

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO REBELLO WADT

**Produção de ácido domóico por *Pseudo-nitzschia* spp. do sul do Brasil,  
respostas alimentares e acúmulo de toxinas por bivalves expostos.**

PONTAL DO PARANÁ

2014

PEDRO REBELLO WADT

**Produção de ácido domóico por *Pseudo-nitzschia* spp. do sul do Brasil,  
respostas alimentares e acúmulo de toxinas por bivalves expostos.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos. Curso de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Luiz Laureno Mafra Junior

PONTAL DO PARANÁ

2014

## CATALOGAÇÃO NA FONTE:

UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar

Liliam Maria Orquiza - CRB-9/712

Wadt, Pedro Rebello

W125p      Produção de ácido domóico por *Pseudo-nitzschia spp.* do sul do Brasil, respostas alimentares e acúmulo de toxinas por bivalves expostos. / Pedro Rebello Wadt. – Pontal do Paraná, 2014.

58 f.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Toxicologia. 2. ASP. 3. Maricultura. 4. Cultivo de bivalves. 5. Floração de algas nocivas. 6. Ácido domóico. 7. Brasil. I.Título. II. Mafra Junior, Luiz Laureno. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 551.47




## CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS

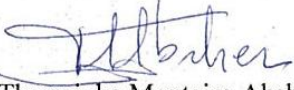
Centro de Estudos do Mar - Setor Ciências da Terra - UFPR

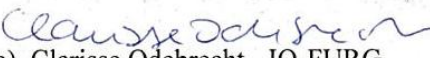
Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil  
Tel. (41) 3511-8644 - Fax (41) 3511-8648 - www.cem.ufpr.br - E-mail: pgsisco@ufpr.br

Ata da sessão pública de Defesa de Dissertação para obtenção do grau de Mestre(a) em Sistemas Costeiros e Oceânicos, área de concentração Dinâmica dos Ecossistemas Oceânicos e Costeiros. Aos trinta e um dias do mês de março de 2014, no anfiteatro do Centro de Estudos do Mar, às catorze horas, reuniu-se em sessão pública a Banca Examinadora da prova de Defesa de Dissertação do(a) candidato(a) ao Título de Mestre(a) em Sistemas Costeiros e Oceânicos, **Pedro Rebelo Wadt**, composta pelos seguintes membros: Dr(a). Luiz Laureno Mafra Júnior como orientador(a) e presidente(a), Dr(a). Theresinha Monteiro Absher - UFPR e Dr(a). Clarisse Odebrecht - IO-FURG, como examinadores. Após os esclarecimentos prestados pelo candidato às arguições feitas pelos membros da Banca, o(a) Sr(a). Presidente(a) suspendeu temporariamente a sessão a fim de que a Banca se reunisse em sessão secreta para deliberar sobre o resultado. Reaberta a sessão, o(a) Sr(a). presidente(a) deu conhecimento ao(a) candidato(a) que, de conformidade com o Art. 67 da Resolução 65/09 CEPE, a dissertação foi **aprovada**, apenas condicionada à apresentação, no prazo de sessenta dias, da redação final com as alterações sugeridas.

Pontal do Paraná, 31/03/2014.

  
Dr(a). Luiz Laureno Mafra Júnior  
Orientador(a) e Presidente(a)

  
Dr(a). Theresinha Monteiro Absher - UFPR  
Membro Examinador(a)

  
Dr(a). Clarisse Odebrecht - IO-FURG  
Membro Examinador(a)

Título da Dissertação: *“Crescimento e produção de toxinas por Pseudo-nitzschia spp. (Bacillariophyceae) e respostas alimentares de diferentes espécies de bivalves comerciais.”*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos aqueles que até o presente momento me deram o estímulo e as condições necessárias para me manter, evoluir, me manifestar e me defender. A todos estes professores sou diariamente grato, e esta gratidão se expressa em cada conquista minha.

Muito obrigado ao meu orientador Luiz Laurenno Mafra Júnior por ter me aceito no laboratório, e ter confiado a mim seu trabalho, por ter me orientado e oferecido sua amizade e paciência, ensinado tanto, e por ter aceitado meu estilo neandertalense e confuso de executar as tarefas designadas com bastante complacência e bom humor.

Também sou grato a todos aqueles que contribuíram na posição de co-autores deste trabalho e auxílio na identificação de espécies de microalgas, análises de ácido domóico, revisão e contribuição intelectual ; Dr. Luciano Felício Fernandes, Luiz Antônio Proença, Thiago Pereira alves, Mathias Alberto Schramm, Camila Tavares , Aline Fernanda Santi e Carolina Capel Godinho, bem como aos membros da banca avaliadora deste trabalho, Dra. Therezinha Monteiro Absher e Clarice Odebrescht.

Obrigado a quem tornou possível minha estadia e alimentação durante o tempo de mestrado, e aos órgãos responsáveis pelo financiamento do projeto e fornecimento de bolsa de estudos, CAPES e Cnpq, em especial ao coordenador do programa de pós graduação, Paulo da Cunha Lana, por concordar na aceitação de um zootecnista no programa de pós graduação em sistemas costeiros e oceânicos, e pelo auxílio na obtenção da bolsa de estudos.

Agradeço imensamente aos meus queridos pais, Luiz Guilherme e Eloisa Wadt, que me ensinaram desde andar e falar até parar e ficar quieto, e tudo que cabe ser ensinado na longa trajetória entre estes dois pontos, inclusive me ensinando a aprender, e me sustentando em todos os sentidos que a palavra pode assumir. Todas as ferramentas necessárias para evoluir e me expressar me foram dadas pela estrutura física e psicológica fornecida por estes dois professores.

Aos meus avós Pedro Magri, Romilda e Luth, e aos meus padrinhos Michelle e Carmem Cecília, por terem sido os técnicos e estrategistas fundamentais na implementação do plano de jogo dessa equipe chamada célula familiar. Obrigado por toda a orientação, bons exemplos e direcionamento. Vocês foram (e são) fundamentais.

A todos os meus amigos que me ensinaram a compreender melhor as diferenças entre as pessoas, a conviver em sociedade e a me ater a meus valores. Tantos amigos nestes 28 anos me ensinaram pouco a pouco a crescer com meus erros, compreender o próximo e ser menos defensivo. Muito obrigado a todos que viveram comigo em Ilha Solteira (Cabeça gorda e agregados), em especial, Thiago Andrade,

Luis Fernando Roque, Danilo Vinicius, Guilherme França, Sávio Mauro e Rodrigo Cassiano por terem sido verdadeiros professores nas disciplinas de convívio social e tomada de decisões, entusiastas do Vaka Ink e excelentes psicólogos.

Aos professores de artes marciais por terem lapidado um pouco a minha disciplina e me dado o material e a amizade necessários para a construção ou manutenção da minha auto-confiança; Luiz Sérgio, Noir Aranha, Fabrício Menegildo, Praxedes e Alex Ortiz.

Especialmente agradeço a todos os amigos que contribuíram ativamente na composição deste trabalho e no controle da situação em certos momentos; Eduardo Camargo, Viviane, Bruna Fernanda, Taty Ribas, Aline Fernanda, Iarema, Ícaro Cuesta, Rodrigo Olivo, Rafael Parizzi, André Menegotto, Dafne Borgo, Marcos (Bode), Evandro Tomelin, Beatriz Spuldaro, Nicole Paloschi, Natassia Zamariola, Thaís Félix, Jenifer Ramos, Bruno Garcia, Rodrigo e Roni Santana, Alexandre Losi, Daniel Gomes, etc, e em especial àquelas que me ensinaram os procedimentos práticos do trabalho laboratorial (além de serem ótimas companhias), Vanessa Coquemala, Daiana Lopes e Camila Tavares.

Por terem sido co-orientadores na interessante trajetória que me levou da granja de suinocultura ao fim do mestrado no laboratório de fitoplâncton, agradeço sinceramente aos orientadores da Unesp - Ilha Solteira João Carlos Cory (em memória), João Francisco Pereira Bastos, e a todos os co-orientadores informais deste trabalho: Lucas Balcão, Luis Sibar, Gustavo Geiser (Doutor gibão), Guilherme Wadt, Humberto (Betão), Pedro Renan Piccoli e José Antonio (Zezão).

Agradeço ao papel fundamental do meu amigo José Hugo na execução deste mestrado e na confiança e amizade em mim depositados, juntamente com as famílias Gondim Guanais e Nunes de Souza.

Em especial agradeço à minha namorada, grande amiga e companheira Carolina Capel por todo o bem que tem me feito ao ter se feito o bem de vir morar comigo. Sem sua presença, este mestrado teria sido muito mais monótono. Esta, sem dúvida, não só muito me orienta, mas por tê-la comigo, me oriento melhor. Meu muito obrigado a esta grande professora e aluna. Guardo demais agradecimentos para fazê-los pessoalmente em suaves parcelas diárias.

Por fim, agradeço a todos que se dispõem a ensinar e a compreender, e a quem gastou alguns minutos lendo esta mensagem.

“Sem sangue não tem chouriço, sem luta não tem vitória. É preciso muita garra para subir os degraus da glória” - Tião Carreiro

## RESUMO

*Pseudo-nitzschia* é um gênero cosmopolita de diatomáceas penadas capazes de formar cadeias lineares de células sobrepostas, e de produzir o aminoácido neurotóxico ácido domóico (AD), normalmente sob situações de estresse, quando há diminuição no metabolismo primário da célula. Neste estudo, foi realizada uma busca por espécies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia* em áreas próximas a parques de cultivo de bivalves nos estados do Paraná e Santa Catarina, com o intuito de se estabelecer o cultivo laboratorial a partir de cepas isoladas, avaliar a capacidade de produção e liberação de AD ao longo de suas curvas de crescimento, e medir as taxas alimentares e de acúmulo de toxinas em bivalves expostos aos cultivos. Amostras foram tomadas para quantificar o AD por cromatografia líquida com detecção ultravioleta (HPLC-UV). Foram isoladas 23 cepas entre 2011 e 2013, que se somaram a outras 4 previamente isoladas em 2003. As cepas PSN-11 (*Pseudo-nitzschia calliantha*) e PSN-4 (*P. cf. multiseriis*) produziram baixos níveis de AD (máximo de 0,054 fg.cél.<sup>-1</sup> e 0,152 pg.cél.<sup>-1</sup>, respectivamente). Um experimento com a cepa PSN-40 (*P. calliantha*) buscou testar o desencadeamento da produção de AD sob estresse luminoso (luz contínua) e agitação mecânica constante. Não foi detectada produção de toxina sob nenhum tratamento. Porém, a agitação promoveu a manutenção das células em longas cadeias por todo experimento, indicando que a turbulência altera a disponibilidade das células à ingestão por organismos planctívoros no ambiente natural. A resposta alimentar dos bivalves comerciais cultivados no sul do Brasil – as ostras *Crassostrea gigas* e *C. brasiliana* e o mexilhão *Perna perna* – frente a florações simuladas de *Pseudo-nitzschia* foi avaliada por meio de: (i) dois ensaios onde aos bivalves foi ofertada uma dieta exclusiva de *Pseudo-nitzschia* em câmaras de incubação, comparando as taxas de clareamento (TC, ml.min<sup>-1</sup>) em cada espécie; e (b) um experimento para se medir o acúmulo e a detoxificação de AD em ostras *Crassostrea* spp. e mexilhões *P. perna* expostos a uma dieta de *P. multiseriis* tóxica por 23 h, seguido da depuração em dieta não tóxica (*Isochrysis galbana*) por 168 h. Mexilhões apresentaram TC's (4,1 ml.min<sup>-1</sup>) significativamente maiores do que as de *C. gigas* (1,7 ml.min<sup>-1</sup>) e *C. brasiliana* (1,4 ml.min<sup>-1</sup>). Entretanto, não acumularam AD em níveis detectáveis por HPLC-UV, sugerindo uma baixa assimilação e/ou alta taxa de detoxificação de AD em *P. perna*. Ostras *Crassostrea* spp. acumularam mais AD (máx. 4,85 µg g<sup>-1</sup>), mas ainda abaixo do limite máximo permitido para comercialização (20 µg AD g<sup>-1</sup>). Foi relatado no presente estudo uma baixa toxicidade das espécies de *Pseudo-nitzschia* spp. isoladas no sul do Brasil, e um baixo acúmulo com alta taxa de detoxificação de AD nas espécies de bivalves investigadas, porém o monitoramento contínuo do fitoplâncton e de toxinas deve ser mantido para se prevenir possíveis eventos de intoxicação durante florações mais tóxicas e/ou mais densas do que as condições testadas no presente estudo.

*Palavras chaves: toxicologia, ASP, maricultura, cultivo de bivalves, floração de algas nocivas, ácido domóico, Brasil*

## ABSTRACT

*Pseudo-nitzschia* spp. are cosmopolite diatoms able to form stepped cell chains, capable of producing the neurotoxic amino acid domoic acid (DA), normally synthesized under stressing situations, when primary metabolism decreases. This study carried out an extensive search for potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species near bivalves farms in the states of Paraná and Santa Catarina, in order to: (a) establish clonal cultures by isolating local cells; (b) evaluate the capacity for DA production and release throughout the growth curve; and (c) measure feeding rates and toxin accumulation in bivalves exposed to the cultures. Periodic samples were taken to quantify the DA concentrations by HPLC-UV. Twenty three strains were isolated between 2011 and 2013, besides 4 previously isolated in 2003. Strains named PSN-11 (*Pseudo-nitzschia calliantha*) and PSN-4 (*P. multiseriis*) produced low DA levels (max.  $0.054 \text{ fg.cell}^{-1}$  and  $0.152 \text{ pg.cell}^{-1}$ , respectively). Another experiment was designed to infer whether constant light and/or turbulence would boost DA production in PSN-40 (*P. calliantha*). No DA production was detected under any conditions tested. However, constant swirling sustained the long cell chains throughout the experiment, indicating that turbulence might affect the cell availability for planktivorous organisms in the field. The feeding responses of commercially raised bivalves in southern Brazil, the oysters *Crassostrea gigas* and *C. brasiliiana* and the mussel *Perna perna*, exposed to simulated *Pseudo-nitzschia* blooms, were evaluated in: (i) short-term assays where bivalves were fed monoalgal *Pseudo-nitzschia* diets in incubation chambers, and the clearance rate (CR,  $\text{ml.min}^{-1}$ ) was compared; and (ii) long-term DA accumulation experiments, in which oysters *Crassostrea* spp. and brown mussels *P. perna* were exposed to a toxic *P. multiseriis* diet for 23 h, followed by a 168-h depuration period on a non-toxic diet (*Isochrysis galbana*). Mussels exhibited significantly higher CR's ( $4.1 \pm 0.39 \text{ ml min}^{-1}$ ) than oysters *C. gigas* ( $1.7 \pm 0.45 \text{ ml.min}^{-1}$ ) and *C. brasiliiana* ( $1.4 \pm 0.39 \text{ ml.min}^{-1}$ ), although no DA accumulation was detected by HPLC in the first, suggesting low toxin assimilation and/or rapid elimination. *Crassostrea* spp. accumulated higher DA levels ( $4.85 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ), but they remained well below the regulatory limit of  $20 \text{ }\mu\text{g DA g}^{-1}$ . We reported low toxicity among the *Pseudo-nitzschia* spp. in southern Brazilian waters, as well as low DA accumulation and high detoxification rates for commercial bivalve species in this study, but continuous monitoring of plankton and toxins must be performed in order to detect prevent intoxications during blooms either more toxic and/or denser than the moderate conditions tested herein.

**Keywords:** toxicology, ASP, aquaculture, bivalve farming, harmful algal blooms, domoic acid, Brazil.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>10</b>
RESPOSTAS NA CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE TOXINAS POR DIATOMÁCEAS DO GÊNERO <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i> SPP. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	10
RESUMO .....	10
1.1 INTRODUÇÃO .....	11
1.2 METODOLOGIA .....	13
1.2.1 ISOLAMENTO DE CEPAS E ESTABELECIMENTO DE CULTIVOS.....	13
1.2.2 Produção de toxina ao longo das curvas de crescimento.....	14
1.2.3 Produção de toxina sob condições estressantes de crescimento.....	15
1.3 RESULTADOS .....	16
1.3.1 Isolamento de cepas e estabelecimento de cultivos.....	16
1.3.3 Produção de toxina sob condições estressantes de crescimento.....	23
1.4 DISCUSSÃO .....	25
1.5 REFERÊNCIAS.....	31
 <b>CAPÍTULO 2 .....</b>	 <b>36</b>
RESPOSTAS ALIMENTARES DE DIFERENTES ESPÉCIES COMERCIAIS DE BIVALVES À MICROALGA NOCIVA <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i> SPP.: TAXAS DE FILTRAÇÃO E ACÚMULO DE TOXINAS .....	36
RESUMO .....	36
2.1 INTRODUÇÃO .....	37
2.2 METODOLOGIA .....	39
2.2.1 Aquisição e manutenção dos organismos .....	39
2.2.2 Taxas alimentares: clareamento e filtração .....	40
2.2.3 Acúmulo e depuração de ácido domóico .....	44
2.3 RESULTADOS .....	45
2.3.1 Taxas alimentares: clareamento e filtração .....	45
2.4 DISCUSSÃO .....	49
2.5 REFERÊNCIAS.....	53
 <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	 <b>56</b>
 <b>ANEXOS .....</b>	 <b>59</b>

# CAPÍTULO 1

---

## **Respostas na curva de crescimento e produção de toxinas por diatomáceas do gênero *Pseudo-nitzschia* spp. sob diferentes condições de cultivo.**

### **Resumo**

As diatomáceas do gênero *Pseudo-nitzschia* spp. são conhecidas pela capacidade de produção da toxina amnésica ácido domóico (AD). Com o intuito de fornecer dados sobre o potencial de produção de AD por espécies que ocorrem no sul do Brasil, o presente estudo se focou no isolamento e cultivo de morfotipos diferentes de *Pseudo-nitzschia* spp. provenientes de áreas próximas a fazendas de cultivo de moluscos bivalves nos estados do Paraná e Santa Catarina, investigando a produção de AD nas curvas de crescimento. O crescimento e a produção de AD, medido por HPLC-UV, foram avaliados sob as condições descritas para diversas cepas de espécies potencialmente toxigênicas de *Pseudo-nitzschia*. Adicionalmente, os efeitos do estresse luminoso (luz contínua) e da turbulência (agitação rotacional constante) na produção de AD e a formação de cadeias de células foram avaliados em uma cepa selecionada, *P. calliantha* (PSN-40). Foram isoladas 23 cepas potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia* spp. entre Maio de 2011 e Junho de 2013, que se somaram a outras 4 previamente isoladas em 2003, sendo selecionadas 12 para os experimentos. A taxa de crescimento exponencial nas 12 cepas testadas variou entre 0,16 e 0,39 d<sup>-1</sup>. Apenas as cepas PSN-11 da espécie *P. calliantha* e PSN-4 *P. cf. multiseriis* produziram AD em cultivo, atingindo, respectivamente, concentrações intracelulares máximas de 0,054 fg e 0,15 pg cél.<sup>-1</sup>, ambas na fase estacionária de crescimento. O estresse luminoso limitou o crescimento, mas não elevou a produção de AD na cepa PSN-40 *P. calliantha*, que permaneceu sempre em níveis abaixo do limite de detecção do método. A turbulência, simulada pela agitação constante, praticamente triplicou a formação de cadeias de células (30%) durante a fase exponencial de crescimento de PSN-40, aumentando o tamanho médio das partículas, podendo afetar a capacidade de ingestão de células tóxicas e, conseqüentemente, o acúmulo de AD por determinados bivalves e outros vetores da toxina. Embora o presente estudo tenha relatado populações pouco tóxicas de *Pseudo-nitzschia* spp. na região, a sua presença e abundância e de sua toxina em áreas de cultivos de bivalves devem ser constantemente monitoradas para se prevenir intoxicações sob condições ambientais especiais.

*Palavras-chave: ficologia, toxicidade, ASP, riscos de intoxicação, toxicidade, ácido domóico, aquacultura, ostreicultura, litoral sul do Brasil.*

## 1.1 Introdução

O primeiro relato sobre a toxicidade da diatomácea *Pseudo-nitzschia* a humanos se deu em um evento de floração nociva de *P. multiseriis* em Prince Edward Island (PEI), na costa leste do Canadá, em 1987, associado à intoxicação de mais de 100 pessoas pelo consumo de mexilhões azuis (*Mytilus edulis*). Após a ocorrência desse caso, a intoxicação e a molécula orgânica responsável foram descritas, conforme relatos de Wright *et al.* (1989): “153 casos de uma intoxicação aguda relacionada ao consumo de mexilhões foram descritos, (...) os sintomas incluíam vômito, diarreia e, em alguns casos, eram seguidos de perda de memória, confusão, desorientação e até mesmo coma. Três pacientes idosos morreram. Em casos mais severos, os danos neurológicos persistiram, sendo proposto o termo Amnesic Shellfish Poisoning (ASP; envenenamento amnésico por consumo de mariscos) para esta nova intoxicação”. Na ocasião, o ácido domóico (AD), uma molécula não proteica, polar, hidrossolúvel, foi isolado de extratos de mexilhões e identificado como o composto responsável pela intoxicação.

O AD é um aminoácido excitatório estruturalmente relacionado ao ácido caínico, que compete pelos receptores para o ácido glutâmico nas regiões das sinapses, causando despolarização dos neurônios, aumentando as concentrações intracelulares de cálcio, resultando na ativação incessante de enzimas sensíveis ao cálcio, e finalmente levando à depleção energética, turgidez e morte celular (MOS, 2001). Pode, em casos mais graves, causar danos neurológicos por astrocitose na região do hipocampo (APPEL *et al.*, 1997), região responsável pela consolidação da memória. A substância, que até então havia sido reportada na macroalga vermelha *Chondria armata* (MAEDA *et al.* 1986), foi então classificada como uma ficotoxina, a primeira conhecida por ser produzida por uma diatomácea.

As diatomáceas penadas *Pseudo-nitzschia* spp. são caracterizadas por formarem cadeias lineares de células sobrepostas (forma de escada). Além de *P. multiseriis*, o AD tem sido então encontrado em florações de outras espécies de *Pseudo-nitzschia*, em baías e regiões costeiras ao redor do mundo. Ao todo, foram descritas 37 espécies de *Pseudo-nitzschia*, das quais 14, todas consideradas cosmopolitas (HASLE, 2002), são capazes de produzir a toxina (revisto em TRAINER *et al.*, 2012).

Pouco ainda se pode generalizar sobre os fatores que podem desencadear uma floração e a produção de AD pelas células, visto que há grande variabilidade nas taxas de crescimento e de produção de toxina entre clones isolados de uma mesma área e cultivados sob condições ambientais idênticas (KUDELA *et al.*, 2003).

Determinadas condições do meio são associadas ao aumento da produção de AD, que geralmente é inversamente relacionada à taxa de multiplicação celular, ou seja, a toxina é produzida em maior quantidade sob condições que causem redução no metabolismo primário, limitando o crescimento celular (PAN *et al.*, 1998). Tais condições incluem: deficiência de ferro lábil e a presença de cobre tóxico (MALDONADO *et al.*, 2002), alterações no fotoperíodo (FEHLING *et al.*, 2005), a forma de nitrogênio disponível (HOWARD *et al.*, 2006), pH e fonte de carbonato (BATES e LÉGER, 2006), concentração de metais (SUBBA RAO *et al.*, 1998), entre outros. Acredita-se ainda que o AD pode ser usado pelas microalgas como sideróforo, substância que é lançada no meio e tem a capacidade de se ligar a nutrientes, tornando-os disponíveis, ou ligando-se a elementos tóxicos para reduzir sua toxicidade (MALDONADO *et al.*, 2002).

A abundância e a toxicidade de espécies de *Pseudo-nitzschia* são variáveis ao longo do ano, ligadas a mudanças nos parâmetros ambientais dominantes. Muitos eventos de ASP ocorrem em zonas temperadas, onde a duração do dia é particularmente variável em função da estação do ano (FEHLING *et al.*, 2004b). Nessas regiões, florações de espécies potencialmente nocivas são mais comuns no outono e na primavera (revisto em BATES *et al.*, 1998). Da mesma forma, a primavera e o fim do verão/ início do outono são as épocas em que abundâncias elevadas de *Pseudo-nitzschia* spp. foram mais visualizadas no litoral do Paraná e norte de Santa Catarina, região subtropical da costa brasileira (MAFRA *et al.*, 2006; TAVARES, *et al.*, 2009; TIBIRIÇÁ, 2013). Nestas mesmas épocas, a taxa alimentar de mexilhões cultivados na região é mais alta (MARENZI e BRANCO, 2005), teoricamente aumentando o risco de acúmulo de toxinas algais.

No Brasil, o AD foi observado pela primeira vez no ambiente durante o verão de 2001, durante uma floração próxima ao parque de cultivo de moluscos marinho de Armação do Itapocoroy, SC. A toxina foi observada em amostras de plâncton concentradas, nas quais, *Pseudo-nitzschia calliantha* dominava em concentrações maiores que  $100.000 \text{ cel.L}^{-1}$  (TAVARES *et al.* 2009). O AD não havia sido encontrado em moluscos bivalves em concentrações acima do nível regulatório no Brasil até

janeiro de 2009, quando a toxina foi detectada em mexilhões marrons (*Perna perna*). Neste evento, até 98.5 µg AD g<sup>-1</sup> no tecido vivo de mexilhões de duas fazendas de cultivo no norte do estado de Santa Catarina, na ocasião onde se apresentou uma floração dominada por *P. Pseudodelicatissima*, que alcançou concentrações celulares acima de 2x10<sup>4</sup> cel ml<sup>-1</sup> (FERNANDES *et al.*, 2013). Houve o fechamento do comércio de moluscos bivalves por cerca de 30 dias, até que as concentrações da toxina se mantivessem dentro do nível de segurança estipulado no Brasil, de 20 µg AD g<sup>-1</sup> de tecido fresco de bivalve.

O objetivo deste trabalho foi o de isolar e cultivar espécimes de *Pseudo-nitzschia* spp. provenientes de águas costeiras da região sul do Brasil, em regiões produtoras de moluscos bivalves e avaliar o seu potencial de crescimento e toxicidade dos cultivos, bem como suas respostas a condições estressantes que possam desencadear a produção de AD.

## 1.2 Metodologia

### 1.2.1 Isolamento de cepas e estabelecimento de cultivos

Amostras de fitoplâncton foram coletadas com redes cilíndrico-cônicas (malha 20 µm, 1,20 m de comprimento e 40 cm de abertura de boca), por tração manual em arrastos de 3 a 5 minutos. O material foi obtido em diferentes pontos de coleta em 8 municípios no litoral dos estados do Paraná e Santa Catarina, desde a Baía Sul de Florianópolis (SC) até o Complexo Estuarino de Paranaguá (PR), nos períodos de agosto de 2002 a setembro de 2003, conforme descrito em Mafra (2005), e de maio de 2011 a junho de 2013 (Tabela 1), buscando-se encontrar células viáveis de *Pseudo-nitzschia* spp. para o estabelecimento de cultivos monoclonais.

O concentrado obtido em cada arrasto foi diluído em água do local em galões de 5 L, e analisado por microscopia óptica em câmaras de Uthermöhl sob microscópio invertido Zeiss® Axiovision, buscando-se encontrar células ou cadeias de células de *Pseudo-nitzschia* spp. aparentemente saudáveis (frústulas intactas, turgidez nos cloroplastos) para isolamento e posterior cultivo. Cepas isoladas por micropipetagem e depositadas em placas de cultivo celular contendo 700 µl de meio

de cultivo f/2 (GUILLARD, 1975), em água do mar estéril, salinidade entre 25 (cepas advindas de áreas estuarinas) e 32, e mantidas em estufas-incubadoras D.B.O ajustadas para 20-22 °C, fotoperíodo de 12:12 h ou 14:10 h (claro : escuro), conforme a cepa, e irradiância de 100-140  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O crescimento celular foi acompanhado por microscopia óptica e o volume de meio foi sucessivamente aumentado (escalonamento do cultivo) Frascos de vidro do tipo Erlenmeyer (50, 125, 250 e 500 ml). Ao atingir 100 ml, os cultivos foram considerados como estabelecidos, e amostras foram retiradas para posterior identificação da espécie por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em um microscópio Jeol® JMI200 EXII, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Aspectos morfológicos com importância taxonômica foram observados nas frústulas, tais como o número de fileiras de aréolas e a forma e disposição das mesmas, e comparadas com literatura especializada.

### *1.2.2 Produção de toxina ao longo das curvas de crescimento*

Para cada cepa foi estabelecida a curva de crescimento a partir de um cultivo estático obtido por repique de um cultivo em crescimento exponencial em 300-500 ml de meio novo e inóculo de 10-15% do volume total, com amostras de 1-5 ml sendo tomadas a cada 1 a 3 d durante as fases exponencial, estacionária e de declínio do cultivo, ao longo de 21 a 33 d, conforme detalhado mais adiante para cada cepa. As amostras eram fixadas em solução de lugol (1%) para posterior contagem em câmaras tipo Sedgewick-Rafter, visando a quantificação da densidade celular, e cálculo da taxa de crescimento. Para algumas cepas, a proporção de células formando cadeias lineares também foi computada.

Cultivos das cepas PSN-1, 2, 3 e 4 foram preparados em triplicata, com um volume inicial de 500 mL e mantidos em meio f/2, salinidade 25, temperatura 20 °C, fotoperíodo de 14:10 h e intensidade luminosa de 100  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Em intervalos de 3 d, durante 33 d, alíquotas de 1 ml foram retiradas de cada frasco para contagem celular e 5 ml adicionais foram filtrados a vácuo em filtros de fibra de vidro de 25 mm de diâmetro (tipo Whatman GF/C; 25mm de diâmetro e porosidade nominal 1,2  $\mu\text{m}$ ) para determinação da concentração de AD nas frações particulada (filtros) e dissolvida (filtrado). As cepas PSN-11,13,15 e 16 foram mantidas com 300 ml de

meio de cultivo f/2, em duplicata. A cada 2 d, durante 25 d, alíquotas de 5 ml foram retiradas para contagem e alíquotas de 30 ml para filtração a vácuo e quantificação de AD. Por fim, as cepas PSN-20, 27, 28 e 40 foram cultivadas em 300 ml de meio f/2, inoculado com 10% de cultivo concentrado da cepa, de onde foram retiradas, a cada 2 d ao longo da fase exponencial e a cada 3 a 5 d nas fases estacionária e de declínio do cultivo, alíquotas de 5 ml para contagem e de 50 ml para filtração e determinação das concentrações intra- e extracelulares de AD.

A análise de AD foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguindo diferentes métodos: (a) detecção por fluorescência (LC-FLD) em um sistema de HPLC Shimadzu<sup>®</sup> LC10 na Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, Itajaí-SC), conforme protocolo descrito por Pocklington *et al.* (1990) para as cepas PSN-1, 2, 3 e 4; (b) detecção por ultravioleta (LC-UVD) em um sistema de HPLC Shimadzu<sup>®</sup> Prominence com detector de foto diodo SPD-M20A no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal de Rio Grande (IO-FURG, Rio Grande - RS), seguindo método descrito por Mafra *et al.* (2009c) para as cepas PSN-11, 13, 15 e 16; ou (c) LC-UVD em sistema de HPLC Hitachi<sup>®</sup> Chromaster VWR no Instituto Federal de Santa Catarina (IF-SC, Itajaí - SC), conforme método harmonizado da União Europeia (EURLMB, 2008) para as cepas PSN-20, 27, 28 e 40.

### 1.2.3 Produção de toxina sob condições estressantes de crescimento

A taxa de crescimento celular e a produção de AD da cepa PSN 40 foram adicionalmente testadas em cultivos sob estresse luminoso (luminosidade constante) e de turbulência (agitação rotacional contínua). Neste experimento, a influência da luminosidade constante ( $114 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sobre o crescimento celular e a produção de AD foi avaliada em frascos estáticos e em mesa agitadora orbital a 80 rpm, em triplicata, e comparados àqueles obtidos em frascos estáticos, onde a homogeneização das células e do meio de cultivo foi realizada manualmente 2 a 3 vezes ao dia. Amostras foram tomadas diariamente nos primeiros 7 d de cultivo (fase exponencial de crescimento), a cada 2 d até o 18º dia (fase estacionária) e uma amostra ao 24º dia (fase de declínio). Amostras de 50 ml foram tomadas para análise de AD por LC-UVD nos dias 0, 3, 7, 11, 16, 18 e 24 do experimento, processadas e analisadas conforme descrito anteriormente para esta cepa.

## 1.3 Resultados

### 1.3.1 Isolamento de cepas e estabelecimento de cultivos

Centenas de espécimes (células ou cadeias de células) de *Pseudo-nitzschia* spp. pertencentes a diferentes morfotipos foram isolados de amostras diversas, sendo possível se estabelecer o cultivo com 27 das cepas isoladas (Tabela 1). As cepas escolhidas para a avaliação das taxas de crescimento, formação de cadeia de células e produção de AD foram: PSN-1, 2, 3, 4, 11, 13, 15, 16, 20, 27, 28 e 40, que demonstraram maior adaptação/resistência às condições de cultivo e que pertenciam a morfotipos que incluem espécies potencialmente tóxicas, conforme análise inicial por microscopia ótica e confirmação por microscopia eletrônica.

Tabela 1: Cultivos estabelecidos a partir de cepas isoladas no litoral de Santa Catarina e Paraná, entre março de 2003 e julho de 2013.

Município, estado	Localidade	Data (mês /ano)	Código da cepa	Coordenadas geográficas
Paranaguá, PR	Baía de Paranaguá	02-03/2003	PSN-1, 2, 3, 4	25° 29' S; 48° 31' W
Paranaguá, PR	Ilha do Mel	05/2011	PSN-11, 13, 15, 16	25°32' S; 48°18' W
Guaratuba, PR	Baía de Guaratuba	06/2011	PSN-19, 20, 21, 22	25°52' S; 48°33' W
Florianópolis, SC	Baía Sul	05/2012	PSN-27, 28	27°46' S; 48°34' W
Itajaí, SC	Praia Brava	11/2012	PSN-30, 31, 32, 33	26°57' S; 48°37' W
Pontal do Paraná, PR	Pontal do Sul	11/2012	PSN-34	25°34' S; 48°20' W
Florianópolis, SC	Pântano do Sul	11/2012	PSN-35, 36	27°46' S; 48° 30' W
Pontal do Paraná, PR	Vila do Maciel	04/2013	PSN-37	25°33' S; 48°26' W
Itapoá, SC	Itapema do Norte	06/2013	PSN-38	26°04' S; 48°36' W
Pontal do Paraná, PR	Pontal do Sul	06/2013	PSN-39	26°36' S; 48°23' W
Matinhos, PR	Caiobá	06/2013	PSN-40	25°50' S; 48°32' W
São Francisco do Sul, SC	Canal do Linguado	07/2013	PSN-41, 42	26°18' S; 48°42' W

A identificação das cepas PSN-1, 2, 3 e 4 foi prejudicada devido a um processo erosivo nas valvas, que impossibilitou a visualização das aréolas e de outras estruturas importantes para a sua identificação, sob microscopia eletrônica (não mostrado). Baseado em microscopia ótica (Figura 1-g), a cepa PSN-1 foi identificada como *Pseudo-nitzschia pungens*; as cepas PSN-2 e 3 provavelmente espécies do complexo *P. pseudodelicatissima / cuspidata*; e as características de tamanho, forma e padrão de sobreposição das células da cepa PSN-4 foram semelhantes às descritas para *P. multiseriata* (MAFRA, 2005). As cepas PSN-11, 13, 15, 16 e 40 foram identificadas como *P. calliantha* por MET (Fig.1a-f), enquanto que a cepa PSN 27, apesar de ter sido analisada quanto ao crescimento e produção de AD, não pode ser identificada por perda de material. As cepas PSN 20 e PSN 28 não foram identificadas e a perda do cultivo por contaminação impediu a descrição da curva de crescimento.

### 1.3.2 Produção de toxina ao longo das curvas de crescimento

As cepas de *P. calliantha*, PSN-13, 15, 16 e 40, foram comparadas em suas curvas de crescimento (fig. 2), mas não foi constatada a produção de AD em níveis detectáveis em nenhuma das fases. A cepa PSN-13 (fig. 2a) não teve crescimento significativo durante o cultivo, enquanto que a cepa PSN-15 (fig. 2b) apresentou a maior taxa crescimento exponencial ( $\mu$ ) de  $0,39 \text{ d}^{-1}$ , atingindo densidade máxima de  $32 \times 10^4 \text{ cel.ml}^{-1}$  no 7º dia de cultivo. A cepa PSN-16 (fig. 2 c) obteve  $\mu$  de  $0,24 \text{ d}^{-1}$  e, ao 7º dia de cultivo, atingiu a mais alta densidade celular dentre as cepas analisadas, ultrapassando  $7 \times 10^5 \text{ cél.ml}^{-1}$ . A cepa PSN-40 (fig. 2-e) apresentou  $\mu$  de  $0,37$  entre os dias 1 e 5, atingindo o pico de densidade celular ( $3 \times 10^5 \text{ cél.ml}^{-1}$ ) ao 7º dia de cultivo, entrando na fase estacionária a partir do 9º dia.

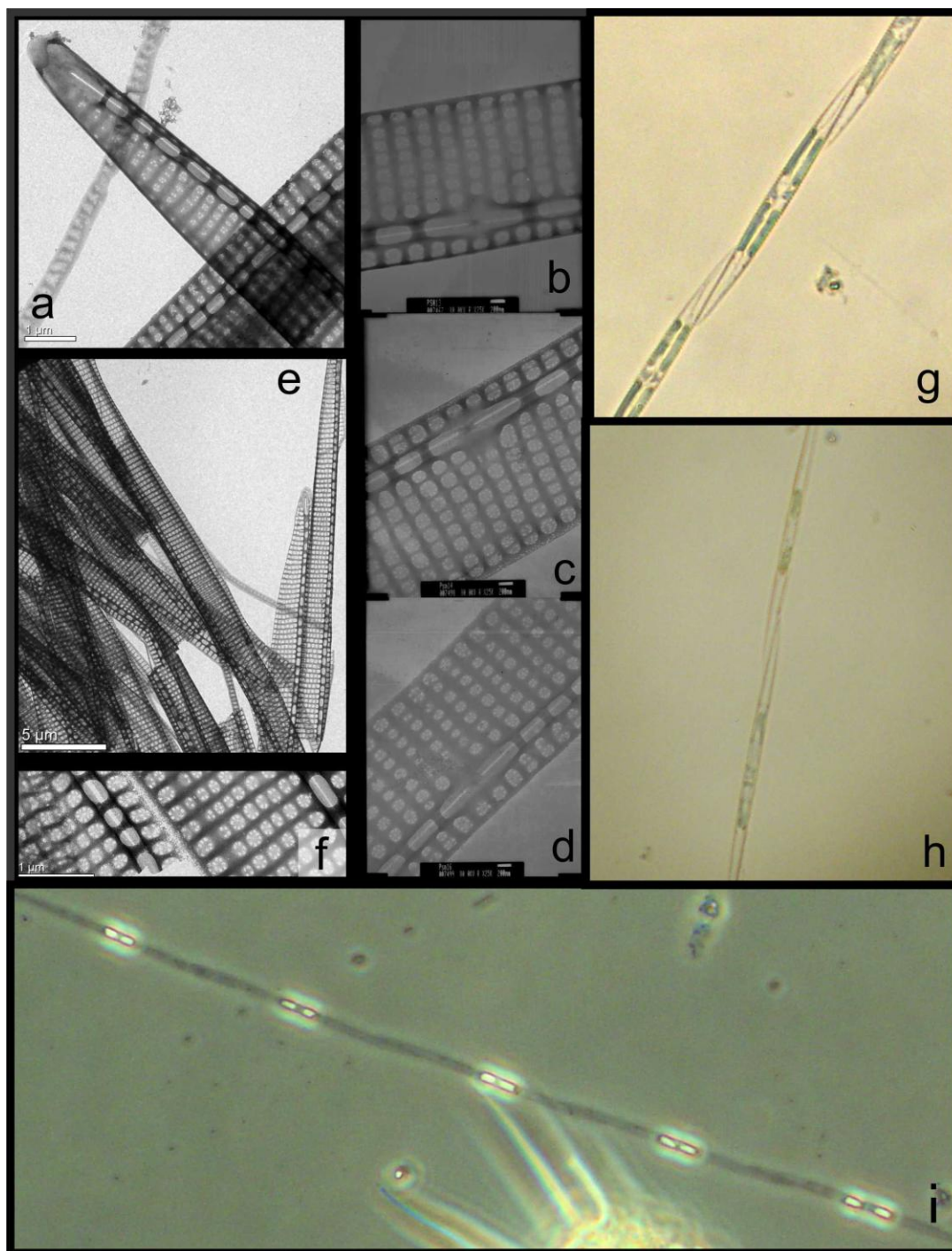


Figura 1: *Pseudo-nitzschia* spp.: microfotografias em microscopia eletrônica de transmissão (a-f) de *P. calliantha*: cepas PSN 11 (a), PSN 13 (b), PSN 15 (c), PSN 16 (d) e PSN 40 (e, f), evidenciando as auréolas na fíbula e poróides subdivididos em 4 a 6 hímenens, característicos da espécie; e em microscopia óptica (g-i) de espécies com identificação não confirmada, provavelmente: *P. multiseries* - PSN 4 (g), *P. pungens* - PSN 1 (h) e *P. pseudodelicatissima* - PSN 2 (i).

A produção de AD detectada durante o crescimento de *P. multiseries*, cepa PSN-4, e *P. calliantha*, cepa PSN-11 (fig. 3, 4 e 5), foi baixa. Enquanto que o acúmulo de AD<sub>part</sub> (particulado, intracelular) foi detectado em ambas as cepas, as

concentrações de  $AD_{diss}$  (dissolvido no meio de cultivo) foram detectáveis somente para PSN-4. A cepa de *P. calliantha* PSN-11 apresentou crescimento exponencial de  $0,16 d^{-1}$  e menor produção de AD, atingindo o pico máximo de densidade celular ( $37,4 \times 10^4 \text{ cél.ml}^{-1}$ ) no dia 18 e a produção de  $AD_{part}$  máxima de  $0,054 \text{ fg cél.}^{-1}$  no 14º dia de cultivo (fig. 3). A densidade celular máxima de PSN-4 (*P. multiseriis*) foi de  $1 \times 10^4 \text{ cél.ml}^{-1}$  ao 12º dia, (fig. 4) com taxa de crescimento exponencial de  $0,30 d^{-1}$ . Esta cepa alcançou a concentração máxima de  $AD_{part}$  ( $0,152 \pm 0,022 \text{ pg cél.}^{-1}$ ) no 15º dia de cultivo (fig. 4) e de  $AD_{diss}$  ( $1,23 \pm 0,19 \text{ ng ml}^{-1}$ ) no 24º dia (fig. 5).

As cepas não identificadas PSN-20 e 28 não se adaptaram ao cultivo e suas curvas de crescimento não foram traçadas, todavia se manteve a coleta de amostra para análise de AD nos dias programados, que não revelaram a presença de concentrações detectáveis da toxina. A cepa não identificada PSN-27 apresentou a taxa de crescimento exponencial de  $0,19 d^{-1}$ , com densidade celular máxima de  $2,0 \times 10^4 \text{ cél.ml}^{-1}$  ao 3º dia de cultivo, mas, assim como as anteriores, não produziu a toxina em níveis detectáveis por HPLC-UV.

O padrão de formação de cadeias de células foi diferente para cada cepa testada (fig. 6), embora tenha sido predominantemente durante a fase exponencial de crescimento em todos os casos. Para PSN-13, a proporção de células formando cadeias foi baixa durante toda a curva de crescimento. Ao 7º dia de cultivo, somente cerca de 1% das células formaram cadeias curtas (2 células). Em PSN-15, houve uma maior proporção de células formando cadeias, chegando a 7% do total no 4º dia, e em PSN-16, ~20% das células se encontravam em cadeias ao 4º dia de cultivo, formando cadeias de até 6 células. PSN 27 apresentou maior proporção de cadeias ao 3º dia de cultivo, com 35% das células formando cadeias e PSN-40 apresentou a maior capacidade de formação de cadeias entre todas as cepas avaliadas, com aproximadamente 45% das células formando cadeias de até 8 células ao 3º dia de cultivo (fig. 6).

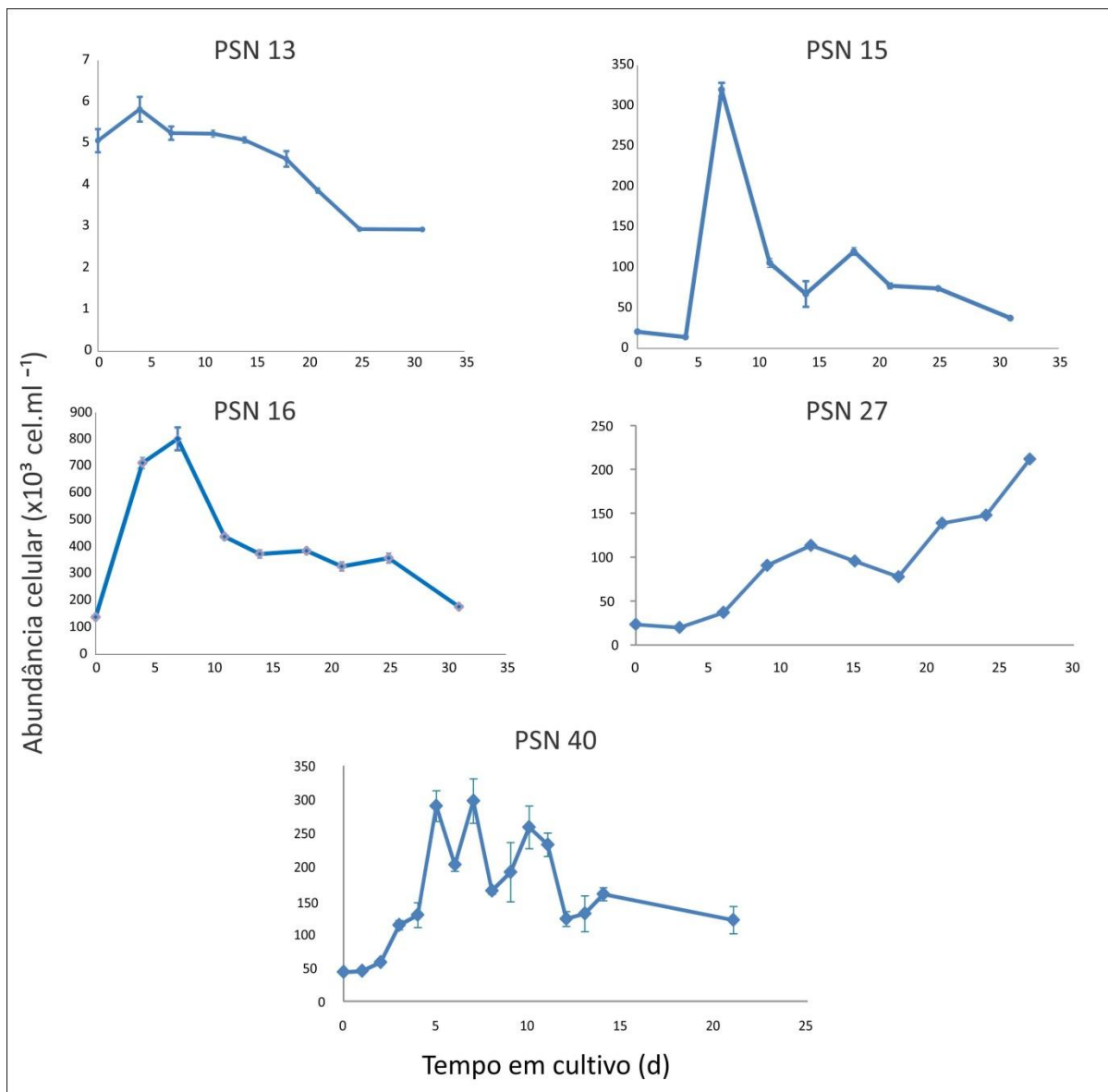


Figura 2: Curvas de crescimento traçadas para diferentes cepas de *Pseudo-nitzschia* spp.

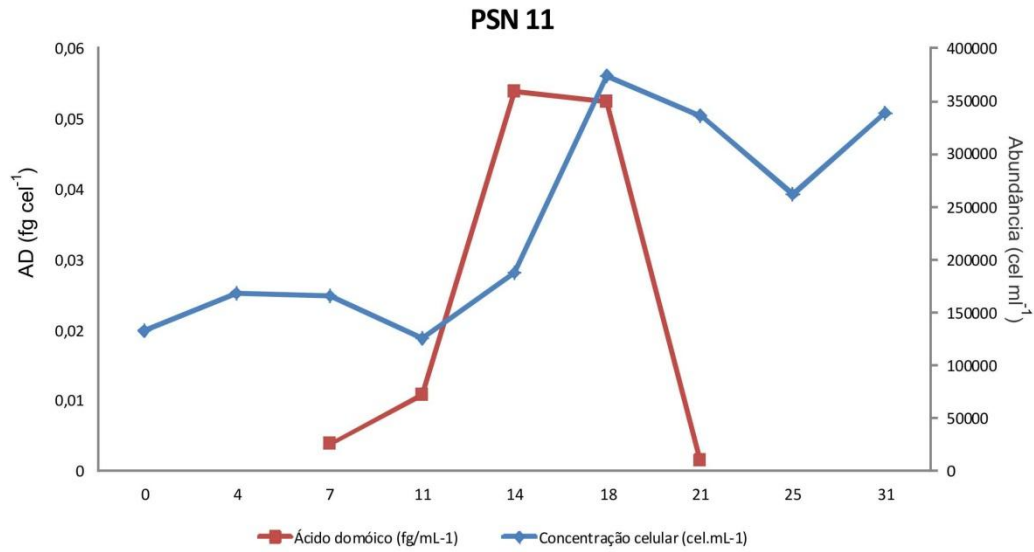


Figura 3: Concentração intracelular de ácido domóico (AD) ao longo da curva de crescimento da cepa de *P. calliantha* PSN-11, em cultivo estático.

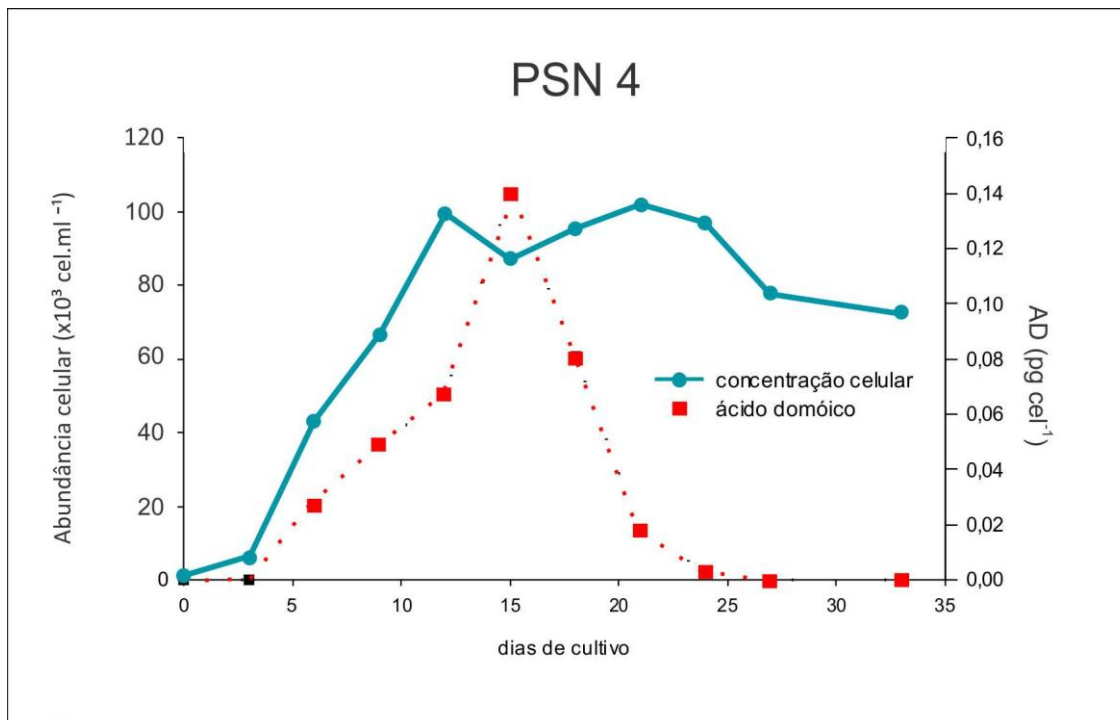


Figura 4: Concentração intracelular de ácido domóico (AD) ao longo da curva de crescimento da cepa de *Pseudo-nitzschia multiseries* PSN-4, em cultivo estático.

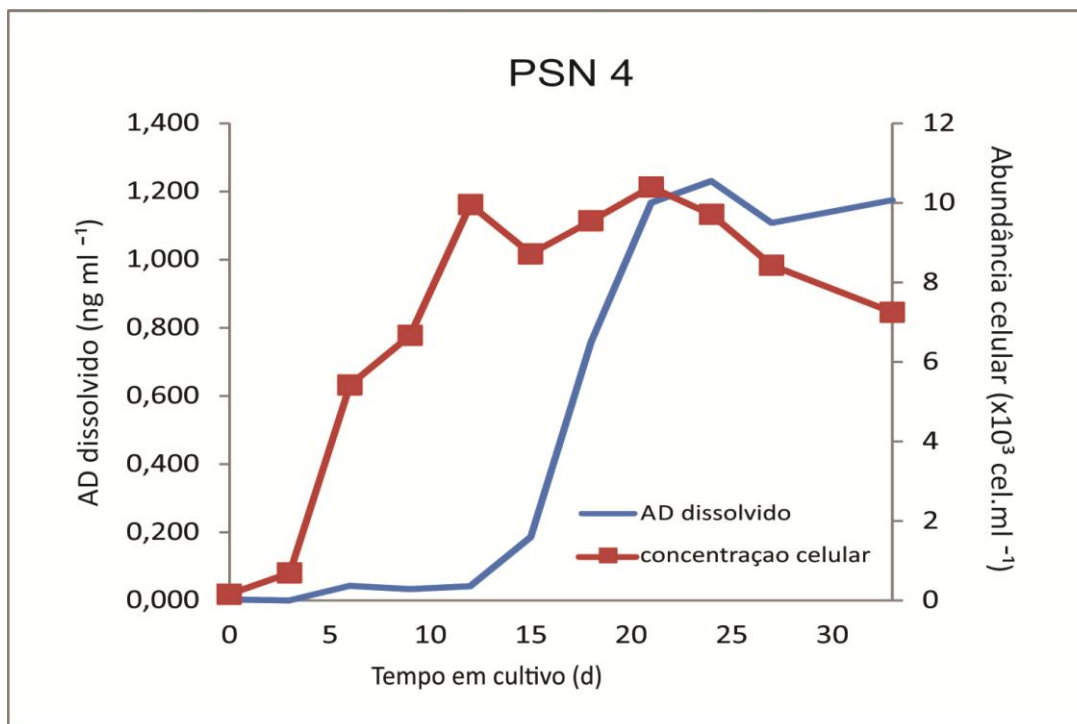


Figura 5: Concentração de ácido domóico (AD) dissolvido no meio de cultivo ao longo da curva de crescimento da cepa de *Pseudo-nitzschia multiseries* PSN 4, em cultivo estático.

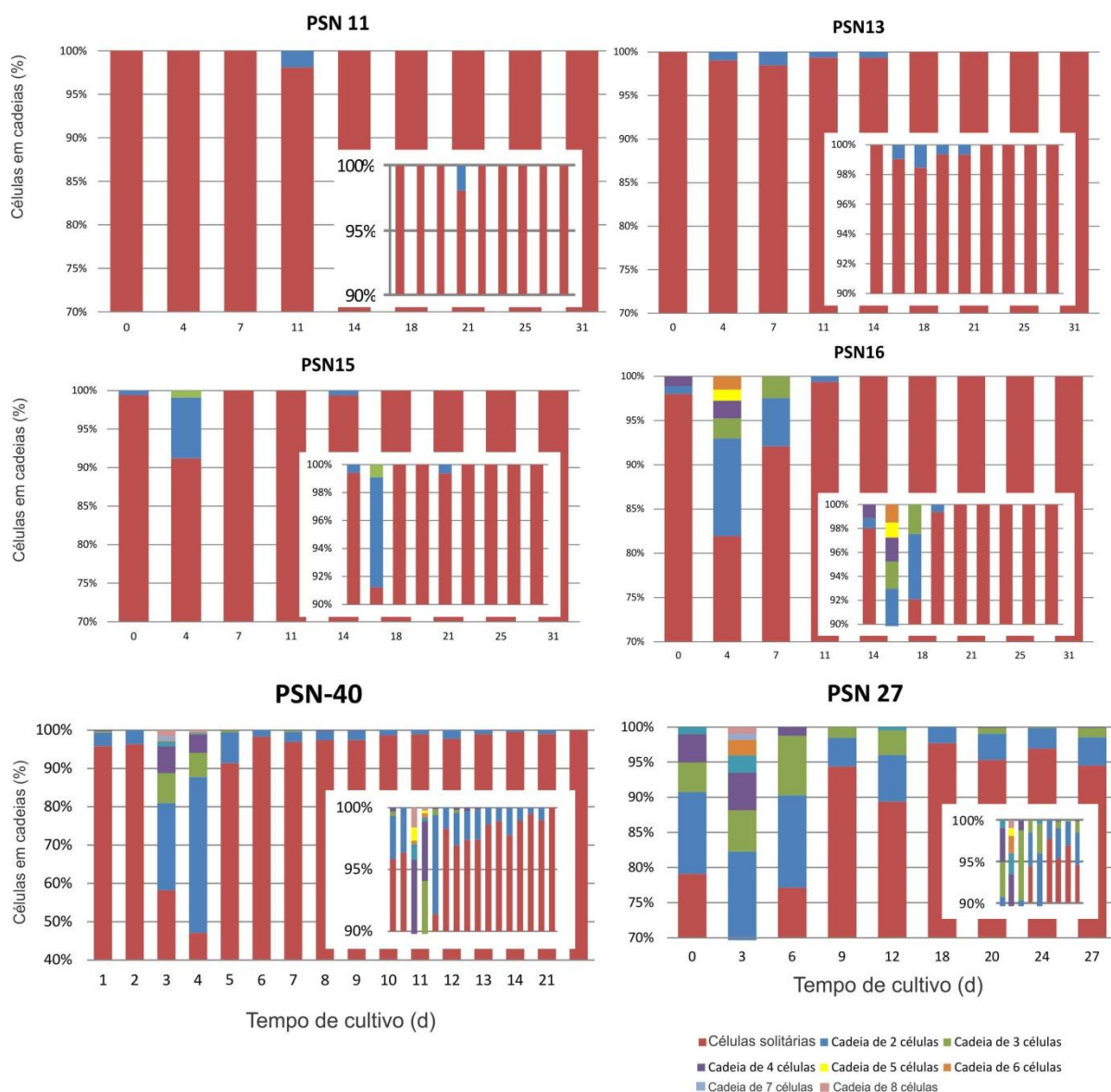


Figura 6: Percentual de células solitárias ou formando cadeias de 2 a 8 células durante o crescimento em cultivo estático para as cepas de *P. calliantha* PSN-11,13,15,16. A área em destaque mostra a distribuição dos mesmos dados, detalhando o limite superior da escala (90–100%).

### 1.3.3 Produção de toxina sob condições estressantes de crescimento

Durante o experimento que descreveu a curva de crescimento para PSN-40 sob estresse luminoso (fig. 7), não foi detectada a produção de AD em nenhuma das fases do crescimento celular. As cepas não apresentaram crescimento celular significativo. A densidade celular decresceu até atingir um mínimo de  $1,1 \times 10^4$  cél.  $\text{ml}^{-1}$  ao 4<sup>o</sup> dia para o tratamento estático e  $2,4 \times 10^4$  cél.  $\text{ml}^{-1}$  ao 7<sup>o</sup> para o cultivo

agitado. A taxa de crescimento exponencial foi praticamente nula ( $0,044 \text{ d}^{-1}$  no tratamento estático e  $0,041 \text{ d}^{-1}$  no agitado) na fase em que houve algum crescimento (do 3º ao 11º dia e do 7º a 16º, respectivamente). Entretanto, quando avaliada a formação de cadeias de células, os cultivos mantidos sob agitação mantiveram as células em cadeias até o fim do experimento, atingindo proporções maiores do que aquelas do tratamento estático, onde houve rompimento da maioria das cadeias até o 4º dia do experimento (fig. 8).

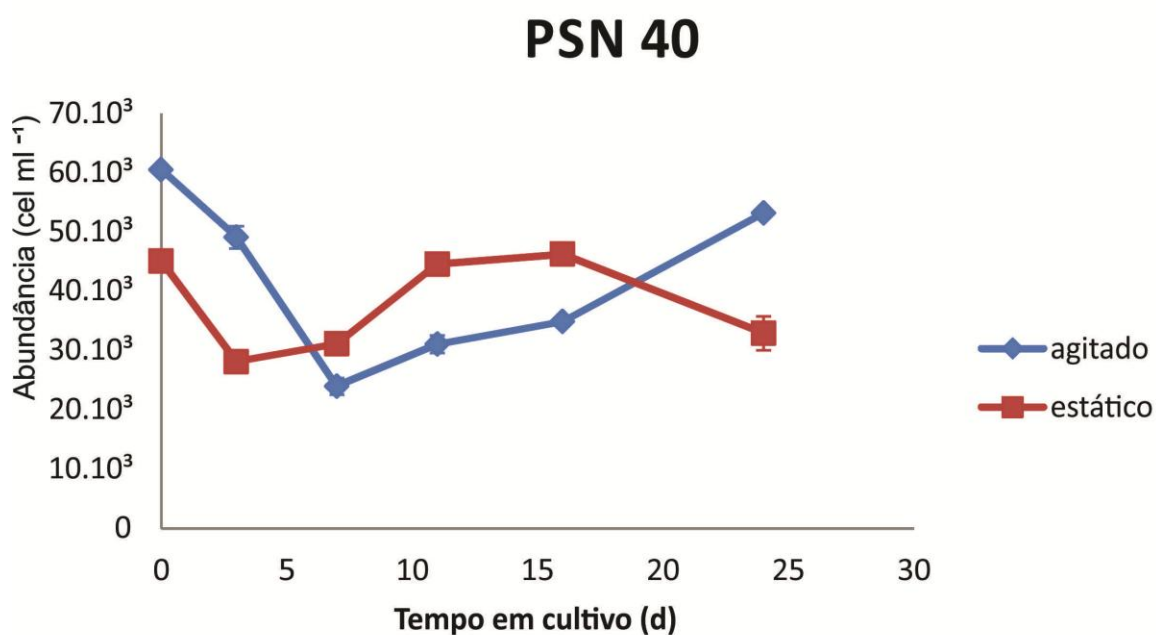


Figura 7: Curvas de crescimento de dois cultivos de *Pseudo-nitzschia calliantha* (cepa PSN-40) sob estresse de luminosidade constante, mantidos sob agitação mecânica ou de forma estática.

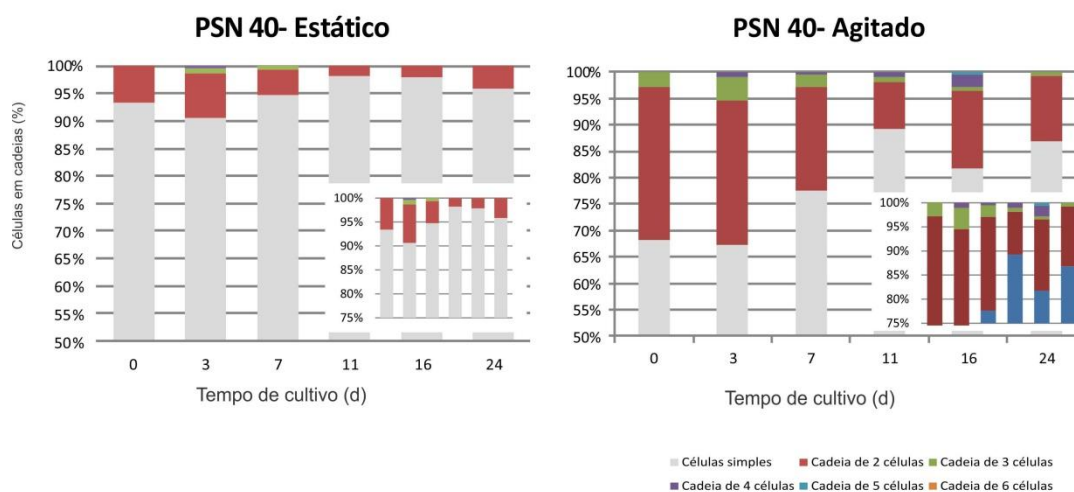


Figura 8: Percentual de células formando cadeias de 2 a 6 células nos cultivos de *Pseudo-nitzschia calliantha* (cepa PSN-40) sob estresse de luminosidade constante, mantidos sob agitação mecânica ou de forma estática. A área em destaque mostra a distribuição dos mesmos dados, detalhando o limite superior da escala (75–100%).

## 1.4 Discussão

O isolamento e o estabelecimento de cultivos a partir de diferentes morfotipos de *Pseudo-nitzschia* visou identificar a presença de espécies potencialmente tóxicas na região investigada. Houve um grande esforço no presente estudo, que abrangeu uma extensa área amostral e o isolamento de centenas de espécimes ao longo de diferentes épocas, para que o potencial tóxico de *Pseudo-nitzschia* spp. fosse avaliado nas áreas de cultivos de moluscos bivalves do litoral paranaense e centro-norte catarinense. Apesar da ocorrência de espécies toxigênicas, como *P. calliantha*, *P. multiseriis* e *P. pungens*, os cultivos estabelecidos neste estudo revelaram um baixo potencial tóxico entre as populações locais de *Pseudo-nitzschia* spp. na região.

Durante o isolamento de células ou cadeias de células de *Pseudo-nitzschia* spp., o grupo taxonômico ao qual a espécie pertencia foi inferido com base em características como a inserção das cadeias, porte e angulosidade da célula (CAVALCANTE, 2011). Todavia, a identificação só foi confirmada por visualização em MET após o estabelecimento do cultivo, quando se dispunha de quantidade maior de material. O isolamento de morfotipos como base para a identificação das espécies encontradas em uma dada região é complicado pela similaridade entre as

espécies do gênero. Assim, uma espécie de potencial nocividade pode não ser isolada porque outras similares já o foram, ou ainda ser isolada mas o cultivo ser perdido nas fases iniciais de estabelecimento, antes das análises de produção de toxinas, seja por contaminação do cultivo por bactérias e/ou outras microalgas, ou por má adaptação às condições laboratoriais. Esses problemas levariam a uma subestimação da real diversidade e potencial tóxico das espécies presentes em um determinado local. Desta forma, apesar do grande esforço amostral deste estudo, não se pode eliminar a possibilidade de que existam outras espécies ou populações mais tóxicas de *Pseudo-nitzschia* spp. além das avaliadas na região. De fato, em 2009, durante uma floração de *Pseudo-nitzschia* spp. em duas regiões produtoras de bivalves em Santa Catarina, concentrações elevadas de AD foram encontradas em mexilhões nas regiões onde a floração foi dominada por *P. pseudodelicatissima* (FERNANDES *et al.*, 2013).

Cultivos monoclonais de *Pseudo-nitzschia* spp. tendem a declinar após sucessivos repiques ao longo do tempo em laboratório. Sucessivas divisões binárias causam a redução gradativa do comprimento das células e o decréscimo na produção de AD (BATES *et al.*, 1999), até que as células atingem um tamanho no qual a divisão equacional se torna impraticável. Neste ponto, a célula passa a ser inviável fisiologicamente e ocorre a morte celular, caso não ocorra reprodução sexuada células com outras cepas da mesma espécie para o re-estabelecimento do tamanho original por meio da formação de auxósporos, como descreve Amato *et al.* (2005). Em seu estudo, Amato *et al.* (2005) realizaram diversos cruzamentos de cepas da espécie não tóxica *Pseudo-nitzschia delicatissima*, resultando em “células-filhas” de comprimento máximo, e dando origem a cultivos monoclonais que tiveram uma redução gradual no tamanho celular ao longo de divisões assexuadas sucessivas, rapidamente chegando a 50% do tamanho original. Da mesma forma, os cultivos isolados do litoral de Santa Catarina e Paraná durante o presente estudo chegaram a um ponto no qual o seu escalonamento não rendeu mais um crescimento celular satisfatório e o material foi perdido. Em alguns casos, isto aconteceu antes de se testar o potencial de crescimento e toxicidade da cepa em questão.

Todavia, com base nos cultivos estabelecidos no período abordado pelo trabalho, é possível observar que a produção de toxinas nas condições testadas foi particularmente baixa. A cepa PSN-4 alcançou o maior nível de AD intracelular

(0,152 pg cel<sup>-1</sup>) dentre os cultivos testados, e ainda liberou concentrações quantificáveis de AD dissolvido no meio (1,230 ng ml<sup>-1</sup>). Neste estudo, a quantidade de cepas tóxicas obtidas representou uma pequena parcela do  $n$  amostral, tendendo a sustentar a afirmação de que a ocorrência de produção de AD na região não é comum nem tampouco expressiva, corroborando com os resultados de monitoramento na região de Florianópolis- SC, onde a ausência desta toxina foi relacionada à ausência ou baixa ocorrência das espécies tóxicas (ALVES *et al.*, 2010).

No presente estudo, as taxas de crescimento, densidade celular, fase de crescimento em que ocorreu o pico de abundância, formação de cadeias e até mesmo a produção de AD variaram consideravelmente entre cepas de uma mesma espécie sob condições similares de cultivo, o que foi notório para *Pseudo-nitzschia calliantha*. Isto indica uma alta variabilidade genética entre as cepas adquiridas do ambiente e ressalta a dificuldade em se prever o potencial nocivo de diferentes florações de *Pseudo-nitzschia* spp., ainda que de uma mesma espécie, numa dada região. Outros fatores que afetam a produção de AD por uma mesma espécie de *Pseudo-nitzschia*, como a limitação de metais-traço no meio (SUBBA RAO *et al.*, 1998) a associação com bactérias (HAGSTRÖM *et al.*, 2007) e a concentração de diferentes fontes de nitrogênio (HOWARD *et al.*, 2007) no ambiente não foram investigados neste trabalho, mas devem ser considerados em estudos futuros para se ter uma avaliação mais segura sobre o potencial de ocorrência de florações tóxicas de *Pseudo-nitzschia* na região. As lacunas no conhecimento sobre a biologia de *Pseudo-nitzschia* e a fisiologia da produção de AD dificultam a previsibilidade quanto à severidade de eventos de florações tóxicas em diversas regiões do globo. Em particular, condições locais de metais, fatores bióticos e a composição de espécies têm de ser incorporados na previsão de florações, resultando em modelos mais confiáveis em escalas geográficas e temporais (LELONG, 2012).

Assim, sabendo-se que a produção, emissão e degradação do AD varia de acordo com a genética das cepas e os fatores ambientais dominantes (HAGSTRÖM *et al.*, 2007), a avaliação das respostas de uma mesma cepa sob condições ambientais variadas em ambiente simulado de laboratório, testando combinações distintas destes fatores, levará à uma previsão sobre as respostas esperadas das espécies sob determinadas condições no ambiente, o que diminuiria o peso da variabilidade genética na previsibilidade de eventos tóxicos.

A luminosidade – tanto os níveis de irradiância quanto a duração do fotoperíodo – é um fator importante a ser considerado no crescimento de cepas de *Pseudo-nitzschia* em laboratório. As espécies de *Pseudo-nitzschia* são bem tolerantes a variações de luminosidade, o que pode ser evidenciado pelo fato destas espécies serem cosmopolitas. Lewis *et al.* (1993), por exemplo, reportaram taxas de divisão celular similares em *P. multiseriis* em irradiâncias de 80 e 180  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O fotoperíodo, por sua vez, pode ser um dos principais fatores que determinam as características dos eventos de ASP em altas latitudes, influenciando na composição das espécies, desencadeamento, densidade e toxicidade de uma floração de *Pseudo-nitzschia* (FEHLING *et al.*, 2004b).

Os efeitos do fotoperíodo no crescimento celular e na produção de AD de *Pseudo-nitzschia* spp. vêm sendo estudados para diversas espécies. Sabe-se que a produção de AD é favorecida quando há uma limitação no metabolismo primário (BATES e RICHARDS, 1996) e um concomitante desvio de ADP e  $\text{NADPH}^+$  para o metabolismo secundário (PAN *et al.*, 1998); entretanto uma certa quantidade de energia fotossintética se faz necessária para a síntese de toxina. Bates (1998) verificou produção similar de AD em cepas de *P. multiseriis* sob irradiância variando de 90 a 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e afirma que a espécie é capaz de produzir AD sob luminosidade constante, assim como sob ciclos diários de claro: escuro. Controversamente, no presente estudo, a cepa PSN-40 de *P. calliantha* não produziu AD sob luz constante, apesar de seu crescimento ter sido severamente limitado sob tal condição. Entretanto, esta cepa não representou um modelo satisfatório para se testar tal variável, já que a mesma não produziu concentrações detectáveis da toxina sob um fotoperíodo de 12:12 h. Considerando que na região sul do Brasil há uma variação substancial no fotoperíodo ao longo das estações do ano, a importância do fotoperíodo e da intensidade luminosa para a produção de AD por *P. calliantha* e outras espécies deve ser melhor investigada em trabalhos futuros. Tendo em vista sua baixa toxicidade, entretanto, métodos analíticos mais sensíveis, como LC-MS/MS, devem ser aplicados para uma quantificação precisa, evitando que se negligencie a variação na produção de baixos níveis de AD.

Assim como o fotoperíodo, o papel de outras variáveis físico-químicas, e da combinação entre elas, sobre o crescimento de *Pseudo-nitzschia* e a produção de AD deve ser avaliado. Mafra *et al.* (2009a) realizaram cultivos de *P. multiseriis* em galões aerados e frascos estáticos. Naqueles galões onde foi bombeado ar

constantemente, as células atingiram níveis de AD superiores às aquelas dos cultivos estáticos ao fim da fase exponencial; entretanto não ficou claro se o aumento na toxicidade se deu pelo efeito da turbulência ou pela adição de uma fonte extra de carbono via aeração. No presente estudo, a turbulência foi simulada por agitação rotacional, sem aeração, para se isolar tal fator. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, a cepa de *P. calliantha* utilizada não produziu AD em quantidades detectáveis sob nenhuma condição testada. Não obstante, o tratamento com agitação manteve um percentual de células formando cadeias superior àquele do tratamento estático durante todo o tempo de experimento, o que denotou um efeito da turbulência sobre esta variável. Mesmo que isto não tenha influenciado na produção de AD, este resultado pode estar ligado a outros fatores ainda não abordados na fisiologia deste gênero de diatomáceas marinhas. Estudos realizados no “hot spot” Juan de Fuca, na costa oeste dos EUA, revelaram que florações recorrentes de *Pseudo-nitzschia*, sobretudo de *P. australis*, são mais tóxicas em períodos precedidos por fortes ventos, mas isso deve estar mais relacionado ao aporte de nutrientes decorrente da ressurgência gerada (MACFADYEN e HICKEY, 2010) do que à turbulência. Adicionalmente, espera-se que a presença de longas cadeias lineares de células diminua a eficiência de ingestão de *Pseudo-nitzschia* e, portanto, o acúmulo de AD por alguns moluscos bivalves como as ostras do gênero *Crassostrea* (MAFRA *et al.*, 2009b)

No presente estudo, destacou-se a presença da espécie tóxica *P. calliantha* em diversos pontos próximos a cultivos de bivalves no Paraná e em Santa Catarina, ressaltando a existência de espécies toxinogênicas em toda a região. A espécie *P. calliantha*, que foi a principal espécie isolada e testada no presente estudo, mas que apresentou baixa toxicidade, tem formado florações subsequentes a florações de espécies de maior toxicidade, como *P. australis* na costa norte do Chile (MARIÑO *et al.*, 2009) e *P. pseudodelicatissima* em Santa Catarina, Brasil (FERNANDES *et al.*, 2013). Da mesma forma, uma floração de *P. pseudodelicatissima* ocorreu logo após uma floração mais tóxica de *P. australis* na baía de Monterrey, Califórnia, EUA (SCHOLIN *et al.*, 2000). Isso gera o questionamento sobre a possibilidade de uma espécie menos tóxica se favorecer do AD lançado previamente por outra espécie na água, o que possivelmente facilitaria a aquisição de nutrientes pela espécie menos tóxica, e poderia prolongar o tempo de uma floração multiespecífica e um eventual período de proibição de comercialização de moluscos bivalves contaminados.

Estudos futuros devem investigar a associação de espécies tóxicas, o desencadeamento de florações de espécies menos tóxicas associadas ao declínio da floração de uma espécie com maior produção de AD, e uma possível aquisição oportunista de nutrientes previamente ligados ao AD dissolvido por espécies menos tóxicas de *Pseudo-nitzschia*.

O litoral sul do Brasil, na região entre a costa do Paraná e o litoral centro-norte de Santa Catarina, possui apenas um registro de concentrações de AD acima do nível permitido em mexilhões (FERNANDES *et al.*, 2013), apesar da presença de diversas espécies toxinogênicas (MAFRA *et al.*, 2006, CAVALCANTE, 2011; TIBIRIÇÁ, 2013; FERNANDES *et al.*, 2013) e do monitoramento da toxina em algumas áreas de cultivo de Santa Catarina há mais de 15 anos (PROENÇA *et al.*, 2012). O presente estudo aponta a possível razão, senão a principal, que é o baixo nível de AD nas cepas isoladas da região, alcançando somente 0,054 fg a 0,154 pg cel.<sup>-1</sup> em meio de cultivo repleto de nutrientes. A baixa toxicidade no ambiente, portanto, pode estar associada, além de fatores genéticos das populações locais de *Pseudo-nitzschia* spp., à alta disponibilidade de nutrientes nas águas costeiras da região, supridas por grandes aportes de rios e baías no Paraná e Norte de Santa Catarina e por sistemas transientes de ressurgência costeira na região ao sul da Ilha de Santa Catarina (FERNANDES *et al.*, 2013). Uma vez que o AD pode ser produzido mais intensamente na deficiência de nutrientes (PAN *et al.*, 1996; FEHLING *et al.*, 2004a), a presença de espécies e populações pouco tóxicas, aliada a condições suficientes de nutrientes, sugerem que o risco de intoxicação amnésica (ASP) pelo consumo de bivalves advindos destas áreas de cultivo é majoritariamente baixo. Ainda assim, somente o monitoramento da presença de AD e de espécies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia* poderá assegurar a segurança alimentar do produto de cultivo na região e conferir uma vantagem sobre aqueles coletados de bancos naturais em áreas não monitoradas.

## 1.5 Referências

- ALVES, T. P.; SCHRAMM, M. A.; TAMANAHA, M. S.; PROENÇA, L. A. O. Implementação e Avaliação do Monitoramento de Algas Nocivas e de Ficotoxinas em um Cultivo de Moluscos em Florianópolis – SC. **Atlântica - Rio Grande**, v. 32(1), p. 71-77, 2010.
- APPEL, N. M.; RAPOPORT, S. I.; O'CALLAGHAN, J. P. Sequelae of parenteral domoic acid administration in rats: comparison of effects on different anatomical markers in brain. **Synapse**, v. 25, p. 350-358, 1997.
- AMATO, A.; ORSINI, L.; D'ALELIO, D.; MONTRESOR, M. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). **J. Phycol.**, v. 41, p. 542-556, 2005.
- BATES, S. S.; RICHARD, J. Domoic acid production and cell division by *Pseudo-nitzschia multiseriis* in relation to light: dark cycle in silicate-limited chemostatculture. **Can Tech Rep Fish Aquat Sci**, v. 2138, p. 140-143, 1996.
- 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. (Eds.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 267-292, 1998.
- 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**. Springer-Verlag, v. 41, p. 407-426, 1998.
- BATES, S. S.; HILTZ, M. F.; LÉGER, C Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseriis* resulting from sexual reproduction. In: Martin JL, Haya K (eds) Proceedings of the 6th Canadian workshop on harmful marine algae. **Can Tech Rep Fish Aquat Sci**, v. 2261, p. 21–26, 1999.
- BATES, S. S.; LÉGER, C. Effects of Bicarbonate Addition on Domoic Acid Production by *Pseudo-nitzschia multiseriis* in Batch Culture. In Fisheries and Oceans Canada, Gulf Fisheries Centre, New Brunswick, Canada, 2006.

CAVALCANTE, K. P. **Taxonomia da diatomácea potencialmente tóxica *Pseudo-nitzschia peragallo* (Bacillariophyceae) em áreas de maricultura de Santa Catarina**. 69f. Dissertação (Mestrado em Botânica) Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

EURLMB - EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS. **EU-harmonised standard operating procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using uv detection**. v. 1, 2008.

FEHLING, J.; GREEN, D. H.; DAVIDSON, K.; BOLCH, C. J.; BATES, S. S. Domoic Acid Production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Scottish Waters. **J. Phycol.**, v. 40, p. 622–630, 2004b.

FEHLING, J.; DAVIDSON, K.; BOLCH, C. J.; BATES, S. S. Growth and Domoic Acid Production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) Under Phosphate and Silicate Limitation. **J. Phycol.**, v. 40, p. 674-683, 2004a.

FEHLING, J.; DAVIDSON, K.; BATES, S. S. Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. **Harmful Algae**, v. 4, p. 763–769, 2005.

FERNANDES, L. F.; CAVALCANTE, K. P.; PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A. Blooms of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* and *Pseudo-nitzschia calliantha*, and associated domoic acid accumulation in shellfish from the South Brazilian coast. **Diatom Res.** 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1080/0269249X.2013.821424>

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.I.; CHANLEY, M.H. (Eds). **Culture of marine invertebrates**. Plenum, New York, 1975, p. 29–59.

HAGSTRÖM, J. A.; GRANÉLI, E.; MANEIRO, I.; BARREIRO, A.; PETERMANN, A.; SVENSEN, C. Release and degradation of amnesic shellfish poison from decaying *Pseudo-nitzschia multiseries* in presence of bacteria and organic matter. **Harmful Algae**, v. 6, p. 175-188, 2007.

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.

- HOWARD, M. D. A.; COCHLAN, W. P.; LADIZINSKY, N.; KUDELA, R. M. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. **Harmful Algae**, v. 6, p. 206–217, 2007.
- KUDELA, R.; ROBERTS, A.; ARMSTRONG, M. Laboratory analyses of nutrient stress and toxin production in *Pseudo-nitzschia* spp. from Monterey Bay, California. In: STEIDINGER, K.A.; LANDSBERG, J. H.; TOMAS, C. R.; VARGO, G. A. (Eds.) **Harmful Algae** 2002. Florida and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. In press. 2003.
- LELONG, A.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P.; BATES, S. S. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. **Phycologia**, v. 51, n. 2, p.168-216, 2012
- LEWIS, N. I.; BATES, S. S.; MACLACHLAN, J. L.; SMITH, J. C. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries*. In: SMAYDA, T. J.; SHIMIZU, Y. (Eds.) **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**, Elsevier, Amsterdam, p. 601-606, 1993.
- MACFADYEN, A., HICKEY, B.M. Generation and evolution of a topographically linked, mesoscale eddy under steady and variable wind-forcing. **Cont. Shelf Res.**, v. 30, p. 1387–1402, 2010.
- MAEDA, M.; KODAMA, T.; TANAKA, T.; YOSHIZUMI, H.; TAKEMOTO, T.; NOMOTO, K.; FUJITA, T. Structures of isodomoic acids A, B and C, novel insecticidal amino-acids from the red alga *Chondria armata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 4892–4895, 1986.
- MAFRA, L.L.Jr. Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá, PR e toxicidade de Cepas Cultivadas. 79 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MAFRA, L. L. Jr., FERNANDES, L. F., PROENÇA, L. A.O. Harmful algae and toxins in Paranaguá Bay, Brazil: Bases for monitoring. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, p. 107 – 121, 2006.
- MAFRA, L.L. Jr., BRICELJ, V.M., OUELLETTE, C., LÉGER, C., BATES, S.S. Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. I. Filtration and pseudofeces production. **Aquatic Biology**, v. 6, p. 201-212, 2009a.

- MAFRA, L.L. Jr., BRICELJ, V.M., WARD, J.E. Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. II. Selective rejection. **Aquatic Biology**, v. 6, p. 213-226, 2009b.
- MAFRA, L.L.Jr., LÉGER, C., BATES, S.S., QUILLIAM, M.A. Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6003- 6011, 2009c.
- MALDONADO, M.T.; HUGHES, M.P.; RUE, E.L.; WELLS, M.L. The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *Pseudo-nitzschia australis*. **Limnology and Oceanography**, v. 47, p. 515–526, 2002.
- MARENZI, A. W. C; BRANCO, J. O. Avaliar o desenvolvimento do mexilhão *Perna perna* em relação a variáveis ambientais; índice de sobrevivência em um cultivo comercial em armação do itapocoroy-penha-SC. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22(2), p. 394-399, 2005.
- MARIÑO, C.; BLANCO, J.; ÁLVAREZ, G.; URIBE, E.; QUIJANO-SCHEGGIA, S.; LÓPEZ-RIVERA, A.; Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. **Harmful Algae**, v. 8, p. 938–945, 2009.
- MOS, L. Domoic acid: a fascinating marine toxin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 9 (3), p. 79–85, 2001.
- PAN, Y.; SUBBA RAO, D. V.; MANN, K. H. Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* under phosphate limitation. **J. Phycol.**, v. 32, p. 371-381, 1996.
- PAN, Y.; BATES, S. S.; CEMBELLA, A. D. Environmental Stress and Domoic Acid Production by *Pseudo-nitzschia*: a Physiological Perspective. **Natural Toxins**, v. 6, p. 127-135, 1998.
- POCKLINGTON, R.; MILLEY, J. E.; BATES, S. S.; BIRD, C. J.; DE FREITAS, A. S. W.; QUILLIAM, M. A. Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by high-performance liquid chromatography with derivatization. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, p. 351–368, 1990.

PROENÇA, L.A.O.; FONSECA, R.S.; PINTO, T. O. **Microalgas em área de cultivo do litoral de Santa Catarina**. Rima, São Carlos, 2012, 80p. Relatório técnico.

TAVARES, J.T.; PROENÇA, L. A. O.; ODEBRECHT, C. Assessing the harmful microalgae occurrence and temporal variation in a coastal aquaculture area, southern Brazil. **Harmful Microalgae in a Marine Aquiculture Area**. Atlântica, Rio Grande, v. 31, p. 129-144, 2009.

TRAINER, V.L. et al. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring, and impacts on ecosystem health, **Revista Harmful algae** v 14, p. 271-300, 2012

TIBIRIÇÁ, C.E.J.A. **Microalgas potencialmente nocivas na Baía de Guaratuba, Paraná: Distribuição espaço-temporal e fatores controladores**. 102f. Dissertação (Mestrado em Botânica) Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SCHOLIN, C.A.; GULLAND, F.; DOUCETTE, G.J.; BENSON, S.; BUSMAN, M.; CHAVEZ, F.P.; CORDARO, J.; DELONG, R.; DE VOGELAERE, A.; HARVEY, J.; HAULENA, M.; LEFEBVRE, K.; LIPSCOMB, T.; LOSCUTOFF, S.; LOWENSTINE, L.J.; MARIN, R.; MILLER, P.E.; MCLELLAN, W.A.; MOELLER, P.D.R.; POWELL, C.L.; ROWLES, T.; SILVAGNI, P.; SILVER, M.; SPRAKER, T., TRAINER, V.; VAN DOLAH, F.M. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. **Nature**, v. 403, p. 80–84, 2000.

SUBBA RAO, D. V.; PAN, Y.; MUKHIDA, K. Production of Domoic Acid by *Pseudo-nitzschia multiseries* Hasle, Affected by Lithium. **Marine Ecology**, v. 19 (1), p. 31-36, 1998.

WRIGHT, J.L.C.; BOYD, R.K.; DE FREITAS, A.S.W.; FALK, M. et.al. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. **Canadian Journal Chemistry**, Canada, v. 67, p. 481–490, 1989.

# CAPÍTULO 2

---

## Respostas alimentares de diferentes espécies comerciais de bivalves à microalga nociva *Pseudo-nitzschia* spp.: taxas de filtração e acúmulo de toxinas

### Resumo

Florações de algas nocivas podem causar a mortalidade de plantéis de organismos marinhos cultivados, ou a inadequação de produtos, sobretudo moluscos bivalves, destinados ao consumo humano. Considerando que o acúmulo de toxinas varia bastante entre espécies de bivalves, e de acordo com as condições do meio, o presente estudo buscou investigar as taxas de ingestão e de acúmulo de toxina amnésica ácido domóico (AD) em bivalves cultivados no sul do Brasil, em resposta a florações tóxicas de *Pseudo-nitzschia* spp. simuladas em laboratório. Taxas de clareamento e de filtração de células (TC e TF) foram calculadas para as ostras *Crassostrea gigas* e *C. brasiliana* e para o mexilhão *Perna perna*, mediante o fornecimento de células cultivadas de *Pseudo-nitzschia* spp. em fase exponencial ou estacionária de crescimento. Bivalves das espécies obtidas foram dispostos em câmaras experimentais de filtração e as taxas alimentares foram calculada a partir da variação da concentração celular de *Pseudo-nitzschia* durante um tempo de incubação, usando-se uma câmara controle para descontar a sedimentação ou ressuspensão de células. Um experimento adicional verificou o acúmulo e a detoxificação de AD em *P. perna* e *Crassostrea* spp. alimentados com *Pseudo-nitzschia multiseries* por 23h, seguido por 168 h de depuração em dieta não tóxica de *Isochrysis galbana*. A TC não diferiu ( $p = 0,428$ ) entre os estágios de crescimento dos cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp. usados nas dietas, mas variou significativamente ( $p < 0,001$ ) entre as espécies analisadas ( $P. perna > C. gigas = C. brasiliana$ ). Apesar das TCs de mexilhões *P. perna* ( $4,1-5,4 \text{ ml min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$ ) terem sido superiores às de ostras de biomassa equivalente ( $1,3-1,7 \text{ ml min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$ ), eles não acumularam nível detectável de toxina. As ostras acumularam níveis moderados da toxina, atingindo uma concentração máxima de  $4,85 \pm 1,86 \mu\text{g AD g}^{-1}$ , que diminuiu exponencialmente ( $2,1\% \text{ h}^{-1}$ ) a partir do fornecimento da dieta não tóxica. Mexilhões *P. perna*, pelo contrário, acumularam níveis indetectáveis de AD, o que pode ser resultante de altas taxas de eliminação e/ou baixas taxas de assimilação da toxina, dando suporte a uma proposta de manejo diferenciado por espécie de bivalve, em caso de proibição da comercialização de bivalves devido a florações tóxicas de *Pseudo-nitzschia*.

*Palavras-chave:* taxa de clareamento, acúmulo de toxinas, depuração, toxinas amnésicas, ácido domóico, ASP, *Crassostrea* spp., *Perna perna*.

## 2.1 Introdução

Floração de algas nocivas (FAN) é o termo designado para descrever um evento onde há uma rápida multiplicação de uma ou mais espécies de microalgas, com algum tipo de prejuízo ao ecossistema, à saúde humana ou às comunidades humanas adjacentes ao sistema costeiro. Tais eventos podem causar a depleção de oxigênio na água, a mortalidade de organismos aquáticos por lesões físicas ou pela produção de substâncias nocivas, como as ficotoxinas, capazes de afetar organismos aquáticos e humanos (HALLEGRAEFF, 2003). A toxicidade e outros efeitos negativos de algas nocivas não estão limitados a uma classe de algas, mas sim distribuídas entre vários grupos taxonômicos (ZINGONE; ENEVOLDSEN, 2000).

Além disso, as FAN's podem causar impactos econômicos severos ao comércio de pescados (ROELKE, 1993), turismo e saúde pública. Em todo o mundo, as ficotoxinas são responsáveis por 600.000 casos de intoxicação por ano (VAN DOLAH, 2000). O número de eventos tóxicos, com variável grau de impacto, também vem aumentando nas últimas décadas em nível nacional (PROENÇA e MAFRA, 2005; PROENÇA *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2013), alertando para a necessidade de um monitoramento das espécies nocivas na costa do Brasil. Os danos à saúde humana ou animal associados a estas toxinas são geralmente observados após intoxicações agudas, ao passo que os efeitos de exposição sucessiva ou crônica a baixos níveis de toxina são pouco documentados (VAN DOLAH *et al.*, 2001).

As intoxicações mais comuns causadas por microalgas são o envenenamento paralisante, diarreico e amnésico por consumo de mariscos (PSP, DSP e ASP, respectivamente), associadas ao consumo de moluscos bivalves, que acumulam e transferem as toxinas algais ao longo da cadeia trófica. O ASP, que é causado pela neurotoxina ácido domóico (AD), produzida por diatomáceas, foi registrado pela primeira vez em 1987, em Prince Edward Island (PEI), costa leste do Canadá (BATES *et al.*, 1989). Naquela oportunidade, foram registrados 153 casos de uma intoxicação aguda relacionada à ingestão de mexilhões (*Mytilus edulis*), manifestando sintomas que evoluíam desde vômitos, cólicas e diarreia, até a perda

de memória, desorientação, e coma, com quatro óbitos registrados (WRIGHT *et al.*, 1989).

O AD é um aminoácido similar ao neurotransmissor ácido glutâmico, competindo por seus sítios de ligação nos neurônios. Assim, o AD se liga aos receptores sinápticos do glutamato, podendo levar a perda de memória de curto prazo e outros danos persistentes ao sistema nervoso (PERL *et al.*, 1990), pois promove o aumento no nível intracelular de  $Ca^{2+}$ , levando à despolarização massiva nos neurônios, turgidez e morte dos mesmos (PULIDO *et al.*, 2008). Os receptores para o glutamato são mais numerosos na região cerebral do hipocampo, associada a funções como o aprendizado e memória (revisado em BATES *et al.* 1998). Em casos extremos, ou em pacientes com insuficiência renal, o AD pode levar à morte após 48 h da ingestão (PERL *et al.*, 1990; TEITELBAUM *et al.*, 1990). Ainda, a medicação com fortes anti-inflamatórios causa a maior permeabilidade das células intestinais a toxinas (PÓVOA, 2002), favorecendo o mecanismo da intoxicação.

O comércio de bivalves pode ser fechado durante florações de microalgas produtoras de AD, principalmente *Pseudo-nitzschia* spp., visando proteger a saúde humana e evitar casos de intoxicação. No verão de 2009, nos municípios de Penha e Florianópolis (SC), a toxina foi encontrada em concentrações acima do nível regulatório estipulado pelo ministério da aquicultura, pesca e abastecimento (MAPA), de  $20 \mu\text{g AD g}^{-1}$  de tecido fresco de bivalve, associada a uma floração de células do complexo *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (*P. pseudodelicatissima* e *P. calliantha*), resultando em um fechamento comercial de bivalves por 25 dias, com sérias implicações econômicas para os produtores de moluscos e para o turismo (FERNANDES *et al.*, 2013). A presença de espécies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente tóxicas também vem sendo registrada no estado vizinho do Paraná (PR) (MAFRA *et al.*, 2006; TIBIRIÇÁ, 2013).

O tempo de depuração (detoxificação) que segue um episódio de floração tóxica varia conforme a espécie de bivalve contaminado, a composição do séston, as condições ambientais dominantes, entre outros fatores. Blanco *et al.* (2002a, 2002b), estudando a detoxificação de AD em bivalves contaminados, reportaram que a eliminação de toxinas é muito mais rápida em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* (redução de 56-86% do AD em 4 d) do que em vieiras *Pecten maximus* (redução de 90% em 300 d), e que a detoxificação seria afetada por fatores como salinidade e a afinidade de diferentes órgãos/tecidos dos bivalves pelo

AD. Mexilhões *Mytilus edulis* também eliminaram a toxina mais rapidamente do que ostras *Crassostrea virginica* após contaminação com AD em laboratório a 12 °C, sendo que neste caso o tamanho corporal pode afetar a taxa de eliminação da toxina, que foi mais rápida em ostras menores, mas similar para mexilhões de tamanho variado (MAFRA *et al.*, 2010a).

A concentração de toxinas também depende da taxa de ingestão de células tóxicas pelos bivalves e sua capacidade de assimilação. Para ostras *C. virginica*, por exemplo, a menor taxa de acúmulo de AD comparada a de mexilhões *M. edulis* (MAFRA *et al.*, 2010b) é resultante de (i) uma ingestão limitada de células tóxicas e não-tóxicas de *P. multiseriis*, evidenciada por uma redução na taxa de clareamento (i.e., volume de água filtrado por unidade de tempo) de ostras alimentadas exclusivamente com *Pseudo-nitzschia*, aliada a (ii) um mecanismo de rejeição pré-alimentar nas pseudofezes, principalmente para células mais longas e cadeias de células (MAFRA *et al.*, 2009a, 2009b).

O presente estudo buscou investigar as taxas específicas de clareamento e filtração de células de *Pseudo-nitzschia* spp., e de acúmulo e detoxificação de AD por ostras (*Crassostrea gigas* e *C. brasiliana*) e mexilhões (*Perna perna*) cultiváveis no litoral dos estados do PR e SC, região passível da ocorrência de florações tóxicas e sensível a um fechamento comercial pela dependência econômica do turismo e da maricultura. Através de um conjunto de experimentos em laboratório, que simularam a exposição dos bivalves a florações naturais de *Pseudo-nitzschia* spp., o estudo investigou o potencial de cada espécie de bivalve comercial para atuar como vetor de ASP sob condições comumente encontradas no ambiente, e avaliou a possibilidade de se realizar um manejo distinto por espécie de bivalves, no caso da contaminação multiespecífica durante florações tóxicas de *Pseudo-nitzschia* em cultivos comerciais de bivalves na região.

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Aquisição e manutenção dos organismos

Para a determinação das taxas alimentares, as ostras da espécie exótica *Crassostrea gigas* e a nativa *C. brasiliana* foram obtidas do cultivo da Universidade

Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis-SC, e os mexilhões *Perna perna* de cultivo comercial em Penha-SC. As ostras nativas, usadas no experimento de acúmulo e detoxificação de AD, foram provenientes do assentamento de larvas em coletores de um cultivo comercial na Ilha do Mel, Paranaguá-PR, sendo tratadas como *Crassostrea* spp. pela impossibilidade de se determinar a proporção de espécies que compunham o lote. Os bivalves foram mantidos em bandejas flutuantes, em aquários contendo 140 L de água do mar filtrada e esterilizada, a  $22 \pm 1$  °C e salinidade  $30 \pm 2$ , e alimentados com cultivos de e duas ou mais espécies de microalgas não tóxicas (principalmente *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis* sp.) em baixa densidade celular. Todos os bivalves adquiridos possuíam pequeno porte (adultos jovens), visando minimizar a demanda por alimento e a troca d'água, e estes foram mantidos conforme descrito previamente durante alguns meses entre 2013 e o início de 2014, em paralelo aos cultivos de *Pseudo-nitzschia* estabelecidos para uso nos experimentos.

Para a determinação das taxas alimentares em ostras, foi utilizado um cultivo monoclonal de *Pseudo-nitzschia calliantha*, PSN 40, cujas células mediam  $63,58 \times 4,39$  µm (comprimento x largura), em média, no momento do experimento. Para o experimento de alimentação com mexilhões, foi utilizado outro cultivo do grupo *P. calliantha*, PSN-41, com tamanho celular similar ( $64,33 \times 4,59$  µm). Ambas as cepas foram isoladas de águas costeiras em Caiobá, Matinhos-PR e Canal do Linguado, São Francisco do Sul-SC, respectivamente (ver capítulo 1). Por fim, para medir as taxas de acúmulo e detoxificação de AD, foi utilizada uma cepa conhecidamente tóxica de *Pseudo-nitzschia multiseriata*, SOCAL-164 ( $77,41 \times 4,85$  µm), proveniente da Califórnia, EUA, e gentilmente cedida por Christopher Scholin e Holly Bowers (Monterey Bay Aquarium Research Institute, Moss Landing, CA).

### 2.2.2 Taxas alimentares: clareamento e filtração

Todos os experimentos foram realizados em ambiente climatizado a 22 °C, na sala de incubação e cepário do Laboratório de Microalgas (LaMic), no Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (CEM-UFPR). Baterias de experimentos foram realizadas em momentos distintos para se medir as taxas alimentares das espécies de mexilhões *P. perna* e das ostras *C. gigas* e *C. brasiliana*, expostas a 2 tratamentos cada: células de *Pseudo-nitzschia* em fase

exponencial (6-10 d de crescimento em cultivo) ou estacionária (15-20 d), totalizando 6 baterias experimentais.

Em preparação para os experimentos, os bivalves foram dispostos por 12-18 h em um aparelho multi-misturador para monitoramento de moluscos, desenvolvido exclusivamente para experimentos como este (Figura 1). Durante este período de aclimatação, foi fornecida a dieta experimental composta por cultivo de *Pseudo-nitzschia* diluído em 10-12 L de água do mar filtrada, salinidade 30, buscando atingir uma densidade celular de  $\sim 4000$  cél.  $\text{ml}^{-1}$ . A suspensão (dieta) foi armazenada em um galão-estoque (Fig. 1-a) com capacidade total de 50 L, onde era constantemente misturada por aeração e distribuída por mangueiras de acrílico para o sistema de câmaras que continham os bivalves. O multi-misturador conta com seis câmaras cilíndricas em acrílico, de 355 ml cada, dotadas de uma pá homogeneizadora giratória (Fig. 1-e), com velocidade regulável, para evitar a sedimentação das microalgas. Cada câmara é munida de válvulas de admissão (Fig. 1-c) e escape (Fig. 1-d) de água na sua porção superior, sendo a de admissão ligada ao galão-estoque de microalgas e a de escape ligada um sistema receptor, de onde uma bomba peristáltica (Gilson<sup>®</sup>, Miniplus Evolution) (Fig. 1-g) bombeia o escape de volta ao galão-estoque, promovendo a recirculação do sistema. O fluxo era ajustado por meio de torneiras (Fig. 1-b), resultando em uma vazão total de  $178 \text{ ml min}^{-1}$ , ou  $44,6 \text{ ml min}^{-1}$ , em média, por câmara.

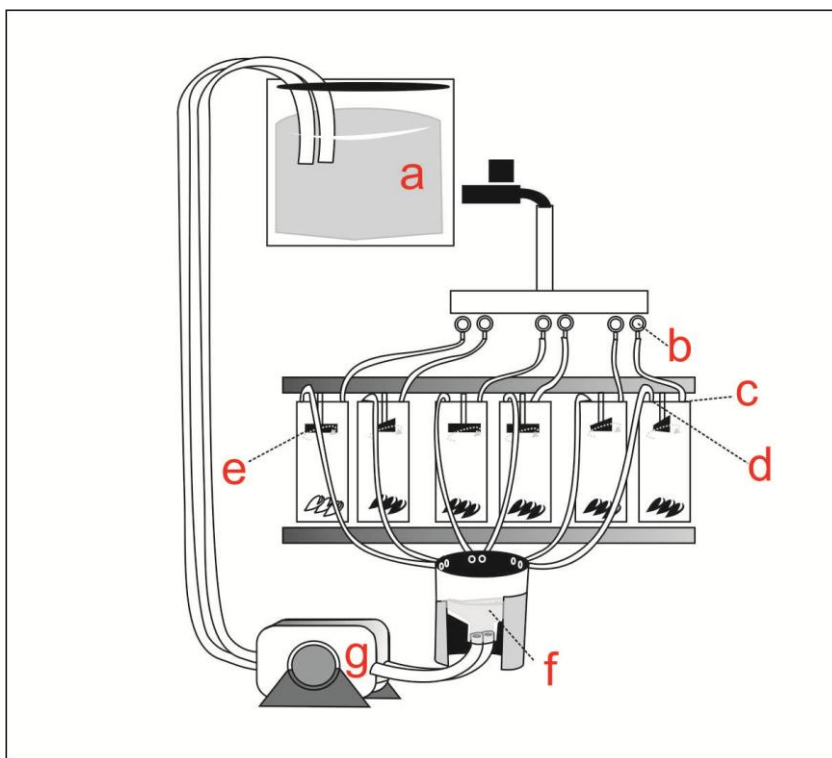


Figura 1: Esquema ilustrativo do sistema utilizado nos experimentos de alimentação com bivalves: o galão-estoque (a), que contém cultivos de *Pseudo-nitzschia*, distribui a dieta por gravidade às torneiras de ajuste de fluxo (b), que daí é conduzida à válvula de admissão (c) das câmaras experimentais; a suspensão é homogeneizada em cada câmara pelas pás agitadoras (e), e conduzida pelas válvulas de escape (d) ao receptor (f), de onde a água é recolhida e bombeada através da bomba peristáltica (g) de volta ao galão-estoque.

Em cada experimento, bivalves medindo em média 25 mm de altura de concha foram alocados em 5 câmaras experimentais (réplicas), sendo 4 a 5 indivíduos por câmara, com exceção da câmara controle, que continha conchas vazias para a quantificação da taxa de sedimentação ou ressuspensão das células de *Pseudo-nitzschia*. Para a obtenção da taxa de clareamento (TC), foi realizada a amostragem de 5 ml de água para quantificação da densidade celular inicial em cada câmara, seguida da interrupção do fluxo de água por um tempo que variou de 6 a 25 min para mexilhões e 20 a 40 min para ostras. Tal diferença no tempo de incubação se deu em função da velocidade de remoção de células da coluna d'água ser notavelmente maior para mexilhões. Ao final deste período, durante o qual os bivalves permaneceram removendo as células suspensas na água, novas amostras foram coletadas de cada câmara, usando uma seringa, para contagem da densidade celular final. A diferença entre a concentração final e a inicial representou a remoção de partículas pela filtração dos bivalves, que foi finalmente somada à sedimentação celular. Esta última foi medida pela diferença nas contagens (final – inicial) da câmara controle. A densidade celular foi quantificada nas amostras

fixadas em solução de lugol acético (1%), por meio de contagem em câmaras Palmer-Maloney de 100 µl, sob microscópio ótico (Olympus® BX41). A TC média por indivíduo ( $\text{ml min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$ ) foi obtida através da fórmula (COUGHLAN 1969):

$$TC (\text{ml min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}) = [(\log_e C_i - \log_e C_f) - (\log_e C_{ci} - \log_e C_{cf})] \times (V \times T^{-1} \times n^{-1}) \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $C_i$  é a concentração celular inicial e  $C_f$  a concentração final na câmara experimental, e  $C_{ci}$  e  $C_{cf}$  são, respectivamente, a concentração inicial e final na câmara controle,  $V$  é o volume da câmara,  $T$  é o tempo e  $n$  é o número de animais por câmara.

Ao fim de cada experimento, os animais foram retirados das câmaras, medidos do umbo à borda da concha (altura de concha), dissecados e raspados das conchas, para obtenção do peso úmido e o peso seco dos tecidos moles em balança analítica de precisão (Ohaus® Discovery). O peso seco foi obtido após 24 h em estufa de bancada FANEM® a 65 °C. Os valores de TC foram então normalizados para um bivalve-padrão, calculado pela média dos pesos secos de todos os bivalves utilizados no experimento ( $W_{pd} = 0,0203 \text{ g}$ ). A TC padronizada ( $TC_{pd}$ ) foi finalmente corrigida pela relação alométrica geral para bivalves (BAYNE; NEWELL, 1983):

$$TC_{pd} (\text{ml min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}) = (W_{pd}/W_{exp})^{0,616} \times TC_{exp} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde  $W_{pd}$  é peso seco padrão (médio),  $W_{exp}$  é o peso seco obtido na amostra (câmara) e  $TC_{exp}$  é a taxa de clareamento obtida no experimento.

Em seguida, foi calculada a taxa de filtração (TF,  $\text{cél. min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$ ), que corresponde ao número de partículas removidas da suspensão por unidade de tempo e é obtida multiplicando-se a TC pela média geométrica entre a densidade celular inicial e final ao longo do período de filtração:

$$TF = TC \times \text{med.geom.} (C_i; C_f) \quad (\text{Eq.3})$$

A comparação entre a  $TC_{pd}$  das diferentes espécies de bivalves foi realizada através de análise de variância (ANOVA) bifatorial, considerando como fatores a espécie de bivalve e a fase de crescimento das células de *Pseudo-nitzschia* oferecidas em suspensão (exponencial ou estacionária), seguida de teste de Tukey, quando necessário. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica® 8.0 (Stat Soft, Inc.).

### 2.2.3 Acúmulo e depuração de ácido domóico

Para investigar o acúmulo e a detoxificação de AD, indivíduos de *Perna perna* (n = 80) e *Crassostrea* ssp. (*C. brasiliiana*, *C. rizophorae* e *Crassostrea* sp. em proporção não determinada) (n = 130) foram dispostos simultaneamente em bandejas flutuantes, em um aquário com 100 L de água do mar esterelizada, a 22 °C e salinidade 30. Depois de um período de 12 h de aclimação, durante o qual os bivalves receberam uma dieta não tóxica composta pelo flagelado *Isochrysis galbana* (10.000 cél. ml<sup>-1</sup>), eles foram expostos por 23 h a uma dieta tóxica elaborada a partir de uma mistura de igual volume de 2 cultivos de *P. multiseriis* (volume total = 9 L) em fase exponencial e estacionária de crescimento (8 e 14 d), simulando uma floração natural. Após adicionar 150 ml da dieta tóxica de *P. multiseriis* ao aquário para se obter uma densidade inicial de 1000 cél. ml<sup>-1</sup>, as células que eram filtradas pelos bivalves foram repostas por meio do bombeamento da dieta tóxica a 5,5 ml min<sup>-1</sup>, usando uma bomba peristáltica. A densidade celular no aquário foi monitorada periodicamente a cada 2 h (exceto durante a madrugada) por meio da tomada de amostras e contagens. Volumes adicionais (50 a 150 ml) foram acrescentados ao aquário no início da manhã e sempre que uma queda acentuada na densidade celular era verificada ao longo do dia. Finalmente, a concentração intracelular de toxinas foi mensurada em amostras (n = 3) de 50 ml do estoque da dieta tóxica, que foram filtradas em filtros Whatman<sup>®</sup> GF/C (25mm de diâmetro e 1,2µm de porosidade) e armazenadas a -20 °C até o momento da análise por HPLC-UV, conforme descrito mais adiante.

Durante o período de acúmulo de toxinas, amostras aleatórias (n = 3) de cada uma das espécies de bivalve, compostas por 4 ostras ou 2 mexilhões cada, foram retiradas após 2, 6, 12 e 23 h de exposição às células tóxicas. Adicionalmente, amostras iniciais de bivalves foram coletadas imediatamente antes do início do experimento (0 h). Todas os bivalves amostrados foram dissecados, pesados e armazenados a -20 °C até o momento do processamento para a análise do conteúdo acumulado de toxinas. Após o tempo de exposição às células tóxicas, os bivalves remanescentes foram remanejados para outro aquário livre de toxinas, onde foram alimentados com uma dieta não-tóxica (1000-10,000 cél. *I. galbana* ml<sup>-1</sup>; diâmetro médio 5 µm) por um período de 168 h, durante o qual amostras de bivalves foram tomadas após 3, 8, 25, 72 e 168 h do início do período de depuração, e

processadas conforme descrito anteriormente. Durante a depuração, a densidade celular de *I. galbana* foi monitorada 3 vezes ao dia.

O AD foi extraído das amostras com adição de metanol 50% na proporção de 4 ml : 1g de tecido, seguido de ruptura/desmembramento dos tecidos por sonda de ultrassom (Cole Parmer® Ultrasonic Processor) a 14 KHz, por 3 min, com pulsos de 3 s e intervalos de 1 s. O produto da lise por ultrassom foi centrifugado a 3200 rpm por 15 min, e 1,5 ml do sobrenadante foi passado por filtros de seringa (0,22 µm porosidade), e armazenado em *vials* de vidro âmbar para análise por HPLC-UV.

A análise de HPLC-UV foi realizada por meio de corrida isocrática e detecção por UV em 242 nm, usando fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>, a 40°C, em colunas C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), com volume de injeção de 40 µl, seguindo método harmonizado da União Europeia (EURLMB, 2008). As concentrações de AD obtidas (µg ml<sup>-1</sup>) foram multiplicadas por 5 (fator de diluição dos extratos) e obteve-se a concentração de toxina, em µg g<sup>-1</sup>, para cada espécie de bivalve ao longo do experimento. A taxa de detoxificação foi obtida pela aproximação a curvas exponenciais das concentrações de AD durante a segunda fase do experimento (depuração). Nesta etapa, todos os valores foram acrescidos do limite de detecção do método (0,075 µg g<sup>-1</sup>), para evitar que valores iguais a zero fossem atribuídos às concentrações não detectáveis de AD.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Taxas alimentares: clareamento e filtração

As taxas de clareamento padronizadas por unidade de peso ( $TC_{pd}$ ) de indivíduos de *C. brasiliiana* expostos a células de *P. calliantha* nas fases estacionária (1,42 ml min<sup>-1</sup>) e exponencial de crescimento (1,32 ml min<sup>-1</sup>) foram equivalentes e similares às daquelas de indivíduos de *C. gigas* (1,43 ml min<sup>-1</sup> na fase estacionária e 1,70 ml min<sup>-1</sup> na exponencial) (Tabela 1). As  $TC_{pd}$  de mexilhões *P. perna* foram aproximadamente o dobro daquelas das ostras (4,08 ml min<sup>-1</sup> na fase estacionária e 3,44 ml min<sup>-1</sup> na exponencial). Segundo a ANOVA (Tabela 2), houve diferenças significativas entre as  $TC_{pd}$ 's das diferentes espécies de bivalves utilizadas ( $p < 0,001$ ), sendo a diferença decorrente dos valores significativamente superiores

medidos para os mexilhões *P. perna* em comparação a ambas espécies de ostras ( $p = 0,0002$  nos dois casos; Tukey); as  $TC_{pd}$ 's das ostras *C. gigas* e *C. brasiliana* não foram significativamente diferentes entre si ( $p = 0,889$ ). Além disso, não houve diferença em decorrência das fases de crescimento das células oferecidas como dieta ( $p = 0,632$ ), nem da interação entre fases de crescimento e espécies de bivalves ( $p = 0,521$ ). As taxas de filtração padronizadas por unidade de peso ( $TF_{pd}$ ), produto da  $TC_{pd}$  e da densidade de células utilizada em cada bateria de experimentos, variou de cerca de 1100 a 3500  $\text{cél. min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$  para ostras e de 2300 a 5000  $\text{cél. min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$  para mexilhões (Tabela 1).

Tabela 1: Taxas (média  $\pm$  erro padrão) de clareamento ( $TC_{pd}$ ) e de filtração ( $TF_{pd}$ ) padronizadas por indivíduo de peso médio ( $\text{células min}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$ ) para as diferentes espécies de bivalves expostas a células de *Pseudo-nitzschia calliantha* em fase exponencial ou estacionária de cultivo.

Espécie	Fase	$TC_{pd}$	$TF_{pd}$
<i>C. gigas</i>	Exponencial	1,70 $\pm$ 0,45	2858 $\pm$ 594
<i>C. gigas</i>	Estacionária	1,43 $\pm$ 0,39	3516 $\pm$ 514
<i>C. brasiliana</i>	Exponencial	1,32 $\pm$ 0,35	2996 $\pm$ 460
<i>C. brasiliana</i>	Estacionária	1,42 $\pm$ 0,39	1105 $\pm$ 514
<i>P. perna</i>	Exponencial	3,44 $\pm$ 0,35	2268 $\pm$ 460
<i>P. perna</i>	Estacionária	4,08 $\pm$ 0,39	4982 $\pm$ 514

Tabela 2: Resultado da análise de variância (ANOVA) para as taxas de clareamento padronizadas por indivíduo de peso médio entre espécies de bivalve, entre fases de crescimento das células de *Pseudo-nitzschia calliantha* usadas como dieta, e a interação entre os dois fatores.

	g.l.	SS	MS	p valor	F valor
Intercepto	1	120,967	120,967	$1,6 \times 10^{-11}$	198,7212
Espécies	2	30,321	15,160	<b>0,000005</b>	24,9051
Fases	1	0,144	0,144	0,632138	0,2367
Espécies * Fases	2	0,821	0,410	0,521301	0,6743
Erro	19	11,566	0,609		

### 2.3.2. Acúmulo e depuração de ácido domóico

A administração da dieta monoalgal composta por células de *P. multiseriis*, com toxicidade média de  $0,290 \pm 1,06 \text{ pg. cel}^{-1}$ , manteve a concentração celular entre 550 a 1180  $\text{cél. ml}^{-1}$  durante a fase de contaminação do experimento (Fig. 2). Posteriormente, a concentração celular de *I. galbana* variou entre 1000 e 10.000  $\text{cel. ml}^{-1}$  (Fig. 3) durante as 148 horas de depuração do experimento.

Os níveis acumulados de AD em *Crassostrea* spp. atingiram o pico máximo ( $4,54 \pm 1,86 \text{ } \mu\text{g AD g}^{-1}$ ) após 23 horas de exposição às células tóxicas (Fig. 4), com taxa de acúmulo de  $0,20 \text{ } \mu\text{g AD g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Mexilhões *P. perna* não apresentaram níveis detectáveis de AD (limite de detecção:  $0,075 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) durante todo o experimento.

A eliminação de AD em *Crassostrea* spp. se deu de forma exponencial, sendo mais acelerada nas primeiras horas, atingindo  $1,95 \pm 0,73 \text{ } \mu\text{g AD g}^{-1}$  após 3 h de depuração, e demorando até 168 h para reduzir os níveis de toxinas a concentrações abaixo do limite de detecção do método (Fig. 5). A taxa de detoxificação exponencial durante todo o período de depuração foi de  $0,021 \text{ h}^{-1}$ . Naturalmente, não se pode descrever a taxa de detoxificação por *P. perna*.

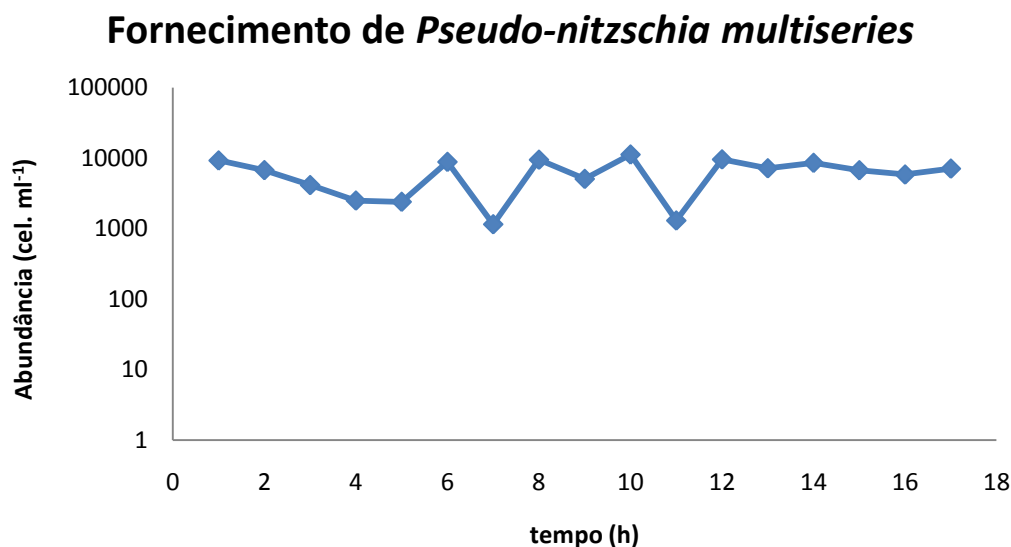


Figura 2: Densidade celular (em escala logarítmica) de *Pseudo-nitzschia multiseriis* oferecida aos bivalves ao longo da fase inicial (contaminação) do experimento de acúmulo e detoxificação de ácido domóico.

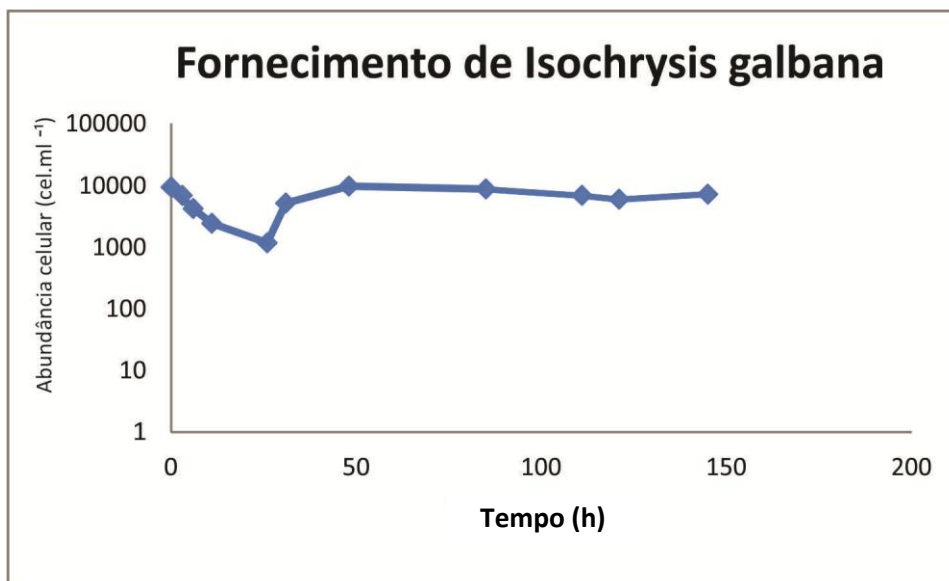


Figura 3: Densidade celular (em escala logarítmica) de *Isochrysis galbana* oferecida aos bivalves ao longo da fase final (depuração) do experimento de acúmulo e detoxificação de ácido domóico.

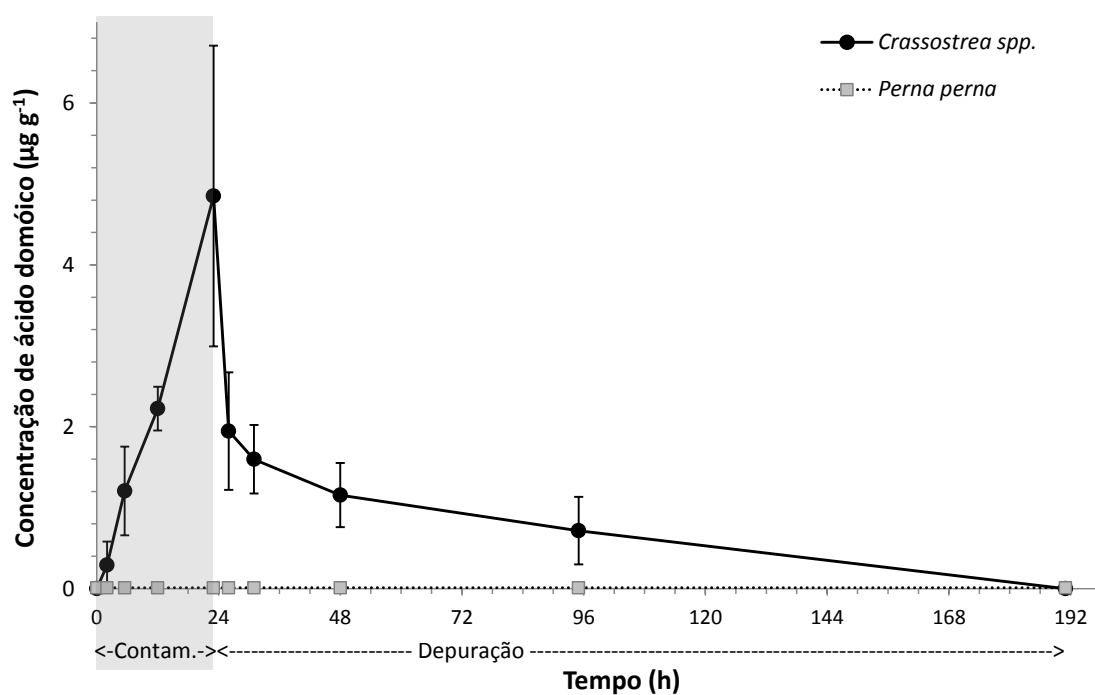


Figura 4: Concentração de ácido domóico (AD) acumulado nos tecidos vivos de ostras *Crassostrea spp.* e mexilhões *Perna perna* durante as fases de contaminação e depuração de um experimento em laboratório. Mexilhões não acumularam níveis detectáveis de AD (limite de detecção = 0,075 µg g<sup>-1</sup>).

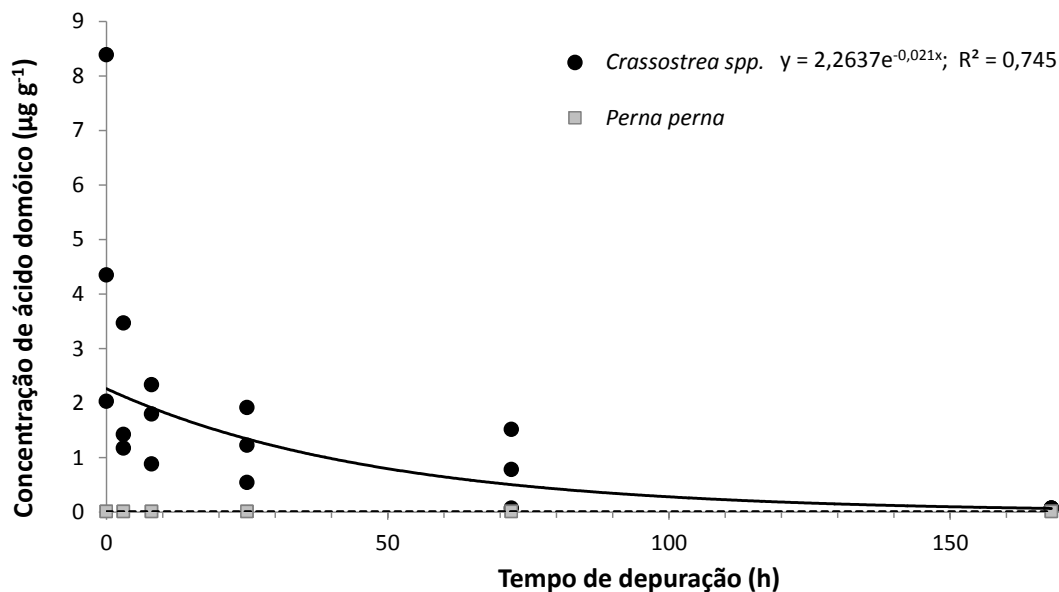


Figura 5: Concentração de ácido domóico (AD) nos tecidos vivos de ostras *Crassostrea spp.* e mexilhões *Perna perna* durante a fase de depuração de um experimento em laboratório. Mexilhões não acumularam níveis detectáveis de toxina (limite de detecção =  $0,075 \mu\text{g g}^{-1}$ ). A função exponencial que representa a detoxificação de AD por ostras, bem como seu  $R^2$ , estão apresentados (taxa de detoxificação exponencial =  $0,021 \text{ h}^{-1}$ ).

## 2.4 Discussão

Dentre as espécies de bivalves cultiváveis no sul do Brasil investigadas no presente estudo, a taxa de clareamento sob o fornecimento de dietas exclusivas de *Pseudo-nitzschia spp.* foi superior em mexilhões *P. perna* do que em ostras *Crassostrea gigas* e *C. brasiliana*. Naturalmente, se esperaria que a taxa de acúmulo das toxinas produzidas por estas microalgas, o ácido domóico (AD) fosse também mais elevada em mexilhões, entretanto, o que se observou neste estudo foi o acúmulo de até  $\sim 5 \mu\text{g AD g}^{-1}$  de tecido fresco em ostras *Crassostrea spp.* após 23 horas de exposição a células tóxicas de *P. multiseriata*, enquanto que mexilhões *P. perna* acumularam a toxina em níveis abaixo do nível de detecção do método de HPLC-UV usado neste experimento ( $0,075 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Métodos mais sensíveis de detecção, como por exemplo aqueles que fazem uso da espectrometria de massas (LC-MS/MS) (e.g. MAFRA *et al.*, 2009c), serão aplicados futuramente a estas amostras com o intuito de se detectar e quantificar níveis de AD abaixo do nível detectável nesse experimento.

A taxa específica de clareamento é um fator determinante na ingestão e assimilação de toxinas por bivalves expostos a altas densidades de células tóxicas. Apesar disso, somente uma maior taxa de clareamento não sustenta a afirmação de que o nível tóxico encontrado será maior em uma dada espécie de bivalve, como visto no presente estudo. Fatores como a seleção alimentar pré-ingestiva, mais eficiente em algumas espécies de bivalves como as ostras do gênero *Crassostrea* (MAFRA *et al.*, 2010b), a taxa de depuração específica, que pode ser elevada em alguns mitilídeos e ostras (BLANCO *et al.*, 2002b; MAFRA *et al.*, 2010a), a composição do séston, que pode influenciar na taxa de filtração (VELASCO e NAVARRO, 2005), entre outros, afetam o aporte de toxinas, seu tempo de retenção nos tecidos dos bivalves e, conseqüentemente, o acúmulo de toxinas no indivíduo. No presente estudo, o balanço entre os processos da ingestão, assimilação e eliminação de toxinas mostrou comportamento distinto entre os bivalves investigados, conforme discutido adiante.

Os fatores interespecíficos são os mais pronunciados diferenciais nas taxas de acúmulo e detoxificação de toxinas algais em moluscos bivalves. Espécies como a vieira *Pecten maximus* elimina AD lentamente de seus tecidos, retendo grandes concentrações da toxina por períodos prolongados de tempo (WOHLGESCHAFFEN *et al.*, 1992; BLANCO *et al.*, 2002a). Por sua vez, mexilhões *Mytillus edulis* eliminam a toxina rapidamente (NOVACZEK *et al.*, 1992) e ostras *Crassostrea virginica* de porte comercial, apesar de eliminarem AD mais lentamente que mexilhões *M. edulis*, acumulam concentrações inferiores de toxinas por apresentarem uma menor taxa de ingestão de células tóxicas de *Pseudo-nitzschia*, o que por sua vez se deve à menor taxa de clareamento e uma maior capacidade de selecionar as partículas alimentares antes da ingestão, eliminando preferencialmente longas células e cadeias de células de *Pseudo-nitzschia* (MAFRA *et al.*, 2010b).

O balanço entre as taxas de assimilação e de depuração específicas de AD podem explicar o menor acúmulo desta toxina em *P. perna* em relação a *Crassostrea* spp. no presente estudo. A taxa de depuração dos mexilhões foi provavelmente mais elevada do que a de assimilação do AD, já que estes organismos demonstraram uma maior capacidade de filtração de células de *Pseudo-nitzschia* e mesmo assim registraram menores concentrações de toxinas em relação às ostras. Tendo em vista que as concentrações médias de AD e a densidade celular a que os bivalves foram expostos ( $0,290 \pm 0,106$  pg DA cél.; 550-

1180 cél. ml<sup>-1</sup>) não representariam uma floração altamente tóxica, o processo de detoxificação pode ter sobreposto a taxa de assimilação dos mexilhões, ao menos até os níveis detectáveis pelo método de HPLC-UV utilizado, que é voltado para o monitoramento de concentrações de AD próximas ao nível regulatório (20 µg g<sup>-1</sup>).

O tamanho da partícula é outro elemento que influencia na taxa de ingestão específica e pode contribuir para um acúmulo diferencial de toxinas em diferentes espécies de bivalves. Dupuy *et al.* (2000) demonstraram em experimentos *in situ* que ostras *Crassostrea gigas* não são eficientes em reter partículas de porte menor de 5 µm. Adicionalmente, Mafra *et al.* (2010a) relataram uma taxa de acúmulo de AD entre 3 e 7,5 x menores em ostras *C. virginica* do que em mexilhões *M. edulis*, quando alimentadas com células de *Pseudo-nitzschia* de aproximadamente 24 µm, mas quando alimentadas com células maiores que 70 µm, as taxas de acúmulo foram até 70x menores do que as de mexilhões; um aumento de até 10 vezes no acúmulo de AD relacionado ao tamanho celular, a 12 °C. Sendo assim, os baixos níveis de AD acumulados em ostras *Crassostrea* spp. (máx. ~5 µg g<sup>-1</sup>) no presente estudo podem ser explicados não somente pela moderada toxicidade das microalgas fornecidas, mas também pela provável rejeição pré-alimentar de células de *P. multiseriis* nas pseudofezes, já que as células fornecidas possuíam comprimento médio de 77,41 ± 1,41 µm, que é superior ao tamanho limite (68 µm) para uma ingestão eficiente por ostras do gênero *Crassostrea* (MAFRA *et al.*, 2009b).

Não há, até o presente momento, outros estudos que tenham quantificado o acúmulo e a depuração de AD em mexilhões marrons *P. perna*, já que os mexilhões utilizados em trabalhos desta natureza são normalmente do gênero *Mytilus*, ocorrentes em regiões de altas latitudes. Entretanto, Hawkins *et al.* (1998), reportaram taxas alimentares superiores em mexilhões da Malásia (*Perna viridis*) em relação a quatro espécies de ostras tropicais, o que corrobora a expectativa de que mexilhões do gênero *Perna* acumulem níveis elevados de toxinas. Entretanto, no presente estudo, as taxas de detoxificação de AD foram presumidamente mais rápidas do que sua assimilação. De fato, a taxa de depuração medida em mexilhões do gênero *Mytilus* é a mais elevada dentre os bivalves já testados, ainda que uma pequena concentração residual de AD, com maior tempo de residência e normalmente retida no trato digestivo e nos rins (NOVACZEK *et al.*, 1992), seja

comumente reportada em *M. edulis* (NOVACZEK *et al.*, 1991; WOHLGESCHAFFEN *et al.*, 1992). Stewart (2008) propôs um mecanismo de depuração altamente eficiente, envolvendo a presença de bactérias no trato digestivo de *M. edulis*, o que deve ser melhor investigado nesta e em outras espécies de mexilhões, como *P. perna*.

O principal resultado alcançado pelo presente estudo, ou seja, as maiores taxas de acúmulo de AD observadas nas ostras a despeito de suas menores taxas de clareamento, pode contribuir para um planejamento integrado de proibição diferencial do comércio e despesca de bivalves em um evento de floração tóxica de *Pseudo-nitzschia* spp., não justificando um fechamento “às cegas” do comércio para todas as espécies de bivalves em uma área afetada. A implantação de tanques de depuração em propriedades ou cooperativas de maricultura auxiliaria ainda mais a manutenção do comércio de bivalves durante períodos nos quais haja a presença de AD no ambiente natural.

Demais estudos devem ser realizados buscando uma comparação mais precisa entre as taxas de acúmulo e depuração entre as espécies *C. gigas* e *C. brasiliiana*, avaliando uma possível vantagem comercial de uma espécie no que diz respeito ao acúmulo de toxinas. Estudos que verifiquem a resposta de ambas as espécies a um evento de floração mais tóxica de *Pseudo-nitzschia* devem ser conduzidos, trazendo mais conhecimento sobre as espécies de bivalves comerciais brasileiras, e enriquecendo a base de dados que orientem o monitoramento de toxinas e prevenção de episódios de ASP nas áreas de cultivos de moluscos bivalves no Brasil.

Considerando (i) as concentrações baixas a medianas de AD acumuladas por ostras *Crassostrea* spp. e mexilhões *P. perna* expostos por um curto prazo a uma floração moderadamente tóxica de *P. multiseriata* simulada em laboratório (presente estudo), a baixa toxicidade de cepas de *Pseudo nitzschia* encontradas no sul do Brasil (capítulo 1), e o registro de apenas um evento de floração onde se observou o acúmulo de níveis de AD acima de  $20 \mu\text{g AD g}^{-1}$  no ambiente natural (FERNANDES *et al.*, 2013), o risco para a ocorrência de eventos de ASP pode ser considerada baixa nesta região. Entretanto, o monitoramento da presença de toxinas não deve ser descartado em face à severidade dos sintomas desencadeados por intoxicações desta natureza, e por ser esta a ferramenta mais eficaz na prevenção e na minimização do impacto de uma possível floração tóxica em áreas de maricultura.

## 2.5 Referências

- BATES, S.S.; BIRD, C.J.; DE FREITAS, A.S.W.; FOXALL, R.; GILGAN, M.; HANIC, L.A.; JOHNSON, G.R.; MCCULLOCH, A.W.; ODENSE, P.; et al.: Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 46, p.1203–1215, 1989.
- 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, p. 267-292, 1998.
- BLANCO, J.; ACOSTA, C. P.; PUENTE, M. B.; ARÉVALO, P.; SALGADO, C.; MOROÑO, A. Depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated with domoic acid. **Aquat. Living Resour**, v. 15, p. 53-60, 2002a.
- BLANCO, J.; ACOSTA, C. P.; PUENTE, M. B.; SALGADO, C. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. **Aquatic Toxicology**, v. 60, p. 111–121, 2002b.
- BAYNE, B.L.; NEWELL, R.C. PHYSIOLOGICAL ENERGETICS OF MARINE MOLLUSCS. In: SALEUDDIN, A.S.M., WILBUR, K.M. (eds). *The Mollusca*. New York, p.407–515, 1983.
- DUPUY, C.; VAQUER, A.; LAM-HÖAI3, T.; ROUGIER, C.; MAZOUNI, N.; LAUTIER, J.; COLLOS, Y.; LE GALL, S. Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. **Marine Ecology Progress Series**, v. 205, p. 171–184, 2000.
- EURLMB - EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS. **EU-harmonised standard operating procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using uv detection**. v. 1, 2008.
- FERNANDES, L. F.; CAVALCANTE, K. P.; PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A. Blooms of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* and *Pseudo-nitzschia calliantha*, and associated domoic acid accumulation in shellfish from the South Brazilian coast. **Diatom Research**. 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1080/0269249X.2013.821424>
- HALLEGRAEFF, G. M. Harmful algal blooms: A global overview. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. UNESCO, Paris, p. 25–50, 2003.
- HAWKINS, A. J. S.; SMITH, R. F. M.; TAN, S. H.; YASIN, Z. B. Suspension-feeding behavior in tropical bivalve molluscs: *Perna viridis*, *Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iradelei*, *Saccostrea cucullata* and *Pinctada margarifera*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 166, p. 173-185, 1998.

- MAFRA, L.L.Jr., FERNANDES, L.F., PROENÇA, L.A.O. Harmful algae and toxins in Paranaguá Bay, Brazil: Bases for monitoring. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, p. 107 – 121, 2006.
- MAFRA, L.L.Jr., BRICELJ, V.M., OUELLETTE, C., LÉGER, C., BATES, S.S. Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. I. Filtration and pseudofeces production. **Aquatic Biology**, v. 6, p. 201-212, 2009a.
- MAFRA, L.L.Jr., BRICELJ, V.M., WARD, J.E. Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. II. Selective rejection. **Aquatic Biology**, v. 6, p. 213-226, 2009b.
- MAFRA, L.L.Jr., LÉGER, C., BATES, S.S., QUILLIAM, M.A. Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6003- 6011, 2009c.
- MAFRA, L.L.Jr.; BRICELJ, V.M.; FENNEL, K. Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin. **Aquatic Toxicology**, v. 100, p. 17–29, 2010a.
- MAFRA JR., L. L., BRICELJ, V. M., OUELLETTE, C., BATES, S. S. Feeding mechanics as the basis for differential uptake of the neurotoxin domoic acid by oysters, *Crassostrea virginica*, and mussels, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 160-171, 2010b.
- NOVACZEK, I.; MADHYASTHA, M.S.; ABLETT, R.F.; JOHNSON, G.; NIJJAR, M.S.; SIMS, D.E. Uptake, disposition and deputation of domoic acid by blue mussels (*Mytilus edulis*). **Aquatic Toxicology**, v. 21, p. 103-118, 1991.
- NOVACZEK, I.; MADHYASTHA, M. S.; ABLETT, R.F.; DONALD, A.; JOHNSON, G.; NIJJAR, M. S.; SIMS, D. E. Depuration of Domoic Acid from Live Blue Mussels (*Mytilus edulis*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 49, p. 312-318, 1992.
- PERL, T.M.; BEDARD, L.; KOSATSKY, T.; HOCKIN, J.C.; TODD, E.C.; REMIS, R.S. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. **The New England Journal of Medicine**, New England, v. 322, p. 1775–1780, 1990.
- PÓVOA, H. **O cérebro desconhecido**: Como o sistema digestivo afeta nossas emoções, regula nossa imunidade e funciona como um órgão inteligente. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2002.
- PROENÇA, L. A. O.; MAFRA, L. L. JR. Ficotoxinas na costa brasileira. **Série Livros do Museu Nacional**, v. 10, p. 57-77, 2005.

- PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A.; TAMANAHA, M. S.; ALVES, T. P. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in subtropical southwest Atlantic. **Harmful Algae News**, v. 33, p. 19-20, 2007.
- PULIDO, O. M. Domoic Acid Toxicologic Pathology: A Review. **Mar. Drugs**, v. 6, p. 180-219, 2008.
- ROELKE, D. L.; FRYXELL, G. A.; CIFUENTES, L. A. Effects on the oyster *Crassostrea virginica* caused by exposure to the toxic diatom *Nitzschi pungens* f. multiseriis. **Journal of Shellfish Research**, v. 12 (1), p. 143, 1993.
- STEWART, J. E. Postconsumption domoic acid generation by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* as a factor in depuration models. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 65, p. 1797-1799, 2008.
- TEITELBAUM J.; CARPENTER S.; CASHMAN N.R. Neurologic sequelae after ingestion of mussels contaminated with domoic acid. **New England Journal of Medicine** 323: p.1632–1633, 1990.
- TIBIRIÇÁ, C.E.J.A. **Microalgas potencialmente nocivas na Baía de Guaratuba, Paraná: Distribuição espaço-temporal e fatores controladores**. 102f. Dissertação (Mestrado em Botânica) Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- TRAINER, V.L. et al. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring, and impacts on ecosystem health, **Revista Harmful algae** v 14, p. 271-300, 2012
- VAN DOLAH, F. M. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. **Environm Health Persp**, v. 108, p.133-41, 2000.
- VAN DOLAH, F. M.; ROELKE, D.; GREENEC, R. M. Health and Ecological Impacts of Harmful Algal Blooms: Risk Assessment Needs. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 7, p. 1329-1345, 2001.
- VELASCO, L. A.; NAVARRO, J. M. Feeding physiology of infaunal (*Mulinia edulis*) and epifaunal (*Mytilus chilensis*) bivalves under a wide range of concentrations and qualities of seston. **Marine ecology Ecology Series**, v. 291, p. 115-124, 2005.
- WRIGHT, J.L.C.; BOYD, R.K.; DE FREITAS, A.S.W.; FALK, M. et.al. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. **Canadian Journal Chemistry**, Canada, v. 67, p. 481–490, 1989.
- WOHLGESCHAFFEN, G. D.; MANN, K. H.; SUBBA RAO, D. V.; POCKLINGTON, R. Dynamics of the phycotoxin domoic acid: accumulation and excretion in two commercially important bivalves. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 297-310, 1992.

ZINGONE, A.; ENEVOLDSEN, H. O. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. **Ocean & Coastal Management**, v. 43, p. 725-748, 2000.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

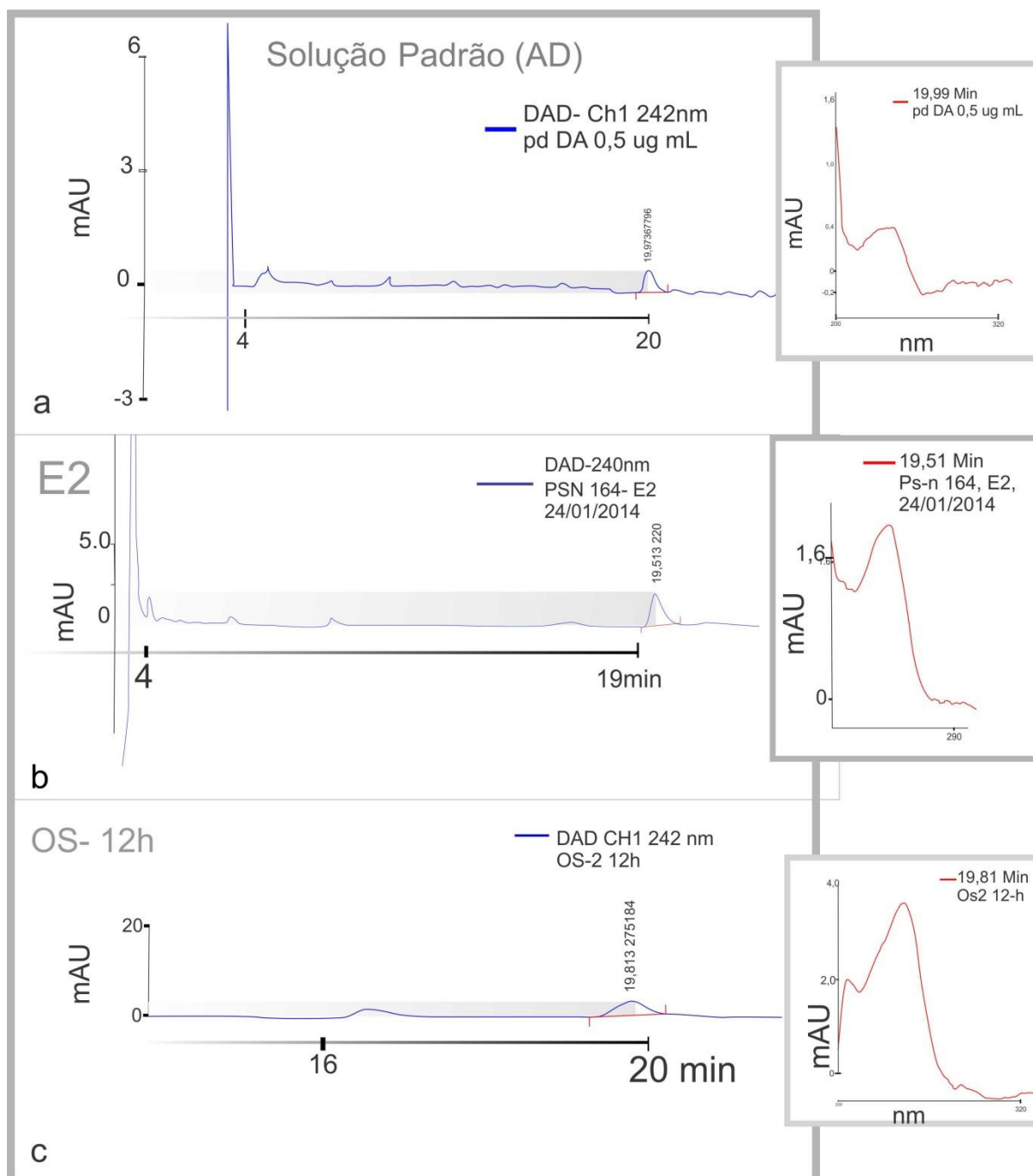
- O estudo da presença e diversidade de espécies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia* no plâncton se faz necessário para a melhor compreensão da sua distribuição e da ameaça que este gênero pode representar para a maricultura e para a saúde humana em regiões produtoras de moluscos bivalves. Da mesma forma, a avaliação das respostas alimentares e das taxas de acúmulo e eliminação de toxinas por espécies comerciais de bivalves auxilia na avaliação do risco de ocorrência de intoxicações em tais regiões;
- Apesar de baixa, a toxicidade das células de *Pseudo-nitzschia calliantha* e *Pseudo-nitzschia multiseriis* cultivadas no presente estudo, assim como a presença de espécies potencialmente tóxicas na região, juntamente com o

fato de uma floração dominada por *P. pseudodelicatissima* em 2009 ter sido associada a níveis de toxinas acima do limite regulatório ( $20 \mu\text{g AD g}^{-1}$ ) em SC (FERNANDES *et al.*, 2013), endossam a afirmativa de que o monitoramento da ficotoxina amnésica nestas áreas deve ser continuamente executado, visto a baixa previsibilidade de uma floração;

- Com base nos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que as baixas taxas de acúmulo de AD reportadas em bivalves expostos a florações simuladas de pequena a moderada toxicidade advém de diferenças interespecíficas nas taxas alimentares e provavelmente na afinidade com a toxina. A rápida depuração de AD por ostras *Crassostrea gigas* e *C. brasiliana* e, provavelmente, por mexilhões *Perna perna* expostos à toxina neste trabalho, demonstra que as perdas econômicas causadas por uma floração de baixa durabilidade não seriam um fator que poderia impor uma ameaça ao setor produtivo de bivalves no sul do Brasil;
- Estudos que relacionem as respostas fisiológicas de produção de toxina sob condições diversas de estresse em diatomáceas do gênero *Pseudo-nitzschia* devem ser conduzidos para se obter um espectro mais amplo de respostas, aumentando assim a previsibilidade do potencial tóxico de uma floração de *Pseudo-nitzschia* spp. frente aos fatores ambientais dominantes. Do mesmo modo, também se fazem necessárias observações adicionais acerca das taxas de acúmulo de AD por bivalves expostos a maiores níveis tóxicos, junto da simulação ou verificação *in situ* da influência de variáveis ambientais no acúmulo desta toxina. Tais informações poderão contribuir para que se construa uma base de conhecimento sólida sobre a relação das espécies de bivalves comercialmente cultivadas no Brasil com a presença de ficotoxinas no ambiente natural;
- Finalmente, a contribuição deste trabalho, na forma de visualização de novos itens dentro de uma Análise do tipo STOW (Fortalezas, ameaças, oportunidades e fraquezas) para a malacocultura no sul do Brasil, é reportada abaixo (textos sublinhados se referem às novas contribuições):

- **Fortalezas** (pontos positivos intrínsecos do setor): boa aceitação do produto e produtividade na região, uso de espécies nativas, diretrizes para o monitoramento de ficotoxinas;
- **Fraquezas** (Pontos negativos intrínsecos do setor) Pouca exportação, pouco hábito de consumo fora do litoral, necessidade de transporte do produto fresco, bivalves sensíveis às condições da água;
- **Oportunidades** (Fatores positivos externos à produção e possibilidades de melhorias): Extensas áreas próprias para cultivo ao longo da costa do Brasil, desenvolvimento de turismo gastronômico, possibilidade de exportação de espécies nativas, possibilidade de ampliação e oficialização do monitoramento de ficotoxinas;
- **Ameaças** (fatores externos que podem vir a prejudicar o setor): Mudanças climáticas, presença de parasitas ou epibiontes que afetem a produção, condição sanitária da água desfavorável, florações de microalgas nocivas, fechamento comercial por presença de ficotoxinas.

## ANEXOS



Anexo 1: Cromatogramas (a-c) e espectros de absorção de UV (d-f) de uma solução padrão de AD a  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (a, d), uma amostra de um cultivo-estoque de *Pseudo-nitzschia multiseria* ("E2") usado no experimento de acúmulo/detoxificação (b, e) e uma amostra de tecido fresco de ostras após 12 horas de acúmulo de toxinas ("OS-12h) durante exposição a células tóxicas (c, f).