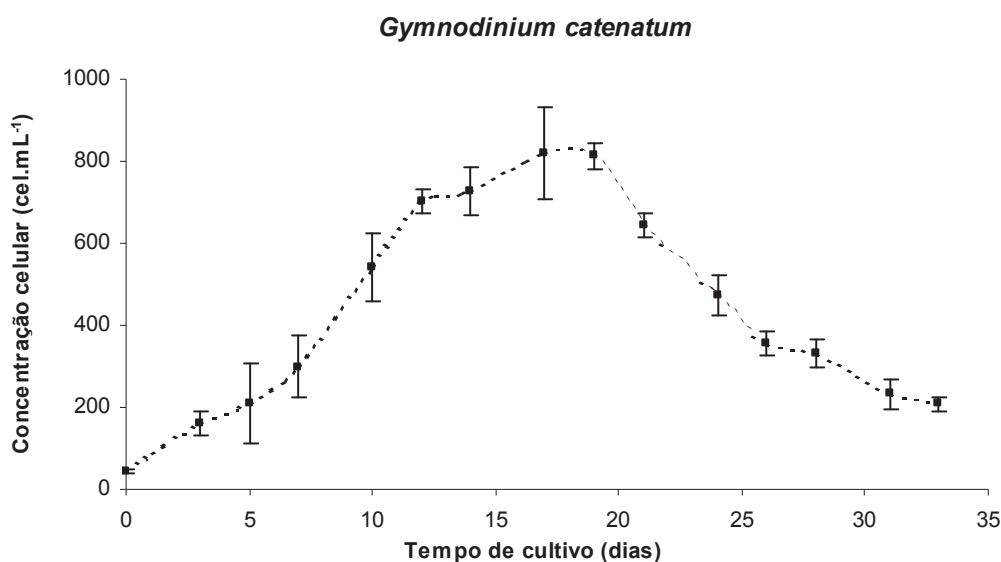
Figura 18 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Gymnodinium catenatum* em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003. O símbolo ⊗ marca a ocorrência somente em amostra viva; o número das estações de coleta está sinalizado acima das barras.



Em outubro de 2002, foram isoladas algumas cepas do dinoflagelado atecado *Gymnodinium catenatum*. Os cultivos foram bem sucedidos no início, mas logo em seguida o crescimento celular tornou-se bastante reduzido e a cultura foi perdida. Em fevereiro de 2004, uma nova cepa foi isolada com sucesso. Nesta oportunidade, entretanto, a alga não foi coletada no CEP, mas sim em um local próximo, a Enseada de Armação do Itapocoroy, localizada no litoral norte de Santa Catarina. Neste caso, alguns cuidados especiais garantiram o sucesso do cultivo. Tentou-se cultivar *G. catenatum* em meio K, específico para dinoflagelados, mas o crescimento foi mais consistente quando se adicionou uma solução de extrato de solo ao meio de cultivo F/2. Outra particularidade foi que, no momento da troca do meio de cultivo, adicionou-se 1 mL do cultivo para cada 10 mL do meio novo a cada 18 dias, ao invés de se adicionar numa proporção de 1:100 a cada 7 dias, como é usualmente feito com outras algas. Este procedimento possibilitou o sucesso do cultivo em laboratório por manter a cultura sempre em crescimento exponencial.

A concentração máxima de *G. catenatum* em cultivo foi obtida no 18º dia, correspondendo a $819,3 \pm 111,4$ cels.mL⁻¹ (Figura 19). A concentração celular inicial foi de $45,7 \pm 4,6$ cels.mL⁻¹ e o cultivo não mostrou uma fase de aclimatação, crescendo exponencialmente desde o início até o 12º dia. A fase estacionária aconteceu entre o 12º e o 19º dia e a fase de declínio do cultivo do 19º dia até o final do experimento, no 33º dia (Figura 19). Calculou-se a constante de crescimento exponencial (μ) em $0,23.\text{dia}^{-1}$ e o tempo de duplicação em 3 dias.

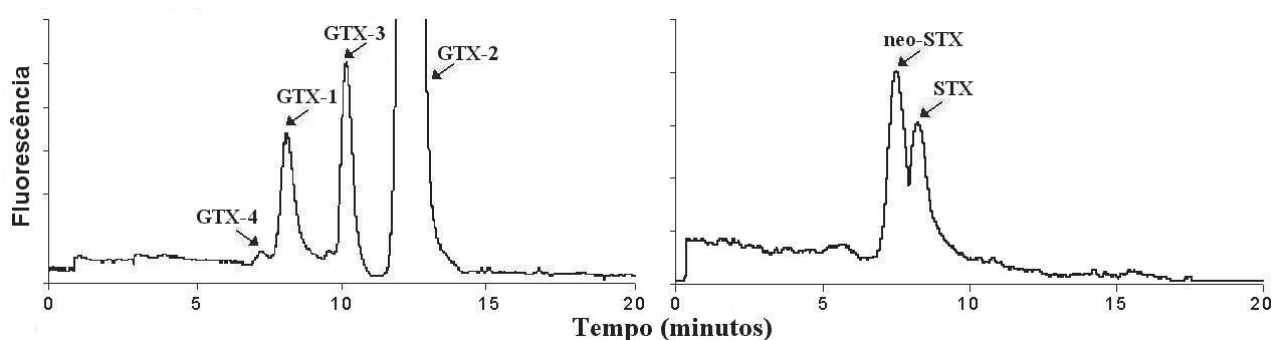
Figura 19 - Curva de crescimento celular (média \pm desvio padrão; n = 3) de uma cepa de *Gymnodinium catenatum* isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, e cultivada em meio F/2 com adição de extrato de solo, 25°C de temperatura, salinidade 33, luminosidade de $60 \mu\text{E}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12:12hs (claro:escuro).



Para a análise das variações no perfil e concentração de toxinas paralisantes, foram filtrados 500 mL do cultivo no 9º dia de experimento (fase exponencial de crescimento), contendo 290.000 células; 436 mL no 12º dia de experimento (início da fase estacionária), contendo 340.080 células; e 338 mL no 20º dia (início da fase de declínio do cultivo), contendo 145.340 células. Na fase inicial, ou de aclimatação do cultivo, assim como no final da fase de declínio, não se obtiveram extratos devido à baixa densidade celular, que não permitiria uma boa análise da presença de toxinas.

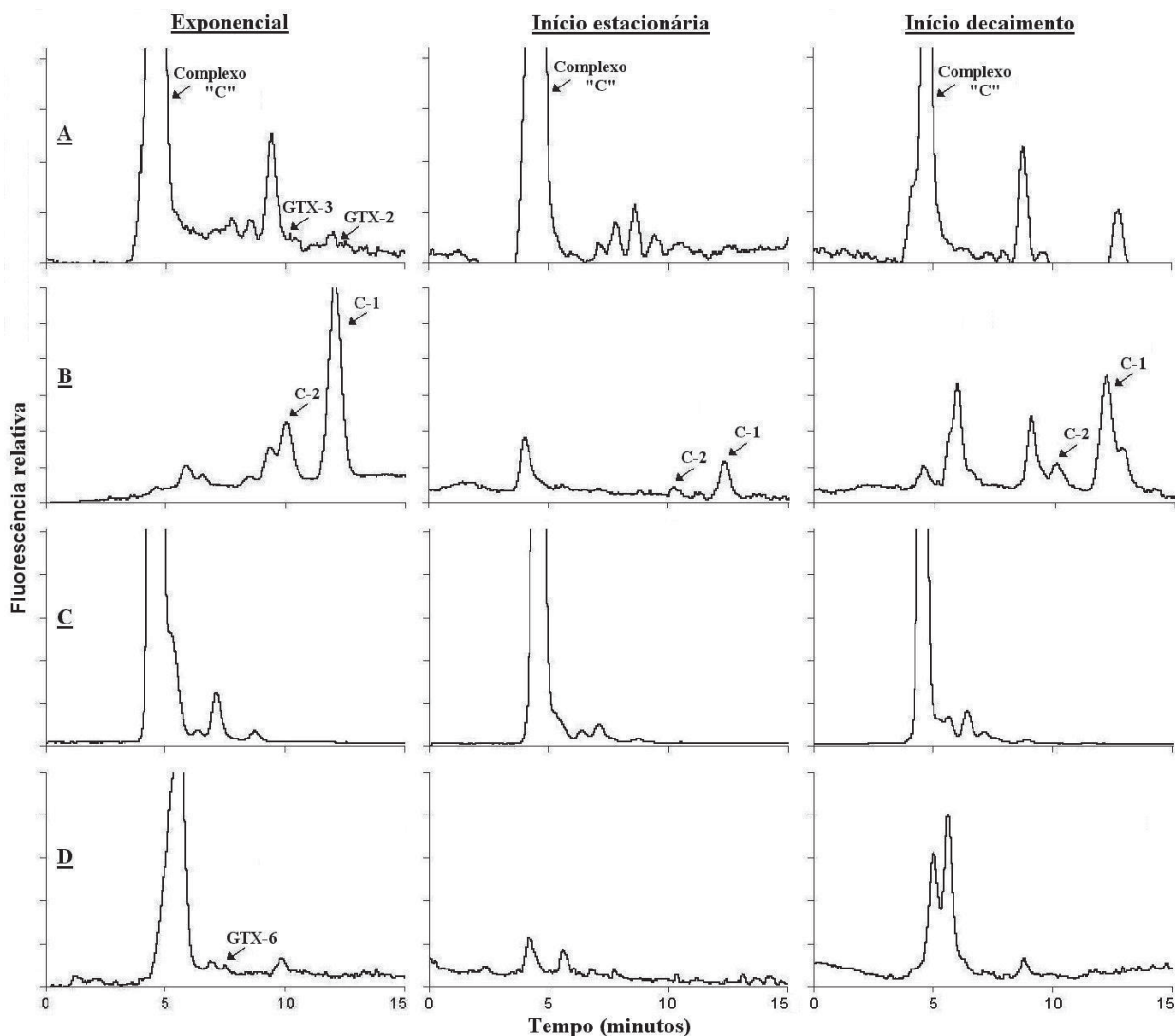
Nas análises de cromatografia líquida, os tempos de retenção para cada padrão de toxinas paralisantes foram obtidos por meio da detecção dos picos de fluorescência em duas corridas cromatográficas, uma para as goniautoxinas (GTX) e outra para saxitoxina e neo-saxitoxina (STX e neo-STX). Os tempos de retenção estão expressos na Figura 20.

Figura 20 - Cromatogramas de fluorescência para a detecção de padrões de toxinas paralisantes pelo método de derivatização pós-coluna e os respectivos tempos de retenção. À esquerda, padrões de goniautoxinas (GTX) e à direita, saxitoxina (STX) e neo-saxitoxina (neo-STX).



As análises dos extratos provenientes de diferentes fases do cultivo da cepa de *Gymnodinium catenatum* revelaram a presença de toxinas paralisantes em todas as fases do crescimento (Figura 21). Na primeira série de corridas cromatográficas, que buscou detectar a presença de GTX1 a GTX4, somente durante a fase exponencial é que a cepa produziu baixíssimas concentrações de GTX2 e GTX3 (Figura 21-A). Entretanto, um pico bastante conspícuo apareceu aos 4,7 minutos de corrida, em todos os extratos. Este pico foi atribuído à presença de um complexo de toxinas do tipo N-sulfocarbamoil (complexo “C”). Depois de feita a hidrólise ácida das amostras, este pico, em sua grande maioria, se desfez e revelou a presença das toxinas C1 e C2 em todos os momentos do crescimento desta cepa (Figura 21-B). Já no segundo conjunto de análises, a saxitoxina, principal toxina paralisante, bem como a neo-saxitoxina, não foram detectadas nas amostras (Figura 21-C). Após a hidrólise ácida das amostras, evidenciou-se a produção de uma pequena quantidade de GTX6 somente na fase exponencial de crescimento da cepa de *G. catenatum* analisada (Figura 21-D).

Figura 21 - Cromatogramas de fluorescência para a detecção de toxinas paralisantes em amostras de *Gymnodinium catenatum*, cepa isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, em diferentes fases do crescimento em cultivo. (A) Cromatogramas para detecção de goniautoxinas - GTX1 a GTX4; (B) de toxinas do grupo C - C1 a C4 - depois de hidrólise ácida; (C) de saxitoxina e neo-saxitoxina; e (D) de goniautoxinas - GTX5 e GTX6 - depois de hidrólise ácida. A detecção foi feita por fluorescência.



Pôde-se inferir, pelos tamanhos e áreas ocupadas pelos picos de cada uma das toxinas encontradas, que as toxinas dominantes nesta cepa de *Gymnodinium catenatum* foram a C1 e a C2. Também foram detectadas quantidades menores de GTX2, GTX3 e GTX6 (Tabela 3). A fase exponencial de crescimento foi quando a alga mostrou a maior produção total de toxinas paralisantes.

Tabela 3 - Concentração de toxinas paralisantes ($\eta\text{mol.mL}^{-1}$) e percentual de representatividade de cada toxina (%) em uma cepa de *Gymnodinium catenatum* isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, em extratos de diferentes fases do crescimento em cultivo. Dados baseados em análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência.

Toxinas paralisantes	FASE EXPONENCIAL		ESTACIONÁRIA (INÍCIO)		DECAIMENTO (INÍCIO)	
	Concentração (nmol.mL^{-1})	Percentual (%)	Concentração (nmol.mL^{-1})	Percentual (%)	Concentração (nmol.mL^{-1})	Percentual (%)
GTX-2	0,007 \pm 0,0003	0,08				
GTX-3	0,055 \pm 0,003	0,60				
GTX-6	0,467 \pm 0,014	5,05				
C-1	3,705 \pm 0,188	40,09	0,305 \pm 0,015	41,27	1,027 \pm 0,052	47,88
C-2	5,007 \pm 0,257	54,18	0,434 \pm 0,022	58,73	1,118 \pm 0,057	52,12
Soma	9,241 \pm 0,462	100,00	0,739 \pm 0,037	100,00	2,145 \pm 0,109	100,00

A maior parte da toxicidade encontrada deveu-se à presença da toxina C2 em quantidades significativas. Apesar da toxina C1 ter sido detectada em concentrações similares, ela pouco contribuiu para a toxicidade total das amostras, já que sua toxicidade específica é uma ordem de grandeza menor do que a da toxina C2 (Tabela 4). A toxina GTX3, que possui uma toxicidade específica bastante elevada, apesar de encontrada em quantidades ínfimas na amostra da fase exponencial de cultivo, foi mais representativa do que a C1 para a toxicidade total (Tabela 4).

Tabela 4 – Toxicidade absoluta ($\mu\text{g STXeq} \cdot \text{cel}^{-1}$) e relativa (%) das toxinas paralisantes em uma cepa de *Gymnodinium catenatum* isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, em diferentes fases do crescimento em cultivo. Dados baseados em análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A toxicidade específica de cada toxina está expressa na coluna da direita.

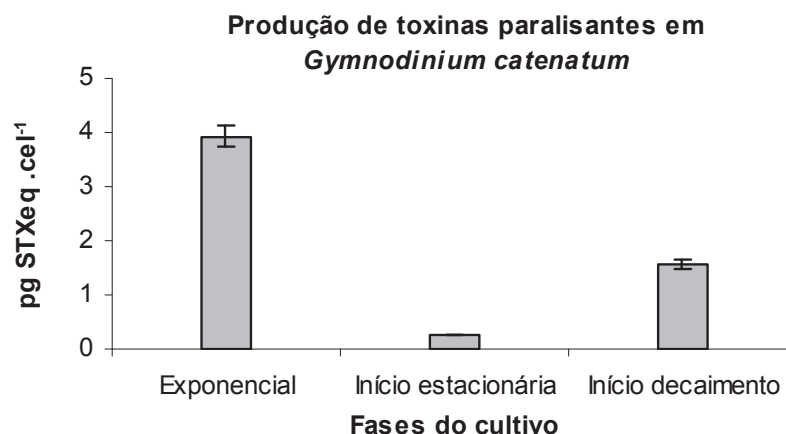
Toxinas paralisantes	FASE EXPONENCIAL		ESTACIONÁRIA (INÍCIO)		DECAIMENTO (INÍCIO)		Toxicidade específica ⁽¹⁾ (MU.mol^{-1})
	Conc. celular ($\mu\text{g STXeq} \cdot \text{cel}^{-1}$)	Percentual (%)	Conc. celular ($\mu\text{g STXeq} \cdot \text{cel}^{-1}$)	Percentual (%)	Conc. celular ($\mu\text{g STXeq} \cdot \text{cel}^{-1}$)	Percentual (%)	
GTX-2	0,017 \pm 0,0007	0,44					892
GTX-3	0,240 \pm 0,012	6,13					1584
GTX-6	0,206 \pm 0,006	5,26					160
C-1	0,153 \pm 0,008	3,91	0,011 \pm 0,0005	4,22	0,085 \pm 0,004	5,45	15
C-2	3,301 \pm 0,169	84,25	0,244 \pm 0,012	95,78	1,471 \pm 0,075	94,55	239
Soma	3,918 \pm 0,196	100,00	0,255 \pm 0,013	100,00	1,555 \pm 0,079	100,00	

FONTE: (1) Oshima, 1995.

Embora a amostra do 9° dia de cultivo (fase exponencial) tenha apresentado uma toxicidade maior do que as demais, não se observou uma relação direta entre o tempo de cultivo e a quantidade de toxinas produzidas pelas células de

Gymnodinium catenatum. A produção de toxinas variou entre 0,255 e 3,918 $\mu\text{g STXeq.cel}^{-1}$ (Figura 22).

Figura 22 - Produção de toxinas paralisantes por célula ($\mu\text{gSTXeq.cel}^{-1}$; n = 3) em uma cepa de *Gymnodinium catenatum* isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, em diferentes fases do crescimento em cultivo (média e desvio-padrão). Valores obtidos por meio de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



Além das análises de cromatografia líquida, a toxicidade de *G. catenatum* foi estimada por bioensaios com camundongos. Os animais utilizados no teste tinham um peso médio de $17,42 \pm 0,66$ g, sendo que os valores não diferiram significativamente entre os diferentes tratamentos (Tabela 5). Os indivíduos que serviram de controle para o experimento sobreviveram e a injeção, neste caso, não demonstrou qualquer outro efeito prejudicial aparente. Nos demais animais, aos quais se aplicou a injeção de diferentes extratos de células de *Gymnodinium catenatum*, observou-se um efeito letal depois de transcorridos entre 3'55" (3 minutos e 55 segundos) até mais de uma hora (Tabela 5). Os valores superiores há uma hora, que não estão detalhados no quadro por não influenciarem nos cálculos, foram todos inferiores a 12 horas.

O extrato mais tóxico testado nos camundongos foi o obtido durante a fase exponencial de cultivo de *G. catenatum* ($2,349 \pm 0,374$ MU ou $0,470 \pm 0,075$ $\mu\text{g STXeq}$). O extrato adquirido no início da fase estacionária de crescimento mostrou uma toxicidade de $1,020 \pm 0,350$ MU ou $0,204 \pm 0,071$ $\mu\text{g STXeq}$. Por fim, o extrato correspondente à fase inicial de decaimento do cultivo somente causou a morte dos

animais em um tempo superior à uma hora, com uma toxicidade estimada em $0,785 \pm 0,035$ MU ou $0,157 \pm 0,007$ $\mu\text{g STXeq}$.

Tabela 5 - Resultados dos testes de toxicidade aguda com uma cepa de *Gymnodinium catenatum* isolada de Armação do Itapocoroy, norte de SC, sobre camundongos do tipo suíço. O tempo de morte dos camundongos foi expresso em minutos e segundos, a toxicidade dos extratos em "mouse units" (MU) e $\mu\text{g STXeq .mL}^{-1}$ e a produção de toxina por célula em $\mu\text{g STXeq .cel}^{-1}$.

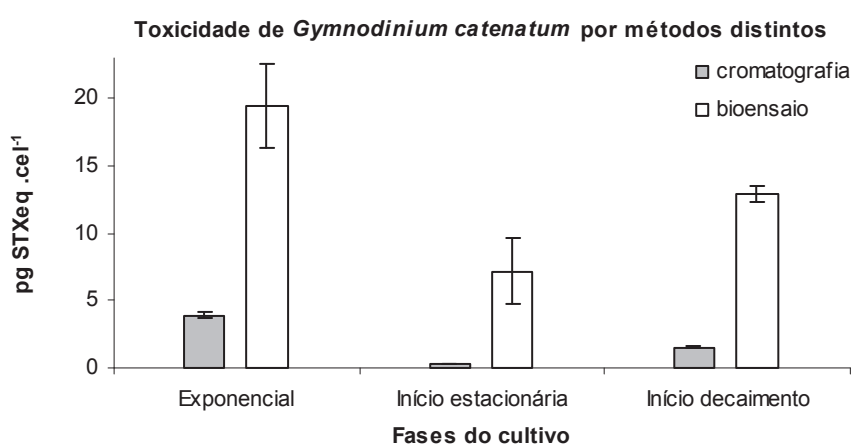
EXTRATO	CAMUNDONGO			TOXICIDADE		
	Réplica	Peso (g)	Tempo de morte ⁽¹⁾	Extrato		Célula ($\mu\text{g STXeq .cel}^{-1}$)
				(MU)	($\mu\text{g STXeq}$)	
Fase Exponencial	A	16,67	4' 11"	2,071	0,4142	17,139
	B	17,53	4' 12"	2,202	0,4404	18,223
	C	18,90	3' 23"	2,774	0,5548	22,957
	Média	17,70	3' 55"	2,349	0,470	19,440
	Desvio padrão	1,12	0' 28"	0,374	0,075	3,094
Início estacionária	A	17,14	23' 36"	0,827	0,16544	5,838
	B	17,02	5' 56"	1,426	0,28512	10,061
	C	17,01	36' 00"	0,800	0,15998	5,645
	Média	17,06	21' 50"	1,02	0,204	7,181
	Desvio padrão	0,07	15' 07"	0,35	0,071	2,496
Início decaimento	A	18,20	+ 1h	0,8225	0,165	13,583
	B	17,25	+ 1h	0,7787	0,156	12,859
	C	16,65	+ 1h	0,7525	0,151	12,427
	Média	17,37	+ 1h	0,785	0,157	12,956
	Desvio padrão	0,78		0,035	0,007	0,584
Controle	A	17,53	-----	-----	-----	-----
	B	17,98	-----	-----	-----	-----
	C	17,10	-----	-----	-----	-----
	Média	17,54	-----	-----	-----	-----
	Desvio padrão	0,44	-----	-----	-----	-----

(1) O extrato correspondente à fase exponencial teve que ser diluído para que os tempos de morte ficassem em torno de 6 a 8 min. Os valores mostrados no quadro foram corrigidos.

Dividindo-se as toxicidades totais pelas concentrações celulares em cada momento do cultivo de *G. catenatum*, as toxicidades por célula foram de $19,440 \pm 3,094$ $\mu\text{g STXeq .cel}^{-1}$ na fase exponencial; $7,181 \pm 2,496$ $\mu\text{g STXeq .cel}^{-1}$ no início da fase estacionária; e $12,956 \pm 0,584$ $\mu\text{g STXeq .cel}^{-1}$ no início da fase de decaimento do cultivo. Neste último momento, a toxicidade por célula foi maior do que na fase estacionária, apesar do extrato naquela etapa ter sido mais tóxico aos camundongos. Quando comparados os valores de toxicidade por célula, medidos por cromatografia e pelo teste em camundongos, percebe-se que os últimos foram bem superiores (Figura 23). Os valores foram, em média, cerca de 5 vezes mais

elevados para o extrato da fase exponencial, aproximadamente 28 vezes no início da fase estacionária, e pouco mais de 8 vezes maiores no início da fase de decaimento.

Figura 23 - Toxicidade (média e desvio padrão; n = 3) de uma cepa de *Gymnodinium catenatum*, em diferentes fases do crescimento em cultivo, medida sob diferentes métodos de análise. As barras escuras mostram a toxicidade total do extrato obtida por cromatografia líquida e barras claras, a toxicidade calculada por bioensaio com camundongos; ambas foram expressas em $\mu\text{g STXeq} \cdot \text{cel}^{-1}$.



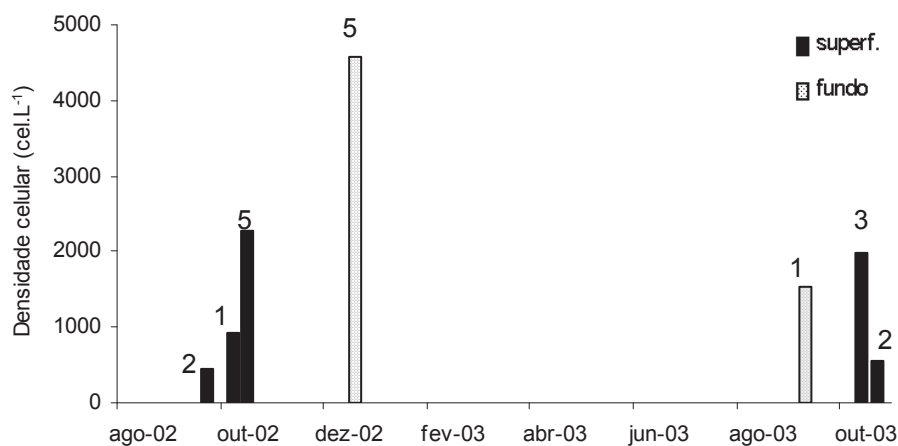
Os bioensaios com camundongos para detecção de toxinas do PSP acumulada no molusco *M. guyanensis*, a exemplo das análises cromatográficas para as toxinas amnésicas, mostraram resultados negativos durante todo o período investigado. Portanto, mesmo havendo a presença de *Gymnodinium catenatum* na água, e a comprovação de que esta alga produz diferentes tipos de toxinas paralisantes, não ocorreu a detecção de toxinas do PSP em amostras de moluscos.

5.2.3 Microalgas produtoras do DSP

Dinophysis acuminata

O dinoflagelado *Dinophysis acuminata* foi detectado sempre durante o período de primavera, em outubro e dezembro de 2002 e em setembro e outubro de 2003, quando terminaram as coletas (Figura 24). Em dezembro de 2002, no estrato profundo da estação de coleta 5, foi registrada a concentração máxima de 4.566 cels.L⁻¹ (Figura 24).

Figura 24 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Dinophysis acuminata* em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003. O número correspondente a cada estação de coleta está representado acima das barras.

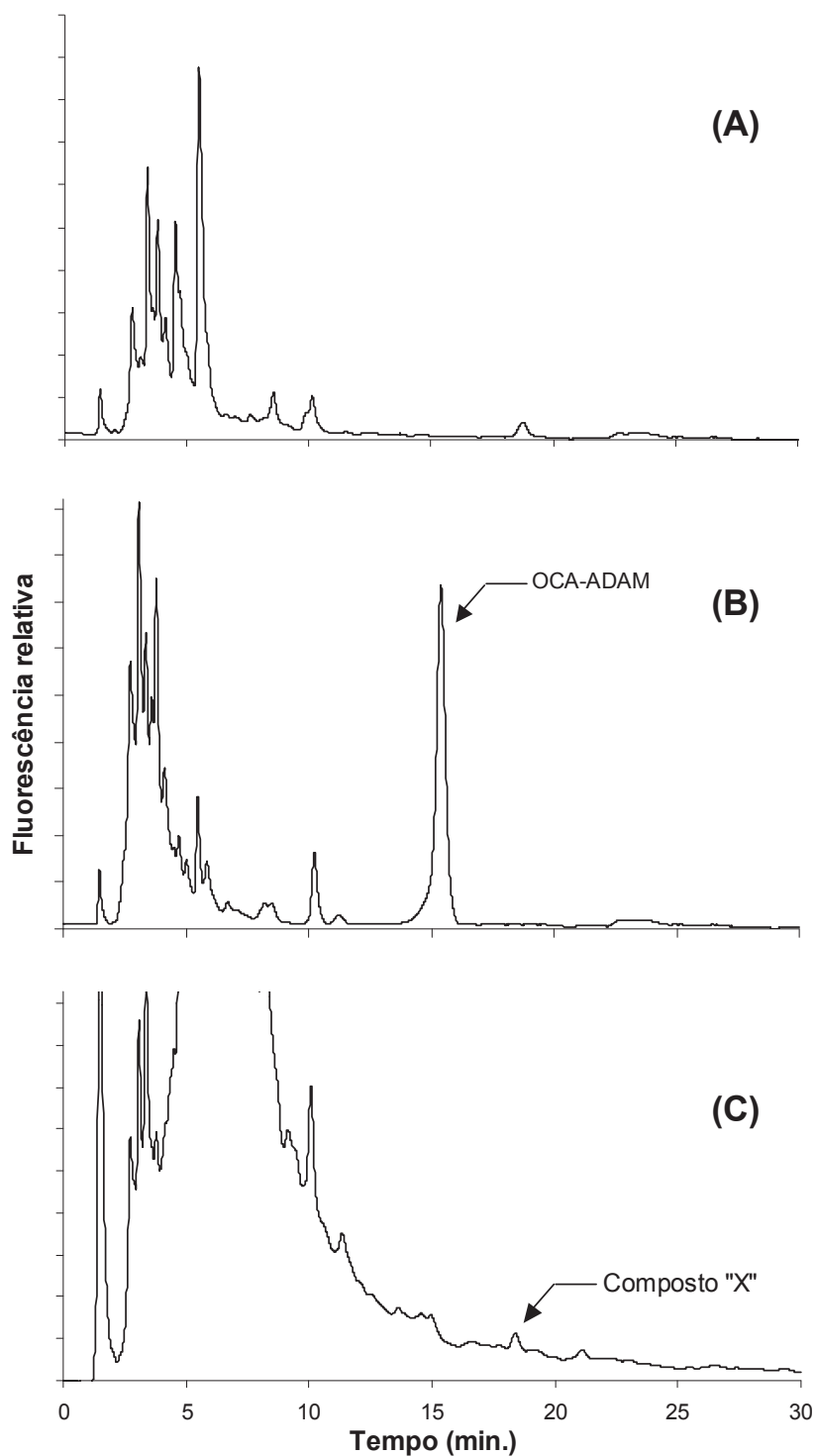


Como essa alga possui ciclo de vida e requerimentos nutricionais complexos, seu cultivo para análise de toxinas tornou-se impraticável. Uma alternativa seria isolar um grande número de células de *D. acuminata* diretamente das amostras vivas e avaliar a sua toxicidade, porém poucos indivíduos foram encontrados neste tipo de material durante nossas coletas.

As análises da presença de ficotoxinas no molusco sururu (*Mytella guyanensis*) revelaram um caso em que o teste de toxicidade aguda em camundongos para a detecção de toxinas diarréicas (DSP) teve efeito positivo. Nesta ocasião, três camundongos receberam a injeção do extrato de hepatopâncreas de sururu, coletado em dezembro de 2002. Dois deles morreram em menos de 24 horas e um terceiro morreu nas 24 horas seguintes. O camundongo usado como organismo controle nada sofreu. A amostra positiva foi proveniente da estação de coleta S-3. O agente causador provavelmente tenha sido o dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, presente neste local em outubro e em dezembro de 2002, em concentrações de até 4.566 cels.L⁻¹.

Nas análises de cromatografia líquida realizadas para confirmar a presença de toxinas diarréicas, o padrão de ácido ocadáico (OCA) ligou-se a um composto derivatizante (ADAM), formando o complexo OCA-ADAM. Este complexo foi detectado no padrão sob a forma de um pico aos 15,3 minutos de corrida (Figura 25-A) e não esteve presente na análise do controle negativo (Figura 25-B).

Figura 25 – Cromatogramas de fluorescência para a detecção de ácido ocadáico em amostras de: (A) controle negativo constituído de água filtrada em sistema mili-Q e solução derivatizante 9-antrildiazometano (ADAM); (B) controle positivo composto por padrão comercial de ácido ocadáico (OCA) e solução derivatizante ADAM, formando o complexo OCA-ADAM; e (C) hepatopâncreas de sururu (*Mytella guyanensis*) tóxico a camundongos. A seta em (C) evidencia a presença de um composto desconhecido (Composto "X").



As análises com a amostra positiva não detectaram a presença do ácido ocadáico no hepatopâncreas do molusco (Figura 25-C), contudo, revelaram a existência de um outro pico de absorção que não esteve presente no controle negativo. O responsável por tal pico, um composto desconhecido denominado de composto "X", foi percebido em todas as sub-amostras aos 18,4 minutos de corrida (Figura 25-C). Sua concentração foi diretamente proporcional à concentração do hepatopâncreas aplicada nas sub-amostras.

5.2.4 Microalgas envolvidas em mortalidades de animais marinhos

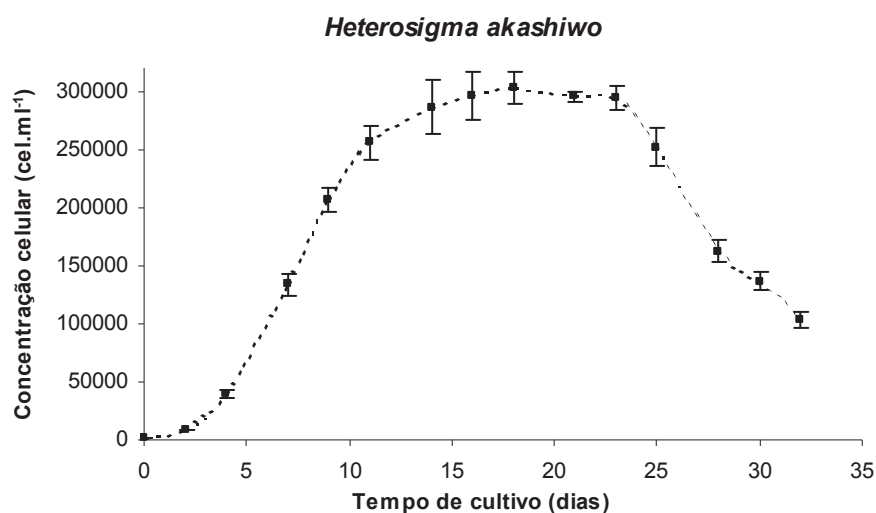
Heterosigma akashiwo

A rafidofíceia *Heterosigma akashiwo* foi detectada nas amostras vivas de outubro de 2002 e outubro de 2003. Esta alga possui a parede celular extremamente frágil e não suporta as concentrações de fixadores comumente utilizadas para preservar amostras de plâncton. Por esta razão, provavelmente, *H. akashiwo* não tenha sido encontrada nas amostras quantitativas.

Não foi preciso isolar esta alga para cultivo porque uma cepa vinha sendo mantida em laboratório desde março de 2001, quando *H. akashiwo* esteve associada a um evento de mortandade massiva de peixes no complexo estuarino de Paranaguá. Na referida ocasião, a cepa foi isolada e permaneceu disponível e viável até a realização dos presentes experimentos de crescimento e toxicidade.

A cepa de *H. akashiwo* sofreu, durante o crescimento em cultivo, uma fase de aclimatação de dois dias, passando, em seguida, a crescer exponencialmente até o 14º dia de cultivo. A fase estacionária abrangeu do 14º ao 23º dia, quando se iniciou a fase de decaimento do cultivo. A máxima concentração celular atingida durante o experimento foi de 303.000 ± 14.413 cels.mL⁻¹ (Figura 26), enquanto que a constante de crescimento exponencial (μ) registrada foi 0,38.dia⁻¹ e o tempo de duplicação 1,83 dias.

Figura 26 - Curva de crescimento celular (média \pm desvio padrão; n = 3) de uma cepa de *Heterosigma akashiwo* isolada do complexo estuarino de Paranaguá, PR, e cultivada em meio F/2, 20°C de temperatura, salinidade 33, luminosidade de 60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12:12hs (claro:escuro).



No momento em que se executou o teste de toxicidade de *Heterosigma akashiwo* sobre juvenis de misidáceo *Mysidopsis juniae*, o cultivo da alga estava em fase exponencial de crescimento, numa concentração de 79.100 cels.mL⁻¹. Além da concentração total, as diluições utilizadas neste teste de toxicidade foram: 50% (39.600 cels.mL⁻¹); 10% (7.910 cels.mL⁻¹); 1% (791 cels.mL⁻¹); 0,1% (79,1 cels.mL⁻¹); e 0,01% (7,91 cels.mL⁻¹). Todos os indivíduos juvenis de *M. juniae* expostos a concentrações iguais ou superiores a 7.910 cels.mL⁻¹ morreram durante o experimento (CL₅₀: 1.821 \pm 545 cels.mL⁻¹). Observou-se um comportamento de herbivoria dos náuplios de *Artemia salina* sobre *Heterosigma akashiwo*, formando aglomerações que serviam de alimento para os misidáceos. Os resultados deste experimento estão expressos na Figura 27.

A concentração de oxigênio dissolvido e o pH foram monitorados e os valores obtidos ficaram dentro dos níveis aceitáveis durante todo o transcorrer do teste (Tabela 6).

Figura 27 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações da rafdofícea *Heterosigma akashiwo* sobre juvenis de misidáceo *Mysidopsis juniae*. Resultado expresso como percentual médio e desvio padrão ($n=3$) de indivíduos mortos após 96 horas de teste, em relação ao número inicial (10 indivíduos).

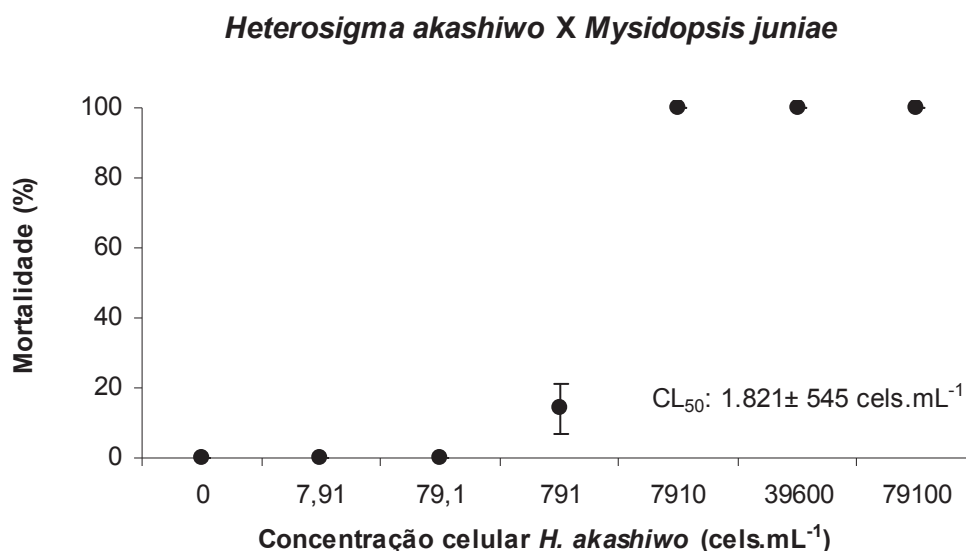


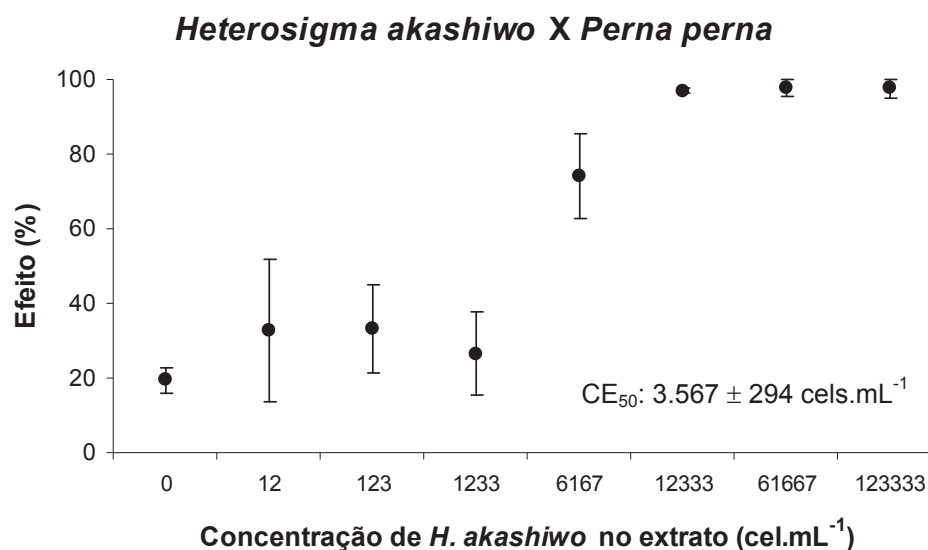
Tabela 6 - Valores de pH e oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) em diferentes tratamentos aplicados no teste de toxicidade de *Heterosigma akashiwo* em juvenis de *Mysidopsis juniae*.

CONCENTRAÇÃO CELULAR (cel.mL ⁻¹)	pH		O ₂ (mg.L ⁻¹)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
0	8,19	8,08	6,1	6
7,91	8,15	8,1	6,3	6,1
79,1	8,15	8,09	6,3	6,1
791	8,16	8,09	6,2	6,2
7910	8,22	8,13	6,2	6,4
39600	8,57	8,42	6,7	6,5
79100	8,96	8,75	8,2	7,1

Outro experimento que testou a toxicidade da rafdofícea *H. akashiwo* sobre invertebrados foi o ensaio aplicado com larvas do molusco *Perna perna*. A alga, que neste experimento foi aclimatada em meio de cultivo F/10, cresceu em uma taxa similar a culturas em meio F/2. O teste iniciou no 18º dia de cultivo, quando a alga já estava no meio da fase estacionária de crescimento. As concentrações celulares usadas foram equivalentes a 100% da concentração do cultivo (123.333 cels.mL⁻¹), 50% (61.667 cels.mL⁻¹), 10% (12.333 cels.mL⁻¹), 5% (6.167 cels.mL⁻¹), 1% (1.233 cels.mL⁻¹), 0,1% (123 cels.mL⁻¹) e 0,01% (12 cels.mL⁻¹). Larvas expostas a concentrações de *H. akashiwo* superiores a 6.167 cels.mL⁻¹ apresentaram um

desenvolvimento anômalo que diferiu significativamente do controle (CE_{50} : 3.567 ± 294 cels.mL⁻¹; Figura 28).

Figura 28 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações da rafigofícea *Heterosigma akashiwo* sobre larvas do molusco *Perna perna*. Percentual médio e desvio padrão ($n=4$) de larvas com desenvolvimento anômalo após 48 horas de teste, em relação ao número inicial (100 indivíduos).



Conforme expresso na Tabela 7, o pH e a salinidade sofreram pequenas alterações durante o transcorrer do teste, mas estiveram dentro do limite de variação do teste, conforme REIS FILHO (1999).

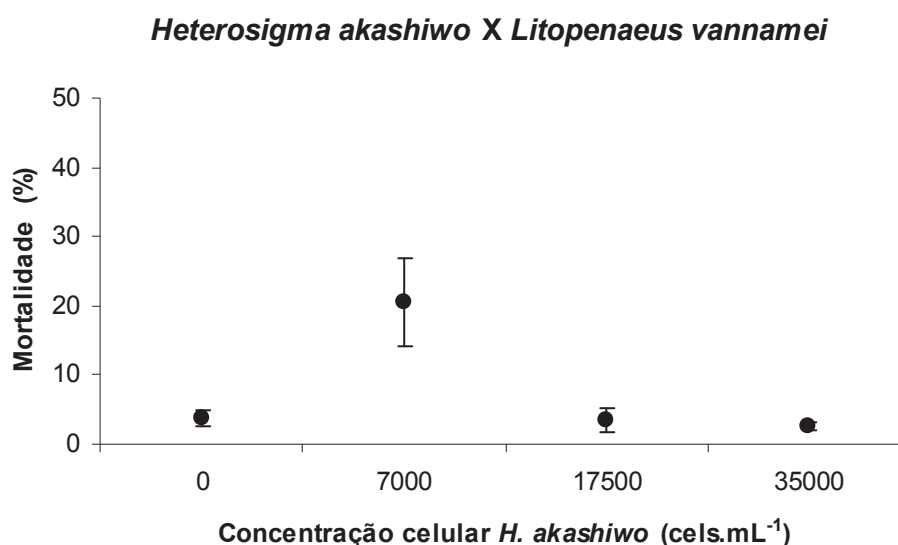
Tabela 7 - Valores de pH e salinidade em diferentes tratamentos aplicados no teste de toxicidade de *Heterosigma akashiwo* em larvas de *Perna perna*.

CONCENTRAÇÃO CELULAR (cel.mL ⁻¹)	pH		SALINIDADE	
	Inicial	Final	Inicial	Final
0	8,1	8,2	33,2	33,4
6,83	8,1	8,2	33,0	33,0
68,3	8,1	8,2	33,2	33,8
683	8,1	8,2	33,0	33,8
3415	8,0	8,1	33,0	33,6
6830	8,0	8,1	33,2	33,9
34150	7,9	8,0	33,3	33,9
68300	7,8	8,0	33,6	33,9

Por fim, a toxicidade de *H. akashiwo* foi testada em pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. No instante em que este experimento teve início, a cepa estava crescendo exponencialmente e atingiu uma densidade de 35.000 cels.mL⁻¹. As concentrações usadas no teste de toxicidade com *L. vannamei* corresponderam, portanto, a 35.000 (100%), 17.500 (50%) e 7.000 cels.mL⁻¹ (20%). Foram testadas somente três concentrações devido ao grande volume de cultura necessário neste experimento. As pós-larvas com 22 dias de idade (PL-22) utilizadas no teste apresentaram um tamanho médio de 9,4 mm ($\pm 2,5$).

Não se pôde determinar a concentração de efeito letal mediano (CL₅₀) neste experimento, assim como não foi possível detectar qualquer efeito que diferisse do controle (CEO), através do teste de Willians. A Figura 29 demonstra o resultado do teste.

Figura 29 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações da rafidofícea *Heterosigma akashiwo* sobre pós-larvas (PL-22) de camarão *Litopenaeus vannamei*. Resultado expresso como percentual médio e desvio padrão ($n=3$) de indivíduos mortos após 48 horas de teste, em relação ao número inicial (20 indivíduos).



Durante este teste, os valores de pH oscilaram entre 6,0 e 8,0. A concentração de oxigênio dissolvido variou entre 4,6 e 7,6 mg.L⁻¹. Os maiores valores de mortalidade observados (após 24hs) coincidiram com as menores concentrações de oxigênio medidas, próximas a 5,0 mg.L⁻¹ (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) e pH, em cada uma das réplicas dos diferentes tratamentos aplicados no teste de toxicidade de *Heterosigma akashiwo* em pós-larvas (PL-22) de *Litopenaeus vannamei*.

CONCENTRAÇÃO CELULAR (cel.mL^{-1})	pH			O_2 (mg.L^{-1})		
	Inicial	24hs	48hs	Inicial	24hs	48hs
0	8	7	7	6,8	6,1	6,4
0	8	6,5	6,5	7	5,5	6
0	8	6,5	6,5	6,6	4,6	6,5
7000	7	6	6,5	6,9	5	6,8
7000	7	6,5	7	6,3	6,9	6,9
7000	7	7	7	7,3	4,7	7,1
17500	8	7	7	6,4	6,1	6,4
17500	7	7	7	7,6	6,9	7
17500	8	7	7	6,9	5,8	6,3
35000	7	6,5	7	7,2	6,4	7,8
35000	7	7	7	6,3	5,8	6,4
35000	8	7	7	7,4	7,4	7,6

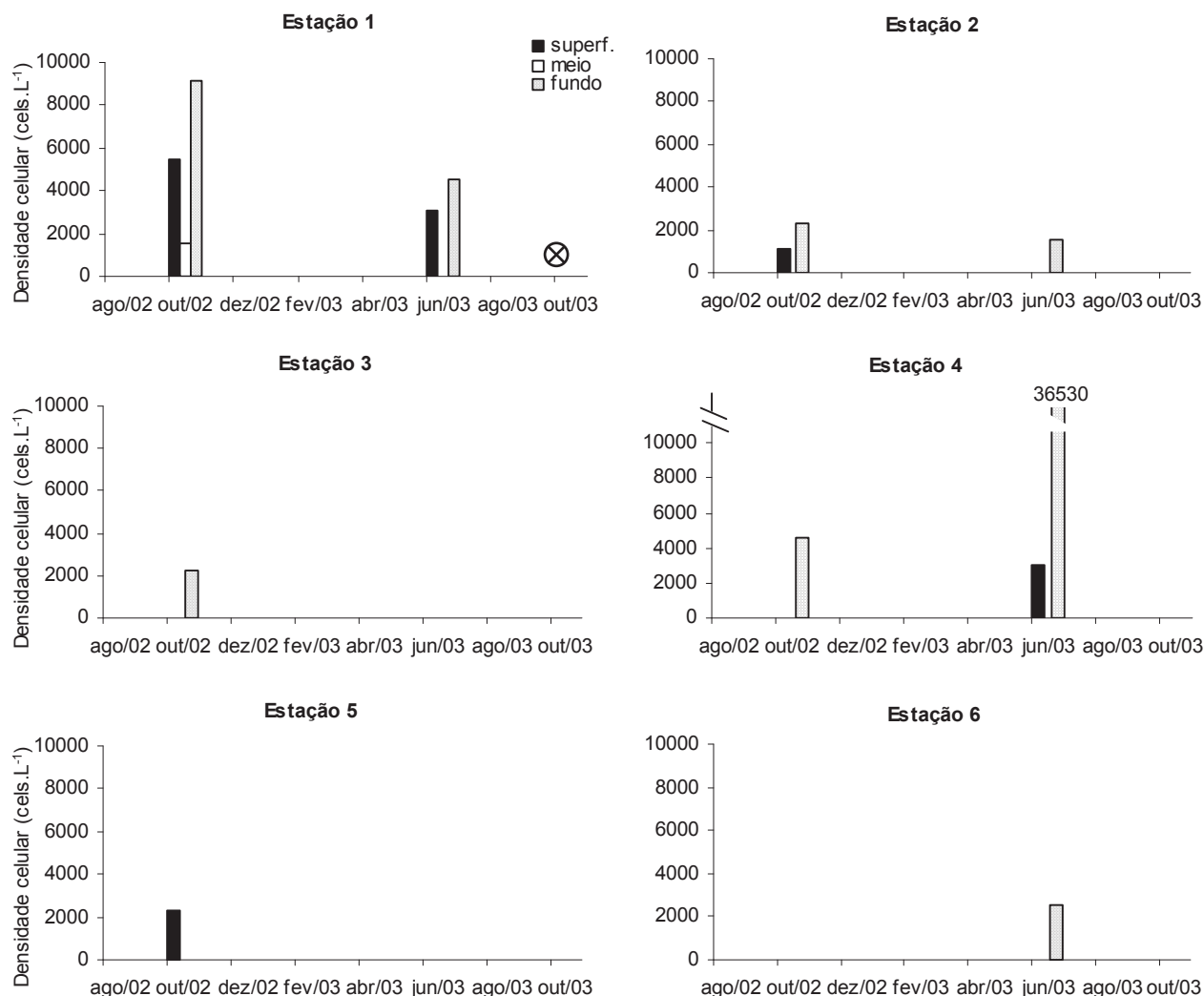
NOTA: Os valores de oxigênio dissolvido destacados em cinza corresponderam aos mais baixos registrados e ocorreram nos frascos onde foram medidas as maiores taxas de mortalidade de pós-larvas.

Chattonella spp.

Outra rafdofícea, *Chattonella* spp., também foi encontrada durante as amostragens, porém esta foi detectada tanto nas amostras vivas, como fixadas. Duas espécies do gênero foram observadas e contadas em conjunto, *C. globosa* Hara et Chihara e *C. cf. marina*. Elas estiveram presentes em todas as estações de coleta, entretanto suas ocorrências foram restritas aos meses de outubro de 2002 e junho de 2003, primavera e final do outono, respectivamente (Figura 30). A concentração máxima – $36.530 \text{ cels.L}^{-1}$ – foi observada no estrato profundo da estação 4, em junho de 2003 (Figura 30). Na amostra viva de outubro de 2003, *Chattonella* spp. voltou a ser detectada em baixa concentração.

Algumas cepas de *Chattonella cf. marina* foram isoladas das amostras de outubro de 2002 e cultivadas em laboratório. O problema mecânico apresentado pela estufa incubadora, já exposto anteriormente, também decretou a morte destas cepas e a extinção de seus cultivos. Desta forma, não foi possível realizar quaisquer testes de toxicidade com *C. cf. marina*.

Figura 30 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Chattonella* spp. em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003. O símbolo ⊗ marca a ocorrência somente em amostra viva.



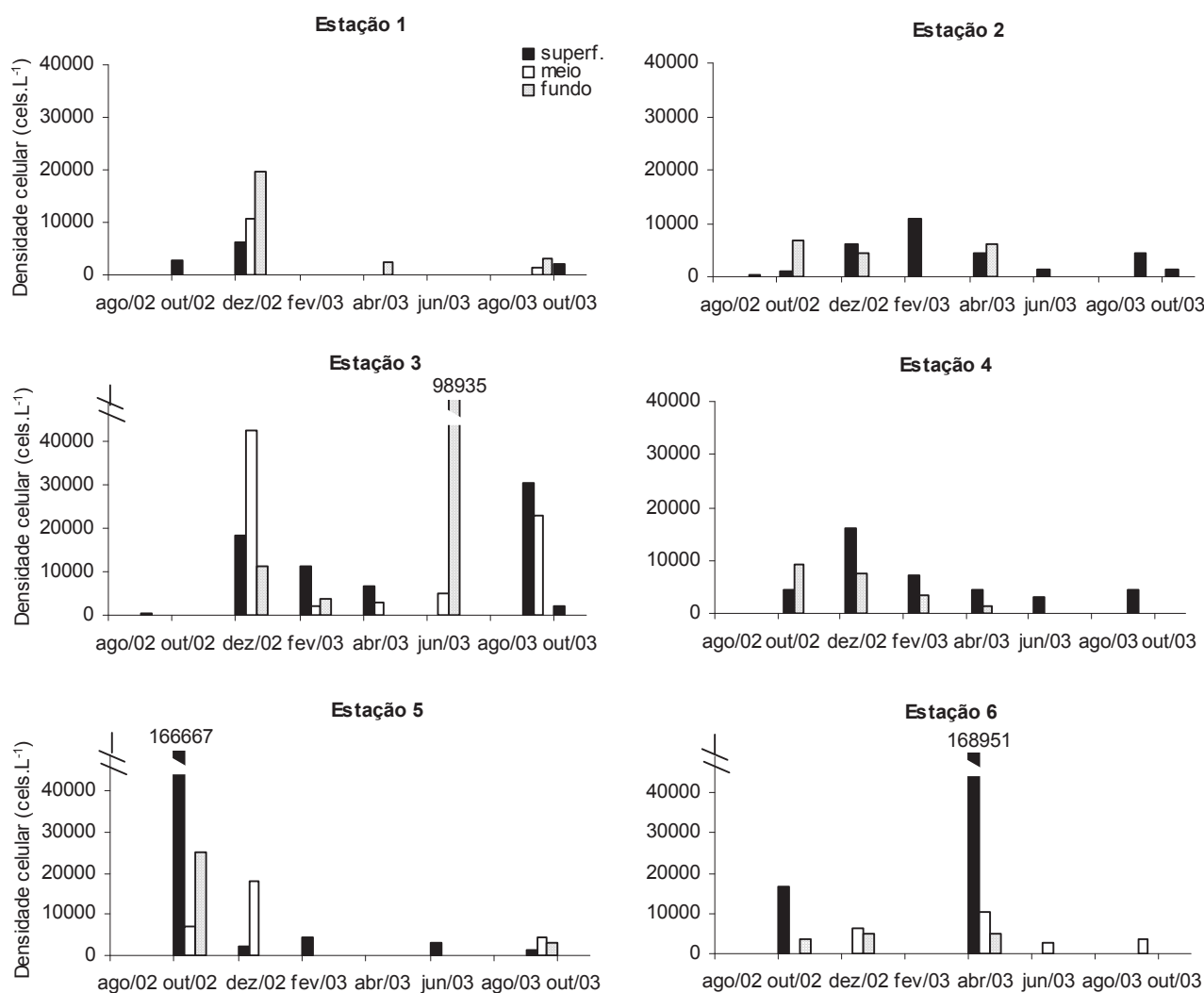
Prorocentrum minimum

O dinoflagelado *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller só não foi encontrado nas amostras de agosto de 2002. A máxima concentração registrada foi na superfície da estação 6, em abril de 2003 – 168.951 cels.L⁻¹ (Figura 31). Em outra ocasião, em outubro de 2002, no estrato superficial da estação 5, a concentração celular chegou a 166.667 cels.L⁻¹.

Uma cepa de *P. minimum* foi isolada e cultivada em outubro de 2002. A exemplo do que ocorreu com *Chattonella* cf. *marina*, o cultivo foi extinto em

conseqüência de um descontrole térmico na estufa incubadora e nenhum teste de toxicidade foi realizado com esta alga na presente investigação.

Figura 31 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Prorocentrum minimum* em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.

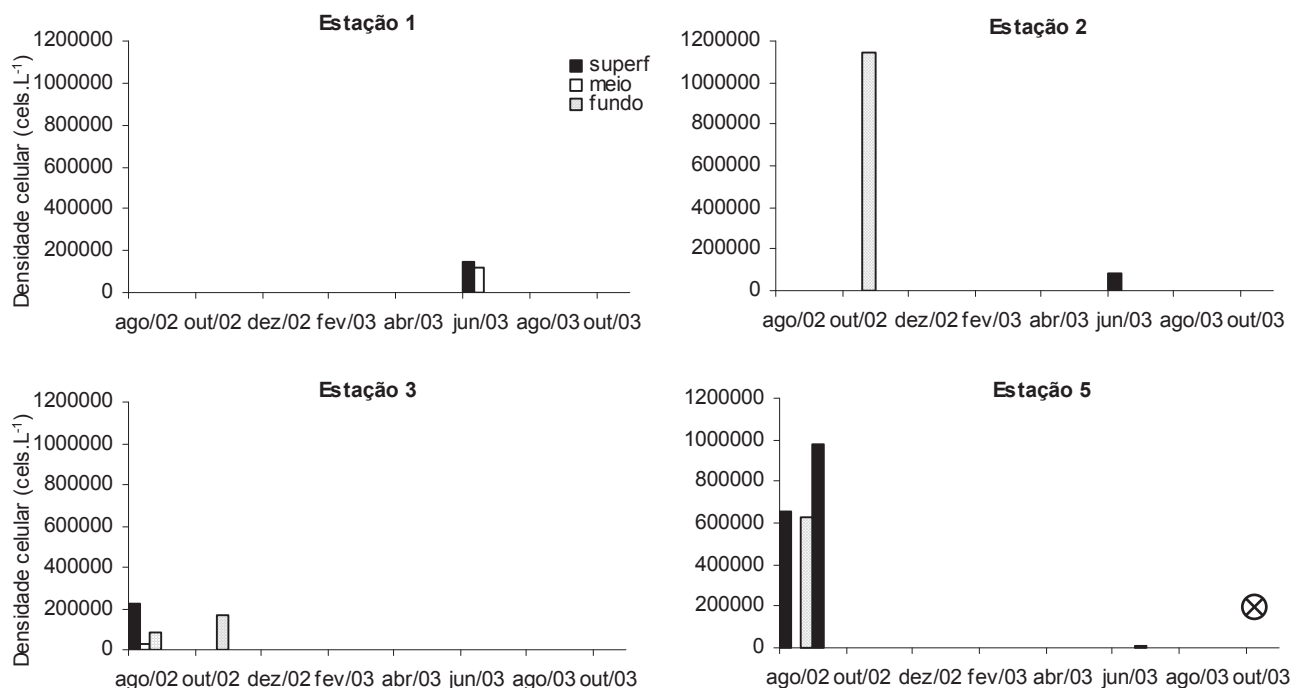


Phaeocystis spp.

A primnesiofícea *Phaeocystis* spp. ocorreu no ambiente sob a forma colonial, possibilitando sua detecção. Sua ocorrência foi predominante no inverno e início de primavera (Figura 32). Foram contadas em conjunto as espécies *P. globosa* Scherffel e *P. pouchetii* (Hariot) Lagerheim. Como suas células são relativamente pequenas e ocorrem agrupadas em densas colônias, as concentrações celulares registradas foram bastante elevadas, chegando ao máximo de 1.141.558 cels.L⁻¹ em

outubro de 2002 no estrato profundo da estação de coleta 2 (Figura 32). *Phaeocystis* spp. voltou a ocorrer em outubro de 2003, mas nesta ocasião somente foi detectada em amostra viva.

Figura 32 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Phaeocystis* spp. em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003. O símbolo ⊗ marca a ocorrência somente em amostra viva.



5.2.5 Outras microalgas nocivas

Coscinodiscus wailesii

A diatomácea *Coscinodiscus wailesii* foi encontrada nas estações 1, 2, 3 e 5, sendo mais abundante nesta última (Figura 33). Sua ocorrência esteve dispersa ao longo do período de estudo, mas as maiores concentrações foram registradas no final do verão. A concentração máxima estimada foi de 14.104 cels.L⁻¹, na estação 5, em março de 2003 (Figura 33).

Trichodesmium erythraeum

A presença da cianobactéria marinha *Trichodesmium erythraeum* foi detectada somente nas amostras de outubro de 2002. A concentração máxima foi 4.566 cels.L⁻¹ (Figura 34). A alga foi observada sob a forma de tricomas, mas foram

contadas as células individualmente. A ocorrência se limitou às estações de coleta 1 e 3, na região mais externa do estuário.

Figura 33 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Coscinodiscus wailesii* em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.

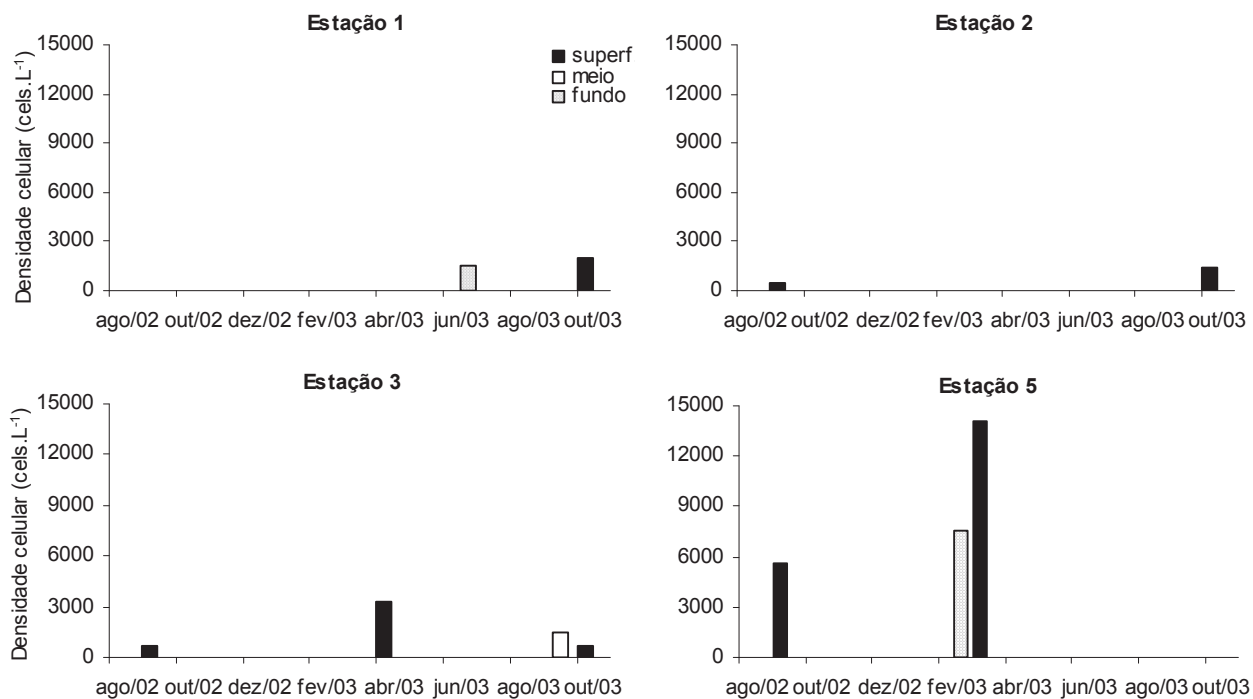
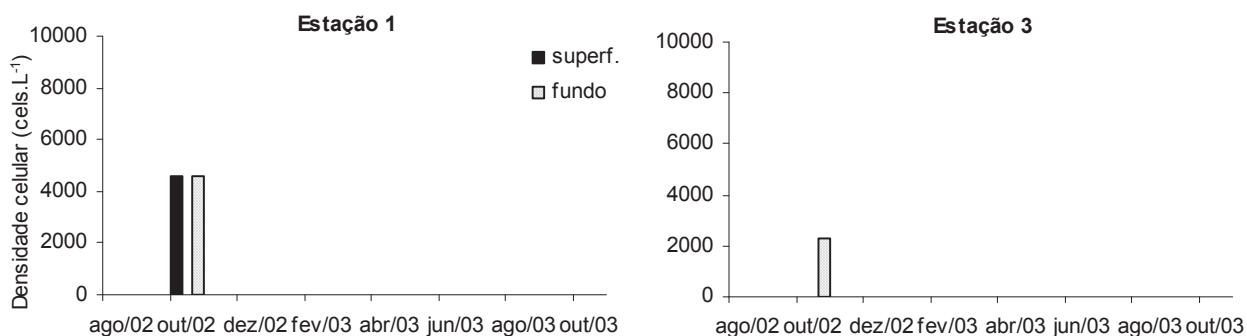


Figura 34 - Densidade celular (cels.L⁻¹) de *Trichodesmium erythraeum* em diferentes estações de coleta no complexo estuarino de Paranaguá, PR – agosto de 2002 a outubro de 2003.



6 DISCUSSÃO

6.1 Oscilações espaciais e temporais nas variáveis ambientais e clorofila-a

A abundância e a composição das comunidades fitoplanctônicas são dependentes da hidrodinâmica e das características físico-químicas do ambiente e das suas variações espaciais e temporais. O conjunto das condições ambientais, tais como luz, nutrientes, salinidade, temperatura, drenagem continental e parâmetros hidrográficos, afetam diretamente a variabilidade espaço-temporal do fitoplâncton e alteram sua taxa de crescimento (THOMPSON, 1998). Num estuário, a estratificação da coluna d'água, as taxas de importação e exportação do fitoplâncton e as interações biológicas, como herbivoria e competição, também são influentes na distribuição do fitoplâncton (PENNOCK, 1985).

Durante o período investigado, houve uma significativa variação temporal na abundância do fitoplâncton, bem como entre os diferentes pontos do complexo estuarino de Paranaguá (CEP). Isso ficou bem evidenciado, tanto pela abundância e distribuição das microalgas, como pelas medidas de clorofila-a em cada estação de coleta e nos diferentes estratos da coluna d'água. Segundo BRANDINI, THAMM e VENTURA (1988), a produção do fitoplâncton no CEP é controlada pela atuação conjunta da disponibilidade de luz, concentração de nutrientes, salinidade e temperatura. O CEP é um ambiente estuarino fortemente controlado pelo regime de marés e influenciado pela pluviosidade e drenagem continental. Esses fatores, por sua vez, influenciam a distribuição espacial e temporal da salinidade, temperatura, nutrientes, material particulado em suspensão e, conseqüentemente, a penetração da luz na coluna d'água. Nos setores mais externos do estuário, as variações ambientais e a abundância do fitoplâncton são fortemente afetadas pelo regime hidrográfico da plataforma continental adjacente (BRANDINI; THAMM; VENTURA, 1988).

A variabilidade espacial nos parâmetros ambientais e na produção primária torna-se mais evidentes quando a entrada de água doce no sistema é mais significativa e ocorre a formação de gradientes de salinidade bem definidos (LAPOINTE; CLARKE, 1992). Durante o período investigado, as salinidades foram maiores no setor externo e menores no setor interno da baía, onde se registrou

valores muito próximos de zero em fevereiro de 2003, período de elevada pluviosidade. Salinidades próximas a zero já haviam sido detectadas por MACHADO et al. (1997) e LANA et al. (2001). A temperatura não sofreu grandes alterações de um setor para o outro, sendo, em geral, um pouco mais elevada nos pontos mais rasos do ambiente. As concentrações de nutrientes inorgânicos dissolvidos seguiram um padrão inverso ao da salinidade, sendo maiores nos setores mais internos do CEP. Nos setores mais externos, os valores foram bastante baixos, principalmente as concentrações das formas nitrogenadas. Uma exceção ao padrão encontrado foi o fosfato, que teve as maiores concentrações medidas em pontos intermediários do sistema, as estações de coleta 3, 4 e 5. Diversos trabalhos já destacaram essa abundância de fosfato nos setores mesohalinos do CEP e sua relação principal com a descarga dos efluentes domésticos da cidade de Paranaguá (KNOPPERS; BRANDINI; THAMM, 1987; BRANDINI; THAMM; VENTURA, 1988; MACHADO et al., 1997). O valor máximo de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfato, registrado na estação 4, em outubro de 2002, é incomum em ambientes estuarinos mesotróficos como o CEP e possivelmente seja justificado pela presença de efluentes domésticos urbanos em adição aos rejeitos de uma indústria de minério de fosfato existente na região. Os baixos valores de transparência da água, medidos pelo disco de Secchi nos pontos mais internos do CEP, refletem a presença de elevadas cargas de material sólido em suspensão que são trazidos pela drenagem continental.

Portanto, de acordo com a presente investigação e com estudos anteriores (BRANDINI; THAMM; VENTURA, 1988; MACHADO et al., 1997; BRANDINI, 2000; LANA et al., 2001), o crescimento do fitoplâncton nos setores mais internos do CEP é limitado pela baixa penetração de luz na coluna d'água, e no setor mais externo pela baixa concentração de nutrientes, sobretudo de nitrogênio inorgânico. Desta forma, a área intermediária do CEP é a mais produtiva devido ao conjunto de condições favoráveis de luz, nutrientes e salinidade. A alta concentração de fitoplâncton (até $4 \times 10^7 \text{ cels.L}^{-1}$) e de clorofila-a (até $67,8 \mu\text{g.L}^{-1}$) encontrados no setor intermediário do CEP durante o atual estudo corroboram tal afirmação. BRANDINI (1985) ressalta, entretanto, que pode haver fotoinibição nestes locais durante o verão, quando são registrados altos níveis de irradiação.

A exemplo de estudos anteriores (e.g. BRANDINI, 2000), o período de verão foi o que revelou as maiores abundâncias de fitoplâncton e concentrações de

clorofila-a. Nesse período (entre dezembro e março) a pluviosidade foi maior, o que resultou numa maior entrada de nutrientes no sistema. A temperatura em elevação favoreceu o crescimento de diversas espécies de microalgas e a abundância total de células aumentou ao mesmo tempo em que os nutrientes foram sendo consumidos. Portanto, o regime de chuvas e a temperatura da água foram os maiores responsáveis pela variação temporal do fitoplâncton no ambiente de estudo. De um modo geral, as florações de microalgas no complexo estuarino de Paranaguá são provavelmente influenciadas pelo aporte de nutrientes trazidos pela descarga fluvial durante os períodos chuvosos (LANA et al., 2001), pela entrada de águas costeiras subtropicais ricas em nutrientes no inverno (FERNANDES, 1992) e pela remineralização de nutrientes junto ao sedimento e seu transporte advectivo para a coluna d'água durante a passagem de frentes frias, predominantemente no outono (MARONE; CAMARGO, 1994; LOPES, 1997).

Assim como a abundância, a composição do fitoplâncton também sofreu intensas variações ao longo do tempo e dos diferentes setores do complexo estuarino de Paranaguá. Entretanto, o presente trabalho teve como enfoque somente as espécies de microalgas potencialmente nocivas. A distribuição espacial e temporal e a toxicidade das microalgas nocivas no CEP, bem como os fatores que influenciam em tais variáveis, serão abordados no restante da discussão.

6.2 Microalgas nocivas e ficotoxinas

6.2.1 Microalgas produtoras do ASP

Pseudo-nitzschia spp.

Há poucos anos, BATES (2000) listava um número de nove espécies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente produtoras de ácido domóico: *P. australis* Frenguelli, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta* (Cleve) Hasle, *P. multiseriata*, *P. multistriata* (Takano) Takano, *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle, *P. pungens*, *P. seriata* (P.T. Cleve) H. Peragallo e *P. turgidula* (Hustedt) Hasle. Recentemente, a descrição de novas espécies e o aperfeiçoamento das técnicas para a detecção de toxinas elevou este número para onze espécies. LUNDHOLM et al. (2003) revisaram o complexo formado pelas espécies *Pseudo-nitzschia cuspidata* (Hasle) Hasle e *P.*

pseudodelicatissima e descreveram duas novas espécies, sendo que uma delas, *P. calliantha*, produziu o ácido domóico. Por fim, a nova espécie *P. galaxiae* Lundholm et Moestrup teve a sua toxicidade confirmada por métodos refinados de cromatografia (CERINO et al., 2005).

Nas amostras coletadas durante a atual investigação foram identificadas três espécies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia*: *P. calliantha*, *P. multiseriis* e *P. pungens*. Além destas, *P. australis* e *P. cf. delicatissima* já haviam sido registradas na região do complexo estuarino de Paranaguá (FERNANDES, 1992), mas não foram encontradas em nossas amostras. Considerando a escassez de estudos que enfoquem especificamente microalgas nocivas e que a identificação taxonômica da maioria das espécies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia* é difícil e requer, quase sempre, o uso de microscopia eletrônica (VILLAC et al., 1993; HASLE, 1995), o número de espécies no CEP pode ser ainda maior.

No Brasil, a ocorrência de *Pseudo-nitzschia* spp. tem sido reportada principalmente no litoral das regiões sul e sudeste, onde se concentram os estudos sobre algas nocivas. Diversas espécies já foram citadas, incluindo várias potencialmente produtoras de toxinas, entre elas: *P. australis*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. multiseriis*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima* e *P. pungens* (VILLAC; TENENBAUM, 2001; ODEBRECHT et al., 2001; MATOS; SANTOS; VILLAC, 2002; TAVARES et al., 2002; MOREIRA, 2004).

A maior parte das espécies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente tóxicas apresenta uma distribuição cosmopolita, tais como *P. pungens*, *P. fraudulenta* e as produtoras aparentemente mais eficientes de ácido domóico, *P. australis* e *P. multiseriis* (HASLE, 2002). Os relatos acerca das espécies *P. delicatissima* e *P. pseudodelicatissima* também indicam uma possível distribuição cosmopolita. Nestes últimos dois casos, há algumas ambigüidades na identificação taxonômica (HASLE, *op cit.*), principalmente porque a última espécie correspondia verdadeiramente a um grupo de três espécies, *P. pseudodelicatissima*, *P. caciantha* Lundholm et al. e *P. calliantha*, (LUNDHOLM et al., 2003). Por outro lado, a espécie *P. seriata* f. *seriata* demonstra uma distribuição restrita ao Atlântico Norte. Outras duas espécies potencialmente tóxicas, *P. multistriata* e *P. turgidula*, possuem distribuição indefinida, a primeira devido à escassez de registros e a última por apresentar dúvidas quanto à identificação. As espécies que não produzem o ácido domóico parecem ter

distribuições mais particulares, como é o caso de *P. subfraudulenta* (Hasle) Hasle, que habita águas mais quentes em baixas latitudes, e da *P. seriata* f. *obtusa* (Cleve) Peragallo, que ocorre exclusivamente nas altas latitudes do Hemisfério Norte (HASLE, 2002).

Na presente investigação, as espécies de *Pseudo-nitzschia* foram analisadas em conjunto. A abundância do gênero foi maior no final do verão e início do outono, durante o período mais chuvoso. Densidades máximas foram registradas na superfície das áreas mais externas do estuário, onde a salinidade é geralmente superior a 30. Entretanto, em fevereiro de 2003, quando uma concentração superior a 300.000 cels.L⁻¹ foi atingida, estes pontos apresentavam salinidades relativamente mais baixas na superfície (entre 19 e 25) e a coluna d'água se encontrava estratificada. A época de maior abundância de *Pseudo-nitzschia* spp. correspondeu ao período em que a água no estuário alcançou a maior temperatura (acima de 30°C). Essa condição de estratificação da água e temperaturas superficiais elevadas, ocorrendo no final do verão e início do outono, é a mesma que parece favorecer o crescimento de *P. australis* na Califórnia, tendo sido observada durante as extensas florações que ocorreram entre 1991 e 1994 (BUCK et al., 1992; WALZ et al., 1994). Entretanto, naqueles locais, as temperaturas máximas que a água pode alcançar são bastante inferiores, cerca de 15 a 18°C (M.C. Villac, com. pess.).

Além da temperatura elevada e da estratificação da coluna d'água, o final do verão, período de maior crescimento de *Pseudo-nitzschia* spp. neste estudo, foi subsequente à época mais chuvosa, o que ficou comprovado pelo gráfico de pluviosidade mensal (Figura 4) e pelas menores salinidades registradas junto à superfície. O consequente aumento na descarga fluvial resultou em um elevado aporte de nutrientes inorgânicos dissolvidos, conforme mensurado em várias estações de coleta. Entretanto, nos locais onde a abundância de *Pseudo-nitzschia* spp. foi maior, as concentrações de alguns nutrientes eram baixas, o que pode ter revelado um elevado consumo, em parte causado por estas diatomáceas. Na superfície das estações 1 e 3 (Figuras 5 e 7), durante o período de maior concentração celular de *Pseudo-nitzschia* spp. (Figura 11), os níveis de alguns nutrientes estavam mais baixos do que no estrato profundo. Isso ocorreu com amônio, nitrito e fosfato. Seguindo um padrão inverso, as concentrações de nitrato e silicato estavam maiores na superfície, onde *Pseudo-nitzschia* era mais abundante.

Foi difícil estabelecer uma relação clara entre a concentração de nutrientes e a abundância de *Pseudo-nitzschia* spp. devido à baixa frequência amostral adotada. Entretanto, alguns outros estudos mostraram que o elevado aporte de nutrientes via descarga fluvial favorece o crescimento e a formação de extensas florações de *Pseudo-nitzschia*. É o que ocorre na região da Baía de Cardigan, Canadá (SMITH, 1993) e no nordeste do Golfo do México, relacionado com períodos de maior vazão do Rio Mississippi (DORTCH et al., 1997). Grandes florações no Canadá e envenenamentos com ácido domóico nos estados americanos de Oregon e Washington, EUA, aconteceram após um longo período de estiagem seguido por dias excessivamente chuvosos (SMITH, 1993; HORNER; POSTEL, 1993). A entrada de águas ricas em nutrientes, trazidas por fenômenos de ressurgência costeira, também contribui com o surgimento de florações de *Pseudo-nitzschia* no sul da Califórnia, EUA (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998).

De acordo com testes *in vitro*, as condições de nutrientes mais propícias ao crescimento celular de *Pseudo-nitzschia* e à produção de ácido domóico são aquelas em que há uma limitação por silicato ou fosfato, na presença de nitrogênio em excesso (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998), o que também é verificado em ambiente natural (SUBBA RAO; QUILLIAM; POCKLINGTON, 1988; DORTCH et al., 1997). No presente estudo, no momento em que havia a máxima concentração celular de *Pseudo-nitzschia* spp., as quantidades de nitrato eram relativamente abundantes, enquanto que o fosfato estava presente em níveis bastante baixos (mínimo de $0,16 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Tanto o aporte fluvial como a remineralização nos sedimentos promovem um enriquecimento de nitrogênio e fósforo em relação ao silício, criando condições favoráveis ao florescimento de *Pseudo-nitzschia*. As formas nitrogenadas que favorecem as florações tóxicas de *Pseudo-nitzschia* não se restringem ao nitrato, elas abrangem também o amônio e as formas orgânicas, que são compostos abundantes nos ambientes costeiros onde tais fenômenos são percebidos (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998). Sendo assim, o processo de eutrofização pode contribuir para o surgimento destes eventos em locais onde não se têm registros anteriores.

As espécies tóxicas de *Pseudo-nitzschia* são tipicamente estuarinas ou costeiras e apresentam elevada tolerância a variações de salinidade (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998). Inúmeros estudos, em laboratório e campo, têm

comprovado este alto grau de tolerância à salinidade. SEGUEL (1991) determinou que uma cepa de *P. multiseriis*, isolada no Canadá, mostrava um crescimento ótimo entre as salinidades de 30 a 45, mas crescia satisfatoriamente até salinidades próximas de 9, enquanto que uma cepa americana se desenvolveu em salinidades entre 13 e 34 (REAP, 1991). No ambiente, esta espécie é comumente encontrada em salinidades entre 5 e 29. Uma combinação de espécies de *Pseudo-nitzschia* foi descoberta nas proximidades do Rio Mississippi, EUA, em salinidades variado de 0 a 36 (DORTCH et al., 1997). A abundância de *Pseudo-nitzschia* spp. em salinidades baixas encontradas na Baía de Paranaguá durante este trabalho e na costa do Rio Grande do Sul (ODEBRECHT et al., 2001) mostra que condições oligo e mesohalinas não inibiram o crescimento desta alga na região sul do Brasil. Apesar disso, ocorrem mudanças na composição das espécies em resposta a variações nas condições ambientais. Desta forma, pode-se considerar o gênero *Pseudo-nitzschia* como altamente tolerante a amplas mudanças nas condições ambientais, mas diferentes espécies podem ser favorecidas em situações distintas (M.C. Villac, com. pess.).

Como o crescimento de *Pseudo-nitzschia* spp. é favorecido por um amplo espectro de fatores, facilmente encontrados em ambientes costeiros como o complexo estuarino de Paranaguá, é plausível se assumir a possibilidade destas algas formarem uma floração, desde que haja um número suficiente de células inicialmente presentes na água (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998). Este estoque, ou inóculo, que alimenta as florações de *Pseudo-nitzschia* pode estar localizado dentro do estuário, ou numa região mais afastada dele, como parece ocorrer na costa pacífico-americana. Lá, independentemente da condição climática, as florações geralmente não são formadas sem que a salinidade ultrapasse 29, sugerindo a entrada de água oceânica no estuário (SAYCE; HORNER, 1996). No extremo sul do Brasil, na região da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, a ocorrência de um pico de abundância durante o verão e outono, subsequente ao pico de primavera que acontece mais afastado da costa, sugeriu que a maior parte das células que servem de inóculo para a praia e estuário tenha origem nas águas da plataforma continental adjacente (ODEBRECHT et al., 2001). Na plataforma

continental adjacente ao complexo estuarino de Paranaguá, a presença de diversas espécies de *Pseudo-nitzschia*, por vezes relativamente abundantes (BRANDINI; MORAES, 1986; BRANDINI, 1988; BRANDINI; FERNANDES, 1996) pode vir a se constituir numa fonte externa de inóculos para o sistema.

A contagem das células de diferentes espécies de *Pseudo-nitzschia* spp. em conjunto nem sempre é um procedimento capaz de prever a intoxicação por ácido domóico, já que a morfologia das espécies tóxicas é semelhante a outras predominantemente não-tóxicas (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998). Como exemplo, a espécie tóxica *Pseudo-nitzschia multiseriis* é morfologicamente similar a *P. pungens*, uma espécie que na grande maioria dos casos não produz toxina. A principal característica que as diferencia é o número de fileira de poróides na frústula, percebida somente por microscopia eletrônica (VILLAC et al., 1993). Mesmo que se consiga identificar uma espécie tóxica numa amostra, a variação na produção de ácido domóico entre cepas de diferentes regiões geográficas também dificulta o estabelecimento de uma relação entre a ocorrência de uma espécie tóxica no ambiente e a previsão de um evento de intoxicação. Para conhecer o potencial tóxico das espécies de *Pseudo-nitzschia*, além de medir níveis de toxinas em amostras de campo, diversos estudos vêm buscando cultivar cepas provenientes de diferentes locais de origem e mensurar a produção de ácido domóico em laboratório. Alguns estudos revelaram a existência de cepas tóxicas e não tóxicas de uma mesma espécie e, ainda, de uma mesma região geográfica (Tabela 9). As análises de cromatografia líquida realizadas com cepas de *Pseudo-nitzschia* cultivadas em laboratório durante o presente estudo revelaram que pelo menos uma das espécies presentes no complexo estuarino de Paranaguá (CEP) representa uma fonte potencial de toxinas. As três espécies encontradas nas amostras de fitoplâncton, *P. pungens*, *P. calliantha* e *P. multiseriis*, já se mostraram capazes de produzir a toxina em outras regiões do mundo (Tabela 9). Contudo, *P. multiseriis* é a única dentre as três conhecida por ser uma produtora potente de ácido domóico.

Tabela 9 - Quadro comparativo entre a produção de ácido domóico por cepas das 11 espécies tóxicas de *Pseudo-nitzschia*, em diferentes investigações e locais de origem. CAN- Canadá; EUA- Estados Unidos; KOR- Coréia do Sul; JPN- Japão; HOL-Holanda; BRA-Brasil; ESP- Espanha; NZL- Nova Zelândia; AUS- Austrália; DIN- Dinamarca; MED- Mar Mediterrâneo.

continua...				
ESPÉCIE	AUTOR	TÓXICA	NAO-TÓXICA	ORIGEM
<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	Subba Rao et al., 1988	X		CAN
	Bates et al., 1989	X		CAN
	Fryxell et al., 1990	X		EUA
	Pocklington et al., 1990	X		CAN
	Smith et al., 1990	X		CAN
	Reap, 1991	X		EUA
	Villac et al., 1993	X		EUA
	Villareal et al., 1994	X		EUA
	Lee; Baik, 1995	X		KOR
	Kotaki et al., 1996	X	X	JPN
	Vrieling et al., 1996	X		HOL
	Lincoln et al., 2001	X		EUA
<i>P. cf. multiseriis</i> (cepa Pnz-4)	Presente estudo	X		BRA
<i>P. australis</i>	Buck et al., 1992	X		EUA
	Fritz et al., 1992	X		EUA
	Garrinson et al., 1992	X		EUA
	Villac et al., 1993	X	X	EUA
	Walz et al., 1994	X		EUA
	Míguez et al., 1996	X		ESP
	Rhodes et al., 1996	X		NZL
	Scholin et al., 2000	X		NZL
<i>P. pungens</i>	Smith et al., 1990		X	CAN
	MacKenzie et al., 1993		X	NZL
	Villac et al., 1993		X	EUA
	Hallegraeff, 1994		X	AUS
	Lundholm et al., 1994		X	DIN
	Villareal et al., 1994		X	EUA
	Kotaki et al., 1996		X	JPN
	Rhodes et al., 1996	X		NZL
	Vrieling et al., 1996		X	HOL
	Bates et al., 1998	X		CAN
	Trainer et al., 1998	X		EUA
<i>P. pungens</i> (cepa Pnz-1)	Presente estudo		X	BRA
<i>P. pseudodelicatissima</i>	Reap, 1991		X	EUA
	Lundholm et al., 1994		X	DIN
	Hallegraeff, 1994		X	AUS
	Villareal et al., 1994		X	EUA
	Rhodes, 1998	X		NZL
	Parsons et al., 1999	X	X	EUA
	Pan et al., 2001	X		EUA
	Lundholm et al., 2003		X	DIN

Tabela 9 – (cont.) Quadro comparativo entre a produção de ácido domóico por cepas das 11 espécies tóxicas de *Pseudo-nitzschia*, em diferentes investigações e locais de origem CAN- Canadá; EUA- Estados Unidos; KOR- Coréia do Sul; JPN- Japão; HOL- Holanda; BRA- Brasil; ESP- Espanha; NZL- Nova Zelândia; AUS- Austrália; DIN- Dinamarca; MED- Mar Mediterrâneo.

ESPÉCIE	AUTOR	conclusão		ORIGEM
		TÓXICA	NÃO-TÓXICA	
<i>P. delicatissima</i>	Smith et al., 1990	X		CAN
	Villac et al., 1993		X	EUA
	Lundholm et al., 1994		X	DIN
	Rhodes et al., 1996	X		NZL
	Lundholm et al., 1997	X		DIN
<i>P. calliantha</i>	Martin et al., 1990	X		CAN
	Lundholm et al., 1994		X	DIN
	Lundholm et al., 1997	X		DIN
	Skov et al., 2003		X	
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp. (cepas 2,3)	Presente estudo		X	BRA
<i>P. galaxiae</i>	Lundholm; Moestrup, 2002		X	DIN
	Cerino et al., 2005	X		MED
<i>P. multistriata</i>	Rhodes et al., 2000		X	NZL
	Sarno; Dahlmann, 2000	X		MED
<i>P. seriata</i>	Bates et al., 1989		X	CAN
	Lundholm et al., 1994	X		DIN
<i>P. fraudulenta</i>	Rhodes et al., 1997	X		NZL
<i>P. turgidula</i>	Rhodes et al., 1997	X		NZL

Como se percebe na Tabela 9, as espécies mais investigadas, por serem mais tóxicas, são *P. multiseriata* e *P. australis*. As demais alternam resultados positivos e negativos quanto à produção de ácido domóico. BATES, GARRINSON e HORNER (1998) apresentaram algumas hipóteses para explicar a grande variabilidade na produção de ácido domóico por diferentes cepas de uma mesma espécie de *Pseudo-nitzschia*, a saber: (a) variação genética entre as cepas das mesmas espécies de diferentes regiões geográficas; (b) diferenças nos fatores controladores da produção da toxina, como nutrientes e bactérias; (c) estudos incompletos acerca das condições de crescimento em cultivo que levem à produção de ácido domóico; (d) identificação equivocada das espécies; ou (e) interpretação incorreta dos resultados. Portanto, antes que a capacidade de produção de toxina seja descartada para uma determinada cepa, devem ser testadas diversas

combinações de condições de crescimento em cultivo. Em adição a isso, aconselha-se que a confirmação da identificação taxonômica seja feita por um profissional experiente.

No Brasil, o ácido domóico foi observado pela primeira vez no litoral de Santa Catarina, durante o verão de 2001. Nesta ocasião, a toxina foi detectada em amostras de plâncton concentradas por rede, onde a espécie *P. pseudodelicatissima* era dominante em concentrações maiores que $100.000 \text{ cel.L}^{-1}$ (TAVARES et al., 2002). A análise de culturas a partir de células isoladas revelou também a produção de AD por *P. pungens* proveniente da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (PROENÇA e VILLAC, não publicado) e cepas de *P. multiseries* oriundas da costa do Rio Grande do Sul (MOREIRA, 2004).

Nas nossas amostras de cultivo, excluindo-se a cepa Pnz-1, identificada como sendo *Pseudo-nitzschia pungens*, a identificação das outras três cepas de *Pseudo-nitzschia* foi prejudicada pela erosão do material. Mesmo realizando inúmeras sessões de microscopia eletrônica, não foi possível distinguir em nossas amostras algumas estruturas que compõem o conjunto de caracteres usados na classificação taxonômica. As células apresentavam fraca incorporação de sílica, o que deve ter sido provocado pela idade avançada do cultivo e pela demora na análise das amostras. Mesmo assim, algumas características observadas em microscopia óptica apontaram para algumas suspeitas. Conforme a classificação proposta por LUNDHOLM et al. (2003), as cepas Pnz-2 e Pnz-3 poderiam ser enquadradas no complexo *P. pseudodelicatissima/ cuspidata*, formado por *P. pseudodelicatissima*, *P. cuspidata*, *P. calliantha* e *P. caciantha*, mas não foi possível se precisar quais as espécies. Por fim, as características de tamanho, forma e sobreposição das células percebidas na cepa Pnz-4 corroboraram as descrições já feitas para *P. multiseries* por HASLE (1965); FRYXELL, REAP e VALENCIC (1990); LEE (1994); HASLE e FRYXELL (1995); HASLE e SYVERSTEN (1996); HASLE, LANGE e SYVERTSEN (1996); VILLAC (1996); e FERRARIO et al. (1999).

Dentre essas cepas isoladas do CEP, uma cepa de *P. pungens* e duas de *Pseudo-nitzschia* sp. não produziram ácido domóico. Pode-se afirmar que elas não foram tóxicas sob as condições testadas, já que o método empregado (POCKLINGTON et al., 1990) é capaz de detectar níveis-traço da toxina (a partir de

15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em cultivos com concentrações celulares tão baixas quanto 20 a 200 $\text{cels}\cdot\text{mL}^{-1}$. Atualmente, métodos ainda mais refinados de detecção sugeriram que alguns resultados negativos podem, na verdade, estar mascarando a presença de quantidades tão pequenas a ponto de não serem detectados pelo método analítico adotado (CERINO et al., 2005). De qualquer modo, quantidades extremamente reduzidas são insignificantes quando se considera o risco para intoxicações.

A outra cepa isolada neste estudo, *Pseudo-nitzschia* cf. *multiseries*, permaneceu durante sete meses em cultivo, durante os quais os experimentos de crescimento e análise da produção de toxina foram desenvolvidos. A concentração celular máxima atingida em cultivo (13.440 $\text{cels}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi muito menor do que as já medidas em outras cepas de *P. multiseries*. As cepas investigadas nos experimentos de LINCOLN et al. (2001) atingiram uma concentração celular máxima entre 144.000 e 350.000 $\text{cels}\cdot\text{mL}^{-1}$ e uma cepa cultivada por KOTAKI et al. (1999) alcançou a concentração de cerca de 700.000 $\text{cels}\cdot\text{mL}^{-1}$. Desta forma, as condições de cultivo utilizadas no presente experimento podem não ter sido as ótimas para esta cepa, apesar de refletirem mais fielmente as variáveis ambientais às quais as algas estavam expostas no momento de sua coleta. Nos dois outros experimentos citados, nos quais a alga apresentou uma maior taxa de crescimento, a quantidade inoculada de células foi maior, a temperatura de cultivo era mais baixa (15°C) e o fotoperíodo mais longo (16:8 horas; claro: escuro) do que em nossas culturas.

A concentração intracelular de ácido domóico em *P. cf. multiseries* variou, em função da fase do crescimento em cultivo, entre 0,003 e 0,176 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$. Embora estejam dentro da amplitude de valores já registrados para *P. multiseries* em cultivo – entre 0,06 e 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (VILLAC et al., 1993) e 0,05 e 8,10 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (LINCOLN et al., 2001) – os níveis máximos de toxina registrados nas presentes análises estiveram bem aquém da produção apresentada por diversas cepas em diferentes regiões geográficas. Diversos outros autores mensuraram concentrações intracelulares bem mais elevadas da toxina em cepas distintas de *P. multiseries*, chegando a alcançar 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (BARGU et al., 2003); 1,4 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (KOTAKI et al., 1996); 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (SMITH et al., 1993); 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (POCKLINGTON et al., 1990); 6,7 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (KOTAKI et al., 1999); e até 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ (BATES et al., 1991). Além de diferenças genéticas, condições de luz (POCKLINGTON et al., 1990), nutrientes

(MALDONADO et al., 2002) e presença de bactérias (DOUGLAS et al., 1993; BATES et al., 1995) podem ter influenciado nas distintas taxas de produção de toxina nestas cepas investigadas de *P. multiseriis*. Além dos fatores ambientais já relacionados, a idade e condição fisiológica do cultivo podem também ser determinantes na produção de ácido domóico, visto que células novas e grandes de *Pseudo-nitzschia*, resultantes do processo de reprodução sexual, produzem substancialmente mais AD do que aquelas menores e mais velhas, originadas de divisões assexuadas sucessivas por diversas gerações (BATES; HILTZ; LÉGER, 1999). Desta forma, a toxicidade de *P. cf. multiseriis* nas águas do complexo estuarino de Paranaguá pode ser maior do que a medida em condições controladas de laboratório.

Pseudo-nitzschia cf. multiseriis apresentou um pico de produção de ácido domóico durante a fase estacionária do crescimento em cultivo, quinze dias após a inoculação do meio de cultura. A alga começou a produzir uma quantidade substancialmente maior de toxina a partir do final da fase exponencial de crescimento e, após um pico máximo na fase estacionária, passou produzir o ácido domóico em uma concentração cada vez menor. Este padrão de produção de AD *in vitro* corroborou alguns resultados obtidos por diferentes autores, conforme descrito a seguir. Em um experimento de cultivo de *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* (*Pseudo-nitzschia multiseriis*), a alga produziu ácido domóico a partir do final da fase exponencial e durante toda a fase estacionária de crescimento (POCKINGTON et al., 1990). Os níveis intracelulares de toxina alcançaram um valor máximo após quinze dias de cultivo, decrescendo a partir de então. Em experimentos conduzidos por LINCOLN et al. (2001), para a maioria das cepas cultivadas de *P. multiseriis*, o pico de produção da toxina ocorreu entre onze e treze dias após o início do cultivo, durante a fase estacionária de crescimento. Várias outras investigações mostraram que a maior parte do ácido domóico em culturas de *P. multiseriis* é produzido durante a fase estacionária (BATES et al., 1991, 1993, 1995; DOUGLAS; BATES, 1992; WOHLGESCHAFFEN; SUBBA RAO; MANN, 1992; DOUGLAS et al., 1993; LEWIS et al., 1993). Por outro lado, uma outra cepa de *P. multiseriis*, isolada de águas japonesas, começou a produzir a toxina depois de doze dias de cultivo e os níveis foram aumentando abruptamente durante toda a fase estacionária e de

declínio do cultivo, atingindo no final do experimento a concentração máxima (KOTAKI et al., 1999).

Essa produção predominante de toxina na fase estacionária de crescimento é bem característica de *P. multiseriis*. Em geral, a dinâmica da produção de ácido domóico durante os experimentos de crescimento em laboratório difere entre as espécies de diatomáceas tóxicas (BATES, 2000). Ao passo que em *Nitzschia navis-varingica* (KOTAKI et al., 2000), *Pseudo-nitzschia multiseriis* e *P. seriata* (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998) a produção de ácido domóico inicia no fim da fase exponencial de crescimento e continua durante a fase estacionária, em *P. australis* (GARRISON et al., 1992) e *P. pseudodelicatissima* (PAN et al., 2001) a produção da toxina ocorre durante a maior parte da fase exponencial e não acontece na fase estacionária de crescimento.

A maior produção de toxina durante a fase estacionária de crescimento mostra claramente que o ácido domóico é um metabólito secundário em *P. multiseriis* (POCKINGTON et al., 1990). Um forte indício para tal afirmação é que quando ocorre um princípio de depleção de sílica no final do período luminoso, e uma conseqüente desaceleração na taxa de crescimento, o gatilho para a síntese de ácido domóico é disparado nas células das algas tóxicas (MOS, 2001). Neste caso, a toxina pode servir simplesmente como uma via alternativa de eliminação do excesso de energia fotossintética (BATES, 1998). Isso corrobora a hipótese de que o ácido domóico provavelmente seja sintetizado durante períodos nos quais os intermediários fosforilados altamente energéticos, como o ATP e o NADPH, não são utilizados no metabolismo primário da alga (PAN; BATES; CEMBELLA, 1998) e o fato de que uma maior quantidade da toxina é excretada nestes momentos (BATES et al. 1991).

A cepa de *Pseudo-nitzschia cf. multiseriis* isolada do complexo estuarino de Paranaguá começou a liberar ácido domóico a partir da fase exponencial de crescimento. As concentrações da toxina dissolvida no meio foram se elevando durante o restante da fase estacionária e durante toda a fase de declínio do cultivo, atingindo um máximo de cerca de 2 ng.mL^{-1} no 33° e último dia de experimento. O último dia do experimento (40°) também foi quando POCKLINGTON et al. (1990) observaram a maior concentração de AD dissolvido no meio em que estava sendo

cultivada uma cepa de *P. multiseriis*. Isso confirmou a constatação de VILLAC et al. (1993) de que a concentração de ácido domóico dissolvido no meio de cultivo aumenta com o passar do tempo e, eventualmente, ultrapassa os níveis intracelulares da toxina. Para outra cepa desta mesma alga, KOTAKI et al. (1999) notaram um comportamento semelhante, porém a concentração extracelular de AD atingiu níveis muito maiores (próximos de 500 $\eta\text{g.mL}^{-1}$), por causa das elevadas concentrações celulares e altas taxas de produção de toxina demonstradas por esta cepa. Esse aumento na liberação de ácido domóico pode ser provocado pela limitação de nutrientes que provoca uma diminuição no crescimento celular (BATES, 1998; PAN ; BATES; CEMBELLA, 1998), mas também ser um reflexo da alta taxa de mortalidade nos momentos finais do cultivo, liberando o conteúdo intracelular no meio.

Apesar da descoberta de uma cepa tóxica proveniente do complexo estuarino de Paranaguá e de espécies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia* terem sido encontradas durante uma boa parte do ano em concentrações por vezes elevadas, não se detectou nenhum nível de toxina amnésica acumulada no molusco *Mytella guyanensis*. A baixa concentração relativa de *Pseudo-nitzschia* spp. no ambiente em relação à abundância total do fitoplâncton (11,2%) pode ter contribuído para a ausência de toxinas nos moluscos analisados, já que, potencialmente, esta alga contribuiu apenas com uma pequena parte da dieta dos moluscos. A diatomácea *Skeletonema costatum* era dominante, representando 83,1% das células. Além disso, na região onde foram medidas as maiores concentrações desta alga (estação 1) não havia um ponto de coleta de moluscos para a análise de toxinas.

Em programas de monitoramento, a detecção de ácido domóico em moluscos filtradores é usada como ferramenta para se proibir a comercialização de frutos-do-mar. Para um consumo seguro, os moluscos não devem conter mais do que 20 μg de ácido domóico por grama de carne (QUILLIAM; XIE; HARDSTAFF, 1995). Desde 1987, diversos países vêm registrando a presença de ácido domóico em diferentes espécies de moluscos, inclusive do gênero *Mytella* Soot-Ryen, 1955, o mesmo do sururu. As maiores concentrações reportadas foram de 2,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no Japão (KOTAKI et al., 1996), 187 $\mu\text{g.g}^{-1}$ na Nova Zelândia (RHODES et al., 1996) e 790 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no

Canadá (BATES; GARRINSON; HORNER, 1998). No Brasil, o monitoramento de ácido domóico na carne de moluscos é mais recente do que o aplicado às toxinas paralisantes e diarréicas. Amostras semanais do molusco *Perna perna* foram coletadas em Armação do Itapocoroy, SC durante seis meses entre 1998 e 1999 (PROENÇA; OLIVEIRA, 1999) e durante dezesseis meses em 2002 e 2003 (FONSECA, 2003), sem que, no entanto a toxina amnésica tenha sido detectada por cromatografia líquida.

O ácido domóico aparentemente não exerce nenhum efeito nos moluscos filtradores intoxicados. Ele pode ser eliminado naturalmente por depuração ou mais rapidamente pelo metabolismo de bactérias (p.e. *Alteromonas* spp. e *Pseudomonas* spp.) presentes nos tecidos desses animais (STEWART et al., 1998). Contudo, uma floração tóxica de *Pseudo-nitzschia* spp. na região do CEP poderia afetar outros animais marinhos. Já foram relatados eventos de mortalidades massivas de leões marinhos (SCHOLIN et al., 2000), aves marinhas (WORK et al., 1993; SIERRA-BELTRÁN et al., 1997) e anchoítas, um peixe filtrador (LEFEBVRE; DOVEL; SILVER, 2001). Nas mortes envolvendo mamíferos e aves, os indivíduos mortos consumiram algum outro animal que se alimentou de células de *Pseudo-nitzschia* e acumulou ácido domóico, como moluscos, caranguejos e peixes como anchoítas e sardinhas (BUCK et al., 1992; SIERRA-BELTRÁN et al., 1997). Componentes do zooplâncton, tais como copépodes (WINDUST, 1992; LINCOLN et al., 2001) e eufasiáceos (BARGU et al., 2003) também podem atuar como importantes vetores de ácido domóico na cadeia trófica, já que podem acumular grandes quantidades de toxina sem sofrerem efeitos deletérios (TESTER; PAN; DOUCETTE, 2001; LINCOLN et al., 2001). Como os copépodes dominam as comunidades zooplânctônicas do complexo estuarino de Paranaguá, por vezes representando cerca de 90% da densidade total (LOPES; VALE; BRANDINI, 1998), este pode ser um importante vetor de contaminação no caso de ocorrência de uma floração tóxica de *Pseudo-nitzschia*.

6.2.2 Microalgas produtoras do PSP

Gymnodinium catenatum

Gymnodinium catenatum é o único dinoflagelado atecado que produz toxinas do PSP (HALLEGRAEFF; FRAGA, 1998). Esta alga, capaz de formar colônias

características com cadeias de até 64 células, foi descrita pela primeira vez no Golfo da Califórnia, México, em 1939 (GRAHAM, 1943 *apud* IRWIN et al., 2003). Nas décadas seguintes, sua re-ocorrência foi escassa e restrita a dois registros entre 1940 e 1970. Dos anos 70 e 80 até hoje, *G. catenatum* foi documentado em algumas regiões e países de diferentes continentes, tais como costa oeste dos Estados Unidos, México, Venezuela, Argentina, Uruguai, Portugal, noroeste da Espanha, Marrocos, sul da Austrália, Singapura, Tailândia, Filipinas, Palau, Malásia (HALLEGRAEFF; FRAGA, 1998 e referências listadas) e Nova Zelândia (IRWIN et al., 2003). No Brasil, a espécie foi encontrada pela primeira vez em 1998, na enseada de Armação de Itapocoroy, município de Penha, SC (PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001). Atualmente, a distribuição de *G. catenatum* no litoral brasileiro abrange os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (NAVES, 2002; MAFRA JUNIOR et al., 2004; PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001; ODEBRECHT *et al.*, 2002).

Logo depois de sua primeira detecção em águas brasileiras, a ocorrência de *Gymnodinium catenatum* foi reportada no complexo estuarino de Paranaguá (PROENÇA; FERNANDES, 2004). É possível que a alga já estivesse presente no ambiente sem que tivesse sido detectada, entretanto isso dificilmente deve ter ocorrido, considerando-se o grande número de estudos realizados na região desde a década de 1960 (*e.g.* MOREIRA-FILHO; KUTNER, 1962) e o fato de que *G. catenatum* é uma espécie bastante característica, de tamanho celular relativamente elevado e capaz de formar extensas cadeias de células. A ocorrência de células solitárias é menos freqüente em ambiente natural, mas pode dificultar a identificação taxonômica. Quando solitárias, as células de *G. catenatum* podem facilmente ser confundidas com outros dinoflagelados nus, tais como a espécie não tóxica *Gyrodinium impudicum* Fraga et Bravo (FRAGA et al., 1995). Este problema é agravado quando as amostras são preservadas com solução de formalina ou lugol acético, podendo haver deformação celular. Contudo, *G. catenatum* apresenta maior tamanho celular, é capaz de formar cadeias maiores com até 64 células e não se têm registros da co-ocorrência de *G. catenatum* e *G. impudicum* na costa sul-brasileira (PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001). Assim sendo, há uma grande probabilidade de que *G. catenatum* seja uma espécie exótica, introduzida recentemente no CEP. Uma fonte potencial de introdução é o transporte em tanques

de lastro de navios, que podem trazer células viáveis (nos casos de viagens curtas) e cistos de resistência de *G. catenatum* (principalmente em rotas trans-oceânicas). A água contida nos tanques é proveniente, na grande maioria das vezes, do porto de origem do navio e vem sendo extensivamente despejada no Porto de Paranaguá ao longo de décadas. Outro mecanismo de introdução possível e, talvez, o mais provável, é a introdução secundária. Neste caso, as células vegetativas podem ter sido introduzidas em um local próximo por água de lastro e depois dispersas por correntes oceânicas para o CEP, já que há registros desta espécie na costa Argentina desde 1962 (BALECH, 1964) e mais tarde na costa uruguaia (BALECH, 1988). Esta espécie já foi comprovadamente introduzida por água de lastro na Austrália (HALLEGRAEFF, 2003) e recentemente foi transportada por correntes desde a Ilha do Norte até a Ilha do Sul, na Nova Zelândia (IRWIN et al., 2003).

Na presente investigação, *G. catenatum* mostrou estar plenamente estabelecido no complexo estuarino de Paranaguá, onde foi encontrado em épocas e locais diferentes, corroborando estudos anteriores (PROENÇA; FERNANDES, 2004). Sua ocorrência ao longo do período estudado foi esporádica, tendo sido detectado na primavera, final do verão, início e final do outono. Em função dessa escassez de registros, não houve um padrão claro de distribuição temporal nem tampouco espacial deste dinoflagelado dentro do CEP, entre agosto de 2002 e outubro de 2003. Esta alga mostrou ser tolerante a uma grande amplitude térmica e salina, tendo sido detectada em amostras de água com temperaturas entre 21,7 e 30,8°C e salinidades entre 18,5 e 30,6. As maiores concentrações celulares foram obtidas quando a salinidade foi inferior a 27.

Alguns outros trabalhos buscaram diagnosticar épocas e condições favoráveis a um maior desenvolvimento de *Gymnodinium catenatum*. Na costa mediterrânea do Marrocos (hemisfério Norte), florações freqüentes de *G. catenatum* acontecem principalmente após o inverno, entre os meses de janeiro e abril (TALEB; IDRISSE; BLAGHEN, 1998). As florações de *G. catenatum* na região da Galícia, Espanha, ocorrem numa freqüência quase anual desde 1976 e geralmente sucedem a temporada de ressurgências, que se estende do final da primavera ao início do outono (FRAGA; BRAVO; REGUERA, 1993). As florações nesta região da Espanha sempre ocorrem após os eventos na costa portuguesa (FRAGA et al., 1988), sugerindo que populações de *G. catenatum* são transportadas da costa nordeste

portuguesa para as rias da Galícia, onde seu crescimento é favorecido pela capacidade de migração vertical e mixotrofia (SORDO et al., 2001). Fato semelhante ocorreu no Brasil, no início de 2004, quando elevadas concentrações celulares de *G. catenatum* foram observadas no litoral catarinense de um a dois meses após o registro de uma floração intensa no Uruguai. Ao contrário do que ocorreu no país vizinho, no Brasil os níveis de toxinas paralisantes não ultrapassaram os permitidos para o consumo humano (PROENÇA, dados não publicados). No México, *G. catenatum* tem sido encontrado em temperaturas variando entre 18 e 25°C (CORTÉS-ALTAMIRANO; NUÑEZ-PASTÉN; PASTÉN-MIRANDA, 1999; GÁRATE-LIZÁRRAGA et al., 2001; GÁRATE-LIZÁRRAGA et al., 2004). Os fatores que favorecem o surgimento de elevadas concentrações celulares desta alga naquela região não são conhecidos, mas a temperatura é determinante, já que as florações sempre ocorrem em temperaturas inferiores a 25°C (GÁRATE-LIZÁRRAGA et al., 2004). No sudeste da Tasmânia, Austrália, as florações de *G. catenatum* ocorrem anualmente (HALLEGRAEFF et al., 2003). Os maiores eventos parecem ser precedidos por períodos de chuva, com um aporte associado de substâncias húmicas, ou matéria orgânica dissolvida (MOD), proveniente da lixiviação nas áreas costeiras (DOBLIN; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1999).

A concentração celular máxima de *G. catenatum*, medida durante o atual estudo, foi de 6.393 cels.L⁻¹. Este valor é relativamente baixo quando comparado a concentrações de florações, mas similar ao que é costumeiramente relatado em outras regiões do mundo, como Portugal (MOITA et al., 2003) e México (GÁRATE-LIZÁRRAGA et al., 2001), em épocas em que não há o registro de florações. Em eventos de florações, as concentrações celulares já atingiram 570.000 cels.L⁻¹ (Bahía Concepción, México; GÁRATE-LIZÁRRAGA et al., 2001), 1.000.000 cels.L⁻¹ (Golfo do México; Graham, 1943 *apud* IRWIN et al., 2003) e entre 1.200.000 e 6.600.000 cels.L⁻¹ (México; MEE; ESPINOSA; DÍAZ, 1986), quando foram registradas intoxicações humanas. Já em outros três episódios na costa mexicana, apesar das elevadas concentrações mensuradas – entre 2.200.000 e 5.000.000 cels.L⁻¹ – não foram reportados casos de envenenamentos (CORTÉS-ALTAMIRANO; ALONSO-RODRÍGUEZ, 1997; MORALES-BLAKE; HERNÁNDEZ-BECERRIL; CAVAZOS-GUERRA, 2000; FIGUEROA-TORRES; ZEPEDA-ESQUIVEL, 2001).

A toxicidade de *Gymnodinium catenatum* varia conforme a região geográfica de origem e em função de condições ambientais específicas. Para se conhecer o potencial tóxico desta alga em um determinado local, sem que tenha havido uma floração, é necessário se isolar ao menos uma cepa e cultivá-la em laboratório. Embora a cepa de *G. catenatum* cultivada no presente estudo tenha sido encontrada em uma localidade diferente da investigada, a sua região de origem, o litoral norte de Santa Catarina, fica bastante próxima do complexo estuarino de Paranaguá (cerca de 200 Km). Como ela é uma importante espécie produtora de toxinas paralisantes, esta foi a alternativa encontrada para analisar seu crescimento e toxicidade, depois que falharam as tentativas de se cultivar cepas provenientes do CEP. A adição de uma solução de extrato de solo ao meio de cultivo F/2 (BLACKBURN; HALLEGRAEFF; BOLCH, 1989) foi mais favorável ao crescimento desta alga do que o uso do meio de cultura K, tradicionalmente usado em experimentos com dinoflagelados. O meio K e o extrato de solo são indicados por conterem selênio em sua composição, um micronutriente indispensável ao crescimento de diversas algas (HARRINSON et al., 1988). Como fator benéfico adicional, o extrato de solo é rico em material orgânico dissolvido (MOD), que favorece o crescimento de *G. catenatum* em cultivo e cujas concentrações elevadas têm sido associadas a florações deste dinoflagelado (DOBLIN; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1999).

A mixotrofia em *G. catenatum* ainda não foi totalmente elucidada, mas experimentos têm mostrado que compostos nitrogenados de baixo peso molecular, como a uréia, mantêm o crescimento deste dinoflagelado em taxas similares às taxas estimuladas por nitrato (DOBLIN; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1999). Observações em culturas de *G. catenatum* e no ambiente não mostram nenhuma evidência de bactérias dentro das células dos dinoflagelados. Somente ocorrem bactérias na superfície celular e durante a fase de senescência, o que descarta um papel direto na sua nutrição. Contudo, culturas axênicas de *G. catenatum* crescem muito devagar e são difíceis de se manter, sugerindo a importância indireta de uma associação com bactérias (DOBLIN; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1999). Uma possível razão para explicar o benefício trazido por essa associação seria a degradação do material orgânico dissolvido presente no meio. Alguns componentes do MOD podem ser rapidamente aproveitados por bactérias (AMON; BENNER,

1994) e regenerados em nitrogênio inorgânico (NH_4^+), servindo como um aporte indireto para o fitoplâncton (CARLSSON; GRANÉLI, 1993). Em nossos experimentos, percebeu-se a presença constante de bactérias e a sua proliferação massiva durante a fase de senescência, inclusive alterando a coloração do meio de cultivo. A presença de MOD no extrato de solo também deve ter favorecido o cultivo de nossa cepa.

A cepa isolada e cultivada neste estudo apresentou uma concentração celular máxima de $819,3 \pm 111,4$ cels.mL⁻¹ e uma constante de crescimento exponencial (μ) de $0,23$ dia⁻¹. No experimento conduzido por DOBLIN, BLACKBURN e HALLEGRAEFF (1999), que testou o crescimento de uma cepa de *G. catenatum* em resposta a substâncias orgânicas dissolvidas, a taxa máxima de crescimento exponencial (k) foi bastante similar ($0,25$ dia⁻¹) e a concentração celular atingiu cerca de 300 cels.mL⁻¹ em condições de limitação por selênio e cerca de 1.000 cels.mL⁻¹ na abundância desse elemento (DOBLIN; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1999).

A análise do perfil de toxinas paralisantes na cepa de *Gymnodinium catenatum* investigada revelou uma dominância de toxinas sulfocarbamoil dos tipos C1 e C2. Na amostra retirada durante a fase exponencial de cultivo, onde a concentração total de toxinas foi maior ($9,241 \pm 0,462$ η mol.mL⁻¹), também foram detectadas quantidades pequenas de GTX2 (0,08% do total), GTX3 (0,6%) e GTX6 (5,05%). Em um estudo anterior, PROENÇA, TAMANAHA e SOUZA (2001) encontraram somente as toxinas C1 e C2 como as componentes do perfil de toxinas em uma cepa de *G. catenatum* isolada da mesma região. Uma das características mais marcantes nesta espécie produtora de PSP, na maioria dos casos, é a ausência de toxinas carbamoil, como a saxitoxina (STX) e neo-saxitoxina (neo-STX). Geralmente, a toxicidade se deve à presença das toxinas do grupo C e às goniautoxinas (GTX), principalmente GTX5 e GTX6 (OSHIMA; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1993; FRANCA et al., 1996; BRAVO; FRANCO; REYERO, 1997), o que concorda com o encontrado em nosso estudo. A investigação de cepas provenientes de diferentes regiões evidencia variações na composição de toxinas

paralisantes (Tabela 10), assim como ocorre entre as fases do ciclo de vida em uma mesma cepa (BRAVO; FRANCO; REYERO, 1997).

Tabela 10 – Quadro comparativo entre perfis de toxinas paralisantes de diferentes cepas de *Gymnodinium catenatum*. STX- saxitoxina; dcSTX- decarbamoil saxitoxina; neoSTX- neo-saxitoxina; C- toxinas sulfocarbamoil; GTX- goniautoxina; dcGTX- decarbamoil goniautoxina; GC- hidroxibenzoato toxinas.

	PERCENTUAL DE TOXINAS PARALISANTES (%)						
	STX	dcSTX	neoSTX	C1 a C4	GTX2,3,5,6	dcGTX2,3	GC1 a GC3
Presente estudo				94 a 100	0 - 6		
Anderson, Sullivan e Reguera, 1989	5 a 10			90 a 95			
Oshima et al., 1990				98			
Proença, Tamanaha e Souza, 2001				100			
Gárate-Lizarraga et al, 2004				50		50	
Gárate-Lizarraga et al, 2004		18	64	7	5	6	
Llewellyn, Negri e Quilliam, 2004				62,5		0,5	37

A composição das toxinas paralisantes em uma cepa de um determinado dinoflagelado não varia significativamente em função das condições nutricionais ou fases de crescimento que se encontra (BOYER et al., 1987). Entretanto, as toxinas GTX2, GTX3 e GTX6 foram encontradas em pequenas concentrações somente durante a fase exponencial de crescimento de *G. catenatum*. Embora tenha havido tal diferença, não se pode descartar que tais toxinas também estivessem presentes durante o período restante de crescimento da alga, porém em quantidades não-detectáveis, já que nas fases mais avançadas do cultivo a produção total de toxinas foi reduzida.

Em alguns casos, o perfil de toxinas produzido por *Gymnodinium catenatum* não é o mesmo que o encontrado nos moluscos contaminados. Nas análises de MacKENZIE e BEAUCHAMP (2001), C1 e C2 foram as toxinas dominantes em células de *G. catenatum* coletadas no ambiente, mas não as eram em moluscos filtradores, onde havia a predominância de GTX. Quando as algas tóxicas são ingeridas por moluscos, o perfil de toxinas pode ser alterado por conversões químicas e processos seletivos de acúmulo/eliminação, quase sempre formando componentes com maior toxicidade específica e que são encontrados com menor frequência em *G. catenatum* (TAKANAKI et al., 1998; GÁRATE-LIZÁRRAGA et al., 2004). As maiores diferenças entre perfis de toxinas paralisantes na alga e em

moluscos são percebidas quando as algas ingeridas são ricas em toxinas do tipo *N*-sulfocarbamoil (C), que são mais lábeis do que outras (OSHIMA; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1993). Isso significa dizer que, mesmo havendo a predominância de toxinas menos potentes no perfil da cepa isolada neste estudo, a toxicidade pode ser magnificada nos tecidos de moluscos filtradores e causar intoxicações em humanos, no caso de uma floração.

Neste estudo, a toxicidade máxima calculada por cromatografia líquida foi de $3,918 \pm 0,196 \mu\text{gSTXeq.cel}^{-1}$. Dos 24 congêneres de toxinas paralisantes atualmente descritos, nossas análises foram capazes de detectar somente a metade deles: STX, neoSTX, GTX1-6 e C1-4. Ainda assim, tal número de congêneres somente pôde ser analisado através da conversão de algumas toxinas por hidrólise ácida, procedimento que também pode não ter sido totalmente eficiente. A ausência de padrões para a análise das toxinas decarbamoil, deoxidecarbamoil e as recentemente descobertas toxinas GC pode ter subestimado uma parcela da toxicidade presente na cepa de *G. catenatum*. São toxinas menos potentes do que as saxitoxinas e goniatoxinas, mas que somadas podem contribuir bastante para a toxicidade total (LLEWELLYN; NEGRI; QUILLIAM, 2004).

Neste caso, o exame mais seguro para a mensuração da quantidade total de toxinas presentes nas amostras de cultivo foi o teste de toxicidade aguda em camundongos, que mediu valores de toxicidade mais elevados ($19,440 \pm 3,094 \mu\text{gSTXeq.cel}^{-1}$). Estes valores foram próximos dos cerca de $28 \mu\text{gSTXeq.cel}^{-1}$, estimado em um estudo anterior com uma cepa de *G. catenatum* isolada da mesma área (PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001). Esta diferença entre a toxicidade de *G. catenatum* medida por cromatografia líquida e bioensaio corroborou o estudo de ANDERSON, SULLIVAN e REGUERA (1989). As toxicidades estimadas por estes autores através de cromatografia e bioensaio foram, respectivamente, de 7,5 e $20 \mu\text{gSTXeq.cel}^{-1}$. A exemplo das nossas análises, os autores também ferveram e acidificaram as amostras antes de injetar nos camundongos. Tais processos devem ter favorecido a hidrólise de algumas toxinas em formas mais potentes, o que, em conjunto com a ausência de alguns padrões na análise de cromatografia, justificaria parcialmente os diferentes resultados entre os dois métodos.

Em ambos os métodos de análise, *Gymnodinium catenatum* foi mais tóxico durante a fase exponencial de crescimento. A fase de decaimento do cultivo foi a menos tóxica segundo os testes com camundongos, o que não havia ocorrido na análise de cromatografia, onde a fase estacionária foi a menos tóxica. Isso ocorreu porque os extratos injetados nos camundongos equivaleram a diferentes quantidades de células; 28.340 células por camundongo no extrato da fase estacionária e somente 12.112 células por camundongo na fase de decaimento. Provavelmente, os animais testados com o extrato da fase de decaimento morreriam mais rapidamente, caso tivesse sido injetado um número maior de células. Na fase exponencial de crescimento, onde a toxicidade foi maior, o extrato equivaleu a 24.167 células por camundongo. O bioensaio com camundongos, além de ser um importante método para detecção de toxinas paralisantes em carnes de moluscos contaminados, sendo usado oficialmente por inúmeros países (FERNÁNDEZ; CEMBELLA, 1995), mostrou ser um poderoso instrumento para a detecção de toxinas paralisantes em culturas de *Gymnodinium catenatum*.

As análises realizadas com extratos do molusco *Mytella guyanensis* não revelaram a presença de toxinas paralisantes durante o período investigado no complexo estuarino de Paranaguá. Embora *G. catenatum* tenha se mostrado tóxico em cultivo, a ausência de toxinas paralisantes acumuladas nos moluscos retirados do ambiente foi justificada pelas baixas concentrações celulares de *G. catenatum* na água. Talvez a ausência de estudos anteriores desta natureza seja o motivo pelo qual, até o momento, não tenham sido detectadas toxinas paralisantes no complexo estuarino de Paranaguá, PR. Em 1997, na enseada de Armação do Itapocoroy, SC, uma região próxima, foram detectadas toxinas paralisantes na carne do molusco bivalve *Perna perna* em níveis superiores àqueles considerados como seguros para o consumo humano (PROENÇA et al., 1999b). Desde então, novas detecções vêm sendo feitas, como resultado de quase uma década de investigações intensivas (PROENÇA et al., 2004a).

6.2.3 Microalgas produtoras do DSP

Dinophysis acuminata

O gênero *Dinophysis* é composto por algumas espécies fotossintetizantes e outras não (LUCAS; VESK, 1990). A proporção na qual as espécies são

encontradas no plâncton pode variar em função da disponibilidade de microalgas que sirvam de alimento e das concentrações de nutrientes na água (NISHITANI; SUGIOKA; IMAI, 2002). Algumas observações indicaram que *D. acuminata* é uma espécie mixotrófica, já que foram observados inúmeros vacúolos alimentares dentro das células pigmentadas (NISHITANI; SUGIOKA; IMAI, 2002). Dentre as presas comprovada ou hipoteticamente ingeridas por *D. acuminata* estão os ciliados (JACOBSON; ANDERSEN, 1994), a criptofíceia *Plagioselmis* sp. (ISHIMARU et al., 1988), outras criptofíceas, cianobactérias (SCHNEPF; ELBRÄCHTER, 1988) e células cocóides componentes do picoplâncton, com 1 a 2 μm de diâmetro (NISHITANI; SUGIOKA; IMAI, 2002).

Dinophysis acuminata é uma espécie abundante em diversas regiões do mundo, muitas vezes representando a principal espécie local de *Dinophysis*, tanto em número quanto em casos relatados de toxicidade. Esta espécie de dinoflagelado é bastante importante na costa do Canadá (CEMBELLA, 1989), Portugal (VALE; SAMPAYO, 2003), Espanha (BLANCO et al., 1995; MOROÑO et al., 2003; REGUERA, 2003), França (DELMAS; HERBLAND; MAESTRINI, 1992; MONDEGUER et al., 2002), Finlândia (GISSELSON et al., 2002; SETÄLÄ et al., 2005), Suécia (JOHANSON et al., 1996; SALOMON; JANSON; GRANÉLI, 2003), Dinamarca (ANDERSEN; HALD; EMSHOLM, 1996), Japão (LEE et al., 1989; NISHITANI; SUGIOKA; IMAI, 2002) e Nova Zelândia (CHANG, 1996; MacKENZIE et al., 2005). No Brasil, *D. acuminata* já foi registrada em toda a região sul do país (PROENÇA e MAFRA JUNIOR, 2005).

Na presente investigação, *Dinophysis acuminata* foi detectada nas amostras de plâncton somente durante o período de primavera, entre setembro e dezembro de 2002 e setembro e outubro de 2003. Na estação 5, localizada na área de transição entre a Baía de Paranaguá e a Baía de Antonina, foram registradas as maiores concentrações celulares. Neste local, a concentração de *D. acuminata* cresceu de 2.283 cels.L⁻¹ em outubro de 2002 para 4.566 cels.L⁻¹ em dezembro daquele ano, que correspondeu à concentração máxima observada durante o estudo. Quando esses valores relativamente elevados foram detectados, a temperatura da água (26,3°C) estava em elevação e as medidas de salinidade, 18 em superfície e 22,5 no fundo, deixaram clara a estratificação da coluna d'água e a presença de uma haloclina (Figura 9). Nesta ocasião, *D. acuminata* foi detectada

somente junto ao fundo. As concentrações de nutrientes eram extremamente reduzidas e, na maioria dos casos, diferiram entre a camada superficial e profunda. Em todo o estudo, *D. acuminata* foi encontrada em quatro estações de coleta, em temperaturas variando de 20 a 26°C e salinidades de 22 a 31. No Japão, a alga é encontrada em temperaturas entre 10 e 29°C e salinidades de 22,7 a 34, entretanto as maiores abundâncias são relacionadas a períodos em que as temperaturas (entre 15 e 20°C) são um pouco menores ao período equivalente no CEP (NISHITANI; SUGIOKA; IMAI, 2002). Na região da Galícia, costa espanhola, *Dinophysis acuminata* é mais abundante em temperaturas entre 12,5 e 22°C, estando presente durante todo o ano e sendo responsável por episódios de DSP entre a primavera e o outono (REGUERA, 2003).

No período de maior abundância de *D. acuminata*, em dezembro de 2002, o extrato do molusco *Mytella guyanensis*, coletado na estação 5, apresentou resultado positivo no bioensaio para detecção de toxinas do DSP. Provavelmente, a contaminação tenha sido causada pela presença de até 4.566 cels.L⁻¹ de *D. acuminata* no local. Apesar de parecer um valor de concentração baixo para a maioria das espécies de fitoplâncton que formam florações, densidades de *D. acuminata* como essa já foram suficientes para causar eventos de DSP em alguns países. No Japão, onde *D. acuminata* provoca sérios prejuízos ao cultivo de moluscos bivalves, as concentrações máximas em dois anos e meio foram de 708 cels.L⁻¹ (NISHITANI; SUGIOKA; IMAI, 2002). Foram mensurados picos de até 20.600 cels.L⁻¹ na Nova Zelândia (CHANG, 1996) e 30.000 cels.L⁻¹ na Espanha (REGUERA, 2003). Na região da Escandinávia, *Dinophysis acuminata* é, ao lado de *D. norvegica* Clapadère et Lachmann, uma espécie comum e frequentemente abundante (SETÄLÄ et al., 2005). Essas espécies dominam as florações que ocorrem no final do verão no Golfo da Finlândia (CARPENTER et al., 1995; GISSELSON et al., 2002) e são normalmente encontradas em concentrações entre 100 a 1.000 cels.L⁻¹ no norte do Mar Báltico (SALOMON; JANSON; GRANÉLI, 2003), podendo ocasionalmente atingir até mais de 150.000 cels.L⁻¹ (CARPENTER et al., 1995).

Os fatores que favorecem as florações de *Dinophysis acuminata* não estão muito bem elucidados e dependem das características ambientais locais. Em Portugal, o período em que as concentrações celulares têm sido historicamente mais elevadas é entre a metade final da primavera e a primeira metade do verão e o fator

determinante na sazonalidade tem sido a descarga fluvial, sendo que os períodos mais secos estiveram comumente associados às maiores abundâncias de *D. acuminata* (VALE; SAMPAYO, 2003). Na Nova Zelândia, a estratificação da água parece estar relacionada com a formação de florações de *D. acuminata*. No inverno de 1981, no estreito de Kenepuru, foi detectado um acúmulo desta alga (20.600 cels.L⁻¹) próximo à base da zona fótica da água, a oito metros de profundidade (CHANG, 1996). Diversos outros estudos têm constatado uma relação entre a abundância de *Dinophysis* spp. e a estratificação da coluna d'água (e.g. DELMAS; HERBLAND; MAESTRINI, 1992; REGUERA; BRAVO; FRAGA, 1995), mas não há nenhuma evidência de que as florações destas algas possam ser favorecidas por elevadas concentrações de nutrientes. Também não foi encontrada nenhuma relação entre a concentração de nutrientes e o crescimento de *D. acuminata* em experimentos rápidos de laboratório (JOHANSSON et al., 1996), nem tampouco nas águas costeiras japonesas (NISHITANI; SUGIOKA; IMAI, 2002). Além disso, florações massivas de *Dinophysis* ocorrem ao longo da costa atlântica da França, tanto em condições pobres como ricas em nutrientes. Concluiu-se que o principal fator relacionado aos eventos franceses era a formação de uma termoclina que persistia durante duas semanas (DELMAS; HERBLAND; MAESTRINI, 1992). Outros estudos também mencionam a formação de uma estratificação como um fator favorável às florações de *D. acuminata*. No Mar Báltico, uma densa comunidade dominada por *Dinophysis acuminata* (cerca de 18.000 cels.L⁻¹) foi localizada durante o ano de 2001 logo abaixo de uma haloclina, a 77 m de profundidade (SETÄLÄ et al., 2005). *D. acuminata* é beneficiada em situações de estratificação da coluna d'água principalmente porque pode realizar migração vertical e se deslocar até essa camada geralmente mais rica em nutrientes, organismos e/ou material orgânico do que a água que se encontra imediatamente acima. Por ser mixotrófica, ela pode se beneficiar mesmo quando essa camada se localiza abaixo da zona fótica da água (SETÄLÄ et al., 2005). Em nosso estudo, havia uma estratificação salina na coluna d'água na estação 5, em dezembro de 2002 (Figura 9), mas como a coleta foi realizada somente em três estratos, não se pode precisar a profundidade dessa haloclina nem tampouco afirmar se havia uma concentração de *D. acuminata* junto a ela. O que se constatou nas contagens foi a total ausência da alga na superfície e

base da zona fótica e sua concentração junto ao fundo (Figura 24), onde a salinidade era notadamente mais elevada.

Quanto à toxicidade, a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Dinophysis* produz o ácido ocadáico (AO) e os seus derivados, as dinofisistoxinas 1 e 2 (DTX1 e DTX2; FERNÁNDEZ et al., 2001). Outro derivado, DTX4, já foi detectado em duas espécies bentônicas de dinoflagelados produtores de DSP, *Prorocentrum lima* e *P. maculosum* Faust (HU et al., 1992; QUILLIAM et al., 1996), mas nunca foi encontrado em moluscos nem em *Dinophysis* spp. ou qualquer outra microalga planctônica (MOROÑO et al., 2003). O último tipo de dinofisistoxina, a DTX3, nunca foi registrado em microalgas, tendo sido descoberto somente em glândulas digestivas de bivalves, o que leva a crer que esta toxina é originada de uma transformação do ácido ocadáico e seus análogos dentro dos moluscos (SUZUKI; OTA; YAMASAKI, 1999).

As variações na composição e quantidade de toxinas produzidas por uma microalga podem ser avaliadas depois que ela é isolada de uma amostra e cultivada em laboratório. Entretanto, quando diversos autores tentaram cultivar cepas de *Dinophysis* spp., isoladamente ou em conjunto com outras espécies de fitoplâncton, as células sobreviveram e se dividiram somente por poucas semanas (SETÄLÄ et al., 2005). Geralmente, as células se tornam menos espessas e pigmentadas com o transcorrer do tempo e o conteúdo plasmático sofre redução e deformação (SAMPAYO, 1993; SETÄLÄ et al., 2005). Até o momento, falharam todas as tentativas de se estabelecer um cultivo verdadeiro de *Dinophysis* spp., algo que pudesse ser mantido em laboratório por um período de tempo razoável (SETÄLÄ et al., 2005 e referências listadas). Na presente investigação, o resultado não foi diferente. Algumas células de *D. acuminata* foram isoladas de amostras coletadas no complexo estuarino de Paranaguá (CEP), dispostas em placas de cultivo contendo meio F/2 enriquecido com extrato de solo. As células se dividiram no máximo por três vezes, perderam a pigmentação e morreram aproximadamente um mês depois de isoladas.

Os poucos registros sobre as variações na produção de toxinas por *Dinophysis* spp. ao redor do mundo foram conseguidos através da filtragem de amostras com elevadas abundâncias destas algas. Alguns estudos mediram a concentração de toxinas diarréicas na amostra total de plâncton, enquanto outros

isolaram uma a uma as células de *Dinophysis* das amostras, acumulando uma quantidade significativa e medindo posteriormente a sua toxicidade. As amostras vivas de plâncton coletadas no CEP apresentavam poucas células de *D. acuminata*, o que inviabilizou as alternativas para se medir a quantidade e variedade de toxinas nesta alga. Apesar disso, algumas investigações conduzidas em outros locais fornecem dados sobre a toxicidade dessa alga. Na maioria dos experimentos com *Dinophysis acuminata*, o ácido ocadáico foi a principal toxina envolvida. O nível de AO em diversas cepas investigadas foi variável ao longo do ano e conforme a região geográfica de origem (MackENZIE et al., 2005). As concentrações medidas de ácido ocadáico em algumas cepas foram relativamente baixas, variando desde quantidades-traço em uma amostra japonesa, $1,6 \mu\text{gAO}\cdot\text{cel}^{-1}$ em uma francesa (LEE et al., 1989) até $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ numa cepa brasileira coletada em Itajaí, Santa Catarina (PROENÇA et al., 1999a). Em outros experimentos, os níveis da toxina foram mais elevados. Na Espanha, por exemplo, as concentrações de AO em três amostras distintas foram de 0 a $11,3 \mu\text{gAO}\cdot\text{cel}^{-1}$ (MOROÑO et al., 2003), 7,9 a $21,7 \mu\text{gAO}\cdot\text{cel}^{-1}$ (REGUERA, 2003) e 1 a $27 \mu\text{gAO}\cdot\text{cel}^{-1}$ (BLANCO et al., 1995). Outros estudos mensuraram concentrações ainda maiores: entre 1,1 e $23 \mu\text{gAO}\cdot\text{cel}^{-1}$ em uma amostra sueca (JOHANSON et al., 1996); de 3,9 a $25,5 \mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ na costa francesa (MONDEGUER et al., 2002); $25,5 \pm 6,7 \mu\text{gAO}\cdot\text{cel}^{-1}$ em uma amostra canadense (CEMBELLA, 1989); e de 3 a $50 \mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ na Baía de Seine, França (MARCAILLOU et al., 2001).

Entretanto, *Dinophysis* spp. podem produzir várias toxinas distintas, incluindo formas recentemente descobertas de toxinas diarréicas, como ésteres do AO (SUSUKI et al., 2003b) e toxinas lipofílicas não-diarréicas, como a PTX11 (SUSUKI et al., 2003a). Algumas vezes, outras toxinas podem ser produzidas em uma quantidade bem maior do que o ácido ocadáico e se tornarem as mais importantes em uma cepa. Como exemplo, as pectenotoxinas (PTX) foram dominantes em cepas neozelandesas, em concentrações de 8 a 29 vezes maiores do que a soma das toxinas diarréicas (AO e DTX; MackENZIE et al., 2005).

Talvez a produção de outras toxinas pela população de *D. acuminata* do complexo estuarino de Paranaguá explique o fato de que a amostra de sururu tóxica aos camundongos não tenha revelado a presença de ácido ocadáico nas análises

de cromatografia. Essa mesma combinação de resultados já foi reportada em amostras de moluscos analisadas na costa de Santa Catarina, quando, em algumas oportunidades, foram observadas mortes de camundongos não associadas necessariamente à presença de ácido ocadáico (L.A.O. PROENÇA com. pess.).

Na análise cromatográfica da amostra de dezembro de 2002, embora não tenha se detectado o ácido ocadáico, foi registrado um pico de absorção aos 18,37 minutos de corrida, denominado aqui de “composto X”. O tempo de retenção dessa substância desconhecida foi superior ao do padrão de AO (15,4 minutos) e sua área e altura foram proporcionais a diferentes dosagens do extrato. Esse composto poderia ser de uma das outras toxinas diarréicas que podem ser produzidas por *Dinophysis* spp., DTX1 e DTX2, que têm tempos de retenção superiores ao do AO. Todavia, a ausência de padrões específicos para tais toxinas não permitiu tal conclusão. A toxina DTX3, que é provavelmente originada da transformação do AO e seus congêneres dentro dos tecidos de moluscos (SUZUKI; OTA; YAMASAKI, 1999), representa outra possibilidade. Também não se pode descartar que as responsáveis pela morte dos camundongos não tenham sido toxinas diarréicas, mas outras toxinas lipofílicas que são extraídas pelo mesmo processo, como as pectenotoxinas e as iessotoxinas, ou mesmo outra substância interferente. Como visto, o bioensaio com camundongos para a detecção de toxinas diarréicas não é um método muito seletivo e é preciso que se tenha disponibilidade de um método de análise por cromatografia líquida bastante refinado e capaz de incluir diversos tipos de toxinas, para que se tenha a elucidação completa de casos de DSP.

A hipótese de que *D. acuminata* tenha sido o agente causador da contaminação do molusco sururu foi reforçada pelo fato da alga já estar presente na região durante a coleta de outubro de 2002, numa concentração de 2.283 cels.L⁻¹. Portanto, há uma possibilidade de que os moluscos encontrados naquele local tenham estado em contato um número significativo de células de *D. acuminata* durante uma boa parte da primavera. Conhecendo a toxicidade dessa alga, os moluscos podem ter acumulado, durante esse período, uma quantidade razoável de toxinas, já que após a ingestão e digestão de células de *Dinophysis* por moluscos filtradores, as toxinas são assimiladas em suas formas originais ou modificadas e, somente mais tarde, são eliminadas (MOROÑO et al., 2003). Estimou-se entre 0,07 e 0,095.dia⁻¹ a taxa de detoxificação de ácido ocadáico em *Mytilus galloprovincialis*

Lamarck, 1819 (MOROÑO et al., 2003). Caso os sururus possuam uma taxa de depuração similar a esse outro mitilídeo, precisariam de algo entre nove a quinze dias para eliminar as toxinas diarréicas acumuladas. Entretanto, tais taxas variam bastante de uma espécie de molusco para outra e estudos específicos com *Mitella guyanensis* devem ser conduzidos para atestar tal possibilidade.

6.2.4 Microalgas envolvidas em mortalidades de animais marinhos

No complexo estuarino de Paranaguá (CEP), entre agosto de 2002 e outubro de 2003, foram detectadas algumas algas que, apesar de não produzirem toxinas responsáveis por envenenamentos em seres humanos, são conhecidas por causarem enormes prejuízos ecológicos e econômicos em diversas regiões do mundo. Tais prejuízos são uma consequência da morte de elevadas quantidades de organismos cultivados ou que servem como recurso pesqueiro. As algas encontradas foram as rafidofíceas *Heterosigma akashiwo* e *Chattonella* spp., o dinoflagelado *Prorocentrum minimum* e a primnesiofícea *Phaeocystis* spp.

Heterosigma akashiwo

Heterosigma akashiwo é uma rafidofícea unicelular de coloração marrom a dourada, que apresenta dois flagelos e mede 10-25 μm de comprimento, 8-15 μm de largura e 8-10 μm de espessura. Sua forma celular varia entre esferoidal, ovóide e oblonga, dependendo das condições e fases de crescimento (SMAYDA, 1998). As células nadam num padrão espiralar, completando de um a dois giros por segundo (HARA; CHIHARA, 1987).

Esta rafidofícea é uma espécie meroplanctônica, que apresenta uma fase móvel, planctônica e pode passar duas fases do ciclo de vida junto ao substrato, como células vegetativas não móveis aglutinadas em cápsulas de mucilagem (TOMAS 1978b) e na forma de cistos de resistência (IMAI; ITAKURA; ITOH, 1993). Os cistos são menores do que as células vegetativas e possuem menos cloroplastos. A célula possui numerosos mucocistos em volta dos cloroplastos, responsáveis pela liberação do muco que envolve tanto os cistos como as formas não-móveis e causa sérios danos às brânquias de peixes durante florações (HARA; CHIHARA, 1987).

Concentrações de formalina e lugol acético comumente usadas na fixação de amostras de plâncton causam a ruptura do delgado revestimento celular em *H. akashiwo*, fato que impossibilitou a detecção dessa alga nas amostras quantitativas do presente estudo. Entretanto, a observação das amostras de material vivo permitiu constatar a presença de *H. akashiwo* em duas oportunidades durante o início da primavera, em outubro de 2002 e outubro de 2003. Os locais de ocorrência foram as estações 1, 2 e 5 e, apesar da impossibilidade de quantificação, *H. akashiwo* não foi encontrada em elevadas concentrações celulares em nenhuma das oportunidades. Nos momentos em que *H. akashiwo* esteve presente nas amostras, a temperatura se encontrava em elevação, em torno dos 25°C. A salinidade entre as estações de coleta variava de 22 a 31. Como não se mediu nenhum pico de abundância nem tampouco uma floração dessa alga, a discussão dos fatores que influenciam sua distribuição espacial e temporal no CEP tornou-se limitada.

Um ano após o término das amostragens desse estudo, em novembro de 2004, foi registrada uma floração de *Heterosigma akashiwo* na Baía de Paranaguá, atingindo concentrações celulares de até 500.000 cels.L⁻¹. Nos dias que antecederam a floração, foi percebida uma forte elevação na temperatura atmosférica e houve um intenso período de chuvas, que provocam queda na salinidade e aumento no aporte de nutrientes por lixiviação (L. FERNANDES, com. pess.). Em anos anteriores, já tinham sido registradas duas florações dessa rafidofícea na região e proximidades. Em março de 2001, uma floração de *H. akashiwo* no complexo estuarino de Paranaguá, PR, com concentrações de até 2.600.000 cel.L⁻¹, foi associada à mortalidade de algumas toneladas de peixes. Proibiu-se a pesca e o consumo de moluscos na região, gerando um gasto estimado em cerca de US\$ 180.000,00 (PROENÇA; FERNANDES, 2004). No final de julho de 2002, uma mancha mais densa de *H. akashiwo* (19.000.000 cel.L⁻¹ e 67.01 µg.L⁻¹ de clorofila-a) foi percebida na praia de Balneário Camboriú, litoral centro-norte de Santa Catarina. A mancha cobriu uma pequena extensão e formou uma fina camada próxima à superfície da coluna d'água, que se encontrava fortemente estratificada. No ponto onde se localizava a mancha, a temperatura variou de 22°C na superfície a 18°C no fundo e a salinidade entre 26 na superfície e 32 junto ao fundo. A floração teve uma curta duração devido à entrada de um sistema de frente fria que provocou fortes ventos e ondulações, favorecendo a homogeneização da coluna d'água.

Nenhum efeito nocivo foi relatado durante esse episódio (PROENÇA et al., 2004b), o que poderia ter sido diferente caso a duração do evento fosse maior. Uma floração com a mesma concentração celular, nas águas estuarinas da Carolina do Sul, EUA, teve maiores proporções e foi associada com a morte de pelo menos 10.000 peixes (KEPPLER et al., 2005).

Heterosigma akashiwo é uma espécie eurihalina e euritérmica. Em cultivo, ela pode sobreviver a salinidades bastante distintas, entre 2 e 50. No ambiente, salinidades mais baixas podem favorecer florações de *H. akashiwo* em detrimento a outros flagelados mais estenohalinos. Em cultivo, a alga é capaz de crescer em taxas elevadas sob temperaturas entre 10 e 30°C (ONO; KHAN; ONOUE, 2000) e o seu crescimento ótimo é obtido entre 15 e 25°C (SMAYDA, 1998). Entretanto, populações naturais podem ocorrer e formar florações em temperaturas um pouco inferiores ou superiores a estas. Diversos fatores podem favorecer a ocorrência de florações de *H. akashiwo*. Em algumas regiões, estes fatores podem ser de origem física, como áreas de ressurgências; em outras o estímulo pode ser químico, como em habitats enriquecidos por nutrientes; e, por fim, regiões de cultivo de peixes e moluscos podem exercer um estímulo biológico para as florações de *H. akashiwo*. Inúmeros experimentos comprovaram o papel adicional do enriquecimento em metais essenciais para a manutenção de florações de *Heterosigma akashiwo*, principalmente ferro e, secundariamente, manganês (YAMOCHI, 1983). Além destes, o aquecimento da água é um fator determinante no crescimento e sazonalidade de florações de *H. akashiwo* (SMAYDA, 1998). O surgimento repentino desta alga na primavera, tanto no CEP (presente estudo) como no litoral catarinense (L. L. MAFRA Jr., obs. pess.), pode refletir o aquecimento da água nesta época, mas também ser estimulado pela maior disponibilidade de nutrientes provenientes da lixiviação, processo que começa a se intensificar neste período e é decorrente da maior incidência de chuvas.

A ampla faixa de tolerância a condições ambientais favorece a distribuição cosmopolita de *Heterosigma akashiwo*. Extensas florações têm sido documentadas no Canadá (TAYLOR; HAIGH, 1993), Estados Unidos (SMAYDA, 1998), Japão (HONJO, 1993), China (TSENG, ZHOU; ZOU, 1993), Nova Zelândia (CHANG; PRIDMORE; BOUSTEAD, 1993), Europa, Chile e Bermudas (HONJO, 1993). Apesar das diferenças entre as regiões de ocorrência, as condições que favorecem as

florações de *H. akashiwo* podem ser similares, mesmo em áreas geográficas distintas. Florações de *Heterosigma akashiwo* ocorrem em condições semelhantes no Japão (HONJO, 1993) e no estreito da Geórgia, EUA (CONNELL; JACOBS, 1999; HARD et al., 2000). Em ambas as localidades, as florações ocorrem quando a temperatura da água ultrapassa 15°C e há uma estratificação salina da coluna d'água, resultando em manchas de coloração marrom intensa que podem ter curta duração ou persistir por meses, enquanto a estratificação for presente. Nas baías de Tampa e Flórida, extensas baías localizadas no estado americano da Flórida, foram registradas florações anuais de *H. akashiwo* durante a primavera e verão, comumente excedendo a densidade de 1.000.000 cels.L⁻¹ (TOMAS, 1998). Tais florações foram detectadas em épocas de temperatura elevada (entre 26 e 33°C), elevada pluviosidade e em pontos com salinidades mais baixas do que nas regiões adjacentes (TOMAS, *op. cit.*). Na baía de Narragansett, EUA, todos os anos *H. akashiwo* se torna abundante a partir da primeira metade da primavera, quando começa a crescer exponencialmente por seis semanas e atinge uma concentração de cerca de 1.000.000 cels.L⁻¹ no final da estação. O fator preponderante para o surgimento destas florações foi o aquecimento da água (LI e SMAYDA, 2000).

A existência de condições favoráveis ao crescimento de *Heterosigma akashiwo* no complexo estuarino de Paranaguá, comprovada em duas florações recentes (PROENÇA; FERNANDES, 2004; L. F. FERNANDES, com. pess.), deve ser levada em consideração numa possível instalação de cultivos de peixes marinhos. As mortalidades massivas de peixes decorrentes de florações de *H. akashiwo* causam enormes perdas econômicas aos países que cultivam peixes de alto valor comercial, como o salmão e o olhete. Na Nova Zelândia, em 1989, uma mortalidade de salmões gerou um prejuízo de 17 milhões de dólares neozelandeses (CHANG, ANDERSON e BOUSTEAD, 1990). Na costa oeste do Canadá as florações causam perdas de 3 a 10 milhões de dólares por ano em fazendas de cultivo de salmões. Por fim, somente um evento registrado em uma área de cultivo localizada no noroeste do Pacífico, na década de 80, causou a mortalidade massiva de salmões e resultou em um prejuízo de cerca de 30 milhões de dólares (TWINER; TRICK, 2000). Mesmo sem a instalação de grandes fazendas de cultivo de peixes, as florações representam um risco à pesca artesanal praticada no CEP, já que *H.*

akashiiwo também provoca, em menor escala, a morte de populações naturais de peixes (HERSHBERGER et al., 1997),

Existem diversas hipóteses para explicar o mecanismo nocivo da rafidofícea *Heterosigma akashiwo* sobre peixes, incluindo: (a) produção de neurotoxinas similares à brevetoxina (KHAN; ARAKAWA; ONOUE, 1997; BOURDELAIS et al., 2002), (b) formação de formas reativas do oxigênio, como radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio (YANG; ALBRIGHT; YOUSIF, 1995; ODA et al., 1997; TWINER; TRICK, 2000) e (c) liberação de polissacarídeos similares à lecitina (ODA et al., 1998; SMAYDA, 1998) que podem cobrir as brânquias e impedir a respiração e a osmo-regulação (CHANG; ANDERSON; BOUSTEAD, 1990; CARRASQUERO-VERDE, 1999). Inicialmente, os peixes afetados perdem o equilíbrio e permanecem como se estivessem anestesiados, gradualmente evoluindo para um quadro de convulsões que antecede a morte (YANG; ALBRIGHT; YOUSIF, 1995; CARRASQUERO-VERDE, 1999). As toxinas similares à brevetoxina citadas nas investigações de KHAN, ARAKAWA e ONOUE (1997) e BOURDELAIS et al. (2002) foram detectadas somente em amostras coletadas durante florações de *Heterosigma akashiwo* e, portanto, a produção de toxinas por esta alga permanece duvidosa. Atualmente, acredita-se que a produção de formas reativas do oxigênio seja mesmo a responsável pela toxicidade de *H. akashiwo* (T. HONJO; T. ODA, com. pess.).

Além de não se conhecer exatamente qual é o mecanismo nocivo envolvido nas mortalidades de peixes, a dificuldade em se determinar a toxicidade de florações de *Heterosigma akashiwo* é agravada pelo fato de haver alguns eventos tóxicos e outros não, inclusive numa mesma área geográfica (CONNELL, 2000). Como exemplo, uma vasta floração de *H. akashiwo* ocorrida em julho de 1990 em Puget Sound, Washington, EUA, matou quase todos os salmões cultivados, enquanto que outro evento detectado em julho de 1997 no mesmo local resultou na morte de apenas 4% dos peixes (CONNELL; JACOBS, 1999). Desta forma, o cultivo e os testes de toxicidade em laboratório tornam-se ferramentas fundamentais para se determinar qual o potencial efeito nocivo de uma floração de *Heterosigma akashiwo* em uma região específica.

Heterosigma akashiwo cresce bastante rápido, tanto em situações de floração como em cultivo. Em nossos experimentos, a alga atingiu a concentração máxima de

303.000 ± 14.413 cels.mL⁻¹ após 18 dias de cultivo, exibindo uma constante de crescimento exponencial (μ) de 0,38.dia⁻¹. Apesar ter sido a alga de crescimento mais rápido dentre as isoladas do complexo estuarino de Paranaguá, outros experimentos já demonstraram que essa capacidade em *H. akashiwo* é ainda maior. LANGDON (1993) observou uma taxa máxima de crescimento de 0,88.dia⁻¹, que ainda assim foi considerada baixa em comparação à taxa de 2,0.dia⁻¹ registrada por TOMAS (1978a), de 3,3.dia⁻¹ reportada por HONJO e TABATA (1985) e às excepcionais taxas de crescimento de 2,0 a 5,0.dia⁻¹, obtidas em um experimento de mesocosmo no ambiente natural (HONJO; TABATA, 1985). As condições de cultivo são capazes de alterar não só a taxa de crescimento, mas a toxicidade de *H. akashiwo*.

O crescimento e a toxicidade de *H. akashiwo* são fortemente afetados pela temperatura de cultivo. Em testes realizados por ONO, KHAN e ONOUE (2000), o maior crescimento foi obtido quando a alga cresceu a 20°C e a maior toxicidade a 25°C. A luz também é outro fator regulador, tanto que nesta mesma investigação o crescimento ótimo foi registrado sob intensidades de luz de 50 a 100 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (1,01 e 1,14.dia⁻¹, respectivamente), mas a toxicidade foi maior na primeira do que na segunda condição de iluminação (ONO; KHAN; ONOUE, 2000). Em todas as condições de luz e temperatura testadas, a toxicidade de *H. akashiwo* foi maior durante o início e metade da fase exponencial de crescimento (ONO; KHAN; ONOUE, 2000). Embora a cepa japonesa tenha apresentado maior toxicidade em 25°C, nossa cepa foi cultivada a 20°C para se aclimatar às condições ambientais do Laboratório de Ecotoxicologia da UNIVALI, local onde os testes de toxicidade foram realizados. A cepa isolada em Paranaguá exibiu taxas de crescimento similares quando cultivada em salinidades de 25 a 35 e em diferentes meios de cultivo, F/2 e F/10⁵ (dados não mostrados).

Como a toxicidade de *Heterosigma akashiwo* a peixes já é bem conhecida (*i.e.* CARRASQUERO-VERDE, 1999), a presente investigação testou o efeito nocivo dessa alga em alguns organismos invertebrados, de elevada importância ecológica e

⁵ O meio F/10 é preparado com os mesmos nutrientes usados no meio F/2 (Guillard, 1975), diluídos cinco vezes.

econômica na região. A rafigodícea afetou a sobrevivência de juvenis do misidáceo *Mysidopsis juniae* num teste de 96 horas de duração ($CL_{50} = 1.821 \pm 545$ cels.mL⁻¹) e o desenvolvimento larval do molusco *Perna perna* em 48 horas ($CE_{50} = 3.567 \pm 294$ cels.mL⁻¹). Em outro estudo, uma cepa isolada do litoral de Santa Catarina mostrou uma CE_{50} de 5.230 ± 575 cels.mL⁻¹ em larvas de *P. perna*, concentração inferior à obtida na presente investigação (TAMANAHA, 2001). A nossa cepa e a de TAMANAHA (2001) foram cultivadas sob as mesmas condições de luz, temperatura e salinidade, entretanto alguns procedimentos podem ter conferido a maior toxicidade à cepa deste estudo. Previamente ao nosso teste, a alga foi aclimatada em meio F/10 para atingir mais facilmente condições de limitação de nutrientes (E. GRANÉLI, com. pess.) e as algas somente foram utilizadas no teste quatro dias após terem atingido a fase estacionária de crescimento, momento em que o estresse fisiológico aumenta e favorece a toxicidade em muitas algas (P. SALOMON, com. pess.). No experimento de TAMANAHA (2001), as algas foram cultivadas em meio F/2 e foram testadas durante a fase exponencial de crescimento.

Experimentos preliminares (MAFRA JUNIOR et al., não publ.) mostraram que a toxicidade da cepa de *H. akashiwo* isolada do CEP em larvas de *P. perna* foi ainda maior quando a alga foi cultivada sob condições limitantes de nitrogênio (N:P= 3,2:1; $CE_{50} = 2.495 \pm 208$ cels.mL⁻¹) e fósforo (N:P= 80:1; $CE_{50} = 2.338 \pm 350$ cels.mL⁻¹). O efeito da limitação de macronutrientes no aumento da toxicidade já foi comprovado em diferentes espécies de fitoplâncton, especialmente primnesiofíceas, e foi relacionado ao estresse fisiológico resultante da diminuição das taxas de crescimento (JOHANSSON; GRANÉLI, 1999a; JOHANSSON; GRANÉLI, 1999b). Embora preliminares, esses testes mostraram que a toxicidade varia em função das condições ambientais e pode ser ainda mais elevada no ambiente natural, desde que haja um fator estimulante.

Os resultados dos nossos testes de toxicidade em invertebrados foram bastante preocupantes, já que o misidáceo é um organismo componente do zooplâncton e importante do ponto de vista ecológico, enquanto que o molusco *P. perna* é extraído de costões rochosos nas regiões adjacentes ao CEP e cujo cultivo se encontra em franca expansão no local. O prejuízo econômico e ao ecossistema pode ser grande, caso uma floração de *H. akashiwo* coincida com épocas de reprodução de microcrustáceos e moluscos. Considerando que a primavera é o

período mais propício ao crescimento de *H. akashiwo* na região e que diversos organismos se reproduzem neste período, o risco é ainda maior. Portanto, uma floração com pelo menos 96 horas de duração poderia causar sérios prejuízos à cadeia trófica local, provocando a morte e o desenvolvimento anômalo de pelo menos 50% dos estágios iniciais de vida de invertebrados, visto que a concentração de efeito mediano da cepa testada foi equivalente às concentrações celulares observadas nas florações de Balneário Camboriú em 2002 e da própria Baía de Paranaguá em 2001 (PROENÇA et al., 2004b; PROENÇA; FERNANDES, 2004).

Heterosigma akashiwo pode causar, ainda, a inanição em tintinídeos (TANIGUCHI; TAKEDA, 1988), copépodes (CHOTIYAPUTTA; HIRAYAMA, 1978) e rotíferos (UYE; TAKAMATSU, 1990); desestabilização nos lisossomos de ostras (KEPPLER et al., 2005); inibição na fertilização de ouriços-do-mar (CONNELL; WELLING; CATTOLICO, 1997); a morte de larvas de equinodermos (WILSON, 1981), larvas de ostras (CONNELL; WELLING; CATTOLICO, 1997) e de metanúplios (4 dias de idade) de *Artemia salina* (LUSH; HALLEGRAEFF, 1996). Esta rafidofícea também diminuiu a taxa de filtração do mexilhão azul *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 (WARD; TARGETT, 1989) e se mostrou uma fonte alimentar pobre para bivalves (FERNANDEZ-REIRIZ et al., 1989). Além dos efeitos em invertebrados, TWINER, DIXON e TRICK (2004) demonstraram que a rafidofícea *Heterosigma akashiwo* produz e excreta componentes orgânicos que podem alterar a atividade metabólica em células de mamíferos.

O outro organismo testado na presente investigação foi a pós-larva do camarão *Litopenaeus vannamei*, uma espécie exótica que é cultivada em sistemas semi-fechados em toda a costa brasileira (MAZOTO et al., 2000), incluindo regiões próximas ao CEP. Concentrações celulares de *Heterosigma akashiwo* da ordem de 35.000.000 cels.L⁻¹ não foram suficientes para matar as pós-larvas com 22 dias de idade (PL-22), estágio no qual os camarões saem do laboratório e são depositadas nos tanques de cultivos. Os animais testados apresentam uma tolerância a substâncias tóxicas superior a de outras espécies de camarão (LIN; CHEN, 2001). Além disso, em um experimento prévio (MAFRA JUNIOR et al., não publ.), a resistência de *L. vannamei* a uma substância tóxica conhecida, o sulfato de cobre, foi mais de 40 vezes superior à demonstrada pelo microcústáceo *Artemia salina*. Este resultado indica que uma floração dessa alga em um tanque de cultivo por si só

não seria capaz de matar os camarões, mesmo em estágios tão iniciais de vida como a PL-22. Contudo, não se deve descartar outros efeitos nocivos de uma floração em um tanque semi-fechado, como a elevada geração de matéria orgânica e a conseqüente diminuição na concentração de oxigênio dissolvido. Em nossos experimentos, concentrações de oxigênio dissolvido iguais ou inferiores a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ foram letais às pós-larvas de *L. vannamei* (Tabela 8).

Chattonella spp.

Conforme HARA, DOI e CHIHARA (1994), o gênero *Chattonella* compreende sete espécies, *C. antiqua* (Hada) Ono, *C. globosa*, *C. marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara, *C. minima* Hara et Chihara, *C. ovata* Hara et Chihara, *C. subsalsa* Biecheler e *C. verruculosa* Hara et Chihara. Dentre elas, *C. antiqua* e *C. marina* são conhecidas como as mais nocivas das espécies (IMAI; YAMAGUCHI; WATANABE, 1998). Contudo, *C. globosa*, *C. subsalsa* e *C. verruculosa* também são capazes de causar a morte de peixes (IOC, 2003). *Chattonella* é encontrada e pode formar florações na Índia (SUBRAHMANYAN, 1954), Japão (OKAICHI, 1989), China (TSENG; ZHOU; ZOU, 1993), sul e sudeste do Brasil (ODEBRECHT; ABREU, 1995; TENENBAUM et al., 1998), sul da Austrália e na costa da Holanda (VRIELING et al., 1995). No CEP, foram encontradas as espécies *C. globosa* e *C. cf. marina*. Ambas ocorreram em conjunto na maioria das estações amostrais e devido principalmente à deformação das células nas amostras preservadas, as duas espécies foram contadas como *Chattonella* spp. Além disso, a identificação de rafdofíceas como *Chattonella* pode ser complicada porque a ausência de uma parede celular rígida favorece uma mudança rápida na forma e no tamanho das células em resposta a alterações nas condições ambientais (NAGASAKI et al., 1989).

Chattonella spp. foi encontrada em todas as estações de coleta, em dois períodos distintos: o início da primavera (outubro de 2002 e outubro de 2003) e o final do outono (junho de 2003). Em outubro de 2002, a concentração celular máxima foi medida na estação 1, aproximadamente $9.000 \text{ cels.L}^{-1}$ (Figura 30). Nesta ocasião, a temperatura da água estava em torno de 23°C , a salinidade aproximadamente 31 e as concentrações de nutrientes eram apenas moderadas, com exceção do amônio ($\sim 12 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Em junho de 2003, *Chattonella* spp. voltou a ser detectada nas amostras. Na maioria das estações, as concentrações celulares

medidas foram inferiores a $4.500 \text{ cels.L}^{-1}$, com exceção da estação 4, que registrou a maior densidade, cerca de $36.500 \text{ cels.L}^{-1}$ junto ao fundo (Figura 30). Neste período, a temperatura da água estava em torno dos 22°C e, apesar de se encontrar em declínio, os valores de temperatura foram bastante semelhantes aos medidos em outubro de 2002. A salinidade medida na estação 4 variou entre 22 a 24 e as concentrações de nutrientes foram elevadas, cerca de $4,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrato no estrato superficial e mais de $36 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de amônio no estrato profundo, o que deve ter estimulado o maior crescimento de *Chattonella* spp neste ponto.

Chattonella spp. foi predominantemente mais abundante nos estratos profundos de quase todos os locais de coleta (Figura 30), o que pode refletir um processo de migração vertical na coluna d'água. Segundo HALLEGRAEFF et al. (1998), a habilidade de migração vertical exibida por *Chattonella* pode induzir ao erro em amostragens corriqueiras de fitoplâncton ou em florações dessa alga, caso a coleta não seja feita em toda a coluna d'água, inclusive junto ao fundo. *Chattonella* pode se concentrar nesta camada, por vezes rica em nutrientes, absorve-los e migrar para a superfície para realizar a fotossíntese. Em alguns pontos do CEP, como é o caso da estação 4, a profundidade é tão baixa que a zona fótica se estende até o fundo, facilitando ainda mais a permanência de algas como *Chattonella* spp. nestes locais.

Algumas peculiaridades do ciclo de vida e requerimentos ambientais desta rafidofícea ajudam a explicar a distribuição encontrada no CEP. O ciclo de vida de *C. marina* foi bastante estudado e é composto por uma alternância de gerações, onde a célula vegetativa planctônica representa a fase diplóide e o cisto, a fase bentônica e haplóide (YAMAGUCHI; IMAI, 1994). Quando há uma limitação de nutrientes, inclusive no final de uma floração, as células vegetativas realizam divisões por meiose e geram células de menor tamanho. Essas pequenas células afundam na coluna d'água e formam os cistos em condições de pouca ou nenhuma luz. Os cistos são tipicamente hemisféricos, com 25 a 35 μm de diâmetro e 15 a 25 μm de altura, de coloração amarelada, esverdeada ou marrom, contendo inúmeros pontos de material escuro no seu interior e permanecem aderidos a superfícies sólidas, tais como frústulas de diatomáceas e grãos de areia (IMAI; YAMAGUCHI; WATANABE, 1998). Quando as condições tornam-se novamente favoráveis, principalmente havendo uma temperatura adequada da água, acontece o desencistamento e

pequenas células haplóides são liberadas no meio. Em seguida, um processo ainda desconhecido gera as células vegetativas, diplóides e de maior tamanho. Essas células habitam a coluna d'água e se reproduzem por meio de divisão binária simples (YAMAGUCHI; IMAI, 1994). No Japão, a capacidade de germinação dos cistos é baixa no outono e começo do inverno e aumenta bastante na primavera e início do verão, quando as temperaturas ótimas de 22 a 25°C são atingidas. As temperaturas mais elevadas registradas na metade final do verão (próximas a 30°C) também são desfavoráveis à germinação dos cistos de *Chattonella* (IMAI; YAMAGUCHI; WATANABE, 1998). Apesar do ciclo de vida de *Chattonella* spp. não ter sido estudado no CEP, atribuiu-se a maior ocorrência na primavera principalmente à elevação da temperatura da água acima dos 22°C e à presença de concentrações não limitantes de nutrientes.

A combinação que resulta nas taxas mais elevadas de crescimento de *C. marina* em cultivo é 25°C de temperatura e 20 de salinidade, mas esta alga pode crescer em temperaturas de 13 a 31°C e salinidades entre 10 e 35 (YAMAGUCHI, IMAI; HONJO, 1991). No Japão, em ambiente natural, células vegetativas de *C. marina* já foram encontradas desde 18,8 até 28°C, mas as florações geralmente acontecem durante o verão, em temperaturas superiores a 23°C (IMAI; YAMAGUCHI; WATANABE, 1998). O requerimento de nutrientes foi investigado em *Chattonella antiqua*, uma espécie bastante similar a *C. marina* em termos de respostas a fatores ambientais. Essa alga usa nitrato, amônio e uréia como fonte de nitrogênio e fosfato inorgânico e, ocasionalmente, glicerolfosfato como fontes de fosfato. Como micronutrientes essenciais, *C. antiqua* necessita de Fe^{3+} e vitamina B₁₂ (NAKAMURA; WATANABE, 1983).

Quando células vegetativas de *Chattonella* surgem na água, uma série de fatores ambientais e competidores biológicos, principalmente diatomáceas, afetam o crescimento e a possibilidade de ocorrência de florações. IMAI (1995) desenvolveu uma teoria para explicar o surgimento de florações de *Chattonella* no Japão. Condições de estratificação da coluna d'água e depleção de nutrientes (menos que 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrogênio inorgânico dissolvido – NID) limitam o crescimento de diatomáceas e levam à formação de células de resistência junto ao fundo. Na superfície da coluna estratificada, *Chattonella* tira proveito da capacidade de migração vertical e estocagem de nutrientes durante a noite e continua crescendo.

Temperaturas em torno de 25°C e dias claros aceleram o seu crescimento. Quando eventos de turbulência promovem a mistura da coluna d'água e concentração de NID cresce a 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, *Chattonella* tem vantagem competitiva sobre as pequenas quantidades de diatomáceas presentes (100.000 cels.L⁻¹ ou menos) e, em uma semana, pode atingir concentrações comumente encontradas em florações, tais como 260.000 cels.L⁻¹ (IMAI, 1995; IMAI; YAMAGUCHI; WATANABE, 1998).

O gênero *Chattonella* Biecheler é o maior responsável pelas florações nocivas que ocorrem no Japão e que prejudicam o cultivo de peixes marinhos (NAKANISHI et al., 1996). As mortalidades massivas de peixes, em geral, além de provocarem enormes prejuízos econômicos, também contribuem para a poluição de áreas costeiras à medida que grandes quantidades de matéria orgânica são geradas e, muitas vezes, acumuladas nos ambientes costeiros (KIM et al., 2000). No complexo estuarino de Paranaguá, até o presente, não se tem notícia de uma floração de *Chattonella* com efeitos deletérios associados. Entretanto, outros locais em diferentes países possuem experiências semelhantes à japonesa. Mesmo no Brasil, em 1998, na baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, uma floração de *Chattonella* sp. provocou uma intensa descoloração na água e dermatoses em banhistas, mas não houve registro de mortalidade de peixes durante o evento (TENENBAUM et al., 1998).

O mecanismo tóxico atuante nas mortalidades de peixes durante florações de *Chattonella marina* é bastante complexo e diversas hipóteses já foram investigadas. O primeiro aspecto abordado foi a produção de altos níveis (>10%) de ácidos graxos livres (*free fat acids* - FFAs), que entram na corrente sangüínea dos peixes pelas brânquias e provocam sua mortalidade (OKAICHI, 1989). Estudos posteriores revelaram a produção de espécies reativas do oxigênio e sua atuação nociva nas brânquias (ODA et al., 1992a, 1992b). Atualmente, reconhece-se que *C. marina* é capaz de produzir estes íons em quantidades cem vezes maiores do que qualquer outra alga (MARSHALL; HOVENDEN; HALLEGRAEFF, 2002). Estudos adicionais abordaram o efeito de *C. marina* na anoxia, produção de muco e na fisiologia respiratória, osmorregulatória e cardiovascular dos peixes (ISHIMATSU et al., 1990). Por fim, essa alga foi apontada como produtora de pequenas quantidades de toxinas lipossolúveis similares em estrutura à brevetoxina (KHAN et al., 1995; AHMED; ARAKAWA; ONOUE, 1995). Investigando o papel tóxico de cada um desses

mecanismos na morte de peixes donzelinhas (*Acanthochromis polycanthus* Bleeker, 1855) em laboratório, MARSHALL et al. (2003) concluíram que os altos níveis de radicais superóxidos não justificavam por si só as mortalidades. Entretanto, a toxicidade foi triplicada quando a presença destes radicais ocorria em conjunto com baixos níveis de ácido eicosapentanóico (EPA), um ácido graxo poliinsaturado tóxico que representa de 18 a 23% dos lipídeos presentes em *C. marina* (MARSHALL et al., 2003).

A outra espécie encontrada no CEP, *C. globosa*, também é capaz de provocar a morte de peixes (IOC, 2003), porém a abundância de estudos sobre *C. marina* reflete sua maior distribuição e relação com eventos de mortalidade massiva de peixes em regiões produtoras. A perda dos cultivos com as cepas isoladas de *C. globosa* e *C. cf. marina* no atual estudo, decorrente de problemas na incubadora onde os cultivos eram mantidos, impossibilitou a avaliação da toxicidade das nossas cepas e sua comparação com as provenientes de outros locais.

Prorocentrum minimum

Prorocentrum minimum é um dinoflagelado fotossintetizante que comumente forma florações em áreas temperadas e subtropicais. Grandes florações têm sido observadas na costa leste dos EUA (STOECKER et al., 1997; FAN; GLIBERT; BURKHOLDER, 2003), no norte do Pacífico (QI et al., 1993), no nordeste do Atlântico (YALLOP, 2001), no Mar Mediterrâneo (GRZEBYK; BERLAND, 1996) e na costa da Austrália (CANNON, 1990). Diversas florações foram documentadas em áreas afetadas por descargas de água doce e/ou nutrientes de origem antropogênica (SMAYDA, 1990; BURNS et al., 2000). A eutrofização nas áreas costeiras, alterando a quantidade e a composição dos nutrientes, podem estar contribuindo para o aumento na ocorrência de florações desse dinoflagelado (GLIBERT et al., 2001).

Como constatado em pesquisas de campo e laboratório, *Prorocentrum minimum* exibe uma ampla faixa de tolerância à salinidade e temperatura (GRZEBYK; BERLAND, 1996) e é capaz de sobreviver e crescer em condições de baixa intensidade luminosa e limitação de nutrientes, podendo realizar migração vertical noturna para captar nutrientes (TYLER; SELIGER, 1981). Sob condições limitantes de nutrientes, *P. minimum* pode, ainda, complementar sua demanda de

carbono e nitrogênio por meio de mixotrofia, predando criptofíceas (STOECKER et al., 1997). Investigações sobre as preferências nutricionais de *P. minimum*, conduzidas em laboratório e durante florações naturais, revelaram que esse dinoflagelado absorve preferencialmente o amônio inorgânico, em seguida formas orgânicas de uréia e aminoácidos livres, e uma menor quantidade de nitrato, mesmo que este esteja presente em alta concentração (FAN; GLIBERT; BURKHOLDER, 2003). Ele possui a habilidade de utilizar essas diferentes fontes de nitrogênio, alterando a fonte conforme a temperatura ambiente e seu estado fisiológico e nutricional. Essa particularidade pode conferir uma vantagem competitiva a *P. minimum*, desde que as concentrações de nutrientes sejam razoáveis (FAN; GLIBERT; BURKHOLDER, 2003).

No CEP, *Prorocentrum minimum* esteve presente durante todas as épocas do ano. Na região mais externa, representada pelas estações 1 a 4, a abundância deste dinoflagelado foi maior entre outubro de 2002 e abril de 2003 (Figura 31), com picos de concentração celular de 20.000 a 45.000 cels.L⁻¹ durante os meses de verão. Todavia, em junho de 2003, foram registradas quase 100.000 cels.L⁻¹ no fundo da estação 3. Nesta oportunidade, foram mensuradas concentrações elevadas de nutrientes inorgânicos dissolvidos, tais como 5,5 µmol.L⁻¹ de N-NH₄⁺; 1,7 µmol.L⁻¹ de N-NO₂⁻; 4,35 µmol.L⁻¹ de N-NO₃⁻; e 1 µmol.L⁻¹ de fosfato (Figura 7). Na superfície, onde não foi detectada nenhuma célula desse dinoflagelado, os níveis de amônio foram mais de 50% maiores do que no fundo. Neste caso, a concentração de *P. minimum* junto ao fundo pode ter sido a responsável pelo consumo de amônio registrado neste estrato, já que ele absorve preferencialmente esta forma nitrogenada.

Na região mais interna da Baía de Paranaguá e na Baía de Antonina, representadas pelas estações 5 e 6, foram registrados os dois picos máximos de concentração de *Prorocentrum minimum* durante o estudo, aproximadamente 170.000 cels.L⁻¹. Ambos os picos foram registrados na superfície e sob temperaturas entre 25 e 26°C. Na estação 5, o pico foi detectado em outubro de 2002 e na estação 6 em abril de 2003, quando as salinidades eram, respectivamente, 22 e 16. A preferência dessa alga por salinidades mais baixas, em águas com marcada influência continental, já foi comprovada em investigações em laboratório (GRZEBYK; BERLAND, 1996) e durante florações (FAN; GLIBERT; BURKHOLDER,

2003). Nas duas situações, as concentrações de nutrientes inorgânicos dissolvidos eram baixas durante o pico de concentração celular, porém elevadas num instante anterior, sobretudo as concentrações de nitrato e fosfato (Figuras 9 e 10). A baixa concentração momentânea de nutrientes possivelmente tenha conferido uma vantagem competitiva ao dinoflagelado mixotrófico *P. minimum*. Entretanto, a baixa frequência amostral não permitiu se provar tal hipótese. Situações semelhantes a essa foram comprovadas durante florações de *P. minimum* na baía de Chesapeake, costa leste dos EUA (FAN; GLIBERT; BURKHOLDER, 2003). Antecedendo uma extensa floração em 1998, a temperatura era baixa (15°C) e as concentrações de nutrientes eram elevadas devido à forte descarga fluvial. No final do evento, a temperatura da água chegou a atingir 23,0°C, a salinidade na superfície variou entre 5,5 a 7,0 e as concentrações de nutrientes baixaram consideravelmente no decorrer do evento, potencialmente refletindo a alta demanda de nutrientes dessa densa população de dinoflagelados (FAN; GLIBERT; BURKHOLDER, 2003). Embora sejam mais comuns na primavera, florações de *P. minimum* já foram atipicamente reportadas durante o inverno na baía de Chesapeake, com temperaturas entre 11,2 e 13,2°C e salinidade entre 2,6 e 5,9 (FAN; GLIBERT; BURKHOLDER, 2003).

De acordo com os requerimentos nutricionais apresentados e com os picos de abundância durante o período investigado, a probabilidade de ocorrer uma floração de *Prorocentrum minimum* no complexo estuarino de Paranaguá é maior nos setores mais internos, onde a salinidade é menor e as concentrações de nutrientes mais elevadas. A toxicidade deste dinoflagelado a moluscos (WIKFORS; SMOLOWITZ, 1995) representa um risco aos bancos naturais de sururu localizados nesta área do CEP, principalmente nos arredores de comunidades pesqueiras como a localidade de Europinha. Florações de *Prorocentrum minimum* nas águas costeiras da América do Norte contribuem para a mortalidade de vieiras e baixas taxas de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de ostras, como notado no ambiente natural e comprovado em laboratório por WIKFORS e SMOLOWITZ (1995). Esse dinoflagelado também é rico em dimetilsulfonilpropionato (DMSP), que pode funcionar como um impedimento para a predação e prolongar a duração das florações (WOLFE, 2000). Além disso, extratos metanólicos dessa alga são tóxicos a camundongos através de injeção intraperitonal (IOC, 2003).

A relação entre algas nocivas e moluscos filtradores tem sido extensivamente estudada no que diz respeito ao acúmulo de toxinas e sua transferência a consumidores humanos. Entretanto, a exposição direta dos moluscos a toxinas de fitoplâncton também representa um risco para a integridade desses animais. Alguns relatos de mortalidades de bivalves associados com florações de algas nocivas (SUMMERSON; PETERSON, 1990; TESTER et al., 1991) e experimentos de laboratório (WIKFORS; SMOLOWITZ, 1995) que comprovam essa relação letal sugerem que os efeitos adversos das algas nocivas sobre moluscos filtradores poderiam ser mais comuns do que se conhece. Por outro lado, a exposição histórica de moluscos filtradores a toxinas de microalgas leva a crer que esses animais tenham desenvolvido mecanismos evolutivos para tolerar tais substâncias e garantir sua sobrevivência. O primeiro comportamento de defesa exibido por esses animais em contato com algas nocivas é o fechamento das conchas. Contudo, para manter funções vitais como respiração e alimentação, os bivalves não podem permanecer desta forma por um longo período. O próximo procedimento de defesa desenvolvido por eles foi o sistema imunológico (CHENG, 1996). Investigações recentes mostram que *P. minimum* pode afetar significativamente o sistema imunológico de moluscos filtradores (HÉGARET; WIKFORS, 2005a, 2005b). Uma exposição de sete dias a uma concentração de 10^8 cels.L⁻¹ de *P. minimum* provocou alteração na composição e morte de células especializadas do sistema imunológico da ostra *Crassostrea virginica* Gmelin e da vieira *Argopecten irradians irradians* Lamarck (HÉGARET; WIKFORS, 2005a). Em um estudo paralelo, os mesmos autores comprovaram esse efeito sobre *C. virginica* no ambiente natural, durante uma floração de *P. minimum* no verão de 2003, na região nordeste dos EUA (HÉGARET; WIKFORS, 2005b). O comportamento imunológico das ostras pode representar uma proteção contra os danos aos tecidos que a ingestão de *P. minimum* causa e servir como uma adaptação às florações anuais da alga na região, já que ostras que nunca tinham entrado em contato com uma floração similar não apresentaram o mesmo comportamento (HÉGARET; WIKFORS, 2005b). Isso chama a atenção para o potencial perigo envolvido em florações de *P. minimum* em locais onde tal evento não é comum, principalmente em áreas produtoras e extratoras de molusco, como o complexo estuarino de Paranaguá. Alterações na quantidade e qualidade dos

nutrientes que entram no sistema podem contribuir para intensificar os fenômenos em questão.

Phaeocystis spp.

A microalga euritêmica e eurihalina *Phaeocystis* Lagerheim constitui um dos gêneros mais representativos de primnesiofíceas, com capacidade de formar florações monoespecíficas em diversos ambientes (LANCELOT et al., 1998). Seu ciclo de vida, bastante incomum, abrange uma fase colonial e diferentes tipos de células solitárias: células flageladas (4 a 5 μm de diâmetro); células não-móveis (6 a 8 μm de diâmetro); e microzoósporos (ROUSSEAU et al., 1994). As colônias são compostas por centenas a milhares de células embebidas em uma matriz mucilaginosa de forma irregular a esférica, geralmente com 20 μm a 1 mm, podendo atingir, ocasionalmente, até vários milímetros de diâmetro (LANCELOT et al., 1998). Uma única colônia de *Phaeocystis globosa* pode conter até 10.000 células em seu interior (ROUSSEAU; MATHOT; LANCELOT, 1990).

Após uma série de confusões taxonômicas, estudos moleculares indicaram que há pelo menos três espécies de *Phaeocystis* formadoras de colônias – *P. antartica* Karsten, *P. globosa* e *P. pouchetii* (MEDLIN et al., 1994), que são diferenciadas pela morfologia da colônia e distribuição geográfica. As duas primeiras possuem células dispostas de maneira uniforme formando colônias esféricas, sendo que *P. antartica* é restrita a águas da Antártida e *P. globosa* habita a maioria das águas temperadas, com temperatura ótima de crescimento em 15°C. Em *P. pouchetii*, as células são agrupadas em blocos, geralmente de quatro células, dispostos em lóbulos da colônia. Sua distribuição é intermediária, estando presente em águas boreais, frias e temperadas (BAUMAN et al., 1994). Apesar da predominância em águas frias e temperadas, alguns poucos estudos relatam a ocorrência de *Phaeocystis* em águas quentes do Golfo Pérsico e Mar da Arábia (AL-HASAN; ALI; RADWAN, 1990; MADHUPRATAP; SAWANT; GAUNS, 2000).

No complexo estuarino de Paranaguá, foram encontradas *Phaeocystis globosa* e *P. pouchetii*, cujas células flageladas solitárias são de difícil identificação e, por essa razão, foram contadas somente as células na forma colonial. Devido a deformações nas amostras preservadas, as duas espécies foram consideradas em conjunto e representadas como *Phaeocystis* spp. Uma das espécies, *P. globosa*, foi

cultivada, porém a dificuldade em se manter a alga na forma colonial fez com que o cultivo fosse abandonado antes de se realizarem os testes de toxicidade. No ambiente natural, essa primnesiofícea foi mais abundante nas estações de coleta 2 e 5, durante o inverno e início da primavera (Figura 32). Possivelmente, a alga não tenha sido detectada nas outras épocas do ano sob a forma colonial porque as altas temperaturas não favorecem a formação de colônias pelas cepas locais. Nas amostras em que *Phaeocystis* spp. foi encontrada, a temperatura variou entre 20 e 25°C e a salinidade entre 9 e 33. Foram registrados picos máximos de 980.000 cels.L⁻¹ em setembro de 2002, na estação 5 e de mais de 1.100.000 cels.L⁻¹ em outubro do mesmo ano, na estação de coleta 2. Não foi encontrada uma relação clara entre os picos de concentração de *Phaeocystis* e os níveis de nutrientes inorgânicos dissolvidos, já que durante o pico de setembro as concentrações de nutrientes eram relativamente altas e no pico de outubro elas eram bastante baixas.

A concentração de *Phaeocystis* na estação de coleta 5 pode estar refletindo somente um acúmulo físico das colônias. O local de coleta foi posicionado na transição entre a Baía de Antonina e a Baía de Paranaguá, uma área influenciada pela pluma de maré, caracterizada pela elevada turbidez devido à retenção de materiais sólidos em suspensão (E. C. MACHADO, com. pess.). CADÉE (1996) mostrou que pode haver um acúmulo de dez a dezenove vezes na concentração de colônias de *Phaeocystis globosa* em pontos específicos da coluna d'água devido à variação da pluma de maré. Contudo, a alga pode realmente ter se desenvolvido diferencialmente na estação 5, já que algumas características locais são favoráveis ao seu crescimento e formação de colônias. A abundância de partículas sólidas na água, refletida na elevada turbidez nesta região, favorece a formação de colônias porque essas partículas servem como substrato inicial. *Phaeocystis* sempre cresce em regiões costeiras com essa propriedade (RIEGMAN; Van BOEKEL, 1996). As formas coloniais de *Phaeocystis*, que constituem a fase do ciclo de vida que forma florações, são favorecidas na presença de altas concentrações de nitrato (RIEGMAN; NOORDELOOS; CADÉE, 1992) e níveis não limitantes de fosfato (RIEGMAN; Van BOEKEL, 1996). No CEP, tais condições nutricionais são encontradas nas regiões mais internas, como na estação 5. Na estação 6, que apresentou concentrações ainda mais elevadas de nutrientes, a baixa salinidade e a pouca penetração de luz na coluna d'água devem ter evitado a formação de colônias

de *Phaeocystis*. Em irradiâncias luminosas menores que $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ num ciclo de 12:12 horas (claro: escuro), as células permanecem na forma solitária e flagelada (PEPERZAK, 2003). Entretanto, a intensidade luminosa que ativa a formação de colônias em *P. globosa* difere de uma cepa para outra.

Tem-se sugerido a necessidade de um substrato sólido para que as células solitárias de *Phaeocystis* iniciem a formação de colônias (LANCELOT; BILLEN; BARTH, 1991). Em amostras naturais, as colônias menores, com 20 a 50 μm de diâmetro, sempre são encontradas aderidas a setas de *Chaetoceros* spp. (PASSOW; WASSMANN, 1994). Nas águas turvas, onde *Phaeocystis* normalmente cresce, a presença de um substrato sólido não constitui um problema. O estímulo inicial para a formação de colônias parece estar mais relacionado com condições ambientais específicas, como a presença de íons de cálcio, que estabilizam a estrutura da colônia (Van BOEKEL, 1992), macro-nutrientes, luz e temperatura da água (RIEGMAN; Van BOEKEL, 1996).

Florações de formas coloniais de *Phaeocystis* têm sido observadas em todas as latitudes, principalmente em ambientes turbulentos e enriquecidos em nutrientes (LANCELOT et al., 1998). Esses eventos, aproximadamente monoespecíficos, são relatados em ambientes temperados ricos em nitrato e áreas polares. Nestes locais, como as águas costeiras da Noruega e o Mar do Norte, grandes florações de *Phaeocystis* ocorrem regularmente durante a primavera, quando as algas se aproveitam do estoque de nutrientes acumulado durante o inverno. Em contrapartida, as florações que acontecem mais no final da primavera e início do verão dependem do aporte de nutrientes trazido pela descarga fluvial (LANCELOT et al., 1998). Mas as florações não ocorrem somente em águas frias. No verão de 1996, foi detectada uma floração bastante extensa de *P. globosa* nas águas quentes do Mar da Arábia, onde a alga foi recentemente introduzida, possivelmente trazida por água de lastro de navios (MADHUPRATAP; SAWANT; GAUNS, 2000). O fenômeno, incomum na região, foi favorecido por ressurgências de água profunda e rica em nutrientes (MADHUPRATAP; SAWANT; GAUNS, 2000).

O término de uma floração de colônias de *Phaeocystis* é regulado por uma série de processos, tais como sedimentação ou afundamento, autólise das células induzida por depleção de nutrientes e pastagem. Portanto, contribuem para a

manutenção de uma floração: condições não-limitantes de nutrientes, ambientes com constante turbulência e a presença de microzooplâncton, que não conseguem pastar sobre as colônias e se alimentam de flagelados, diminuindo a competição por luz e nutrientes exercida por este último grupo (RIEGMAN; Van BOEKEL, 1996). No final da floração, ocorre uma desintegração das colônias, liberando células que se tornam novamente móveis e deixando massas vazias de mucopolissacarídeo, que sedimentam em grandes quantidades (CADÉE, 1996).

Depois de observarem as florações de *Phaeocystis* ao longo de trinta anos de monitoramento na costa holandesa, CADÉE e HEGEMAN (2002) não vêem razão para se classificar essas primnesiofíceas como algas nocivas. Durante sua investigação de longa duração, os autores não constataram nenhum efeito nocivo das florações de *Phaeocystis* sobre o ecossistema. Mesmo havendo o acúmulo de elevadas biomassas, nunca ficou constatada a geração de condições anóxicas em regiões rasas, em decorrência de tais eventos (CADÉE; HEGEMAN, 2002). Entretanto, diversos autores incluem *Phaeocystis* na lista de algas nocivas (e.g. GRANÉLI et al., 1999) porque esta alga pode gerar alguns incômodos a turistas e produzir substâncias tóxicas a invertebrados e larvas de peixes, conforme relatado em experimentos de laboratório (e.g. HANSEN; ERNSTSEN; EILERTSEN, 2004). Apesar disso, a inibição do desenvolvimento larval e a mortalidade de estágios iniciais de vida são processos difíceis de serem percebidos e mensurados em programas de monitoramento, o que pode ter levado CADÉE e HEGEMAN (2002) a assumirem tal posição. Considerando que os danos à vida marinha podem ser, em longo prazo, bem mais graves do que danos à saúde pública e que a região do complexo estuarino de Paranaguá é economicamente dependente das atividades de pesca, aqüicultura e turismo, *Phaeocystis* foi considerada uma alga potencialmente nociva no presente trabalho.

Colônias de *Phaeocystis* presentes em densidades elevadas podem causar uma série de incômodos. A matriz gelatinosa das colônias, composta de mucopolissacarídeos, é extremamente viscosa e possui um forte odor. Isso pode gerar um aspecto repulsivo ao turismo, obstruir redes de pesca e causar danos aos sistemas respiratórios de peixes e bivalves (LANCELOT et al., 1998). Ainda, depois da morte da alga, as colônias podem afundar sob a forma de uma chuva orgânica e aumentar a decomposição bacteriana junto ao sedimento, atividade que pode

consumir grandes quantidades de oxigênio dissolvido (LANCELOT et al., 1998), principalmente em locais com circulação de água restrita.

Em 1992, florações da primnesiofícea *Phaeocystis* sp. foram apontadas como responsáveis pela mortalidade de salmões cultivados na Noruega, sem que no entanto os compostos tóxicos ou mecanismos atuantes tenham sido identificados (MOESTRUP; THOMSEN, 1995). No final do outono e início do inverno de 1997, na China, uma intensa floração de *Phaeocystis globosa* permaneceu durante dois meses, causando a mortalidade de cerca de 60 mil toneladas de peixes cultivados e um prejuízo econômico de aproximadamente 8 milhões de dólares (DOUDING; HUANG, 1998). Durante florações desta alga, foi constatada a produção de dimetilsulfeto, que é transferido para a atmosfera sob a forma de gás e contribui para a acidificação da água da chuva (DAVIDSON; MARCHANT, 1992 *apud* MOESTRUP; THOMSEN, 1995).

Phaeocystis pouchetii podem provocar inanição em copépodes que evitam pastar colônias saudáveis desta alga (ESTEP et al., 1990), reduzir o crescimento em salmões cultivados (EILERTSEN; RAA, 1995) e bloquear o desenvolvimento larval em ouriços-do-mar (HANSEN et al., 2003). Além disso, experimentos *in vitro* com essa primnesiofícea indicaram uma toxicidade aguda sobre larvas do bacalhau *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 (AANESEN; EILERTSEN; STABELL, 1998). Mais tarde, o suposto princípio tóxico foi extraído de cultivos e amostras filtradas durante florações de *Phaeocystis*. A toxicidade desta fração foi comprovada em bioensaios padronizados com moscas (STABELL; AANESEN; EILERTSEN, 1999).

HANSEN, ERNSTSEN e EILERTSEN (2004) constataram a produção e liberação de aldeídos poliinsaturados (PUAs) pela primnesiofícea *P. pouchetii*. Tais substâncias, que demonstraram causar inibição na clivagem de embriões de ouriços-do-mar, reduzir a taxa de eclosão de ovos de copépodes e diminuir o crescimento de células compostas por carbonato de cálcio, somente tinham sido reconhecidas em diatomáceas, até então (MIRALTO et al., 1999). Os PUAs podem interferir na proliferação de células procarióticas e eucarióticas (MIRALTO et al., 1999) e seu significado ecológico talvez seja o de conferir vantagem competitiva frente a outras algas, atuando como um aleloquímico (LEGRAND et al., 2003).

Portanto, florações de ambas as espécies de *Phaeocystis* que ocorrem no complexo estuarino de Paranaguá podem causar uma série de danos à vida marinha. O aumento no aporte de nitrato e fosfato, através da eutrofização, representa um risco potencial para o surgimento de florações dessas primnesiofíceas. O inverno e o início da primavera se mostraram os períodos mais favoráveis ao crescimento das formas coloniais de *Phaeocystis* no local estudado.

6.2.5 Outras microalgas nocivas

Coscinodiscus wailesii

Coscinodiscus wailesii é uma diatomácea eurihalina e euritérmica, que cresce em salinidades de 8 a 36 e temperaturas entre 1 e 28,5°C (RINCÉ; PAULMIER, 1986; RICK; DÜRSELEN, 1995; FERNANDES; ZEHNDER-ALVES; BASSFELD, 2001). Apesar do grande volume celular (diâmetro valvar entre 200 e 350 μm), essa espécie apresenta alta taxa de crescimento ($> 1 \text{ div. dia}^{-1}$) e constante de saturação média e taxas de absorção de nutrientes elevadas (SMAYDA, 1997a; ZEHNDER-ALVES, 2000).

No Brasil, a alga foi detectada pela primeira vez na Baía de Paranaguá, Paraná, em 1987 (VALENTE-MOREIRA, 1987), onde permanece presente até então. Posteriormente, houve um relato na Baía de Tijucas, no litoral de Santa Catarina (SOUZA-MOSIMANN et al., 1993), estado onde a alga foi registrada posteriormente em outras localidades (PROENÇA, não publ.). Atualmente, a área de abrangência de *C. wailesii* inclui também o Estado de São Paulo (L.F. FERNANDES, com. pess.) e do Rio de Janeiro (M.C. VILLAC, com. pess.). Embora seja uma alga bastante característica e haja diversos estudos anteriores sobre a diversidade taxonômica das diatomáceas do complexo estuarino de Paranaguá (MOREIRA-FILHO; KUTNER, 1962; MOREIRA-FILHO; VALENTE-MOREIRA; CECY, 1975; VALENTE-MOREIRA E MOREIRA-FILHO, 1981; MOREIRA-FILHO E VALENTE-MOREIRA, 1984), *C. wailesii* foi detectado nesse ambiente somente há duas décadas atrás. A distribuição mundial desta alga era originalmente restrita ao sudoeste do Pacífico, mas ela invadiu a Europa, Japão e EUA a partir de 1977, transportada por água de lastro de navios. A produção de células bênticas de

resistência, com capacidade de permanecerem viáveis no escuro por até três meses, torna essa diatomácea apta a sobreviver a viagens transoceânicas em tanques de lastro. Pelas razões supracitadas, FERNANDES, ZEHNDER-ALVES e BASSFELD (2001) consideraram a espécie como exótica invasora, tendo sido introduzida no CEP através do transporte em águas de lastro de navios que operam no Porto de Paranaguá.

Em nossas coletas, *C. wailesii* esteve presente em baixas concentrações durante boa parte do período de amostragem (Figura 33). A temperatura em que foi encontrada a diatomácea variou entre 20 e 29°C e a salinidade entre 18,5 e 34. A alga foi mais abundante entre fevereiro e abril de 2003, os meses mais quentes do ano, apresentando uma concentração celular máxima de cerca de 14.000 cels.L⁻¹ em março de 2003. *C. wailesii* foi mais abundante e freqüente no setor intermediário do complexo estuarino de Paranaguá, representado pelas estações 3 e 5. Estes locais foram caracterizados por manterem níveis relativamente elevados de nutrientes durante toda a investigação, quando comparados às estações 1, 2 e 4, pontos com condições um tanto similares de temperatura e salinidade. A variação espacial na abundância de *C. wailesii* no CEP pode ter sido influenciada pela disponibilidade de nutrientes inorgânicos dissolvidos, visto que a alga possui uma elevada demanda de nutrientes para o seu crescimento (SMAYDA, 1997a). Nas estações 3 e 5, a elevada turbulência da água gerada principalmente pelas correntes de maré também pode favorecer o crescimento de *C. wailesii*, que possui uma taxa de sedimentação elevada.

Florações de *C. wailesii* causam prejuízos a cultivos de macroalgas e à pesca comercial especialmente pela rápida retirada de nutrientes da água e pela produção de elevadas quantidades de mucilagem (BOALCH; HARBOUR, 1977; NAGAI; IMAI, 1994; NEHRING, 1998). Além disso, a cadeia trófica local pode ser prejudicada e espécies-chave de fito e zooplâncton serem substituídas por outras. Espécies costeiras comuns de zooplâncton, como os copépodes *Temora longicornis* Muller, 1792 e *Calanus helgolandicus* Claus, 1863, apresentam uma herbivoria ineficiente sobre *C. wailesii* e parecem evitar essa alga como alimento (ROY; HARRIS; PULET, 1989). Na região de Seto Inland Sea, Japão, um local de características físico-químicas comparáveis aos ambientes costeiros da região sul do Brasil, florações da

diatomácea “gigante” *C. wailesii* têm sido associadas a eventos de deficiência de oxigênio dissolvido no fundo (MANABE e ISHIO, 1991).

Em 1991, *C. wailesii* foi detectado durante vários meses em concentrações relativamente elevadas ($10.000 \text{ cels.L}^{-1}$) numa extensa área do complexo estuarino de Paranaguá e plataforma rasa adjacente (FERNANDES, 1992). No final desse período, uma quantidade excessiva de matéria orgânica foi sedimentada e foram registrados déficits de oxigênio dissolvido, especialmente nas camadas mais profundas da coluna d’água. Essa hipoxia possivelmente foi gerada pela decomposição bacteriana das algas e pela formação de uma película de muco no sedimento, derivada da secreção de mucopolissacarídeos. Concomitantemente, observou-se que diversas espécies de fito e zooplâncton foram excluídas temporariamente da região, gerando inclusive a redução da biomassa de estágios larvais de peixes de importância comercial (L. F. FERNANDES, R. M. LOPES e H. L. SPACH, com. pess. em PROENÇA; FERNANDES, 2004). Nas coletas realizadas durante a presente investigação, foram medidas concentrações celulares similares às registradas em 1991, entretanto somente em um ponto isolado. Em 2003, durante o presente estudo, não foram relatados quaisquer efeitos deletérios, como hipoxia e mortalidade de animais associados aos picos de abundância de *C. wailesii*.

Trichodesmium erythraeum

A cianobactéria marinha *Trichodesmium* spp. é amplamente distribuída ao longo dos ambientes marinhos oligotróficos tropicais e oceanos sub-tropicais, em regiões ou épocas com temperatura da água elevada (CAPONE et al., 1998). Nestes ambientes, são reconhecidas duas espécies pelágicas de *Trichodesmium*: *T. thiebauti* Gomont ex Gomont e *T. erythraeum* Ehrenberg (HALLEGRAEFF; JEFFREY, 1984). Estas algas, que crescem sob a forma de tricomas, são encontradas geralmente agrupadas em colônias macroscópicas e possuem a capacidade de formar grandes agregações superficiais e de fixar nitrogênio atmosférico (SUBRAMANIAM, 2002). Esta última característica é importante porque uma produção primária que se baseie na fixação de nitrogênio atmosférico pode resultar numa exportação líquida de carbono da superfície para as águas profundas, conferindo a *Trichodesmium* spp. um importante papel no ciclo global do carbono

(HOOD; MICHAELS; CAPONE, 2000). A fixação de nitrogênio é, também, a adaptação ideal para que a alga cresça em ambientes oligotróficos.

Através de imagens de satélite e observações locais, extensas florações de *Trichodesmium* spp. têm sido registradas no oeste da Austrália, Tailândia, Nova Caledônia, Vanuatu, Ilhas Fiji, Tonga, Golfo do México, costa tropical do Atlântico na América do Sul, costa da Índia, Mar da Arábia e Mar da China (NEGRI et al., 2004 e referências listadas). As florações são mais conspícuas em condições de calmaria, quando os tricomas formam densos tapetes na superfície dos oceanos (NEGRI et al., 2004). Muitas vezes, as florações de *Trichodesmium* spp. em mar aberto se assemelham a partículas de poeira ou serragem flutuando junto à superfície, alinhadas em faixas, paralelas à direção do vento incidente. Na costa oeste dos EUA, entre os estados da Carolina do Sul e Flórida, manchas superficiais densas de *Trichodesmium* são detectadas anualmente, com maior incidência durante o verão, quando já foram medidas concentrações de até 36.000 tricomas.L⁻¹ (DUNSTAN; HOSFORD, 1977).

Na costa brasileira, é comum encontrar florações de *Trichodesmium* em regiões mais afastadas da costa, principalmente durante a primavera e verão. BRANDINI (1988) encontrou uma maior abundância desta alga na plataforma continental paranaense quando as temperaturas estavam em torno de 25°C e a salinidade ao redor de 35. Embora seja menos comum em regiões costeiras, *T. erythraeum* foi detectado dentro do CEP em nossas amostragens. A cianobactéria apareceu em baixas concentrações (até 4.500 cels.L⁻¹) em outubro de 2002. Como foi encontrada predominantemente na estação 1, área mais externa da Baía de Paranaguá, deve ter sido trazida por correntes de maré desde a plataforma adjacente até o interior do sistema. Diversos estudos relatam a ocorrência de *Trichodesmium* na plataforma continental do Estado do Paraná, chegando por vezes a ser um componente abundante nas águas oceânicas pobres em nutrientes (BRANDINI; MORAES, 1986; BRANDINI, 1988; BRANDINI; MORAES; THAMM, 1988). Não se pode, contudo, descartar a possibilidade de formação de uma floração de *Trichodesmium* na região costeira e porções externas do CEP, regiões marcadamente afetadas pelo regime hidrográfico da plataforma continental.

Trichodesmium pode ser nocivo a animais marinhos sob vários aspectos. O término das florações pode gerar condições anóxicas, níveis elevados de amônia e

conseqüentes mortalidades, como observado com ostras na Índia (CHELLHAM; ALAGARSWAMI, 1978) e peixes e camarões na Tailândia (SUVAPEPUN, 1989). Estas algas também têm sido descritas como tóxicas a uma série de outros organismos (HAWSER et al., 1991, 1992; GUO; TESTER, 1994). Uma terceira possibilidade de mecanismo nocivo é a inanição causada a alguns organismos herbívoros, já que tais cianobactérias podem não ser adequadas nutricionalmente e, durante as florações, podem se constituir na principal ou única fonte de alimento disponível. Esse último efeito já foi demonstrado em larvas de camarões pitu e juvenis de ostras (PRESTON; BURFORD; STENZEL, 1998; NEGRI et al., 2004).

Na região nordeste do Brasil, no litoral do estado de Pernambuco, desde a década de 60 se conhece o fenômeno denominado de “Febre de Tamandaré” ou “Tínguí”, uma intoxicação associada a florações da cianobactéria *Trichodesmium erythraeum* (SATO; PARANAGUÁ; ESKINAZI, 1964). Os relatos de intoxicações e os sintomas descritos sugerem a ação de neurotoxinas. Este episódio ocorre geralmente durante os meses de verão e tem se repetido esporadicamente até os dias atuais, inclusive na costa da região norte do país (CARVALHO; ESKINAZI-LEÇA; NOGUEIRA-PARANHOS 1999).

7 BASES PARA O MONITORAMENTO DE MICROALGAS NOCIVAS E FICOTOXINAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ

Apesar do período amostral ter compreendido somente quinze meses, com uma periodicidade de coletas quase bimestral, os dados gerados durante este estudo puderam fornecer um panorama inicial sobre a presença de algas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá (CEP), e suas tendências de variação espacial e temporal.

Os períodos de primavera e o final do verão / início do outono foram as duas épocas com maior diversidade e abundância das algas potencialmente nocivas, durante a presente investigação (Tabela 11). A rafidofícea *Heterosigma akashiwo*, que promove a mortalidade de peixes e que neste estudo mostrou ser tóxica ao microcrustáceo *Mysidopsis juniae* e a larvas do molusco *Perna perna*, somente foi detectada durante primavera, por dois anos consecutivos. Outra rafidofícea, *Chattonella* spp., e a primnesiofícea *Phaeocystis* spp. também foram encontradas predominantemente durante a primavera. O dinoflagelado produtor de toxinas diarréicas, *Dinophysis acuminata*, esteve presente nas amostras exclusivamente na primavera, por dois anos consecutivos. No primeiro ano, na primavera de 2002, um teste para detecção de toxinas diarréicas acumuladas no tecido do molusco *Mytella guyanensis* teve resultado positivo e foi associado a presença de *D. acuminata* na água. Foi ainda durante a primavera que a cianofícea *Trichodesmium erythraeum* se fez presente dentro do estuário. Já o dinoflagelado tóxico *Prorocentrum minimum* teve dois picos de abundância, coincidentes com a primavera e o início do outono. Este último período foi quando o dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, que teve a produção de toxinas paralisantes comprovada em laboratório, também foi registrado. As espécies da diatomácea produtora de toxinas amnésica *Pseudo-nitzschia* foram mais abundantes no final do verão e início do outono. A diatomácea cêntrica *Coscinodiscus wailesii*, que já formou uma floração associada a danos ecológicos no CEP (PROENÇA; FERNANDES, 2004), esteve presente durante diversos períodos do ano, mas teve sua maior abundância registrada no final do verão (Tabela 11). O final do verão foi também quando a abundância total de fitoplâncton foi maior no CEP.

Tabela 11 - Microalgas potencialmente nocivas encontradas no complexo estuarino de Paranaguá, seus períodos de maior abundância, concentrações celulares máximas, data de registro do pico de abundância e potenciais efeitos deletérios - agosto de 2002 a outubro de 2003

MICROALGA	PREDOMINÂNCIA	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA	POTENCIAIS EFEITOS NOCIVOS
<i>Phaeocystis spp.</i>	Inverno a primavera	1.1×10^6 cel.L ⁻¹ - Out/2002	Tóxica a invertebrados e larvas; incômodo a turistas
<i>Trichodesmium erithraeum</i>	Primavera	4.6×10^3 cel.L ⁻¹ - Out/2002	Tóxica a animais marinhos; inanição; poluição visual
<i>Heterosigma akashiwo</i>		Somente em amostras vivas Out/2002 e Out/2003	Mortalidade de peixes; tóxica a invertebrados
<i>Dinophysis acuminata</i>		4.6×10^3 cel.L ⁻¹ - Dez/2002	Produção de toxinas do DSP
<i>Prorocentrum minimum</i>	Primavera a outono	1.7×10^5 cel.L ⁻¹ - Abr/2003	Morte de moluscos; extrato é tóxico a camundongos
<i>Chattonella spp.</i>	Primavera e outono	3.7×10^4 cel.L ⁻¹ - Jun/2003	Mortalidade de peixes
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Final do verão a outono	6.4×10^3 cel.L ⁻¹ - Fev/2003	Produção de toxinas do PSP
<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>		3.2×10^5 cel.L ⁻¹ - Fev/2003	Produção de toxinas do ASP
<i>Coscinodiscus wailesii</i>		1.4×10^4 cel.L ⁻¹ - Mar/2003	Déficit de oxigênio; alteração das cadeias tróficas

Foram vários os fatores que contribuíram para a maior diversidade e abundância das algas potencialmente nocivas na primavera, no final do verão e início do outono. Na primavera, a temperatura em ascensão favorece a germinação de cistos e células de resistência e o crescimento das fases vegetativas de diversas espécies de algas potencialmente nocivas (e.g. SMAYDA, 1998; IMAI; YAMAGUCHI; WATANABE, 1998). A alta concentração de nutrientes, derivada da estocagem durante o inverno e da drenagem continental que começa a aumentar durante a primavera, colabora para que essas espécies de microalgas atinjam elevadas concentrações celulares. O final do verão, quando as temperaturas estão mais elevadas e são trazidas grandes quantidades de nutrientes devido à maior pluviosidade, registra as maiores concentrações celulares de fitoplâncton (BRANDINI, 2000 e referências listadas). Esta época favorece o crescimento de

algumas das espécies potencialmente mais nocivas à saúde humana, como *Pseudo-nitzschia* spp. e *Gymnodinium catenatum* (Tabela 11). No início do outono, depois que as temperaturas se tornaram mais amenas e os nutrientes foram consumidos, a entrada de sistemas de frentes frias causa a geração de ventos e correntes fortes, promovendo a circulação da água e a distribuição dos nutrientes remineralizados no fundo para as camadas superficiais (MARONE; CAMARGO, 1994; LOPES, 1997). O aporte de nutrientes reciclados e a turbulência da água são fatores que favorecem os picos de abundância registrados neste período. Além destas tendências gerais, algumas características particulares a cada espécie nociva e que já foram discutidas no capítulo anterior também indicam uma maior probabilidade de ocorrência de eventos prejudiciais durante a primavera e o final do verão e início do outono.

Na estação 1, localizada na saída do estuário, próxima ao balneário de Pontal do Sul e na 5, situada no começo da baía de Antonina, localidade de Europinha, as algas potencialmente nocivas foram, em geral, mais abundantes. Neste último local, foi registrada a única amostra de molusco contaminado com ficotoxinas durante o estudo. Essa região abriga um conjunto de condições favoráveis ao crescimento das algas de um modo geral, com elevadas concentrações de nutrientes e níveis não limitantes de luz devido a uma presença moderada de material em suspensão. Já na estação 1, os valores mais elevados de salinidade favorecem o crescimento de diversas espécies potencialmente nocivas. Além disso, as populações de algas que crescem na plataforma continental próxima ao CEP podem ser trazidas para as áreas mais externas do sistema e ali encontrarem condições favoráveis ao seu crescimento. Na zona próxima ao Porto de Paranaguá (estação 3) e na desembocadura do rio Itiberê, em Paranaguá (estação 4), a abundância das algas potencialmente nocivas foi um pouco menor, mas também importante. Na estação 6, situada na região mais interna da baía de Antonina e com salinidades mais baixas, as algas foram encontradas com menor frequência, com exceção do dinoflagelado tóxico *Prorocentrum minimum*, que é mais adaptado a essa condição e forma florações sob baixas salinidades em diversas regiões do mundo (SMAYDA, 1990; GRZEBYK; BERLAND, 1996; FAN; GLIBERT; BURKHOLDER, 2003). Logo, o complexo estuarino de Paranaguá é um mosaico de condições ambientais que favorece a ocorrência de florações de diferentes espécies de algas potencialmente nocivas, conforme suas preferências e tolerâncias.

A presença de várias espécies de algas potencialmente nocivas no complexo estuarino de Paranaguá representa um risco iminente. Florações destas algas no CEP, a exemplo do que já ocorreu em 2001 com *Heterosigma akashiwo* (PROENÇA; FERNANDES, 2004), podem causar sérios danos aos organismos marinhos e até mesmo ao homem, por prejudicarem as atividades de pesca, aqüicultura e turismo. A ocorrência de espécies que comprovadamente produziram toxinas diarréicas, amnésicas e paralisantes, em conjunto com o crescimento da atividade de cultivo e a extração natural de mariscos, ostras e o próprio sururu, contribuem para agravar este quadro e potencializam a probabilidade de ocorrência de uma intoxicação em seres humanos. A predominância destas algas durante a primavera e verão, quando uma quantidade significativamente maior de pessoas freqüenta as cidades que margeiam o CEP, também colabora para aumentar os riscos de episódios de envenenamento humano. A ausência de um plano de monitoramento de algas nocivas e toxinas em moluscos, assim como o desconhecimento da comunidade pesqueira sobre o tema, tornam o CEP bastante susceptível aos efeitos deletérios causados por eventos de tal natureza.

Sendo assim, sugere-se a implementação de um plano de monitoramento de microalgas potencialmente nocivas e de ficotoxinas, privilegiando as regiões que se mostraram mais críticas, além de outros locais com elevada atividade pesqueira e onde se realize a extração e o cultivo de animais marinhos, principalmente moluscos. O sucesso de um plano desta natureza depende também da periodicidade de sua amostragem. O ideal é que se realize um acompanhamento semanal das algas e toxinas, mas longas distâncias e elevado número de amostras podem dificultar de sobremaneira essa tarefa.

É também fundamental o monitoramento constante das concentrações de ficotoxinas no ambiente, especialmente no que tange à prevenção de intoxicações humanas. Somente o monitoramento da abundância das espécies potencialmente nocivas de fitoplâncton não é suficiente para garantir uma previsão segura da ocorrência de eventos deletérios ao ambiente ou à saúde humana. Entretanto, a contagem de tais algas no ambiente é uma ferramenta mais simples e rápida e que pode servir como um alerta para a iminência ou possibilidade de um episódio nocivo acontecer. Um exemplo disso foi experimentado no Canadá, durante a segunda grande floração dominada por *Pseudo-nitzschia multiseries*, em 1988 (BATES et al.,

1989). O nível de ácido domóico na água aumentou numa relação direta com a concentração celular da alga. A contagem das células no plâncton em conjunto com a mensuração de toxinas possibilitou a antecipação e o alerta para um potencial problema de toxicidade em moluscos, que veio a ocorrer entre 5 a 10 dias mais tarde. A imediata suspensão no consumo de moluscos fez com que não se registrasse nenhuma morte naquela ocasião (BATES et al., 1989).

Com base nas observações feitas no presente estudo e nos dados existentes na literatura científica, foi composto um plano de ações sintetizado (Tabela 12), onde constam algumas providências que poderão ser tomadas em um futuro monitoramento de algas tóxicas e ficotoxinas no CEP, levando-se em consideração as concentrações celulares das principais microalgas potencialmente nocivas e os níveis de toxinas medidos em moluscos.

Tabela 12 - Plano de ações proposto para o monitoramento de ASP, DSP e PSP no complexo estuarino de Paranaguá, com base na contagem de algas potencialmente nocivas e concentração de toxinas em moluscos bivalves.

	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp. (ASP)	<i>Dinophysis</i> <i>acuminata</i> (DSP)	<i>Gymnodinium</i> <i>catenatum</i> (PSP)	AÇÕES
Nível de rotina	< 50.000 cels.L ⁻¹	ausência	< 100 cels.L ⁻¹	Contagem de microalgas nocivas no plâncton e análise de toxinas em moluscos; semanalmente
Nível de alerta	50.000 cels.L ⁻¹ (1)	presença (1)	100 cels.L ⁻¹ (1)	Intensificar o monitoramento do plâncton
Nível de risco	100.000 cels.L ⁻¹ (2)	1.000 cels.L ⁻¹ (3)	1.500 cels.L ⁻¹ (4)	Intensificar testes para detecção de toxinas em moluscos bivalves
Nível de interdição	20 µg de ácido domóico em 1 g de carne de molusco (5)	2 µg de ácido ocadáico e/ou 1,8 µg de DTX-1 em 1g de hepatopâncreas (6)	80 µg de saxitoxina ou equivalentes em 100 g de carne de molusco (7)	Alertar público e autoridades; proibir a comercialização de moluscos; continuar os testes em ritmo intensificado
Nível de liberação	< nível de interdição em 3 amostras consecutivas num período de 14 dias (8)	< nível de interdição em 2 amostras consecutivas num período de 7 dias (8)	< nível de interdição em 3 amostras consecutivas num período de 14 dias (8)	Liberar o consumo de moluscos depois de restabelecidos os níveis seguros de toxinas; continuar o monitoramento

FONTES: (1) Anderson *et al.*, 2001; (2) Bates; Garrinson; Horner, 1998; (3) Reguera, 2003; (4) Proença et al., não publ.; (5) Quilliam; Xie; Hardstaff, 1995; (6) Lee et al., 1987; (7) Fernández; Cembella, 1995; (8) Todd, 2003.

Desta forma, as algas potencialmente nocivas e as ficotoxinas acumuladas em moluscos bivalves seriam constantemente monitoradas, mas os esforços poderiam ser aumentados em determinadas épocas, usando como sinal de alerta a

concentração celular das principais microalgas tóxicas no ambiente. De acordo com esse modelo proposto, depois de atingido o nível de alerta para uma ou mais algas (Tabela 12), o monitoramento do plâncton deve ser intensificado, diminuindo o intervalo entre as amostragens e, se for o caso, aumentando o número de estações de coleta. Então, se o nível de risco para uma ou mais algas for alcançado (Tabela 12), intensifica-se os testes para detecção das toxinas em moluscos, sejam eles bioensaios com camundongos ou análises de cromatografia líquida. Somente precisam ser intensificados os testes para detecção das toxinas produzidas pela microalga que ultrapassou o nível de risco. A quantificação das toxinas presentes nos moluscos, por bioensaio no caso de PSP e DSP e cromatografia para ASP e confirmação de eventos de DSP, é que irá determinar se os bivalves estão aptos para o consumo humano. Caso as concentrações de toxinas atingirem os níveis de interdição (Tabela 12), as autoridades competentes devem ser informadas para que procedam com medidas proibitivas e divulgação ao público consumidor. Hospitais, postos de saúde e clínicas também devem ser avisados para que fiquem atentos a quadros com sintomatologia característica das intoxicações. O monitoramento das toxinas deve prosseguir em ritmo intenso, até que sejam restabelecidos níveis considerados seguros, ou seja, abaixo dos níveis de interdição. Alcançados esses níveis, deve-se observar um período de quarentena no qual novas amostragens precisam ser realizadas para confirmar a diminuição da toxicidade. O período de quarentena e o número necessário de amostragens para confirmar o resultado são específicos para cada intoxicação (Tabela 12). Quando os níveis de liberação são observados, a comercialização e o consumo dos moluscos podem voltar à normalidade, mediante a continuidade do monitoramento.

As toxinas diarréicas estão entre as toxinas marinhas que manifestam sintomas sob as menores doses de ingestão (Tabela 12). Gastreenterites originadas de DSP têm sido registradas em casos de ingestão de doses tão baixas quanto 48 a 75 μg de ácido ocadáico (YASUMOTO et al., 1985; VALE; SAMPAYO, 2002). Por outro lado, para provocar o PSP são necessários níveis entre 1 e 4 mg de saxitoxina (SCHANTZ, 1984) e os sintomas do ASP são manifestados após a ingestão de 60 a 110 mg de ácido domóico (TODD, 1993).

Pela razão apresentada acima e pelo grande volume celular e alta produção de toxinas observada em *Dinophysis acuminata*, os níveis de alerta e risco para essa

alga foram mais restritivos. Em alguns países, quando se trata especialmente do monitoramento de DSP, a restrição à comercialização de moluscos é feita com base na contagem de células tóxicas no plâncton (ANDERSEN; HALD; RADWAN, 1996). Apesar de não existir um número mínimo de células de *D. acuminata* definido como capaz de causar problemas de DSP, é comum assumir que 1.000 cels.L⁻¹ seja uma quantidade preocupante e capaz de originar eventos de intoxicações (REGUERA, 2003). Contudo, moluscos bivalves em contato com 200 cels.L⁻¹ de *Dinophysis fortii* (YASUMOTO et al., 1985) ou *D. acuminata* (BLANCO et al., 1998) já são capazes de adquirir um nível de toxicidade maior do que o aconselhável para o consumo humano. Por outro lado, NISHITANI, SUGIOKA e IMAI (2002) mensuraram concentrações de cerca de 500 cels.L⁻¹ de *D. fortii* e 700 cels.L⁻¹ de *D. acuminata*, sem que nenhuma toxicidade tenha sido registrada em moluscos. A tendência é que, quando a abundância total do fitoplâncton é baixa e a concentração relativa das microalgas tóxicas na água torna-se maior, os moluscos filtram mais células tóxicas na sua alimentação. Isso explica, em parte, porque alguns eventos de intoxicação ocorrem com concentrações tão baixas de *Dinophysis* (SAMPAYO et al., 1990). Outro fator de variação é a taxa de divisão celular. Quando as algas estão se dividindo muito lentamente, em períodos com condições desfavoráveis ao crescimento, as toxinas produzidas vão sendo acumuladas por um longo período, aumentando a toxicidade em cada uma das células remanescentes. Em épocas de crescimento ativo e maior abundância de *Dinophysis*, as células tendem a ser menos tóxicas (REGUERA, 2003). Devido a essa grande variabilidade, o monitoramento de uma área com intensa atividade de extração e/ou cultivo de moluscos marinhos deve sempre contemplar a análise de toxinas nos moluscos, em adição à contagem de espécies de microalgas nocivas. O primeiro é um procedimento mais direto e confiável, já que mede a toxicidade no organismo vetor dos envenenamentos.

Mesmo assim, o uso da contagem de células no plâncton mostrou ser uma ferramenta auxiliar importante no monitoramento de toxinas diarréicas na Espanha. REGUERA (2003) observou que há uma defasagem temporal de uma semana entre o pico de abundância de *Dinophysis acuminata* na água e o valor máximo de toxicidade encontrado em mexilhões cultivados no mesmo local. A importância de se observar um período de quarentena após um evento de intoxicação de moluscos também foi salientada pela autora. A detoxicação (=depuração) em mexilhões

contaminados durou entre 3 a 4 semanas após as concentrações de *Dinophysis* tornarem-se menores do que 1.000 cels.L⁻¹ (REGUERA, 2003). Outra justificativa para o período de quarentena é a longa duração dos eventos de contaminação de moluscos por toxinas diarréicas, como observado em Portugal (VALE; SAMPAYO, 2003).

Os níveis de alerta e risco para *Pseudo-nitzschia* spp. (Tabela 12) foram menos restritivos devido à elevada quantidade de ácido domóico que um ser humano necessita ingerir para se intoxicar e à alta concentração de células necessária para produzir tal quantidade. BATES, GARRINSON e HORNER (1998) assumiram que é preciso uma concentração celular de ao menos 100.000 cels.L⁻¹ de *Pseudo-nitzschia* para contaminar moluscos em níveis críticos para o consumo humano. Contudo, na presente investigação, mesmo tendo ultrapassado a concentração de 300.000 cels.L⁻¹ em fevereiro de 2003, não foi detectado ácido domóico nos moluscos analisados. Na Galícia, região da Espanha, uma floração de até 450.000 cels.L⁻¹ de *Pseudo-nitzschia australis* resultou na contaminação de moluscos mitilídeos em concentrações de 18 µg.g⁻¹, um nível muito próximo do limite para o consumo humano (MÍGUEZ; FERNÁNDEZ; FRAGA, 1996). Isso chama a atenção para o problema de se contar espécies tóxicas em conjunto com espécies não tóxicas, bem como ressalta a importância de se considerar a contribuição relativa das células de *Pseudo-nitzschia* na concentração total do fitoplâncton. Nas nossas amostras em que houve o pico de mais de 300.000 cels.L⁻¹ de *Pseudo-nitzschia* spp., essa concentração representava somente cerca de 11% do total de células no fitoplâncton. Caso sua contribuição relativa fosse próxima a 100%, mesmo mantendo a concentração de 300.000 cels.L⁻¹, os moluscos teriam uma maior chance de serem contaminados porque estariam potencialmente ingerindo uma quantidade maior de células de *Pseudo-nitzschia*.

O nível de risco adotado para *Gymnodinium catenatum* foi de 1.500 cels.L⁻¹ (Tabela 12) com base em análises realizadas em Armação do Itapocoroy, Santa Catarina. Em 2004, naquele local, amostras de moluscos exibiram uma baixa toxicidade em testes de PSP, com níveis próximos ao limite de detecção do bioensaio com camundongos. No ambiente, foram detectadas pouco mais de 1.700 cels.L⁻¹ de *G. catenatum*, sendo que nenhuma outra alga produtora de toxinas paralisantes foi encontrada (PROENÇA et al., não publ.). Por outro lado, florações

com cerca de $50.000 \text{ cels.L}^{-1}$ de *G. catenatum* já foram responsáveis por níveis muito altos de intoxicação em moluscos (até $3.990 \mu\text{gSTXeq.100g}^{-1}$) nas rias de Vigo e Pontevedra, Espanha (ANDERSON; SULLIVAN; REGUERA, 1989). Entretanto, naquela oportunidade a contagem do dinoflagelado no plâncton pode ter sido subestimada, já que um ano depois uma floração atingiu até $2.000.000 \text{ cels.L}^{-1}$ em alguns pontos e a toxicidade máxima medida em moluscos foi menor ($2.640 \mu\text{gSTXeq.100g}^{-1}$; ANDERSON; SULLIVAN; REGUERA, 1989).

O monitoramento de *Gymnodinium catenatum* como causador de PSP deve ser realizado através de uma amostragem do plâncton em toda a coluna d'água. Essa alga é uma espécie de dinoflagelado altamente ativa e, durante suas florações, o uso de migrações verticais possibilita sua perpetuação por longos períodos ao passo que exclui competitivamente outras espécies (CLEMENTSON et al., 2004). Outra peculiaridade a que se deve estar atento é o tamanho das cadeias de *G. catenatum*. A presença de longas cadeias (32 a 64 células) de *G. catenatum* no ambiente tem sido relacionada a populações que estão crescendo ativamente e com toxicidade ascendente (GÁRATE-LIZÁRRAGA et al., 2004).

Por vezes, a toxicidade de *Gymnodinium catenatum* detectada por bioensaios com camundongos não condiz com o perfil de toxinas pouco potentes encontradas em análises de cromatografia líquida. Novas toxinas paralisantes, como as recém-descobertas GC1, GC-2 e GC-3, podem ser as responsáveis por tal diferença. Por possuírem uma porção menos polar de hidroxibenzoato, as moléculas de GC1-3 possivelmente tenham uma grande habilidade de atravessar o epitélio intestinal e vascular, assim como a saxitoxina e outras toxinas paralisantes potentes (LLEWELLYN; NEGRI; QUILLIAM, 2004). Ainda, o fato das moléculas serem lipofílicas pode reduzir sua taxa de eliminação em mamíferos e favorecer seu acúmulo no tecido adiposo animal, inclusive em moluscos bivalves (ISHIDA et al., 1996). A possibilidade de que toxinas desconhecidas contribuam para a toxicidade total de *G. catenatum* torna o bioensaio com camundongos um método bastante útil no monitoramento de PSP, apesar das questões éticas envolvidas.

Um evento de intoxicação de moluscos por toxinas paralisantes também deve ser seguido por um período de depuração. TALEB, VALE e BLAGHEN (2003) mencionaram entre um e dois meses o período médio que os moluscos

contaminados precisavam para se purificar, depois de terem sido contaminados por toxinas paralisantes. A duração dependia do grau de contaminação e a espécie de molusco envolvida.

Como visto, o monitoramento de ficotoxinas no CEP deve ter como principais alvos as espécies apresentadas neste estudo, ou seja, *Dinophysis acuminata*, *Pseudo-nitzschia* spp., e *Gymnodinium catenatum*, mas não pode deixar de considerar a possibilidade de outras espécies tóxicas aparecerem no ambiente.

A introdução de espécies exóticas contribui para o aumento na ocorrência de florações de algas nocivas ao longo do globo. O transporte pode ocorrer naturalmente, através de correntes oceânicas e costeiras (TESTER et al., 1991), ou ser induzido pelo homem por meio de atividades como o lastreamento de navios (HALLEGRAEFF; BOLCH, 1992; RIGBY; HALLEGRAEFF, 1994) e a translocação de estoques de animais para a aquicultura (SCARRATT; SCARRATT; SCARRATT, 1993). Nestes processos, as microalgas são levadas de uma região de comum ocorrência até outros locais onde sua presença nunca houvera sido registrada antes. Caso consigam se instalar com sucesso no novo ambiente, as espécies invasoras, ou exóticas, podem causar impactos complexos em compartimentos distintos do ecossistema (RUIZ et al., 2000). Elas podem alterar as relações tróficas da cadeia alimentar, competir com espécies nativas por espaço, ou introduzir substâncias tóxicas ou novas doenças, que afetam os organismos residentes e as populações humanas (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000).

Tanto as correntes oceânicas e costeiras, como a aquicultura e a água de lastro de navios que é descarregada no porto de Paranaguá podem trazer novas espécies de microalgas nocivas para o CEP, ou mesmo cepas mais tóxicas das espécies já estabelecidas. Outras espécies de *Dinophysis*, que já foram encontradas em diferentes regiões do Brasil, são capazes de produzir toxinas diarréicas e representam um risco, caso sejam detectadas no CEP. Essas espécies são: *D. caudata* (litorais nordeste, sudeste e sul) *D. fortii* (RS), *D. mitra* (RS), *D. rotundata* (SC e RS) e *D. tripos* (SC e RS) (CARDOSO, 1993; SEELIGER; ODEBRECHT; CASTELLO, 1998; YONEDA, 1999; SCHMITT; PROENÇA, 2000).

O dinoflagelado produtor de PSP *Pyrodinium bahamense* Plate não possui registros no Brasil, mas representa um grave problema econômico e de saúde

pública em diversos países tropicais pobres (Van DOLAH, 2000; HALLEGRAEFF, 2003). Estes países, situados na região do Indo-Pacífico e América Central, dependem do consumo de alimentos marinhos e não possuem experiência na pesquisa de algas tóxicas. Na região indo-pacífica, o *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester et Taylor vem sendo responsável por intoxicações desde 1972, quando formou uma floração em Papua Nova Guiné. Desde então, novas ocorrências se seguiram em Brunei (1976), região central das Filipinas (1983), norte das Filipinas (1987) e Malásia (1988; Van DOLAH, 2000). Somente nas Filipinas, esta alga já foi responsável por mais de 1.500 casos de envenenamento, com 100 fatalidades, resultantes do consumo de moluscos e peixes filtradores que continham a toxina. Na Guatemala, em uma única floração em 1987, 187 pessoas foram hospitalizadas e 26 morreram (HALLEGRAEFF, 2003). Várias espécies do gênero *Alexandrium*, que também não são encontradas no CEP, são produtoras de toxinas paralisantes que causam problemas gravíssimos de saúde pública nos locais em que ocorrem. Como estes dinoflagelados formam cistos de resistência e podem ser introduzidos em novas regiões pela água de lastro de navios (SCHOLIN; HALLEGRAEFF; ANDERSON, 1993), sugere-se também a implementação de um plano de manejo de água de lastro no Porto de Paranaguá para mitigar o problema da introdução de novas espécies nocivas. O referido plano de manejo já está sendo elaborado no âmbito do projeto ALARME (FNMA/PROBIO n. CVI 008/2002).

No complexo estuarino de Paranaguá, diversas espécies nocivas podem ter sido introduzidas recentemente. Dentre elas, *Coscinodiscus wailesii* foi apontado como uma espécie exótica e que teria sido introduzida na Baía de Paranaguá via água de lastro de navios (FERNANDES; ZEHNDER-ALVES; BASSFELD, 2001). *Heterosigma akashiwo* foi detectada no Brasil somente a partir de 1997 (PERSICH; GARCIA; ODEBRECHT, 1998). Existe a possibilidade que esta espécie estivesse presente no ambiente sem ter sido identificada, mas ela pode ser mais uma espécie exótica, cujo mecanismo de introdução é desconhecido (PROENÇA; FERNANDES, 2004). A outra espécie com origem duvidosa é *Gymnodinium catenatum*, que foi registrado no Brasil pela primeira vez em 1998 (PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001). Dificilmente esta espécie passaria despercebida em amostras de plâncton coletadas anteriormente, já que as células formam cadeias longas e características.

Entretanto, resta a dúvida se este dinoflagelado foi trazido em tanques de lastro de navios ou transportado através de correntes litorâneas desde as águas argentinas e/ou uruguaias (PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001).

Além de novas introduções, outras algas nocivas já encontradas no CEP não foram abordadas no presente estudo. A diatomácea *Amphora coffeaeformis*, presente no CEP em baixas concentrações (PROCOPIAK, 2004), foi apontada por SHIMIZU et al. (1989) como produtora de baixas concentrações de ácido domóico. Contudo, a toxicidade dessa alga é dúbia, já que novas cepas isoladas não confirmaram tal capacidade (BATES et al., 1989; LUNDHOLM; SKOV, com. pess. em BATES, 2000). Além disso, SALA, SAR e FERRARIO (1998), em um estudo de revisão morfológica, argumentaram que *A. coffeaeformis* tem sido freqüentemente identificada de maneira errônea, e que a classificação dessa espécie como toxigênica é ambígua. Outra espécie já detectada no CEP foi o dinoflagelado produtor de toxinas do PSP *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech (L.F. FERNANDES, com. pess.). Entretanto, em nossas amostras, nenhuma célula desta alga foi encontrada. Este dinoflagelado já havia sido observado em altas densidades na costa do Rio Grande do Sul, em 1996 (ODEBRECHT; MÉNDEZ; GARCIA, 1997). Lá, células viáveis e cistos foram isolados e cultivados, e a toxicidade de *A. tamarense* foi comprovada por cromatografia líquida. O perfil de toxinas paralisantes foi composto pelas toxinas dos tipos C1, C2, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, neoSTX e STX, sendo que as moléculas de maior toxicidade específica foram predominantes, mostrando o perigo desta microalga para a saúde pública (PERSICH, 2001).

A implementação de um bom plano de monitoramento de microalgas nocivas e ficotoxinas não previne somente danos à saúde pública, mas ajuda a mitigar as perdas econômicas conseqüentes das florações dessas algas. Dificilmente consegue-se estimar o custo econômico dos eventos de florações de microalgas nocivas e existem relativamente poucos dados concretos que quantifiquem tais prejuízos, mas eles são bastante expressivos. Um único evento de envenenamento paralítico por consumo de mariscos (PSP), no Nordeste dos EUA, teve um custo estimado de 6 milhões de dólares (SHUMWAY, 1988). Em 1997, um evento envolvendo o dinoflagelado *Pfiesteria piscicida* em Chesapeake Bay, EUA, resultou em protestos públicos, vários enfermos e uma perda estimada de 43 milhões de dólares (SIELING; LIPTON, 1998). Em Washington, florações da rafidofícea

Heterosigma akashiwo causaram prejuízos anuais de 4 a 5 milhões de dólares aos produtores de peixes em cultivos de tanque-rede (HORNER; GARRINSON; PLUMLEY, 1997). Ainda nessa mesma região, as perdas econômicas devido a florações da diatomácea *Chaetoceros* spp. chegam a custar cerca de 500 mil dólares para a indústria pesqueira, a cada episódio (RENSEL, 1993). No ano 2000, uma extensa floração de *Gymnodinium catenatum* causou uma interdição voluntária na comercialização de moluscos cultivados e extração em bancos naturais, gerando um prejuízo de cerca de US\$ 2 milhões mensais (IRWIN et al., 2003).

A maior razão pela qual governos e entidades privadas mantêm seus planos de monitoramento de microalgas nocivas e ficotoxinas é a aqüicultura. Essa atividade vem sendo apontada como uma solução para o aumento da produção de alimentos de origem marinha e encontra-se em franca expansão em diversos locais do litoral brasileiro, incluindo o CEP e regiões adjacentes. Entretanto, a implementação de áreas para a aqüicultura e a obrigação de se garantir a qualidade do alimento produzido conduzem à necessidade de um monitoramento dos organismos nocivos nos corpos d'água e de substâncias tóxicas nos próprios alimentos. Grandes programas de monitoramento são praticados na Espanha (SÁNCHEZ-MATA; MORA, 2000), Escócia (HENDERSON; DAVIES, 2000), Suécia (ACKEFORS, 2000), França (BELIAEFF et al., 2001), Noruega (DAHL; AUNE; AASE, 1996) e Nova Zelândia (RHODES; SCHOLIN; GARTHWARTE, 1999), onde ajudam a garantir a qualidade dos frutos-do-mar cultivados e conquistar as vendas no mercado externo.

O estado de Santa Catarina, no Brasil, é o maior produtor nacional de moluscos marinhos. Para fornecer suporte a esta expressiva atividade, em 1997 foi implantado um programa piloto de monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas na região da Enseada de Armação do Itapocoroy, responsável por uma grande produção do molusco *Perna perna* e que corresponde ao maior parque de cultivo de moluscos em nível nacional (SOBRAL; MANZONI, 2000). A análise das ficotoxinas é realizada através de bioensaios com camundongos, no caso de DSP e PSP, e por cromatografia líquida de alta eficiência para ASP. Já foram detectadas toxinas amnésicas, diarréicas e paralisantes (PROENÇA et al., 2004a) e as microalgas potencialmente nocivas mais comuns são *Pseudo-nitzschia* spp., *Gymnodinium catenatum*, *Dinophysis acuminata*, *D. caudata* e *Prorocentrum minimum* (TAVARES;

ODEBRECHT; PROENÇA, 2001). Devido à proximidade geográfica e semelhança climática, a implementação de um programa de monitoramento no complexo estuarino de Paranaguá poderia ser beneficiada da experiência catarinense, através de parcerias e trocas de informações. Além disso, as espécies de microalgas nocivas e de moluscos cultivados em ambas as regiões são basicamente as mesmas.

Portanto, somente através da implementação de programas de monitoramento se pode conhecer os problemas relacionados à presença de algas nocivas e ficotoxinas em um determinado local, bem como buscar medidas para mitigar e prevenir seus conseqüentes efeitos danosos.

8 CONCLUSÕES

- De um modo geral, a temperatura da água e a concentração de nutrientes são os principais fatores que regulam as variações sazonais na ocorrência de microalgas potencialmente nocivas no complexo estuarino de Paranaguá (CEP);
- O CEP se constitui num mosaico de condições ambientais que favorece a ocorrência de florações de diferentes microalgas nocivas, cuja distribuição varia em função das preferências e tolerâncias de cada espécie e da hidrodinâmica do ambiente;
- O setor intermediário do CEP é a região mais propícia para o crescimento das microalgas, devido a co-existência de níveis moderados de salinidade e condições não limitantes de luz e nutrientes inorgânicos dissolvidos;
- O teste de toxicidade com camundongos demonstrou ser uma ferramenta mais eficiente do que a cromatografia líquida para estimar a toxicidade de amostras contendo toxinas paralisantes, em virtude do complexo perfil de toxinas a ser analisado;
- A elucidação completa de casos de DSP detectados por testes de toxicidade só é possível caso haja disponibilidade de um método de análise por cromatografia líquida bastante refinado e capaz de incluir diversos tipos de toxinas;
- Pós-larvas com 22 dias de idade do camarão *Litopenaeus vannamei* não são um bom organismo indicador de toxicidade de algas, já que demonstram uma elevada tolerância a várias substâncias tóxicas e a condições ambientais adversas. Em contrapartida, larvas do molusco *Perna perna* e juvenis do misidáceo *Misidopsis juniae* têm aplicação prática e eficiente;
- A existência de diversas espécies de algas potencialmente nocivas e a comprovação da produção de toxinas amnésicas, diarréicas e paralisantes indicam a necessidade da implementação de um programa de monitoramento de microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá, PR. Tal necessidade é reforçada pela dependência social e econômica da população local por atividades como o turismo, pesca, extrativismo e cultivo de animais marinhos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AANESEN, R.T.; EILERTSEN, H.C.; STABELL, O.B. Light-induced toxic properties of the marine alga *Phaeocystis pouchetii* towards cod larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p. 109-121, 1998.
- ACKEFORS, H. Review of Swedish regulation and monitoring of aquaculture. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 16, p. 214-223, 2000.
- AHMED, M.S.; ARAKAWA, O.; ONOUE, Y. Toxicity of cultured *Chattonella marina*. In: Lassus, P. et al. (Ed.). **Harmful Marine Algal Blooms**. Paris: Lavoisier Intercept Ltd., 1995, p. 543-548.
- AHNRED, F.E. **Seafood Safety**. Washington D.C.: National Academy Press, 1991. 432 p.
- AL-HASAN, R.H.; ALI, A.M.; RADWAN, S.S. Lipids and their constituent fatty acids of *Phaeocystis* sp. from the Arabian Gulf. **Marine Biology**, v. 105, p. 9-14, 1990.
- AMON, R.M.W.; BENNER, R. Major role for high-molecular weight dissolved organic matter in the marine carbon cycle. **Nature**, v. 369, p. 549-552, 1994.
- ANDERSEN, P.; HALD, B.; EMSHOLM, H. Toxicity of *Dinophysis acuminata* in Danish Coastal waters. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and toxic algal blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996. p. 281-284.
- ANDERSON, D.M.; GARRISON, D.J. The ecology and oceanography of harmful algal blooms. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1009-1035, 1997.
- ANDERSON, D.M.; SULLIVAN, J.J.; REGUERA, B. Paralytic Shellfish Poisoning in northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 665-674, 1989.
- ANDERSON, D.M. et al. **Monitoring and management strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters**, APEC # 201-MR-01.1. Paris: Asia Pacific Economic Program, Singapore and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, 2001.
- ANDRIGUETTO-FILHO, J.M. Institutional prospects in managing coastal environmental conservation units in Paraná State, Brazil. In: COASTAL ZONE '93, 8, New Orleans, 1993. **Proceedings of the 8th Symposium on Coastal Ocean Management**. New Orleans: Am. Soc. Civil Eng, 1993.
- AOAC Paralytic shellfish poison: Biological method. Final Action. In: HELLRICH, K (Ed.). **Official Methods of Analysis**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1990. p. 881-882.
- APHA - American Public Health Association/ AWWA - American Water Works Association/ WEF - Water Environmental Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1999.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMOUZE, J.-P. Une mortalité de poissons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de Cyanophyceae. Coincidence ou conséquence? **Révue Hydrobiologie Tropicale**, v. 27, n. 3, p. 265-272, 1994.
- BALECH, E. El plancton del Mar del Plata durante el período 1961-1962. **Bol. Inst. Biol. Marina, Mar del Plata**, v. 4, p. 1-49, 1964.
- BALECH, E. **Los dinoflagelados del Atlántico sudoccidental**. Madrid: Instituto Español de Oceanografía, Publicaciones Especiales, no 1, 1988. 310p.
- BARGU, S. et al. Feeding responses of krill to the toxin-producing diatom *Pseudo-nitzschia*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 284, p. 87-104, 2003
- BATES, S.S. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In: ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.M. (Eds.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Berlin: Springer-Verlag, 1998. p. 405-426.
- BATES, S.S. Domoic acid-producing diatoms: another genus added. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 978-985, 2000.
- BATES, S.S.; GARRISON, D.L.; HORNER, R.A. Bloom dynamics and physiology of domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. In: ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.M. (Ed.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. p. 267-292.
- BATES, S.S.; HILTZ, M.F.; LÉGER, C. Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseriis* resulting from sexual production. In: MARTIN, J.L.; HAYA, K. (Ed.). **Proceedings of the Sixth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae**, Montreal, 1999. p. 21-26.
- BATES, S.S. et al. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 46, p. 1203-1215, 1989.
- BATES, S.S. et al. Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. *Multiseriis* in culture: nutrients and irradiance. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 48, p. 1136-1144, 1991.
- BATES, S.S. et al. Discrimination between domoic-acid-producing and nontoxic forms of the diatom *Pseudonitzschia pungens* using immunofluorescence. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 100, p. 185-195, 1993.

- BATES, S.S. et al. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. **Natural Toxins**, v. 3, p. 428-435, 1995.
- BAUMANN, M.E.M. et al. The taxonomic identity of the cosmopolitan prymnesiophyte *Phaeocystis*: a morphological and ecophysiological approach. **J. Mar. Syst.**, v. 5, p. 5-22, 1994.
- BELIAEFF, B. et al. "Phytoplankton events" in French coastal waters during 1987-1997. **Oceanologica Acta.**, v. 24, n. 5, p. 425-433, 2001.
- BÍBLIA, A. T. Êxodo. Português. **Bíblia Sagrada**. Reed. versão de Antonio Pereira de Figueiredo. São Paulo: Ed. Das Américas, 1950. Cap. 7, vers. 20-21.
- BLACKBURN, S.I.; HALLEGRAEFF, G.M.; BOLCH, C.J. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania. **Australian Journal of Phycology**, v. 25, p. 577-590, 1989.
- BLANCO, J. et al. From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus, P. et al. (Ed.). **Harmful Marine Algal Blooms**. Paris: Lavoisier Intercept Ltd., 1995, p. 777-782.
- BLANCO, J. et al. Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: environmental and biological influences. In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago del Compostella: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998, p. 204-207.
- BOALCH, G.T.; HARBOUR, D.S. Unusual diatom off the coast of south-west England and its effect on fishing. **Nature**, v. 269, p. 687-688, 1977.
- BOURDELAIS, A.J. et al. New fish-killing alga in coastal Delaware produces neurotoxins. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, p. 465-470, 2002.
- BOYER, G.L. et al. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. **Marine Biology**, v. 96, p. 123-131, 1987.
- BRANDINI, F.P. Ecological studies in the Bay of Paranaguá. I. Horizontal distribution and seasonal dynamics of the phytoplankton. **Bol. Inst. Oceanogr.**, v. 33, n. 2, p. 139-147, 1985.
- BRANDINI, F.P. Composição e distribuição do fitoplâncton na região Sueste do Brasil e suas relações com as massas de água (Operação Sueste – julho/agosto 1982). **Ciência e Cultura**, v. 40(4), p. 334-341, 1988.
- BRANDINI, F.P.; FERNANDES, L.F. Microalgae of the continental shelf off Paraná State, southeastern Brazil: a review of studies. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 44(1), p. 69-80, 1996.
- BRANDINI, F.P.; MORAES, C.L.B. Composição e distribuição do fitoplâncton em áreas costeiras e oceânicas da região sueste do Brasil. **Nerítica**, v. 1(3), p. 9-19, 1986.
- BRANDINI, F.P.; MORAES, C.L.B.; THAMM, C.A. Shelf break upwelling, subsurface maxima of chlorophyll and nitrite, and vertical distribution of a subtropical nano – and microplankton community off southeastern Brazil (November 1985). **Memórias do III Encontro Brasileiro de Plâncton**, Caiobá, 1988.
- BRANDINI, F.P.; THAMM, C.A.; VENTURA, I. Ecological Studies in the Bay of Paranaguá. III. Seasonal and Spatial Variations of Nutrients and Chlorophyll-a. **Nerítica**, v. 3, n. 1, p. 1-30., 1988.
- BRANDINI, N. **Variação espacial e sazonal da produção primária do fitoplâncton em relação às propriedades físicas e químicas na Baía das Laranjeiras e áreas adjacentes (Complexo estuarino da Baía de Paranaguá – PR/BR)**. Curitiba, 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BRAVO, I.; FRANCO, J.M.; REYERO, M.I. PSP toxin composition of three life cycle stages of *Gymnodinium catenatum*. In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago del Compostella: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998, p. 356-358.
- BRICELJ, V.M.; LONSDALE, D.J. *Aureococcus anophagefferens*: Causes and ecological consequences of brown tides in U.S. mid-Atlantic coastal waters. **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 5, p. 1023-1038, 1997.
- BUCK, K.R. et al. Autoecology of *Pseudonitzschia australis* Frenguelli, a suspected domoic acid producer, from Monterey Bay, California. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 84, p. 293-302, 1992.
- BURKHOLDER, J.M.; GLASGOW JUNIOR, H.B. Trophic controls on stage transformations of a toxic amnush-predator dinoflagellate. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 200-205, 1997.
- BURNS, C.L. et al. The effect of nitrogen source on the growth and toxicity of three potentially harmful dinoflagellates. **Journal of Phycology**, v. 36(3), p. 97-105, 2000.
- BUSHAW-NEWTON, K.L.; SELLNER, K.G. Harmful Algal Blooms. In: NOAA's State of Coast Report. Silver Spring, MD: National Oceanic and Atmospheric Administration. http://state-of-coast.noaa.gov/bulletins/html/hab_14/hab.html, 1999. (on-line)
- CADÉE, G.C. Accumulation and sedimentation of *Phaeocystis globosa* in the Dutch Wadden Sea. **Journal of Sea Research**, v. 36, p. 321-327, 1996.
- CADÉE, G.C.; HEGEMAN, J. Phytoplankton in the Marsdiep at the end of the 20th century; 30 years monitoring biomass, primary production, and *Phaeocystis* blooms. **Journal of Sea Research**, v. 48, p. 97-110, 2002.

- CANNON, J.A. Development and dispersal of red tides in the Port River, South Australia. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC MARINE PHYTOPLANKTON, 1990, Lund. **Toxic Marine Phytoplankton, vol. 4. Proceeding...** Lund: International Society for the Study of Harmful Algae, 1990. p. 110-115.
- CAPONE, D.G. et al. An extensive bloom of the N-2-fixing cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the central Arabian Sea. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 172, p. 281-292, 1998.
- CARDOSO, L.S. **Dinoflagelados da Ilha do Arvoredo e da Praia de Ponta das Canas – SC, Brasil (setembro de 1991 a fevereiro de 1992):** considerações taxonômicas e ecológicas. Porto Alegre, 1993. 306p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CARLSSON, P.; GRANÉLI, E. Availability of humic bound nitrogen for coastal phytoplankton. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 36, p. 433-447, 1993.
- CARPENTER, E.J. et al. The dinoflagellate *Dinophysis norvegica*: biological and ecological observations in the Baltic Sea. **European Journal of Phycology**, v. 30, p. 1-9, 1995.
- CARRASQUERO-VERDE, J.R. Role of associated bacteria in *Heterosigma carterae* toxicity to salmonids. **Aquatic Toxicology**, v. 45, p. 19-34, 1999.
- CARVALHO, I.M.C.M.M., ESKINAZI-LEÇA, I.; NOGUEIRA-PARANHOS, J.D. Novo registro da cianoficea *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg em águas costeiras do litoral do Estado do Piauí. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FICOLOGIA, 8, 1999, Porto de Galinhas. **Anais...** Porto de Galinhas: Sociedade Brasileira de Ficologia, 1999. p. 59.
- CEMBELLA, A.D. Occurrence of okadaic acid a major shellfish toxin in natural populations of *Dinophysis* spp. from the eastern coast of North America. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, p. 307-310, 1989.
- CERINO, F. et al. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. **Harmful Algae**, v. 4(1), p. 33-48, 2005.
- CETESB. **Água do mar – Teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* Silva, 1979 (Crustácea: Mysidacea)**. São Paulo: CETESB, 1992. 25 p. Norma Técnica L5.251.
- CHANG, F.H. Distribution and abundance of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae) and *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) in Kenepuru and Pelorus Sounds, New Zealand. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and toxic algal blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996. p. 93-96.
- CHANG, F.H.; ANDERSON, C.; BOUSTEAD, N.C. First record of a *Heterosigma* (Raphidophyceae) bloom with associated mortality of cage-reared salmon in Big Glory Bay, New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 24, p. 461-469, 1990.
- CHANG, F.H.; PRIDMORE, R.; BOUSTEAD, N. Occurrence and distribution of *Heterosigma* cf. *akashiwo* (Raphidophyceae) in a 1989 bloom in Big Glory Bay, New Zealand. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 675-680.
- CHELLHAM, A.; ALAGARSWAMI, K. Blooms of *Trichodesmium thiebautii* and their effects on experimental pearl culture in the Pambau area and its effect on the fauna. **Curr. Sci.**, v. 10, p. 263, 1978.
- CHENG, T.C. Hemocytes: forms and functions. In: KENNEDY, V.S.; NEWELL, R.I.E.; EBLE, A.F. (Ed.). **The Eastern Oyster *Crassostrea virginica***. College Park: Maryland Sea Grant, 1996, p. 299-333.
- CHOTIYAPUTTA, C.; HIRAYAMA, K. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. **Marine Biology**, v. 45, p. 105-111, 1978.
- CLEMENTSON, L.A. et al. Properties of light absorption in a highly coloured estuarine system in south-east Australia which is prone to blooms of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. **Estuarine, coastal and Shelf Science**, v. 60, p. 101-112, 2004.
- COHEN, P.; HOLMES, C.F.B.; TSUKITANI, Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. **Trends in Biochemical Science**, v. 15, p. 98-102, 1990.
- CONNELL, L.B. Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta: Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. **Marine Biology**, v. 136, p. 953-960, 2000.
- CONNELL, L.B.; JACOBS, M.A. Anatomy of a bloom: *Heterosigma carterae* in Puget Sound 1997. In: STRICKLAND, R.M. (Ed.). **Puget Sound Research '98**. Seattle: Puget Sound Quality Authority, 1999. p. 830-834.
- CONNELL, L.; WELLING, K.A.; CATTOLICO, R.A. Algal organic metabolites affect survival of pacific oysters, *Crassostrea gigas*, larvae. **Journal of Shellfish Research**, v. 16(2), p. 439-501, 1997.
- CORTÉS-ALTAMIRANO, R.; ALONSO-RODRÍGUEZ, R. Mareias rojas durante 1997 en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. **Ciências del Mar**, v. 15, p. 31-37, 1997.
- CORTÉS-ALTAMIRANO, R.; NÚÑEZ-PASTÉN, A.; PASTÉN-MIRANDA, N. Abundancia anual de *Gymnodinium catenatum* Graham dinoflagelado tóxico de la costa este del golfo de California. **Ciencias del Mar**, v. 35, p. 51-56, 1999.
- DAIGO, K. Studies on the constituents of *Chondria armata*. I: Detection of the anthelmintical constituents & II: Isolation of an anthelmintical constituent. **J. Pharm. Soc. Japan**, v. 79, p. 350-356, 1959.
- DAHL, E.; AUNE, T.; AASE, B. Reddish water due to mass occurrence of *Dinophysis* spp. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and toxic algal blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996. p. 265-268.

- DALE, B.; YENTSCH, C.M. Red tide and paralytic shellfish poisoning. **Oceanus**, v. 21, p. 41-49, 1978.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443-449, 2000.
- DAVIDOVICH, N.A.; BATES, S. Sexual reproduction in the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pseudo-delicatissima* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v. 34, p. 126-137, 1998.
- DELMAS, D.; HERBLAND, A.; MAESTRINI, S.Y. Environmental conditions which lead to increase in cell density of the toxic dinoflagellates *Dinophysis* spp. in nutrient-rich and nutrient-poor waters of the French Atlantic coast. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 89, p. 53-61, 1992.
- DOBLIN, M.A.; BLACKBURN, S.I.; HALLEGRAEFF, G.M. Growth and biomass stimulation of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) by dissolved organic substances. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 236, p. 33-47, 1999.
- DORTCH, Q. et al. Abundance and vertical flux of *Pseudo-nitzschia* in the northern Gulf of Mexico. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 146, p. 249-264, 1997.
- DOUDING, L.; HUANG, W. *Phaeocystis* bloom in Southeast China coastal water. **Harmful Algae News**, v. 19, p. 09, 1999.
- DOUGLAS, D.J.; BATES, S.S. Production of domoic acid, a neurotoxic amino acid, by an axenic culture of the marine diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* Hasle. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 49, p. 85-90, 1992.
- DOUGLAS, D.J. et al. Domoic acid production by axenic and non-axenic cultures of the pennate diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries*. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 595-600.
- DUNSTAN, W.M.; HOSFORD, J..The distribution of planktonic blue green algae related to the hydrography of the Georgia Bight. **Bulletin of Marine Science**, v. 27, p. 824-829, 1977.
- EILERTSEN, H.C.; RAA, J. Toxins in sea-water produced by a common phytoplankter: *Phaeocystis pouchetii*. **J. Mar. Biotechnol.**, v. 3, p. 115-119, 1995.
- ESTEP, K.W. et al. Predation by copepods upon natural populations of *Phaeocystis pouchetii* as a function of the physiological state of the prey. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 67, p. 235-249, 1990.
- FAN, C.; GLIBERT, P.M.; BURKHOLDER, J.M. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. **Harmful Algae**, v. 2, p. 283-299, 2003.
- FERNANDES, L.F. **Variação sazonal do fitoplâncton e parâmetros hidrográficos em uma estação na costa de Paranaguá, Paraná, Brasil**. Curitiba, 1992. 93p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- FERNANDES, L.F.; ZEHNDER-ALVES, L.; BASSFELD, J. The recently established diatom *Coscinodiscus waillesii* (Coscinodiscales, Bacillariophyta) in Brazilian waters. I. Remarks on morphology and distribution. **Phycol. Res.**, v. 49, p. 89-96, 2001.
- FERNÁNDEZ, M.L.; CEMBELLA, A.D. Mammalian bioassay. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Ed.). **Manual on Harmful Marine Microalgae: IOC Manual and Guides**, n. 33. Paris: UNESCO Publishers, 1995, p. 213-228.
- FERNÁNDEZ, M.L. et al. Toxin of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In: Hallegraeff, G.M. et al. (Ed.). **Harmful Algal Blooms 2000**. Paris: IOC of UNESCO, 2001, p. 360-363.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.L. et al. Biomass production and variation in the Biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, p. 17-37, 1989.
- FERRARIO, M.E. et al. Potentially toxic species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Argentinian coastal waters. **Nova Hedwigia**, v. 68, p. 131-147, 1999.
- FIGUEROA-TORRES, M.G.; ZEPEDA-ESQUIVEL, M.A. Mareas rojas del Puerto Interior, Colima, México. **Scientiae Naturae**, v. 3, p. 39-52, 2001.
- FONSECA, R.S. **Monitoramento de ácido domóico em moluscos cultivados na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha - SC)**. Itajaí, 2003. 40p. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade do Vale do Itajaí.
- FRAGA, S.; BRAVO, I.; REGUERA, B. Poleward surface current at the shelf break and blooms of *Gymnodinium catenatum* in Ria Vigo (NW Spain). In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 245-249.
- FRAGA, S. et al. Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and shellfish toxicity in Ria de Vigo, Spain. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 27, p. 349-361, 1988.
- FRAGA, S. et al. *Gyrodinium impudicum* sp. nov. (Dinophyceae), a nontoxic, chain forming, red tide dinoflagellate. **Phycologia**, v. 34, p. 514-521, 1995.

- FRANCA, S. et al. The toxin profile of some PSP producing dinoflagellates occurring in the Portuguese coastal waters as determined by alternative analytical methods. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996, 519-522.
- FRITZ, L. et al. An out-break of domoic acid and poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 438-442, 1992.
- FRYXELL, G.A.; REAP, M.E.; VALENCIC, D.L. *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseries* Hasle: observations of a known neurotoxic diatom. **Nova Hedwigia, Belh.**, v. 100, p. 171-188. 1990.
- GÁRATE-LIZÁRRAGA, I. et al. Red tides along the coasts of the Baja California Sur, México (1984 to 1999). **Oceánides**, v. 16, p. 127-134, 2001
- GÁRATE-LIZÁRRAGA, I. et al. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. **Baseline / Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 378-402, 2004.
- GARRISON, D.L. et al. Confirmation of domoic acid production by *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 604-607, 1992.
- GAUSS, C.-M. et al. A molecular modeling analysis of the binding interactions between okadaic acid class of natural product inhibitors and the ser-thr phosphatases, PP1 and PP2A. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 5, p. 1751-1773, 1997.
- GESHER, B.D. et al. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. **Toxicon**, v. 35, p. 711-722, 1997.
- GISSELSON, L.-Å. et al. *Dinophysis* blooms in the deep euphotic zone of the Baltic Sea: do they grow in the dark? **Harmful Algae**, v. 1, p. 401-418, 2002.
- GLIBERT, P.M. et al. Harmful algal blooms in the Chesapeake and coastal Bays of Maryland, USA: comparison of 1997, 1998, and 1999 events. **Estuaries**, v. 24, p. 875-883, 2001.
- GRANÉLI et al. Harmful algal blooms in European marine and brackish waters. **Res. Encl. Seas Ser.**, v. 5, p. 1-93, 1999.
- GRZEBYK, D.; BERLAND, B. Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. **Journal of Plankton Research**, v. 18, p. 1837-1849, 1996.
- GUILLARD, R.L.R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.I.; CHANLEY, M.H. (Eds.) **Culture of marine invertebrates**. New York: Plenum, 1975, p. 29-59.
- GUO, C.; TESTER, P.A. Toxic effect of the bloom-forming *Trichodesmium* sp. (Cyanophyta) to the copepod *Acartia tonsa*. **Nat. Toxins**, v. 2, p. 222-227, 1994.
- HALLEGRAEFF, G.M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. **Phycology**, v. 32, p. 79-99, 1993.
- HALLEGRAEFF, G.M. Species of the diatom genus *Pseudonitzschia* in Australian waters. **Botanica Marina**, v. 37, p. 397-411, 1994.
- HALLEGRAEFF, G.M. Harmful Algal Blooms: a global overview. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Ed.). **Manual on Harmful Marine Microalgae – Monographs on oceanographic methodology 11**. Paris: UNESCO, 2003, p. 25-50.
- HALLEGRAEFF, G.M.; BOLCH, C.J. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ship' ballast water: Implications for plankton biogeography and aquaculture. **Journal of Plankton Research**, v. 14, p. 1067-1084, 1992.
- HALLEGRAEFF, G.M.; FRAGA, S. Blooms dynamics of the toxic *Gymnodinium catenatum*, with emphasis on Tasmanian and Spanish coastal waters. In: ANDERSON, D.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.H. (Ed.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**: NATO ASI, Series, n.41, 1998, p.59-80.
- HALLEGRAEFF, G.M.; JEFFREY, S.W. Tropical phytoplankton species and pigments of continental shelf waters of north and north-west Australia. **Mar. Ecol., Prog. Ser.**, v. 20, p. 59-74, 1984.
- HALLEGRAEFF, G.M. et al. *Chattonella marina* raphidophyte bloom associated with mortality of cultured bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in South Australia. In: In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago del Compostela: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998, p. 93-96.
- HAMANO, Y.; KINOSHITA, Y.; YASUMOTO, T. Suckling mice assay for diarrhetic shellfish toxins. In: ANDERSON, D.M.; WHITE, A.W.; BADEN, D.G. (Ed.). **Toxic Dinoflagellates**. New York: Elsevier, 1985, p. 383-388.
- HANSEN, E.; ERNSTSEN, A.; EILERTSEN, H.C. Isolation and characterisation of a cytotoxic polyunsaturated aldehyde from the marine phytoplankter *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim. **Toxicology**, v. 199, p. 207-217, 2004.
- HANSEN, E. et al. Anti-mitotic activity towards sea urchin embryos in extracts from the marine haptophycean *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim collected along the coast of northern Norway. **Toxicon**, v. 41, p. 803-812, 2003.

- HARA, Y.; CHIHARA, M. Morphology, ultrastructure, and taxonomy of the Raphidophycean alga *Heterosigma akashiwo*. **Bot. Mag. Tokyo**, v. 100, p. 151-163, 1987.
- HARA, Y.; DOI, K.; CHIHARA, M. Four new species of *Chattonella* (Raphidophyceae, Chromophyta) from Japan. **Japanese Journal of Phycology**, v. 42, p. 407-420, 1994.
- HARD, J.J.; et al. Genetic variation in mortality of chinook salmon during a bloom of the marine alga *Heterosigma akashiwo*. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 1387-1397, 2000.
- HARRIS, G.P. **Phytoplankton Ecology – Structure, function and fluctuation**. Chapman and Hall Ltd.: London, 1986. 384p.
- HARRISSON, P.J. et al. Survey of selenium requirements in marine phytoplankton. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 47, p. 89-96, 1988.
- HASLE, G.R. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. **Skr. Norske Vidensk-Akad. I. Mat.-Nat. Kl. Ny Serie**, v. 18, p. 1-45, 1965.
- HASLE, G.R. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriata* (Bacillariophyceae): nomenclatural history, morphology and distribution. **Journal of Phycology**, v. 31, p. 428-435, 1995.
- HASLE, G.R. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? **Harmful Algae**, v. 1, p. 137-146, 2002.
- HASLE, G.R.; FRYXELL, G.A., Taxonomy of diatoms. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Ed.). **Manual on Harmful Marine Microalgae: IOC Manual and Guides**, n. 33. Paris: UNESCO Publishers, 1995, p. 339–364.
- HASLE, G.R.; SYVERTSEN, E.E. Marine diatoms. In: Tomas, C.R. (Ed.). **Identifying marine diatoms and dinoflagellates**. San Diego: Academic Press, 1996, p. 5-385.
- HASLE, G.R.; LANGE, C.B.; SYVERTSEN, E.E. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. **Helgol. Meeresunters**, v. 50, p. 131-175, 1996.
- HAWSER, S.P. et al. A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. **Toxicon**, v. 29, p. 277-278, 1991.
- HAWSER, S.P. et al. Toxicity of blooms of the cyanobacterium *Trichodesmium* to zooplankton. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 79-86, 1992.
- HÉGARET, H.; WIKFORS, G.H. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. **Harmful Algae**, v. 4(2), p. 187-199, 2005(a).
- HÉGARET, H.; WIKFORS, G.H. Effects of natural and field-simulated blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. **Harmful Algae**, v. 4(2), p. 201-209, 2005(b).
- HENDERSON, A.R.; DAVIES, I.M. Review of aquaculture, its regulation and monitoring in Scotland. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 16, p. 200-208, 2000.
- HERSHBERGER, P.K. et al. *Heterosigma* bloom and associated fish kill. **Harmful Algae News**, v. 16, p. 1 & p. 4, 1997.
- HOEK, C. van den; MANN, D.G.; JAHNS, H.M.. **Algae - An introduction to phycology**. Cambridge University Press: Cambridge, 1st ed., 1995. 627p.
- HONJO, T. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 33-41.
- HONJO, T.; TABATA, K. Growth dynamics of *Olisthodiscus luteus* in outdoor tanks with flowing coastal water and in small vessels. **Limnology and Oceanography**, v. 30, p. 653-664, 1985.
- HOOD, R.R.; MICHAELS, A.F.; CAPONE, D.G. Answers sought to the enigma of marine nitrogen fixation. **EOS**, v. 81, p. 138-139, 2000.
- HORNER, R.A.; POSTEL, J.R. Toxic -diatoms in western Washington waters. **Hydrobiologia**, v. 269/270, p. 197-205, 1993.
- HORNER, R.A.; GARRISON, D.L.; PLUMLEY, F.G. Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S. West Coast. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1076-1088, 1997.
- HU, T. et al. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. **J. Nat. Prod.**, v. 55, p. 1631–1637, 1992.
- IMAI, I. Ecological control of *Chattonella* red tides by diatoms. **Kaiyo Monthly**, v. 27, p. 603-612, 1995.
- IMAI, I.; ITAKURA, S.; ITOH, K. Cysts of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo*, Raphidophyceae, found in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 59, p. 1669-1673, 1993.
- IMAI, I.; YAMAGUCHI, M.; WATANABE, M. Ecophysiology, life cycle, and bloom dynamics of *Chattonella* in the Seto Inland Sea, Japan. In: ANDERSON, D.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.H. (Ed.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms: NATO ASI, Series**, n.41, 1998, p. 95-111.
- IOC Taxonomic Reference List of Toxic Plankton Algae. In: Intergovernmental Oceanographic Commission. <http://www.bi.ku.dk/ioc>, 2003. (on-line)

- IRWIN, A. et al. Cyst and radionuclide evidence demonstrate historic *Gymnodinium catenatum* dinoflagellate populations in Manukau and Hokianga Harbours, New Zealand. **Harmful Algae**, v. 2, p. 61-74, 2003.
- ISHIDA, H. et al. Study of neurotoxic shellfish poisoning involving New Zealand shellfish, *Crassostrea gigas*. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996, p. 491-494.
- ISHIMARU, T. et al. Culture of *Dinophysis fortii* and *D. acuminata* with the cryptomonad, *Plagioselmis* sp. In: AIBARA, K. et al. (Ed.). **Mycotoxins and Phycotoxins**. Tokyo: Japanese Assessment Mycotoxicology, 1988, p. 19-20.
- ISHIMATSU, A. et al. Respiratory, ionoregulatory and cardiovascular responses of the yellowtail *Seriola quinqueradiata* to exposure to the red tide plankton *Chattonella*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 56(2), p. 189-199, 1990.
- JACOBSON, D.M.; ANDERSEN, R.A. The discovery of mixotrophy in photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophyceae): light and electron microscopical observations of food vacuoles in *Dinophysis acuminata*, *D. norvegica* and two heterotrophic dinophysoid dinoflagellates. **Phycologia**, v. 33, p. 97-110, 1994.
- JOHANSSON, N.; GRANÉLI, E. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 239, p. 243-258, 1999(a).
- JOHANSSON, N.; GRANÉLI, E. Cell density, chemical composition and toxicity of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta) in relation to different N:P supply ratios. **Marine Biology**, v. 135, p. 209-217, 1999(b).
- JOHANSSON, N. et al. Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996, p. 277-280.
- KELLER, M.D. et al. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 23, p. 633-638, 1987.
- KEPPLER, C.J. et al. Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Harmful Algae**, v. 4(2), p. 275-285, 2005.
- KHAN, S.; ARAKAWA, O. ONOUE, Y. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. **Aquaculture Research**, v. 28, p. 9-14, 1997.
- KHAN, S. et al. Properties of the neurotoxins separated from a harmful red tide organism *Chattonella marina*. **Isr. J. Aquacult.**, v. 47, p. 137-141, 1995.
- KIM, D. et al. Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: possible involvement of NAD(P)H oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1524, p. 220-227, 2000.
- KNOPPERS, B.A.; BRANDINI, F.P.; THAMM, C.A.C. Ecological studies in the Bay of Paranaguá. II. Some physical and chemical characteristics. **Nerítica**, v. 2(1), p. 1-36, 1987.
- KORRINGA, P.; ROSKAM, R.T. An unusual case of mussel poisoning. International Council for the Exploration of the Sea. **C.M./ Shellfish Committee**, n. 49, 2 p., 1961.
- KOTAKI, Y. et al. Domoic acid production by an isolate of *Pseudo-nitzschia multiseriis*, a possible cause for the toxin detected in bivalves in Ofunato Bay, Japan. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996, p. 151-154.
- KOTAKI, Y. et al. Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseriis* isolated from Ofunato Bay, Japan. **Toxicon**, v. 37, p. 677-682, 1999.
- KOTAKI, Y. et al. Domoic acid production in *Nitzschia* isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 1057-1060, 2000.
- LANA, P. C. et al. The subtropical estuarine complex of Paranaguá Bay, Brazil. In: Selliger, U.; Kjerfve (Ed.). **Ecological Studies**, v. 144 - Coastal Marine Ecosystems of Latin America. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, p. 131-145.
- LANCELOT, C.; BILLEN, G.; BARTH, H. The dynamics of *Phaeocystis* in nutrient enriched coastal zones. **Water Pollution Research Report**, v. 23, p. 1-106, 1991.
- LANCELOT, C. et al. Autoecology of the Marine Haptophyte *Phaeocystis* sp. In: ANDERSON, D.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.H. (Ed.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**: NATO ASI, Series, n.41, 1998, p. 209-224.
- LANDSBERG, J.H. Neoplasia and biotoxins in bivalves: Is there a connection? **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 203-230, 1996.
- LANGDON, C. The significance of respiration in production measurements based on oxygen. **ICES mar. Sci. Symp.**, v. 197, p. 69-78, 1993.
- LAPOINTE, B. E.; CLARK, M. W. Nutrient input from the watershed and coastal eutrophication in the Florida Keys. **Estuaries**, v. 45, p. 465-76., 1992.
- LEE, J.H. Neurotoxin-producing diatom, *Pseudonitzschia pungens* Grunow f. *Multiseriis* Hasle, off the coastal waters of southern Korea. I. Morphological features. **Korean Journal of Phycology**, v. 9, p. 125-134, 1994.

- LEE, J.H.; BAIK, J.H. Domoic acid-producing *Pseudonitzschia pungens* f. *Multiseriis* from Jinhae Bay, Korea: morphology, growth and population dynamics. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC PHYTOPLANKTON, 7, 1995, Sendai. **Proceedings...** Sendai: International Society for the Study of Harmful Algae, 1995. p. 96.
- LEE, J.H. et al. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. **Agr. Biol. Chem.**, v. 51, p. 877-881, 1987.
- LEE, J.-S. et al. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, p. 147-152, 1989.
- LEFEBVRE, K.A.; DOVEL, S.L.; SILVER, M.W. Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. **Marine Biology**, v. 138(4), p. 693-700, 2001.
- LEGRAND, C. et al. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. **Phycologia**, v. 42, p. 406-419, 2003.
- LEWIS, N.I. et al. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis*. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 601-606.
- LI, Y.; SMAYDA, T.J. *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): On prediction of the week of bloom initiation and maximum during the initial pulse of its bimodal bloom cycle in Narragansett Bay. **Plankton Biology and Ecology**, v. 47(2), p. 80-84, 2000.
- LIN, Y.-C.; CHEN, J.-C. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 259, p. 109-119, 2001.
- LINCOLN, J.A. et al. Feeding, egg production, and egg hatching success of the copepods *Acartia tonsa* and *Temora longicornis* on diets of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* and the non-toxic diatom *Pseudo-nitzschia pungens*. **Hydrobiologia**, v. 453/454, p. 107-120, 2001.
- LLEWELLYN, L.; NEGRI, A.; QUILLIAM, M. High affinity for the rat brain sodium channel of newly discovered hydroxybenzoate saxitoxin analogues from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. **Toxicon**, v. 43, p. 101-104, 2004.
- LOPES, R.M. **Distribuição espacial, variação temporal e atividade alimentar do zooplâncton no complexo estuarino de Paranaguá**. Curitiba, 1997. Tese (Doutorado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- LOPES, R.M.; VALE, R.; BRANDINI, F.P. Composição, abundância e distribuição espacial do zooplâncton no complexo estuarino de Paranaguá durante o inverno de 1993 e o verão de 1994. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 46(2), p. 195-211, 1998.
- LUCAS, I.A.N.; VESK, M. The fine structure of two photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophyceae). **Journal of Phycology**, v. 26, p. 345-357, 1990.
- LUNDHOLM, N.; MOESTRUP, Ø. The marine diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* sp. nov. (Bacillariophyceae), morphology and phylogenetic relationships. **Phycologia**, v. 41, p. 594-605, 2002.
- LUNDHOLM, N. et al. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. **Phycologia**, v. 33, p. 475-478, 1994.
- LUNDHOLM, N. et al. Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. **Phycologia**, v. 36, p. 381-388, 1997.
- LUNDHOLM, N. et al. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* / *cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? **Journal of Phycology**, v. 39, p. 797-813, 2003.
- LUSH, G.J.; HALLEGRAEFF, G.M. High toxicity of the red tide dinoflagellate *Alexandrium minutum* to the brine shrimp *Artemia salina*. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and toxic algal blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996, p. 389-392.
- MACHADO, E.C. et al. Temporal and spatial dynamics of nutrients and particulate suspended matter in Paranaguá Bay, PR, Brazil. **Nerítica**, v. 11, p. 15-34, 1997.
- MACKENZIE, L.; BEAUCHAMP, T. ***Gymnodinium catenatum* in New Zealand: a new problem for public health and the shellfish industry**, 2001. Disponível em: <http://www.cawthron.org.nz/Assets/Gcat.pdf> Acesso em: 10 out. 2004.
- MACKENZIE, L. et al. Domoic acid and the New Zealand greenshell mussel (*Perna canaliculus*). In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 607-612.
- MACKENZIE, L. et al. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. **Harmful algae**, v. 4(1), p. 75-85, 2005.
- MADHUPRATAP, M.; SAWANT, S.; GAUNS, M. A first report on a bloom of the marine prymnesiophycean, *Phaeocystis globosa* from the Arabian Sea. **Oceanologica Acta**, v. 23, n. 1, p. 83-90, 2000.
- MAFRA JUNIOR, L.L. et al. Harmful algae and toxins in a Brazilian port area. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 11, 2004, Cape Town. **Abstracts...** Cape Town: International Society for the Study of Harmful Algae, 2004. p. 176.

- MALDONADO, M.T. et al. The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *Pseudo-nitzschia australis*. **Limnology and Oceanography**, v. 47(2), p. 515–526, 2002.
- MANABE, T.; ISHIO, S. Bloom of *Coscinodiscus wailesii* and DO déficit of bottom water in Seto Inland Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 23, p. 181-184, 1991.
- MARCAILLOU, C. et al. *Dinophysis acuminata* distribution and specific toxin content in relation to mussel contamination. In: Hallegraeff, G.M. et al. (Ed.). **Harmful Algal Blooms 2000**. Paris: IOC of UNESCO, 2001. p. 356-359.
- MARONE, E.; CAMARGO, R. Marés meteorológicas no litoral do estado do Paraná: o evento de agosto de 1993. **Nerítica**, v. 8(1/2), p. 73-85, 1994.
- MARSHALL, J.-A.; HOVENDEN, M.; HALLEGRAEFF, G.M. Photosynthesis does influence reactive oxygen species production in the red tide alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae). **Journal of Plankton Research**, v. 142, p. 1231-1236, 2002.
- MARSHALL, J.-A. et al. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. **Harmful Algae**, v. 2, p. 273-281, 2003.
- MARTIN, J.L. et al. *Nitzschia pseudodelicatissima* – a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 67, p. 177-182, 1990.
- MATOS, M.C.F.G.; SANTOS, V.S.; VILLAC, M.C. Composição e distribuição do gênero *Pseudo-nitzschia* na Baía de Guanabara, RJ. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FICOLOGIA, 9, 2002, Aracruz. **Anais...** Aracruz: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2002. p. 156.
- MAZOTTO, J. et al. Effect of stocking density and temperature on survival of *Litopenaeus vannamei* larvae during metamorphosis from nauplii to protozoa I. In: AQUICULTURA BRASIL, 2000, Florianópolis. **Proceedings...** Florianópolis, 2000. p.45.
- MEDLIN, L.K. et al. Molecular biology and systematics. In: GREEN, J.C.; LEADBEATER, B.S.C. (Ed.). **The Haptophyte Algae**. Systematics Association Special Vol. No. 51. Oxford: Clarendon Press, 1994, p. 393-411.
- MEE, L.D.; ESPINOSA, M.D.; DÍAZ, G. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the pacific coast of México. **Marine Environmental Research**, v. 19, p. 17-92, 1986.
- MÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, M.L.; FRAGA, S. First detection of domoic acid in Galicia (NW of Spain). In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and toxic algal blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996, p. 143-145.
- MIRALTO, A. et al. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. **Nature**, v. 402, p. 173-176, 1999.
- MOESTRUP, Ø.; THOMSEN, H.A. Taxonomy of toxic haptophytes (Prymnesiophytes). In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEBELLA, A.D. (Ed.). **Manual on Harmful Marine Microalgae**: IOC Manuals and Guides n° 33. Paris: UNESCO, 1995, p. 319-338.
- MOITA, M.T. et al. Distribution of chlorophyll *a* and *Gymnodinium catenatum* associated with coastal upwelling plumes off central Portugal. **Acta Oecologica**, v. 24, p. S125-S132, 2003.
- MONDEGUER, F. et al. Aspect and toxicity of *Dinophysis cf. acuminata* associated with mussel toxicity in spring and autumn. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 10, 2002, St. Peter Beach. **Abstracts...** St. Peter Beach: International Society for the Study of Harmful Algae, 2002. p. 2021.
- MORALES-BLAKE, A.; HERNÁNDEZ-BECERRIL, D.U.; CAVAZOS-GUERRA, C. Registros de Mareas Rojas en las Bahías de Manzanillo, Colima, México. In: RÍOS-JARA, R. et al. (Ed.). **Estudios sobre plancton en México y el Caribe**. Guadalajara: Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara, 2000, p. 81-82.
- MOREIRA, M.O.P. **Distribuição temporal da diatomácea *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo na praia do Cassino, RS, e fisio-ecologia e toxicidade de *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle**. Rio Grande, 2004. 239 p. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande.
- MOREIRA-FILHO, H.; KUTNER, M.B.B. Contribuição ao conhecimento das diatomáceas do manguezal de Alexandra, Paraná. **Bol. Univ. Fed. Paraná, Bot.**, v. 4, p. 1-36., 1962.
- MOREIRA-FILHO, H.; VALENTE-MOREIRA, I.M. Catálogo das diatomáceas (Chrysophyta-Bacillariophyceae) marinhas e estuarinas do Estado do Paraná, Brasil. **Acta. Biol. Par.**, v. 13 (1,2,3,4), p. 3-49, 1984.
- MOREIRA-FILHO, H.; VALENTE-MOREIRA, I.M.; CECY, I.I.T. Diatomáceas da Baía de Paranaguá, Estado do Paraná, Brasil (Chrysophyta-Bacillariophyceae). **Bolm. Mus. Bot. Municipal**, v. 20, p. 1-25, 1975.
- MOROÑO, A. et al. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 269-280, 2003.
- MOS, L. Domoic acid: a fascinating marine toxin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 9, p. 79-85, 2001.
- NAGAI, S.; IMAI, I. Auxospore formation of a giant diatom *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae), in culture. **Bull. Plank. Soc. Japan**, v. 40, p. 151-167, 1994.

- NAGASAKI, K. et al. Identification of red tide algae *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua* by means of monoclonal antibodies. In: MIYACHI, S.; KARUBE, I.; ISHIDA, Y. (Ed.). **Current topics in marine biotechnology**. Tokyo: Fuji Technology Press Ltd., 1989, p. 161-164.
- NAKAMURA, Y.; WATANABE, M. Growth characteristics of *Chattonella antiqua* Part 2. Effects of nutrients on growth. **J. Oceanogr. Soc. Japan**, v. 39, p. 151-155, 1983.
- NAKANISHI, K. et al. Detection of the red tide-causing plankton *Chattonella marina* using a piezoelectric immunosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, p. 73-80, 1996.
- NAVES, J. L. **Uma abordagem da toxicidade em extratos de cultivos de dinoflagelados, gênero *Prorocentrum* e *Alexandrium*, do Canal de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2002. 115p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade de São Paulo.
- NEGRI, A.P. et al. Effects of the bloom-forming alga *Trichodesmium erythraeum* on the pearl oyster *Pinctada máxima*. **Aquaculture**, v. 232, p. 91-102, 2004.
- NEHRING, S. Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea. Supposed regions of origin and possible transport vector. **Arch. Fish. Mar. Res.**, v. 46, p. 181-194, 1998.
- NISHITANI, G.; SUGIOKA, H.; IMAI, I. Seasonal distribution of species of the toxic dinoflagellate genus *Dinophysis* in Maizuru Bay (Japan), with comments on their autofluorescence and attachment of picophytoplankton. **Harmful algae**, v. 1, p. 253-264, 2002.
- ODA, T. et al. Hydroxyl radical generation by red tide algae. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 294, p. 38-43, 1992(a).
- ODA, T. et al. Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. **Marine Biology**, v. 112, p. 505-509, 1992(b).
- ODA, T. et al. Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 61, p. 1658-1662, 1997.
- ODA, T. et al. Lectin-induced enhancement of superoxide anion production by a red tide phytoplankton. **Marine Biology**, v. 131, p. 383-390, 1998.
- ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Raphidophycean in southern Brazil. **Harmful Algal News**, n. 12/13, p. 4, 1995. (Agardh) Kutzing in Argentina. **Diatom Research**, v. 13(2), p. 223-336, 1998.
- ODEBRECHT, C.; MÉNDEZ, S.; GARCIA, V.M.T.. Oceanographic processes and harmful algae blooms in the Subtropical Southwestern Atlantic. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 8, 1997, Vigo. **Abstracts...** Vigo: International Society for the Study of Harmful Algae, 1997. p. 152.
- ODEBRECHT, C. et al. The distribution of the genus *Pseudo-nitzschia* off southern Brazil and relationships with oceanographic conditions. In: HALLEGRAEFF, G.M. et al. (Ed.), **Harmful Algal Blooms 2000**. Paris: IOC of UNESCO, 2001, p. 42-45.
- ODEBRECHT, C. et al. Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso. In: SAR, E.A.; FERRARIO, M.E.; REGUERA, B. (Ed.) **Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano**. Vigo: Instituto Español de Oceanografía, 2002, p. 219-233.
- OKAICHI, T. Red tide problems in the Seto Inland Sea, Japan. In: OKAICHI, T.; ANDERSON, D.M.; NEMOTO, T. (Ed.). **Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology**. New York: Elsevier Science Publishing, 1989, p. 137-142.
- ONO, K.; KHAN, S.; ONOUE, Y. Effects of temperature and light intensity on the growth and toxicity of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 427-433, 2000.
- OSHIMA, Y. Post-Column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Ed.). **Manual on Harmful Marine Microalgae: IOC Manuals and Guides n° 33**. Paris: UNESCO, 1995, p. 81-94.
- OSHIMA, Y. et al. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: GRANÉLI, E. et al. (Ed.). **Toxic Marine Phytoplankton**. New York: Elsevier, 1990, p. 391-396.
- OSHIMA, Y.; BLACKBURN, S.I.; HALLEGRAEFF, G.M. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. **Marine Biology**, v. 116, p. 471-476, 1993.
- PAN, Y.; BATES, S.S.; CEMBELLA, A.D. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physio-logical perspective. **Natural Toxins**, v. 6, p. 127-135, 1998.
- PAN, Y. et al. *Pseudo-nitzschia* sp. cf. *pseudodelicatissima* – a confirmed producer of domoic acid from the northern Gulf of Mexico. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 220, p. 83-92, 2001.
- PARSONS, T. R.; TAKAHASHI, M. HARGRAVE, B. **Biological Oceanographic Processes**. Oxford: Pergamon Press, 1984. 330 p.
- PARSONS, T. R. et al. *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in Louisiana coastal waters: molecular probe field trials, genetic variability and domoic acid analyses. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 1368-1378, 1999.
- PASSOW, U.; WASSMANN, P. On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii* (Harlot): IV. The formation of marine snow by *P. pouchetii*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 104, p. 153-161, 1994.

- PENNOCK, J. R. Chlorophyll Distribution in the Delaware Estuary: Regulation by light-limitation, **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 21, p. 711-725, 1985.
- PEPERZAK, L. Daily irradiance governs growth rate and colony formation of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). **Journal of Plankton Research**, v. 15, p. 809-821, 1993.
- PEREIRA, A.D., et al. Improvement to the HPLC-Fluorescence analysis method for the determination of acid DSP toxins. In: LASSUS, P. et al. (Ed.) **Harmful Marine Algal Blooms**, Paris: Lavoisier, 1995. p. 33-38.
- PERL, T.M. et al. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. **N. Eng. J. Med.**, v. 322, p. 1775-1780, 1990.
- PERSICH, G.R. **Estudos sobre a fisiologia, genética e toxicidade do dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech do sul do Brasil**. Rio Grande, 2001. 100 p. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande.
- PERSICH, G.R.; GARCIA, V.M.T.; ODEBRECHT, C. Microalgas potencialmente nocivas na costa do Rio Grande do Sul. In: SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 11, 1998, Rio Grande. **Anais...** Rio Grande: Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 1998. p. 261-263.
- POCKLINGTON, R. et al. Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton: by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, vol. 38, p. 351-368, 1990.
- PREMAZZI, G.; VOLTERRA, L. **Microphyte Toxins**. Luxembourg: Office of Official Publications of the European Communities, 1993. 338 p.
- PRESTON, N.P.; BURFORD, M.A.; STENZEL, D.J. Effects of *Trichodesmium* spp. blooms on penaeid prawn larvae. **Marine Biology**, v. 131, p. 671-679, 1998.
- PROCOPIAK, L.K. **Diatomáceas (Bacillariophyta) em águas de lastro de navios do Porto de Paranaguá, e na Baía de Paranaguá, PR, com ênfase em espécies exóticas e nocivas**. Curitiba, 2004. 224 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- PROENÇA, L.A.O. Clorofila *a* do fitoplâncton em seis enseadas utilizadas para o cultivo de moluscos bivalves no litoral de Santa Catarina. **Notas Técnicas da FACIMAR**, v. 6, p. 33-44, 2002.
- PROENÇA, L.A.O.; FERNANDES, L.F. Introdução de microalgas no ambiente marinho: impactos negativos e fatores controladores. In: (SILVA, J.S.V.; SOUZA, R.C.C.L.) **Água de Lastro e Bioinvasão**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. p. 77-97.
- PROENÇA, L.A.O.; MAFRA JUNIOR, L.L. Ocorrência de ficotoxinas na costa brasileira. **Série Livros do Museu Nacional.**, 2005 (no prelo).
- PROENÇA, L.A.O.; OLIVEIRA, G.F. Análise do ácido domóico em moluscos cultivados no litoral de Santa Catarina. **Notas Técnicas da FACIMAR**, v. 3, p. 27-32, 1999.
- PROENÇA, L.A.O.; TAMANAHA, M.S.; SOUZA, N.P. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. **Atlântica**, Rio Grande, v. 23, p. 59-65, 2001.
- PROENÇA, L.A.O. et al. Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 50(6), p. 458-462, 1998.
- PROENÇA, L.A.O. et al. Produção de ácido okadaico, uma toxina diarreica, por *Dinophysis acuminata* em Santa Catarina. **Atlântica**, Rio Grande, v. 21, p. 121-127, 1999(a).
- PROENÇA, L.A.O., et al. Occurrence of paralytic shellfish poisoning -PSP in southern Brazilian waters. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1, p. 16-21, 1999(b).
- PROENÇA, L.A.O., et al. Seven years of phycotoxins and harmful algae monitoring in Armação do Itapocoy, southern Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 11, 2004, Cape Town. **Abstracts...** Cape Town: International Society for the Study of Harmful Algae, 2004(a). p. 213.
- PROENÇA, L.A.O., et al. Annual phytoplankton distribution in a eutrophic subtropical bight in southern Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 11, 2004, Cape Town. **Abstracts...** Cape Town: International Society for the Study of Harmful Algae, 2004(b). p. 214.
- QI, Y. et al. Occurrence of red tides on the coasts of China. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 43-46.
- QUILLIAM, M. A.; XIE, M.; HARDSTAFF, W. R. A rapid extraction and cleanup procedure for the liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. In: HALLEGRAEFF, G. M., ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Ed.). **Manual on Harmful Marine Microalgae**. Paris: UNESCO, 1995. p. 95-112.
- QUILLIAM, M. A. et al. Production of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996. p. 289-292.
- REAP, M.E. ***Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseriata* Hasle**: growth phase and toxicity of clonal cultures isolated from Galveston, Texas. Galveston, 1991. 77 p. Thesis (M.Sc.) – Texas A&M University.
- REIS FILHO, R.W. **Estudos preliminares envolvendo testes de toxicidade embrio-larvais com o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**. Itajaí, 1999. 48 p. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade do Vale do Itajaí.

- REGUERA, B. **Biología, autoecología y toxicología de las principales especies del género *Dinophysis*, asociadas a episodios de intoxicación diarreogénica por bivalvos (DSP)**, Barcelona, 2003. 298 p. Tesis (Doctoral) – Departamento de Ecología, Universidad de Barcelona.
- REGUERA, B.; BRAVO, I.; FRAGA, S. Autoecology and some life history stages of *Dinophysis acuta* Ehrenberg. **Journal of Pankton Research**, v. 17, p. 999-1015, 1995.
- RENSEL, J.E. Severe blood hypoxia of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to the marine diatom *Chaetoceros concavicornis*. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Developments in Marine Biology**. New York: Elsevier Science Publishing, 1993, p. 625-630. v. 3: Toxic phytoplankton blooms in the sea.
- REYNOLDS, C.S. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 384p.
- RHODES, L. Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 32, p. 537-544, 1998.
- RHODES, L.; ADAMSON, J.; SCHOLIN, C. *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 34, p. 463-467, 2000.
- RHODES, L.; SCHOLIN, C.; GARTHWARTE, I. *Pseudo-nitzschia* in New Zealand and the role of DNA probes and immunoassays in refining marine biotoxin monitoring programmes. **Natural Toxins**, v. 8, p. 105-111, 1999.
- RHODES, L. et al. *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production *in vitro* and links with shellfish toxicity. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996. p. 155-158.
- RHODES, L. et al. New records of domoic acid (DA) producing *Pseudo-nitzschia* species deduced by concurrent use of whole cell DNA probe-based and DNA immunochemical assays. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 8, 1997, Vigo. **Abstracts...** Vigo: International Society for the Study of Harmful Algae, 1997. p. 103.
- RICK, H.J.; DÜRSELEN, C.D. Importance and abundance of the recently established species *Coscinodiscus wailesii* Gran et Angst in the German Bight. **Helgolander Meeresun**, v. 49, p. 355-374, 1995.
- RIEGMAN, R.; Van BOEKEL, W. The ecophysiology of *Phaeocystis globosa*: a review. **Journal of Sea Research**, v. 35, p. 235-242, 1996.
- RIEGMAN, R.; NOORDELOOS, A.A.; CADEE, G.C. *Phaeocystis* blooms and eutrophication of the continental zones of the North Sea. **Marine Biology**, v. 112, p. 479-484, 1992.
- RIGBY, G.; HALLEGRAEFF, G.M. The transfer and control of harmful marine organisms in shipping ballast water: Behaviour of marine plankton and ballast water exchange trials on the MV "Iron Whyalla". **Journal of Marine Environmental Engineering**, v. 1, p. 91-110, 1994.
- RINCÉ, Y.; PAULMIER, G. Dones nouvelles sur la distribution de la diatomée marine *Coscinodiscus wailesii* Gran et Angst (Bacillariophyceae). **Phycologia**, v. 25, p. 73-79, 1986.
- RÖRIG, L.R. et al. Studies on the ecology and toxicity of *Trichodesmium* spp. blooms in southern Brazilian coastal waters. In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago del Compostella: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998, p. 22-25.
- ROSEMBERG, R.; LINDAHL, O.; BLANCK, H. Silent spring in the sea. **Ambio**, v. 17, p. 289-290, 1988.
- ROUSSEAU, V.; MATHOT, S.; LANCELOT, C. Calculating carbon biomass of *Phaeocystis* sp. from microscopic observations. **Marine Biology**, v. 107, p. 305-314, 1990.
- ROUSSEAU, V. et al. The life cycle of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae): evidence and hypotheses. **J. Mar. Syst.**, v. 5, p. 23-39, 1994.
- ROY, S.; HARRIS, R.P.; PULET, S.A. Inefficient feeding by *Calanus helgolandicus* and *Temora longicornis* on *Coscinodiscus wailesii*: quantitative estimation using chlorophyll-type pigment and effects on dissolved free amino acid. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 52, p. 145-153, 1989.
- RUIZ, G. M. et al. Global spread of microorganisms by ships. **Nature**, v. 408, p. 49-50, 2000.
- SALA, S.E.; SAR, E.A.; FERRARIO, M.E. Review of materials reported as containing *Amphora coffeaeformis*
- SALOMON, P.; JANSON, S.; GRANÉLI, E. Parasitism of *Dinophysis norvegica* by Amoebophrya sp. in the Baltic Sea. **Aquat. Microb. Ecol.**, v. 33, p. 163-172, 2003.
- SAMPAYO, M.A. de M. Trying to cultivate *Dinophysis* spp. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 807-810.
- SAMPAYO, M.A. de M. et al. *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: GRANÉLI, E. et al. (Ed.). **Toxic Marine Phytoplankton**. New York: Elsevier, 1990, p. 215-220.
- SÁNCHEZ-MATA, A.; MORA, J. A review of marine aquaculture in Spain: production, regulations and environmental monitoring. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 16, p. 209-213, 2000.
- SARNO, D.; DAHLMANN, J. Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). **Harmful Algae News**, v. 21, p. 5, 2000.

- SATO, S.S.; PARANAGUÁ, M.N.; ESKINAZI, E. On the mechanism of red tide of *Trichodesmium* in Recife, Northeastern Brazil, with some consideration of the relation to the human disease, "Tamadaré Fever". **Trabalhos do Instituto Oceanográfico**, Recife, v. 5/6, p. 7-49, 1964.
- SAYCE, K.; HORNER, R.A. *Pseudo-nitzschia* spp. in Wilapa Bay, Washington, 1992 and 1993. In: YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; FUKUYO, Y. (Ed.). **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Paris: IOC of UNESCO, 1996. p. 131-134.
- SCARRATT, A.M.; SCARRATT, D.J.; SCARRATT, M.G. Survival of live *Alexandrium tamarense* cells in mussel and scallop spat under simulated transfer conditions. **Journal of Shellfish Research**, v. 12, p. 383-388, 1993.
- SCHANZ, E.J. Historical perspective on paralytical shellfish poisoning. In: RAGELIS, M. (Ed.) **Seafood Toxins**, ACS - Symposium Series 262. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1984. p. 99-111.
- SCHMIT, F.; PROENÇA, L.A.O. Ocorrência de dinoflagelados do gênero *Dinophysis* (Enrenberg, 1839) na enseada de Cabeçudas (verão e outono de 1999). **Notas Técnicas da FACIMAR**, v. 4, p. 49-59, 2000.
- SCHNEPF, E.; ELBRÄCHTER, M. *Dinophysis* Ehrenb.: Evolutionary, phylogenetic and toxicological implications. **Bot. Acta**, v. 101, p. 196-203. , 1988.
- SCHOLIN, C.A.; HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M. Molecular evolution and global dispersal of the *Alexandrium tamarense* / *catenella* species complex. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC MARINE PHYTOPLANKTON, 6, 1993, **Abstracts...**, 1993. p. 174.
- SCHOLIN, C.A. et al. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. **Nature**, v. 403, p. 80-84, 2000.
- SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C. & CASTELLO, J.P., **Os ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil**. Rio Grande: Ecoscintia, 1998. 326p.
- SEGUEL, M.R. **Interactive effects of temperature-light and temperature-salinity on growth of five phytoplanktonic species isolated from a shallow-water embayment of Nova Scotia**. Wolfville, 1991. 218 p. Thesis (M.Sc.) – Acadia University.
- SETÄLÄ, O. et al. Survival and photosynthetic activity of different *Dinophysis acuminata* populations in the northern Baltic Sea. **Harmful Algae**, v. 4(2), p. 337-350, 2005.
- SHIMIZU, Y. et al. Dinoflagellate and other microalgal toxins: chemistry and biochemistry. **Pure Applied Chemistry**, v. 61, p. 513-516, 1989.
- SHUMWAY, S.E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 21, p. 65-104, 1988.
- SIELING, B.; LIPTON, D. Fish Health in Chesapeake Bay: *Pfiesteria's* Impact on Seafood Industry Sales. In: Maryland Sea Grant, University System of Maryland, <http://www.mdsg.umd.edu/fish-health/pfiesteria/pfeconomics/index.html>, 1998. (on-line)
- SIERRA-BELTRÁN, A. et al. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. **Toxicon**, v. 35, p. 447-453, 1997.
- SKOV, J.; DO, T.B.L.; TON, T.P. Bacillariophyceae. In: LARSEN, J.; LAM, N.N. (Ed.). **Guide to the identification of potentially toxic microalgae in Vietnamese coastal waters**. Opera Botanica, 2003.
- SMAYDA, T.J. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: Graneli, E. et al. (Ed.). **Toxic marine phytoplankton**. New York: Elsevier Science Publishing, 1990, p. 29-40.
- SMAYDA, T.J. Ecophysiology and Bloom Dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). In: ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.M. (Eds.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Berlin: Springer-Verlag, 1998. p. 113-131.
- SMAYDA, T.J. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1137-1153, 1997(a).
- SMAYDA, T.J. What is a bloom? A commentary. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1132-1136, 1997(b).
- SMITH, J.C. Toxicity and *Pseudonitzschia pungens* in Prince Edward Island, 1987-1992. **Harmful Algae News**, n. 6, p. 29-40, 1993.
- SMITH, J.C. et al. Variation in domoic acid levels in *Nitzschia* species: implication for monitoring programs. **Bulletin of the Aquaculture Association of Canada**, v. 90, p. 27-31, 1990.
- SMITH, J.C. et al. Growth and domoic acid production and retention by *Nitzschia pungens* forma *multiseriata* at low temperatures. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 631-636.
- SOBRAL, A.P.; MANZONI, G.C. Respostas fisiológicas (comportamentais), do marisco *Perna perna* (Linnaeus, 1758), exposto a diferentes concentrações de óleo diesel (comercial) na água. In: SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 13, 2000, Itajaí. **Anais...** Itajaí: CTTMar/UNIVALI, 2000. p. 780-781.
- SOMMER, U. Are marine diatoms favoured by high Si:N ratios? **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 115, p. 309-315, 1994.
- SORDO, I. et al. An inshore poleward current in the NW of the Iberian Peninsula detected from satellite images, and its relation with *G. catenatum* and *D. acuminata* blooms in the Galician Rias. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 53, p. 787-799, 2001.

- SOURNIA A. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. In: Lassus P. et al. (Ed.). **Harmful marine algal blooms**. Paris: Lavoisier, Intercept. Ltd., 1995. p. 103-112.
- SOURNIA, A.; CHRETIENNOT-DINET, M.J.; RICARD, M. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? **Journal of Plankton Research**, v. 13, p. 1093-1099, 1991.
- SOUZA-MOSIMANN, R. M. et al. Diatoms from stomach contents of three shrimp species of artesanal marine fishery in Santa Catarina State, Brazil. **Insula**, v. 22, p. 83-106, 1993.
- STABELL, O.B.; AANESEN, R.T.; EILERTSEN, H.C. Toxic peculiarities of the marine alga *Phaeocystis pouchetii* detected by in vivo and in vitro bioassay methods. **Aquatic Toxicology**, v. 44, p. 279-288, 1999.
- STEWART, J.E. et al. Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, 456-p. 464, 1998.
- STOECKER, D.K. et al. Mixotrophy in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 152(1), p. 1-12, 1997.
- STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. **A Practical Handbook of Seawater Analysis**. 2nd ed. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1972.
- SUBBA RAO, D.V.; WOHLGESCHAFFEN, G.D. Morphological variants of *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseriata* Hasle. **Botanica Marina**, v. 33, p. 545-550, 1990.
- SUBBA RAO, D.V.; QUILLIAM, M.A.; POCKLINGTON, R. Domoic acid – a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 45, p. 2076-2079, 1988.
- SUBRAHMANYAN, R. On the life-history and ecology of *Hornelia marina* gen. et sp. nov. (Chloromonadineae) causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms off the Malabar Coast. **Indian J. Fish.**, v. 1, p. 182-203, 1954.
- SUBRAMANIAN, A. Detecting *Trichodesmium* blooms in SeaWiFS imagery. **Deep-Sea Research II**, v. 49, p. 107-121, 2002.
- SUMMERSON, H.C.; PETERSON, C.H. Recruitment failure of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*, during the first red tide, *Ptychodiscus brevis*, outbreaks recorded in North Carolina. **Estuaries**, v. 13(3), p. 322-331, 1990.
- SUVAPEPUN, S. Occurrences of red tide in the Gulf of Thailand. In: OKAICHI, T.; ANDERSON, D.M.; NEMOTO, T. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RED TIDES, 1987, Takamatsu (Japan). **Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology**. New York: Elsevier, 1989, p. 41-44.
- SUZUKI, T.; OTA, H.; YAMASAKI, M. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acetyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. **Toxicon**, v. 37, p. 187-198, 1999.
- SUZUKI, T. et al. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel *Perna canaliculus*. **Toxicon**, v. 39, p. 507-514, 2003(a).
- SUZUKI, T. et al. Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-2 seco acid in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. **Fish. Sci.**, v. 67, p. 506-510, 2003(b).
- TAKATANI, T. et al. Paralytic shellfish poison infestation to oyster *Crassostrea gigas* due to dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in Amakusa Islands, Kumamoto Prefecture. **Japanese of Food Hygienic Society of Japan**, v. 39, p. 292-295, 1998.
- TALEB, H.; IDRISSE, H.; BLAGHEN, M. Seasonality of PSP toxicity in shellfish from the Atlantic and Mediterranean coasts of Morocco. In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago del Compostela: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, 1998. p. 68-69.
- TALEB, H.; VALE, P.; BLAGHEN, M. Spatial and temporal evolution of PSP toxins along Atlantic shore of Morocco. **Toxicon**, v. 41, p. 199-205, 2003.
- TAMANAH, M.S. **Avaliação da toxicidade do extrato hidrossolúvel de *Heterosigma akashiwo* (rafidofíceia) Hada 1968**. Itajaí, 2001. 57 p. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade do Vale do Itajaí.
- TANIGUSHI, A.; TAKEDA, Y. Feeding rate and behavior of the tintinnid ciliate *Favela taraikaensis* observed with a high speed VTR system. **Marine Microbial Food Webs**, v. 3, p. 21-34, 1988.
- TAVARES, J.F.R., ODEBRECHT, C. e PROENÇA, L.A.O. Dinoflagelados tóxicos: um risco em área de maricultura (Armação de Itapocoroy, Penha - SC, 2000). In: SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 14, 2001, Rio Grande. **Anais...** Rio Grande: FURG, 2001. p. 271-273.
- TAVARES, J.F. et al. Harmful algae and phycotoxins in a mussel culture área, Brazil. In: X INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, St. Petersburg, 2002. **Abstracts...** St. Petersburg: International Society for the Study of Harmful Algae, 2002. p. 276.
- TAYLOR, F.J.R.; HAIGH, R. The ecology of fish-killing blooms of the chloromonad flagellate *Heterosigma* in the Strait of Georgia and adjacent waters. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 705-710.

- TENENBAUM, D.R. et al. Floração de rafdofíceia na Baía de Seperiba, Rio de Janeiro, Brasil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA e COLÓQUIO BRASILEIRO DE ALGAS NOCIVAS, 5 e 1, 1998, Itajaí, **Anais...** Itajaí: CTTMar/UNIVALI, 1998. p. 70.
- TERAO, K. et al. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin 1 and pectenotoxin 1. **Toxicol.**, v. 24, p. 1141-1151, 1986.
- TESTER, P.A.; PAN, Y.; DOUCETTE, G.J. Accumulation of domoic acid activity in copepods. In: HALLEGRAEFF, G.M. et al. (Ed.), **Harmful Algal Blooms 2000**. Paris: IOC of UNESCO, 2001. p. 418-420.
- TESTER, P.A. et al. An expatriate red tide bloom: transport, distribution, and persistence. **Limnol. Oceanogr.**, v. 36, p. 1953-1961, 1991.
- THOMPSON, P.A. Spatial and Temporal Patterns of Factors Influencing Phytoplankton in a Salt Wedge Estuary, the Swan River, Western Australia. **Estuaries**, v. 21, n. 4, p. 801-817, 1998.
- TODD, E.C.D. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning – A review. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 69-83, 1993.
- TODD, K. Role of phytoplankton monitoring in marine biotoxin programmes. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Ed.). **Manual on Harmful Marine Microalgae – Monographs on oceanographic methodology 11**. Paris: UNESCO, 2003, p. 649-656.
- TOMAS, C.R. *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae) I. Effects of salinity and temperature on growth, motility and survival. **Journal of Phycology**, v. 14, p. 309-313, 1978(a).
- TOMAS, C.R. *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae) II. Formation and survival of a benthic stage. **Journal of Phycology**, v. 14, p. 314-319, 1978(b).
- TOMAS, C.R. Blooms of potentially harmful raphidophycean flagellates in Florida coastal waters. In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago del Compostella: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, 1998. p. 101-103.
- TRAINER, V.L. et al. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia pungens*. In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago del Compostella: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, 1998. p. 337-340.
- TSENG, C.K.; ZHOU, M.J.; ZOU, J.Z. Toxic phytoplankton studies in China. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 347-352.
- TWINER, M.J.; TRICK, C.G. Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by the ichthyotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*. **Journal of Plankton Research**, v. 22, p. 1961-1975, 2000.
- TWINER, M.J.; DIXON, S.J.; TRICK, C.G. Extracellular organics from specific cultures of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) irreversibly alter respiratory activity in mammalian cells. **Harmful Algae**, v. 3, p. 173-182, 2004.
- TYLER, M.A.; SELIGER, H.H. Selection for a red tide organism: physiological responses to the physical environment. **Limnology and Oceanography**, v. 26, p. 310-324, 1981.
- UYE, S.; TAKAMATSU, K. Feeding interactions between planktonic copepods and red-tide flagellates from Japanese coastal waters. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 59, p. 97-107.
- VALE, P.; SAMPAYO, M.A. de M. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro Lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. **Toxicol.**, v. 40(7), p. 989-996, 2002.
- VALE, P.; SAMPAYO, M.A. de M. Seasonality of diarrhetic shellfish poisoning at a coastal lagoon in Portugal: rainfall patterns and folk wisdom. **Toxicol.**, v. 41, p. 187-197, 2003.
- VALENTE-MOREIRA, I.M. The marine and estuarine diatom flora in the balnearies of Canoas and Ipanema, Paraná State, Brazil. **Estudos de Biologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, v. 17, p. 26-48, 1987.
- VALENTE-MOREIRA, I.M.; MOREIRA-FILHO, H. Diatomáceas de Pontal do Sul, Município de Paranaguá, Estado do Paraná, Brasil (Chrysophyta-Bacillariophyceae). **Phycol. Lat. Amer.**, v. 1, p. 156-185, 1981.
- Van BOEKEL, W. *Phaeocystis* colony mucus components and the importance of calcium ions for colony stability. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 87, p. 301-305, 1992.
- Van DOLAH, F.M. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 1, p. 133-141, 2000.
- VENRICK, E.L. How many cells to count? In: SOURNIA, A. (Ed.) Phytoplankton manual. **Monogr. oceanogr. Methodol.**, v. 6, p. 167-180, 1978.
- VILLAC, M.C. et al. *Pseudonitzschia australis* Frenguelli and related species from the West Coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production. **Journal of Shellfish Research**, v. 12, n. 2, p. 457-465, 1993.
- VILLAC, M.C. Synecology of the genus *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from Monterey Bay, California, U.S.A. **PhD Thesis**, Texas A&M University, College Station, TX, 1996. 258 p.
- VILLAC, M.C.; TENENBAUM, D.R. The coastal *Pseudo-nitzschia* from the state of Rio de Janeiro, Brazil. In: HALLEGRAEFF, G.M. et al. (Ed.), **Harmful Algal Blooms 2000**. Paris: IOC of UNESCO, 2001. p. 34-37.

- VILLAREAL, T.A.; ROELKE, D.L.; FRYXELL, G.A. Occurrence of the toxic diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* in Massachusetts Bay, Massachusetts, U.S.A. **Mar. Environ. Res.**, v. 37, p. 417-423, 1994.
- VRIELING, E.G. et al. *Chattonella* and *Fibrocapsa* (Raphidophyceae): First observation of, potentially harmful, red tide organisms in Dutch coastal waters. **Netherlands Journal of Sea Research**, v. 33(2), p. 183-191, 1995.
- VRIELING, E.G. et al. Identification of a domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in the Dutch Wadden Sea with electron microscopy and molecular probes. **European Journal of Phycology**, v. 31, p. 333-340, 1996.
- WALZ, P.M. et al. Domoic acid- producing diatom blooms in Monterey Bay, California: 1991-1993. **Natural Toxins**, v. 2, p. 271-279, 1994.
- WARD, J.E.; TARGETT, N.M. Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behavior of the blue mussel *Mytilus edulis*. **Marine Biology**, v. 101, p. 313-321, 1989.
- WIKFORS, G.H.; SMOLOWITZ, R.M. Experimental and histological studies of four life-history stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. **Biol. Bull.**, Woods Hole City, v. 188, p. 313-328, 1995.
- WILSON, D.P. Na experimental search for phytoplanktonic algae producing external metabolites which condition natural sea waters. **Journal of Marine Biology Association UK**, v. 61, p. 585-607, 1981.
- WINDUST, A. **The responses of bacteria, microalgae and zooplankton to the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* and its toxic metabolite domoic acid.** Dalhousie, 1992. 107 p. Thesis (M.Sc.) – Dalhousie University.
- WOHLGESCHAFFEN, G.D.; SUBBA RAO, D.V.; MANN, K.H. Vat incubator with immersion core illumination – a new, inexpensive setup for mass phytoplankton culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 25-29, 1992.
- WOLFE, G.W. The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: constraints, mechanisms and impacts. **Biol. Bull.**, v. 198, p. 225-244, 2000.
- WORK, T.M. et al. Domoic acid intoxication of brown pelicans and cormorants in Santa Cruz, California. In: SMAYDA, T.J.; SHIMIZU, Y. (Ed.). **Developments in Marine Biology**. v. 3: Toxic phytoplankton blooms in the sea. New York: Elsevier Science Publishing, 1993, p. 643-649.
- XI, D.; RAMSDELL, J.S. Glutamate receptors and calcium entry mechanisms for domoic acid in hippocampal neurons. **Neuroreport**, v. 7, p. 1115-1120, 1996.
- YALLOP, M.L. Distribution patterns and biomass estimates of diatoms and autotrophic dinoflagellates in the NE Atlantic during June and July, 1996. **Deep-Sea Research**, v. 48, p. 825-844, 2001.
- YAMAGUCHI, M.; IMAI, I. A microfluorometric analyses of nuclear DNA at different stages in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). **Phycologia**, v. 33, p. 163-170, 1994.
- YAMAGUCHI, M.; IMAI, I.; HONJO, T. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth rates of the noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae). **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 57, p. 1277-1284, 1991.
- YAMOCHI, S. Mechanisms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay, Japan. Part 1. Nutrient factors involved in controlling the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada. **J. Ocean. Soc. Jpn.**, v. 39, p. 311-316, 1983.
- YANG, C.Z.; ALBRIGHT, L.J.; YOUSIF, A.N. Oxigen-radical-mediated effects of the toxic phytoplanker *Heterosigma carterae* on juveniles rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Dis. Aquatic Organisms**, v. 23, p. 101-108, 1995.
- YASUMOTO, T. et al. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. **Bull. Jap. Soc. Sc., Fish.**, v. 46, p. 1405-1411, 1978.
- YASUMOTO, T. et al. Diarrhetic shellfish poisoning. In: RAGELIS, E.P. (Ed.) **Seafood toxins, ACS Symposium Series, 262**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1984, p. 207-214.
- YASUMOTO, T. et al. Diarrhetic Shellfish Toxins. **Tetrahedron**, v. 41, p. 1019-1025, 1985.
- YONEDA, N.T. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha: Plâncton**, 1999. Disponível em: <<http://www.bdf.fat.org.br/workshop/costa/plancton>>. Acesso em: 24 set. 2004.
- ZEHNDER-ALVES, L. **Estabelecimento de cultivo da diatomácea *Coscinodiscus walesii* Gran & Angst (Bacillariophyta) em meios de cultura com água do mar enriquecida da Baía de Paranaguá, Paraná.** Curitiba, 2000. 41 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- ZENEON, O.; PREGNOLATTO, N.P. Memórias técnico-científicas da divisão de Bromatologia e Química. **Instituto Adolfo Lutz**, Florianópolis, p. 173-198, 1992. Edição comemorativa.
- ZINGONE, A.; ENEVOLDSEN, H.O. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. **Ocean e Coastal Management**, v. 43, p. 725-748, 2000.

ANEXOS

Anexo 1 Tabela de Somer, relacionando tempo de morte de camundongos injetados com extratos de PSP e unidades de toxicidade

Tempo de morte (min:s)	Mouse units (MU)	Tempo de morte (min:s)	Mouse units (MU)
1:00	100	5:00	1,92
:10	66,2	:05	1,89
:15	38,3	:10	1,86
:20	26,4	:15	1,83
:25	20,7	:20	1,80
:30	16,5	:30	1,74
:35	13,9	:40	1,69
:40	11,9	:45	1,67
:45	10,4	:50	1,64
:50	9,33		
:55	8,42	6:00	1,60
		:15	1,54
2:00	7,67	:30	1,48
:05	7,04	:45	1,43
:10	6,52		
:15	6,06	7:00	1,39
:20	5,66	:15	1,35
:25	5,32	:30	1,31
:30	5,00	:45	1,28
:35	4,73		
:40	4,48	8:00	1,25
:45	4,26	:15	1,22
:50	4,06	:30	1,20
:55	3,88	:45	1,18
3:00	3,70	9:00	1,16
:05	3,57	:30	1,13
:10	3,43		
:15	3,31	10:00	1,11
:20	3,19	:30	1,09
:25	3,08		
:30	2,98	11:00	1,075
:35	2,88	:30	1,06
:40	2,79		
:45	2,71	12:00	1,05
:50	2,63	13:	1,03
:55	2,56	14:	1,015
		15:	1,000
4:00	2,50	16:	0,99
:05	2,44	17:	0,98
:10	2,38	18:	0,972
:15	2,32	19:	0,965
:20	2,26	20:	0,96
:25	2,21	21:	0,954
:30	2,16	22:	0,948
:35	2,12	23:	0,942
:40	2,08	24:	0,937
:45	2,04	25:	0,934
:50	2,00	30:	0,917
:55	1,96	40:	0,898
		60:	0,875

Fonte: FERNÁNDEZ; CEMBELLA, 1995, p. 222-223.

Anexo 2 Correção dos valores de toxicidade pelo peso do camundongo

Peso do camundongo (g)	Mouse units (MU)
10	0,50
10,5	0,53
11	0,56
11,5	0,59
12	0,62
12,5	0,65
13	0,675
13,5	0,70
14	0,73
14,5	0,76
15	0,785
15,5	0,81
16	0,84
16,5	0,86
17	0,88
17,5	0,905
18	0,93
18,5	0,95
19	0,97
19,5	0,985
20	1,00
20,5	1,015
21	1,03
21,5	1,04
22	1,05
22,5	1,06
23	1,07

Fonte: FERNÁNDEZ; CEMBELLA, 1995, p. 226.