

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CENTRO DE ESTUDOS DO MAR  
CURSO TECNOLOGIA EM AQUICULTURA**

**TATIANY RIBAS**

**USO DE ESPÉCIES CULTIVÁVEIS DE MOLUSCOS BIVALVES EM EXPERIMENTOS  
DE ACÚMULO E DEPURAÇÃO DE TOXINAS ALGAIS**

**PONTAL DO PARANÁ**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**TATIANY RIBAS**

**USO DE ESPÉCIES CULTIVÁVEIS DE MOLUSCOS BIVALVES EM EXPERIMENTOS  
DE ACÚMULO E DEPURAÇÃO DE TOXINAS ALGAIS**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como  
requisito parcial, básico, à obtenção do grau de  
Tecnólogo em Aquicultura, no Curso de Tecnologia  
em Aquicultura do Centro de Estudos do Mar, Setor de  
Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior.**

**PONTAL DO PARANÁ**

**2013**

**CURSO TECNOLOGIA EM AQUICULTURA**

Centro de Estudos do Mar

Setor de Ciências da Terra

Universidade Federal do Paraná

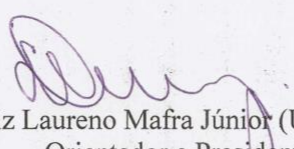
Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil

CEP 83255-000 - Cx. Postal 50002

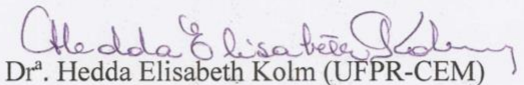
Tel. +55 (41) 3511 8644

E-mail : [aquicultura@ufpr.br](mailto:aquicultura@ufpr.br)**TERMO DE APROVAÇÃO****Tatiany Ribas****Uso de espécies cultiváveis de moluscos bivalves em experimentos de acúmulo e depuração de toxinas produzidas por microalgas nocivas**

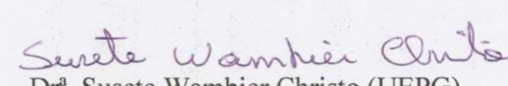
Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Tecnólogo em Aqüicultura, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Dr. Luiz Lauren Mafra Júnior (UFPR-CEM)  
Orientador e Presidente



Dr. Hedda Elisabeth Kolm (UFPR-CEM)  
Membro Examinador



Dr. Susete Wambier Christo (UEPG)  
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 18/12/13.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade do aprendizado, pela proteção e discernimento. Aos meus guias espirituais, que sempre me orientam, encorajam e me fortalecem, me fazendo seguir em frente.

Ao Prof. Luiz Mafra Jr, por toda dedicação, sabedoria, humildade, paciência, insistência, incentivo, amizade, sobretudo pelo exemplo de caráter e determinação.

A minha família, principalmente minha mãe, porque devo a ela tudo que sou hoje. E a minha filha por ter me compreendido todos esses anos de estudo, nas idas e vindas, chegadas e despedidas.

Aos amigos que me aguentaram, dando um suporte emocional em todas as horas.

A todos os colegas do LAMIC: Pedro e Carol, Vanessa, Viviane, Daiana, Iarema, Camila, Rafael, Bruna, Mariana e Deisi, por toda força, companheirismo e descontração.

Aos Técnicos dos Laboratórios do CEM: Vanessa (Lamic), Liciane e Celene (Química/Eunice), Daniele (Genética), Fernanda (Hedda e Cesar), Josiane (Pesquisadora/Química/ Cesar) e Augusto – Tinho (Aluno de mestrado/Genética).

Ao Dr. Toshiyuki Suzuki (National Research Institute of Fisheries – SCI – NRIFS, Yokohama, Japão), pela análise das amostras, que está em andamento.

A Epagri – Escritório de São Francisco do Sul, por todo auxílio e prestatividade em nossas coletas.

Ao Prof. Cesar de Castro Martins, por ter autorizado o uso do laboratório e cedido o nitrogênio e o metanol para a extração das toxinas, no preparo das amostras.

## RESUMO

As vantagens econômicas que um cultivo extensivo de moluscos bivalves apresenta perante os demais tipos de cultivos, em termos de disponibilidade de alimento natural, tornam-se menos atrativas diante da dificuldade do controle da qualidade do alimento disponível no ambiente marinho. Como o principal componente da dieta dos bivalves são as microalgas, microorganismos fitoplanctônicos, fotossintetizantes, que ajudam a compor a base da cadeia alimentar marinha, eles estão expostos a toda sorte de espécies, inclusive as tóxicas, como por exemplo, o dinoflagelado *Dinophysis acuminata*. Essa espécie de microalga nociva, que é encontrada com frequência no litoral paranaense, produz toxinas diarréicas do tipo ácido okadaico (AO) e dinofisistoxinas (DTXs). As espécies de bivalves utilizadas neste trabalho - as ostras *Crassostrea gigas* e *C. brasiliana* e o mexilhão *Perna perna* - fazem parte do grupo de moluscos bivalves mais cultivados e mais consumidos no Brasil, assim há uma maior preocupação em relação ao seu controle sanitário. Como os bivalves são eficientes filtradores e acumuladores de substâncias químicas, são considerados os principais agentes patogênicos transmissores do envenenamento diarréico por consumo de mariscos (DSP), um dos maiores problemas de saúde pública ligados ao consumo dos moluscos bivalves. Portanto, este trabalho propôs estabelecer bases metodológicas para a execução de estudos comparativos de acúmulo e depuração de toxinas algais por bivalves sob condições controladas em laboratório. Foi elaborado um protocolo de preparo de amostras, que poderá ser usado para vários tipos de toxinas algais e várias espécies de bivalves, apenas com algumas adaptações específicas de cada espécie. Avaliou-se a sobrevivência durante o período de manutenção em laboratório, que foi limitado pela baixa concentração alimentar oferecida. Contudo, a taxa de sobrevivência foi bastante satisfatória para as espécies de ostras *C. gigas* e *C. brasiliana* (82 % e 87 %, respectivamente), demonstrando uma boa resistência às restrições do ambiente artificial. Já os mexilhões tiveram uma taxa de sobrevivência de (59 %), revelando maior sensibilidade. Os níveis de amônia (< 0,25) e pH (6 – 7,4) permaneceram dentro do tolerável. A temperatura da água variou entre 20,5 e 23,2 °C e a salinidade oscilou entre 28 e 30 nesse período. Os parâmetros biométricos medidos durante o experimento demonstraram que em altura de concha, os valores médios foram de 29 mm para *C. brasiliana* (n = 100), 32 mm para *P. perna* (n = 50) e 34,3 mm para *C. gigas* (n = 100). Entretanto, *C. brasiliana* apresentou um peso desconchado (tecidos moles somados), em média quase duas vezes superior ao das demais espécies (0,94 g, contra 0,49 g de *C. gigas* e 0,57g de *P. perna*). A fração composta pela glândula digestiva representou, em média, 23,4% do peso dos mexilhões e entre 29,5 e 31,4% do peso das ostras. Os bivalves foram expostos simultaneamente a uma suspensão rica em células de *Dinophysis acuminata* (entre 1.350 e 13.750 células L<sup>-1</sup>), com total sobrevivência dos indivíduos durante os períodos de acúmulo e depuração de toxinas.

**PALAVRAS CHAVES:** ficotoxinas; *Dinophysis acuminata*; *Crassostrea gigas*; *Crassostrea brasiliana*; *Perna perna*; ácido okadaico.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>08</b>
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. Obtenção dos bivalves e manutenção em laboratório.....	13
3.2. Experimento-piloto: toxinas diarréicas de <i>Dinophysis acuminata</i> .....	16
3.2.1. Coleta de Fitoplâncton.....	16
3.2.2. Fornecimento da dieta experimental.....	18
3.2.3. Coleta e processamento das amostras de bivalves.....	19
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
4.1. Sobrevivência e biometria dos bivalves durante o período de manutenção.....	26
4.2. Sobrevivência e biometria dos bivalves durante o experimento.....	27
4.3. Protocolo de preparo para amostras de bivalves em experimentos de acúmulo e depuração de toxinas.....	31
<b>5.CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema de cultivo extensivo de moluscos bivalves apresenta uma grande vantagem econômica em relação às demais formas de cultivo, pois é feito em ambiente natural, utilizando-se de recursos marinhos disponíveis, como a água e o alimento. O mesmo não acontece em um sistema de cultivo intensivo, onde o produtor fornece toda a alimentação necessária para as diversas fases do cultivo. O custo gerado com a alimentação em um ciclo completo de um cultivo intensivo é muito elevado, podendo representar 75 % do custo total da produção (Halver, 2002). Contudo, apesar dessa vantagem, o fato de não se ter o controle sobre a qualidade do alimento ofertado, coloca em risco a segurança sanitária dos organismos e a qualidade do produto final. O principal alimento dos moluscos bivalves são as microalgas, (Ferreira *et al.*, 2010): microorganismos fitoplanctônicos, fotossintetizantes, que ajudam a compor a base da cadeia alimentar marinha e possuem acentuada variabilidade em relação a composição e abundância. Foram identificadas, até hoje, cerca de 5.000 espécies de microalgas marinhas, e dentre estas espécies, 300 desenvolvem florações e 40 destas, são potencialmente produtoras de toxinas, (Hallegraeff *et al.*, 1995; FAO, 2005). Para uma microalga ser classificada como nociva, é necessário que sejam analisados os efeitos prejudiciais desencadeados durante o desenvolvimento das florações. Estas florações ocorrem quando as condições físicas, químicas e biológicas do ambiente, favorecem a multiplicação intensa, em um curto período de tempo, de uma determinada espécie de microalga, ocasionando elevada densidade celular. Os dinoflagelados, por exemplo, tornam-se predominantes e podem formar florações principalmente em ambientes com baixa turbulência da água e alta concentração de nutrientes (Proença & Mafra Jr., 2005), podendo causar efeitos prejudiciais mesmo em densidades de poucos milhares de células por litro.

Florações de algas nocivas (FANs) - termo adotado pela Comissão Oceanográfica Intergovernamental (COI) da UNESCO, aceito internacionalmente para determinar qualquer proliferação de microalgas, independente de sua concentração (Reguera *et al.*, 2011), que podem causar vários danos: ao ambiente, por meio de alterações nas

propriedades estéticas da água, incluindo a alteração na cor ou formação de espumas, ou pela depleção de oxigênio causada por intensa atividade microbiana no final das florações; aos organismos marinhos, podendo causar a morte daqueles mais sensíveis às toxinas algais ou até mesmo por danos causados ao aparelho respiratório de alguns animais; aos humanos, podendo causar graves enfermidades e levar à morte pelo consumo de moluscos bivalves, principalmente ostras e mexilhões, contaminados com as ficotoxinas. Desta forma, as FANs podem causar grande impacto à saúde pública, ao meio ambiente e ao setor econômico, sobretudo, às atividades de aquicultura, pesca e turismo (Proença & Mafra Jr., 2005; Reguera *et al*, 2011; Blanco *et al*, 1999).

As ficotoxinas são metabólitos secundários de composição química variada (Proença & Mafra Jr., 2005). Sua toxicidade é determinada pelo mecanismo de ação da toxina, pela sensibilidade do organismo-alvo e de outros fatores que a determinam mais ou menos tóxica. O envenenamento em humanos depende ainda, da capacidade do organismo-vetor em acumular toxinas. Como os moluscos bivalves são exímios filtradores, são os grandes vetores desta transmissão, justificam-se as pesquisas sobre a fisiologia destes organismos, mais especificamente, sobre sua capacidade em acumular as toxinas produzidas pelas microalgas, bem como a depuração das mesmas (Mafra *et al.*, 2010).

As ficotoxinas marinhas mais importantes, ou seja, as que apresentam grande risco para o consumo humano através dos moluscos bivalves contaminados são identificadas como síndromes, que constituem cinco grupos principais: PSP (envenenamento paralisante por consumo de mariscos); ASP (envenenamento amnésico por consumo de mariscos); NSP (envenenamento neurológico por consumo de mariscos); AZP (envenenamento por azaspirácidos) e DSP (envenenamento diarréico por consumo de mariscos) (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998 *apud* FAO, 2005).

Dentre os organismos responsáveis pelos episódios de DSP, que é um dos maiores problemas de saúde pública ligado ao consumo dos moluscos bivalves em nível mundial, a microalga *Dinophysis acuminata* é encontrada com frequência no litoral paranaense, (L.L. Mafra Jr., com. pess.). Este dinoflagelado está presente na alimentação natural dos bivalves, havendo uma grande preocupação com a

contaminação desses organismos por toxinas diarréicas, pois o maior perigo está no fato de, tanto o local de cultivo, quanto os bivalves contaminados não apresentarem nenhuma diferença aparente, que possa distingui-los para evitar o consumo (Vale, 2004). Mesmo ocorrendo em baixa abundância dentro da comunidade fitoplanctônica (1-10%) (Ferreira *et al*, 2010), as microalgas do gênero *Dinophysis* geralmente podem ser tóxicas mesmo em baixas densidades celulares (entre 200 e 10.000 cel/L<sup>-1</sup>) (Reguera, 2003 *apud* Proença & Mafra Jr., 2005; FAO, 2005). *D. acuminata*, assim como outras espécies deste gênero, produz toxinas diarréicas do tipo ácido okadaico (AO) e dinofisistoxinas (DTXs), (Haraguchi & Odebrecht, 2010; Lee *et al*, 1989), que são toxinas termotolerantes, isto é, resistem a altas temperaturas, inclusive ao cozimento e congelamento (Vale, 2004). No caso da DSP, os sintomas mais comuns nos quadros clínicos de intoxicação são dores abdominais e de cabeça, fraqueza muscular, vômito e diarreia, que aparecem logo após o consumo do molusco contaminado (Oliveira *et al*, 2010). Somente 1 µg AO.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo é suficiente para produzir os sintomas durante três dias, com ou sem tratamento médico. Mesmo quando as quantidades ingeridas são abaixo daquelas necessárias para manifestar os sintomas, porém se existe um consumo frequente de moluscos contaminados, há fortes indícios de que a exposição crônica às toxinas pode promover tumores cancerígenos no estômago e intestino (Cordier *et al*. 2000). No final da década de 1970, no Japão, foi descrita a DSP, pela primeira vez. Quando ocorreram dois episódios de envenenamento (1976 e 1977), causados pelo dinoflagelado *Dinophysis fortii*, o ácido okadaico e seus derivados foram descobertos, como um novo grupo de toxinas diarréicas, (Yasumoto *et al*. 1980).

Atualmente, tendo em vista o risco que consumidores de moluscos estão expostos no Brasil, devido às recorrentes contaminações através do consumo de moluscos bivalves, foi criado “O Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves – PNCMB, instituído pela Instrução Normativa Interministerial n° 7 de 8 de maio de 2012. Este programa, que foi elaborado para monitorar toda a produção do setor destinada ao consumo humano, inclui ostras, berbigões, vieiras, mexilhões e outros. Foi instituído em conjunto pelos Ministérios da Pesca e Aquicultura (MPA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para regulamentar este programa, foi criada a Portaria n° 204 de 28 de junho de 2012, que estabelece os procedimentos

corretos para coleta de amostras para realização de análises de micro-organismos contaminantes e de toxinas em moluscos bivalves, bem como de análises para o monitoramento de espécies de microalgas potencialmente produtoras de toxinas.

A escolha das espécies dos organismos utilizados neste trabalho - as ostras *Crassostrea gigas* e *C. brasiliana* e o mexilhão *Perna perna* - se deu pelo fato de fazerem parte do grupo de moluscos bivalves mais cultivados, e muito consumidos no Brasil, devendo-se ter, assim, maior preocupação em relação ao seu controle sanitário. Como esses moluscos bivalves são eficientes filtradores e naturalmente acumuladores de substâncias e microorganismos, mesmo não sendo afetados pelas toxinas (Barbieri, 2009), estes estão sempre sujeitos a se tornarem agentes patogênicos, apresentando riscos ao consumo humano (Alves *et al*, 2010).

A ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) é uma espécie exótica originária do Japão, sendo assim conhecida em alguns locais como “ostra japonesa” ou “ostra do pacífico”. Como a *C. gigas* possui uma taxa de crescimento muito elevada, se comparada às ostras nativas, e por ser de fácil adaptação, foi introduzida no Brasil no início dos anos 1980, por Jacques Debevois (Brito, 2008), para dar início ao primeiro grande projeto de cultivo de ostras em nível industrial no Brasil, fato que ocorreu em Cananéia, litoral do Estado de São Paulo. Como a espécie é de águas mais frias, logo se adaptou às águas do litoral do Estado de Santa Catarina, onde predominam temperaturas mais baixas. Visto o grande potencial de cultivo desse molusco, em 1990 a Universidade Federal de Santa Catarina, importou e introduziu o pacote tecnológico da produção de *C. gigas* no litoral catarinense, que se tornou, e até hoje é, o maior produtor e gerador de pesquisas da espécie em todo o país. Já a ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) é uma espécie nativa do litoral brasileiro e ocorre no infralitoral, sendo considerada de grande porte, podendo chegar a 20 cm de comprimento de concha (Brito, 2008) e, portanto, apresenta grande potencial para cultivo. Por fim, o mexilhão *Perna perna* (Linneus, 1758) também é uma espécie nativa do litoral brasileiro e por atingir o maior tamanho comercial, o *P. perna* é a espécie de mexilhão mais cultivada e comercializado no Brasil, principalmente no Estado de Santa Catarina que, além das ostras, também é seu maior produtor.

O presente estudo é parte integrante do projeto de pesquisa “Acúmulo e

*depuração de toxinas algais em espécies cultiváveis de moluscos bivalves*”, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz L. Mafra Jr, (CNPq Edital Universal, proposta nº 481759/2010-7), que tem como objetivo a caracterização da presença e toxicidade de microalgas potencialmente nocivas nas áreas de cultivo de moluscos bivalves no litoral paranaense, bem como a avaliação do potencial de acúmulo de toxinas algais por espécies cultiváveis de moluscos bivalves. Para tanto, a presente investigação buscou estabelecer as bases metodológicas para a execução de estudos comparativos de acúmulo e depuração de toxinas algais por bivalves sob condições controladas em laboratório, porém, representativas do ambiente natural. A técnica desenvolvida foi aperfeiçoada durante um experimento-piloto, no qual ostras do gênero *Crassostrea* spp. e mexilhões da espécie *Perna perna* foram expostos, em laboratório, a um evento simulado de floração de *Dinophysis acuminata* em ambiente de cultivo.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Estabelecer bases metodológicas para a execução de estudos comparativos de acúmulo e depuração de toxinas algais por bivalves sob condições controladas em laboratório, contribuindo assim, para o melhor entendimento sobre aspectos relevantes para seu controle sanitário.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a sobrevivência e os parâmetros biométricos (comprimento da concha, peso desconchado) de mexilhões (*Perna perna*) e ostras (*Crassostrea brasiliiana* e *C. gigas*) durante o período de manutenção em laboratório;
- Determinar a contribuição do hepatopâncreas para o peso total dos tecidos das diferentes espécies de bivalves utilizadas, já que este órgão concentra as maiores quantidades de toxinas algais nestes organismos;

- Expor os bivalves, simultaneamente, a uma suspensão rica em células de *Dinophysis acuminata*, representativa de uma floração tóxica, avaliando a sobrevivência dos indivíduos durante os períodos de acúmulo e depuração de toxinas;
- Estabelecer, com base em tal experimento-piloto, os protocolos para a coleta e o processamento de amostras visando à análise de toxinas algais para cálculo das taxas de acúmulo e depuração por diferentes espécies de moluscos bivalves.

### 3.MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.Obtenção dos bivalves e manutenção em laboratório

Em 2012, no Laboratório de cultivo de microalgas, em dois aquários de 160 L cada, de dimensões: 97 cm x 47 cm x 40 cm, foram colocadas quatro bandejas flutuantes, perfuradas para permitir um fluxo adequado de água (Figura 01), e aeração constante para a manutenção dos mesmos até a execução do experimento. A água utilizada nos aquários foi proveniente da porção externa da Baía de Paranaguá, coletada em maré enchente e trazida por um caminhão pipa e armazenada em duas caixas d'água de 3.000 L cada, onde foram cloradas (1mL de cloro / 5 L de água) e neutralizadas com tiosulfato (1 mL / 1 L de água) antes de serem utilizadas nos aquários. Com o ambiente de cultivo preparado, foi recebido em janeiro de 2012 o primeiro lote de ostras *C. gigas*, que continha 2.206 indivíduos de aproximadamente 40 dias de idade. Nesse teste foram trabalhados apenas *C. gigas*, uma vez que, não houve sucesso na captura das ostras nativas naquela oportunidade e conseqüentemente, não foi feita a aquisição do mexilhão *Perna perna*. Foram confeccionados 17 coletores de sementes, que foram instalados em um cultivo de ostras em "long-line" no município de Guaratuba/PR. Porém, como foram levados ao ambiente já no final da temporada de reprodução, quando foram trazidos ao laboratório, não havia "sementes" de ostras, mas sim incrustações diversas, predominantemente compostas de cracas e outros crustáceos e briozoários, que foram apropriadamente descartados (Figura 02). Desta forma, não foi possível a execução do experimento naquele ano.

Já no verão de 2013, os moluscos bivalves foram trazidos de Florianópolis, no dia 31 de Janeiro, oriundos da produção no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM / UFSC), sendo compostos por indivíduos juvenis das ostras *Crassostrea gigas* (208 indivíduos) e *C. brasiliana* (295 indivíduos) e do mexilhão *Perna perna* (195 indivíduos). As *C. brasilianas*, até que atingissem o tamanho ideal, ficaram durante quatro meses em estruturas de cultivo chamadas “travesseiros”, em um cultivo em águas da baía da Babitonga, na localidade de Laranjeiras, em São Francisco do Sul / SC. A escolha de organismos na fase juvenil, representando indivíduos adultos (tamanho comercial), foi feita pelas vantagens de serem mais fáceis de manter em laboratório e por ainda não produzirem material reprodutivo, o que poderia interferir nos resultados do experimento. Desde então, foram mantidos com uma “dieta de manutenção” composta pelas microalgas flageladas, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, e a diatomácea *Chaetoceros muelleri*. Permaneceram sob essa dieta até 24 horas antes do experimento, quando então, foram transferidas para um único aquário com 100 L de água do mar filtrada e receberam como alimento, a microalga *T. suecica*, até o início do experimento. A espécie *T. suecica* foi escolhida como dieta de aclimatação e, conforme descrito mais adiante, dieta de depuração na segunda fase do experimento, por ser não tóxica, de boa qualidade nutricional e porque era a microalga com maior volume de produção no laboratório na época do experimento.

Os parâmetros abióticos, tais como temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH e concentração de amônia, foram monitorados nos aquários de manutenção, com devida freqüência para manter o ambiente adequado às condições de saúde dos bivalves.

Durante esse período em laboratório, foram feitos dois tipos de biometria mensais: (a) em cada bivalve, foi medido o comprimento de concha (mm), utilizando um paquímetro digital, tomando a medida máxima: desde o umbo até a extremidade oposta da concha (posterior), e (b) o peso desconchado (g) de três organismos (pequeno P, médio M e grande G) de cada espécie, com auxílio de uma balança de três casas de precisão, para se avaliar o crescimento da população sob a dieta de manutenção e auxiliar na escolha da classe de tamanho dos indivíduos que seriam usados no

experimento.

Durante a execução das biometrias, foi possível detectar um problema de infestação de organismos bentônicos nas ostras *C. brasilianas*, adquirido no período em que as ostras ficaram em “travesseiros”, no ambiente natural, até a fase juvenil. A medida tomada para reduzir a infestação por poliquetas foi o “castigo”, que é uma das técnicas utilizadas em cultivos de bivalves para reduzir incrustações, onde é feita a imersão das ostras em água doce ou destilada em laboratório, durante 15 minutos, no mínimo, para que os organismos sensíveis a baixa salinidade, sejam eliminados. Outro método utilizado nos cultivos comerciais é a exposição diária ao sol, que se dá através do ciclo de marés, quando se posiciona, estrategicamente, as estruturas de cultivo na região de entre-marés.



Figura 1. Bandejas flutuantes adaptadas às necessidades dos bivalves.



Figura 2. Coletores de sementes após serem retirados do cultivo, com várias incrustações.

Para a construção das bases metodológicas, que irão contribuir para a execução de estudos comparativos de acúmulo e depuração de toxinas algais, foi gerado um protocolo padrão, que poderá ser usado em experimentos com diversos tipos de toxinas. Para tanto, foi preciso se realizar um estudo de caso, feito através de um experimento-piloto, onde três espécies de moluscos bivalves cultiváveis foram submetidas às toxinas diarréicas produzidas pela microalga *D. acuminata*, conforme será apresentado a seguir:

### **3.2.Experimento-piloto: toxinas diarréicas de *Dinophysis acuminata***

#### **3.2.1.Coleta de fitoplâncton**

A coleta foi realizada no dia 09/05/2013, na Baía da Babitonga, São Francisco do Sul / SC (26°16'52.0"N; 48°40'38.3"). A escolha do local foi feita pela confirmação da

presença da microalga *D. acuminata*, através do Certificado de ensaio: n° 097/2013, de 16/04/2013 (Figura 3), emitido pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina CIDASC. Com o auxílio de uma pequena embarcação, utilizando-se duas redes de fitoplâncton com malha de 20 µm, foram feitos vários arrastos na localidade de Laranjeiras, a uma profundidade de 1,5 m, aproximadamente, e 65 cm de transparência da água, medida com disco de Secchi. A temperatura da água foi obtida com um termômetro padrão de mercúrio, estava em 24°C, e a salinidade, medida com um refratômetro, variou entre 32 e 33. Para eliminar partículas maiores que a faixa de tamanho desejada, que é a faixa de tamanho da célula de *D. acuminata* (entre 20 e 60 µm), assim que os arrastos eram feitos, os 80 L do concentrado coletados, passaram por uma peneira de zooplâncton com malha de 60 µm (confeccionada no Laboratório de Microalgas do CEM/UFPR), antes de serem armazenados nos quatro galões de 20 L, com água do mar local.

O microscópio foi montado em campo, junto ao píer utilizado para embarque e desembarque. Através da análise de uma amostra do concentrado, feita no microscópio, foi possível confirmar a presença da microalga *D. acuminata* no local da coleta e assim, garantir o sucesso do experimento.

MICROALGAS		Microalga - cél./L.			
Localidade	Data Coleta	<i>Dinophysis acuminata</i>	<i>Dinophysis</i> spp. Total	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp x 1000 (%)	<i>Gymnodinium catenatum</i>
Armação do Itacoporói	16/04/2013	NO	NO	39,60 (9,0)	NO
Canto Grande	16/04/2013	NO	NO	42,70 (3,2)	NO
Laranjeiras (São Francisco do Sul)	16/04/2013	150	150	3,80 (0,3)	NO
Paulas (São Francisco do Sul)	16/04/2013	300	300	1,45 (0,1)	NO

P: presente na amostra de rede; NO: não observado na amostra.

*Dinophysis* spp. total: somatório de todas as espécies de *Dinophysis*. Alerta quando contagem total maior que 500 cél./L.

*Pseudo-nitzschia* spp: alerta quando contagem maior que 100 mil cél./L ou abundância maior que 50% da contagem total.

*Gymnodinium catenatum*: alerta quando presente.

Figura 3. Certificado de ensaio n° 097/2013, de 16/04/2013, emitido pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina CIDASC, indicando a presença de *D. acuminata* na localidade.

### 3.2.2. Fornecimento da dieta experimental

Foram utilizados, em todo o experimento: 106 indivíduos de *C. gigas*, 106 indivíduos de *C. brasiliiana* e 55 indivíduos de *P. perna*, que, após serem selecionados de acordo com o tamanho estipulado para cada espécie, foram transferidos para um único aquário e mantidos em bandejas separadas. Durante as 24 h de aclimação, os bivalves permaneceram sob a dieta monoespecífica controle composta de *T. suecica*. A água do mar filtrada foi trocada completamente para receber a dieta teste contendo a microalga *D. acuminata* e dar início ao experimento. O início foi no dia 10/05/2013 às 10 horas da manhã, após a coleta da primeira amostra de bivalves, quando começou a fase de acúmulo. Neste momento foi acrescentado ao aquário, que já continha 100 L de água do mar filtrada, o primeiro galão de 20 L do concentrado, contendo a dieta com *D. acuminata*. O restante da dieta, os outros 60 L do concentrado, foram adicionados, ao longo de um período de 24 h, com auxílio de uma bomba peristáltica, dispensando 15,57 ml/min, totalizando, 934 ml por hora de experimento (ou 0,93 l/h), garantindo assim que a densidade celular de *D. acuminata* permanecesse elevada durante a fase de acúmulo de toxinas. Os galões com a dieta tóxica foram mantidos sob aeração e iluminação constante durante toda a fase inicial. Para dar início à próxima fase, “depuração”, os bivalves restantes foram lavados com água do mar filtrada e transferidos para um segundo aquário, devidamente preparado para o recebimento da dieta composta por 100 L de água do mar filtrada e pela microalga *T. suecica*, que foi ofertada aos bivalves durante o período de sete dias, totalizando 8 dias consecutivos de experimento.

Durante todo o período de execução do experimento, foram retiradas de forma homogênea, tanto dos aquários como dos galões coletados para a dieta teste, contendo *D. acuminata*, alíquotas de 10 ml para a análise quantitativa das microalgas. Cada alíquota foi armazenada em vidro âmbar e fixada com três gotas de solução de lugol 1 %. Entre as fases de acúmulo (*D. acuminata*, Figura 04) e depuração (*T. suecica*), foram retiradas 37 amostras para quantificação da abundância de microalgas. Todas as amostras foram contadas em triplicata, com auxílio de microscópio ótico (Olympus® BX41) e câmaras de contagem Sedgewick-Rafter, quando o número de células era elevado (> 1000/ml) e também em microscópio ótico invertido (Zeiss®, modelo ID-03), usando o

método de Utermöhl (1958), quando o número de células era reduzido, tendo que contar a câmara toda, após sedimentados de 2,4 e 2,5 ml de amostras por câmara.

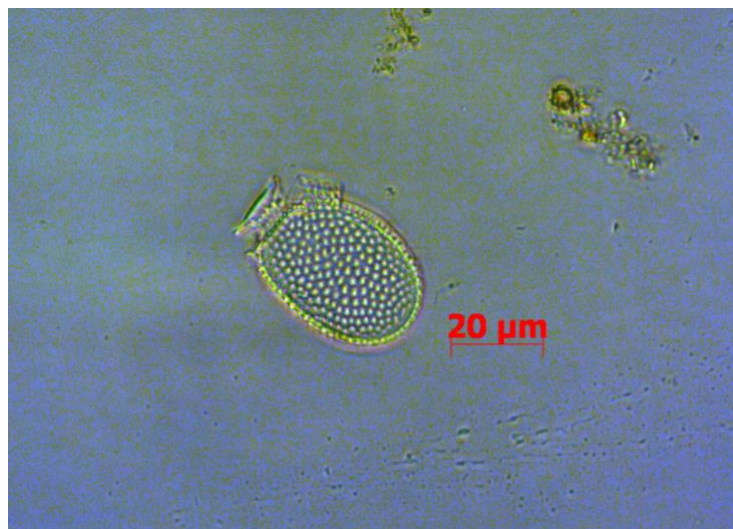


Figura 4. Célula de *Dinophysis acuminata* fotografada em uma das amostras analisada durante o experimento.

### 3.2.3. Coleta e processamento das amostras de bivalves

Por ser um experimento-piloto, onde os procedimentos servirão como informações de base para a construção de um protocolo para experimentos futuros, que poderá ser utilizado para diversas toxinas, o preparo das amostras foi adaptado de uma forma que possa ser reproduzido para diversas espécies de bivalves. Um método semelhante ao utilizado para o preparo das amostras na extração de toxinas, no presente experimento, foi usado, anteriormente, por Proença e Oliveira, (1999), na análise de ácido domóico em moluscos cultivados no litoral do Estado de Santa Catarina.

Em cada período amostral, foram retirados do aquário 30 indivíduos (12 *C.gigas*, 12 *C.brasiliana* e 6 *P.perna*), correspondendo a três réplicas para cada espécie de bivalve, compostas por 4 ostras ou 2 mexilhões cada. As amostras de ostras continham o dobro de indivíduos, necessários para reduzir a variabilidade individual nas taxas de filtração, comum nessas espécies de bivalves. Devido ao comportamento de fechamento periódico das conchas, é aconselhável uma média de várias ostras para se obter um

resultado seguro, o que é feito combinando-se os tecidos de vários indivíduos em uma amostra única. Já os mexilhões, que apresentam variações menores de um indivíduo para outro, permitem o uso de amostras com um número reduzido de indivíduos (2 no presente estudo). No tempo amostral inicial (0 h), antes da exposição à *D. acuminata*, as amostras foram simples (sem réplicas), compostas por 2 mexilhões ou 4 ostras de cada espécie, e serão usadas simplesmente para demonstrar que os organismos não estavam previamente contaminados com toxinas diarréicas. Os bivalves foram amostrados em tempos variados ao longo da fase acúmulo (5, 9, 14 e 24 h) e depuração (3, 10, 48 e 168 h). Além disso, amostras de 40 ml de água do mar foram retiradas de cada um dos galões que continham a dieta com *D. acuminata* ofertada aos bivalves, e filtradas em filtros de microfibras de vidro GF/C (Whatman) para posterior análise de toxinas.

Para cada bivalve amostrado, antes da abertura da concha, os indivíduos foram medidos (altura de concha em mm) com um paquímetro digital (Figura 05). Após a abertura, foi feita a secagem em papel toalha para se minimizar o erro na quantificação das toxinas por interferência da água interna (Figura 06). Foi então medido o peso de cada indivíduo desconchado, com uma balança digital de três casas de precisão (Figura 07). Em seguida, para cada indivíduo, foi feita a secção das vísceras, contendo as glândulas digestivas (*gd*), separando - os dos outros tecidos (*ot*), que incorporavam o manto - músculos, brânquias e palpos labiais, entre outros, utilizando-se de bisturi, pinças e uma tesoura cirúrgica. Foi feita a pesagem separadamente da *gd* e dos *ot*, que foram acondicionados em tubos Falcon de 15 ml. Já dentro do tubo, o material somado de quatro ostras ou dois mexilhões, foram pesados novamente para se obter o peso úmido total da amostra e calcular o volume de solvente necessário para se extrair as toxinas. Todos os tubos foram devidamente identificados com uma sigla referente aos dados dos bivalves que compuseram a amostra (espécie), hora da retirada, fase de experimento (acúmulo / depuração), material (glândula digestiva *gd* / outros tecidos *ot*) e o número da réplica (1, 2 e 3). (Ex.: Amostra: *Crassostrea gigas*; 5 h; fase de acúmulo; glândula digestiva; réplica 1: Sigla:CG5hAgd1). Após o acondicionamento do material nos tubos Falcon (Figura 08), as amostras foram levadas imediatamente para um freezer comum, onde permaneceram até a etapa de extração de toxinas.



Figura 5. Utilização do paquímetro para a medida da altura da concha – do umbo à região posterior.

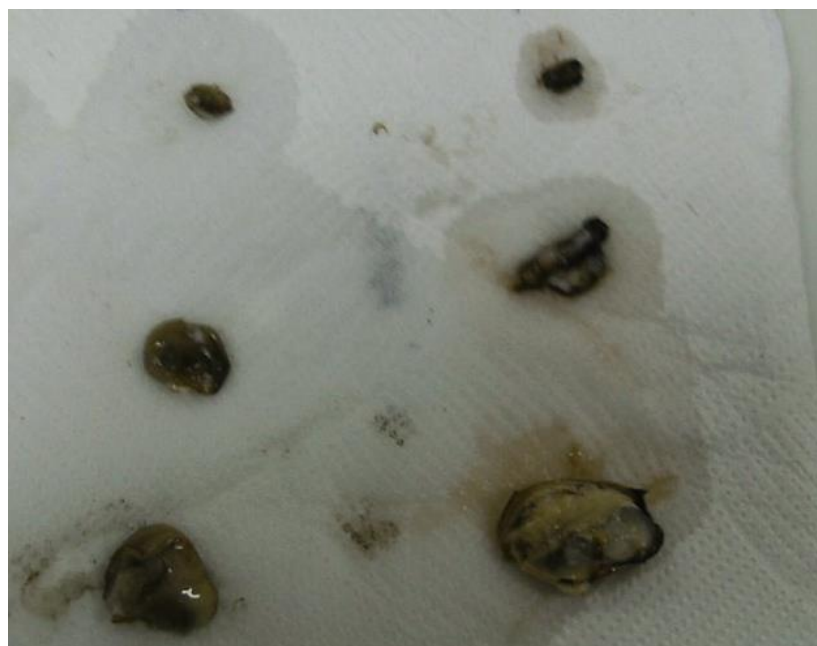


Figura 6. Secagem em papel toalha para minimizar o erro na quantificação das toxinas por interferência da água interna.

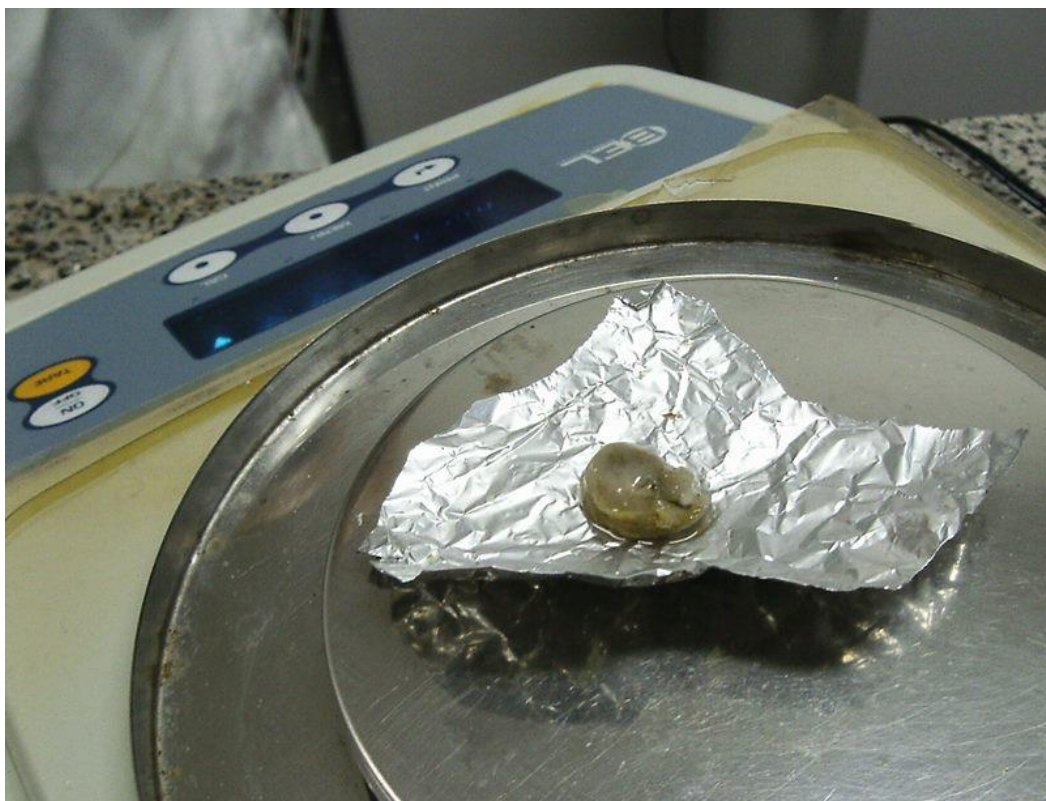


Figura 7. Balança digital de três casas de precisão – peso desconchado.



Figura 8. Amostras em tubos Falcon 15 ml prontas para congelamento.

No momento da extração, as amostras foram então descongeladas e processadas em lotes, para preservar a qualidade do material. Foram enumeradas de 1 a 151 para facilitar a manipulação, já que havia um número grande de amostras. Como as toxinas diarréicas são lipossolúveis, a cada amostra foi acrescentada uma quantidade de metanol 100 % de acordo com o peso individual de cada uma, numa razão de 9:1 (v:v). Com o acréscimo do metanol, algumas amostras excederam o volume de 15 ml, precisando ser transferidas para tubos de 50 ml. Com o auxílio de uma sonda de ultrassom (20 Hz), foram trituradas por 2 a 3 minutos, aplicando-se pulsos de 3 segundos com intervalos de 1 segundo, com potência de 70 % (Figura 9). Com isso obteve-se o rompimento das células, e a liberação das possíveis toxinas incorporadas aos tecidos dos bivalves. Nesta etapa todas as amostras foram transferidas para tubos Falcon de 50 ml, devido ao tamanho da sonda de ultrassom usada.



Figura 9. Sonda de ultrassom (20 Hz) - amostras trituradas por 2 a 3 minutos, aplicando-se pulsos de 3 segundos com intervalos de 1 segundo, com potência de 70 %.

As amostras contendo os filtros de fibra de vidro, onde foram filtradas 40 ml de cada galão com a dieta com *D. acuminata*, também foram preparadas nesta fase: cada um dos três filtros foi cortado em quatro partes (para melhor trituração), recebeu 3 ml de

metanol e em seguida, o mesmo tratamento que as demais amostras, que continham as glândulas digestivas e outros tecidos. Durante todo o processo de trituração por ultrassom, os tubos foram imersos em um Becker com água e gelo, para evitar o aquecimento excessivo do extrato (Figura 9). Após a trituração, as amostras foram transferidas novamente para os tubos Falcon de 15 ml para centrifugação das amostras (FANEM® *Baby I Centrifuge*, mod.: 205), por 2 minutos a 2.400 rpm, para decantação dos resíduos sólidos (Figura 10). Com auxílio de uma pipeta, alíquotas de 0,25 ml do sobrenadante, foram transferidas de cada amostra para tubos de Eppendorf de 0,50 ml com filtros de centrífuga (Millipore Ultrafree-MC, membrana Durapore PVDF, 0,45 µm porosidade), e então levadas para uma microcentrífuga (HT® – MCD2000) por 1,15 min, sob uma velocidade de 10.500 rpm (Figura 11). A seguir, foram retirados e descartados os filtros acoplados aos microtubos Eppendorf de todas as amostras (exceto as de número 132 a 148, que, por falta de Eppendorfs com filtro, foram processadas seguindo o método de filtragem a vácuo, com filtro de fibra de vidro Whatman GF/F (#0,7µm).

Em todas as amostras, a alíquota filtrada, passou pelo processo de secagem. Tal procedimento foi conduzido com a utilização corrente de nitrogênio gasoso, manualmente a cada amostra, por cerca de 5 minutos, até evaporação de toda a porção líquida. Após o preparo, as amostras foram enviadas, via FEDEX, para a análise da concentração de toxinas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS), no “National Research Institute of Fisheries – NRFSI”, Yokohama – Japão.

Os procedimentos descritos nesta seção poderão ser aplicados, com alguns pequenos ajustes, a experimentos que busquem analisar as taxas de acúmulo e depuração de bivalves expostos a diferentes tipos de microalgas produtoras de toxinas. Para tanto, um protocolo experimental padronizado foi desenvolvido e encontra-se apresentado na seção de “Resultados e Discussão”.



Figura 10. Centrífuga específica de tubos de 15 ml (FANEM® *Baby I Centrifuge*, mod.: 205).



Figura 11. Microcentrifuga (HT® – MCD2000) para tubos de Eppendorf de 0,50 ml, com filtros Millipore Ultrafree-MC, membrana Durapore PVDF, 0,45  $\mu$ m porosidade.

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.Sobrevivência e biometria dos bivalves durante o período de manutenção

Durante o período de manutenção em laboratório, aproximadamente três meses que antecederam a execução do experimento, o crescimento dos bivalves, expressa como a altura da concha (Figura 12), foi limitado pela baixa concentração alimentar oferecida. Ainda assim, a taxa de sobrevivência foi bastante satisfatória para as espécies de ostras *C. gigas* e *C. brasiliana* (82 % e 87 %, respectivamente), demonstrando uma boa resistência à limitação de alimento e ao ambiente artificial. Já os mexilhões tiveram uma taxa de sobrevivência muito inferior (59 %), demonstrando maior sensibilidade às condições que foram submetidos em laboratório. Os níveis de amônia (< 0,25) e pH (6 – 7,4) permaneceram dentro do tolerável, sendo controlados pelas trocas periódicas de água e aeração. A temperatura da água variou entre 20,5 e 23,2 °C e a salinidade oscilou entre 28 e 30 durante a manutenção em laboratório.

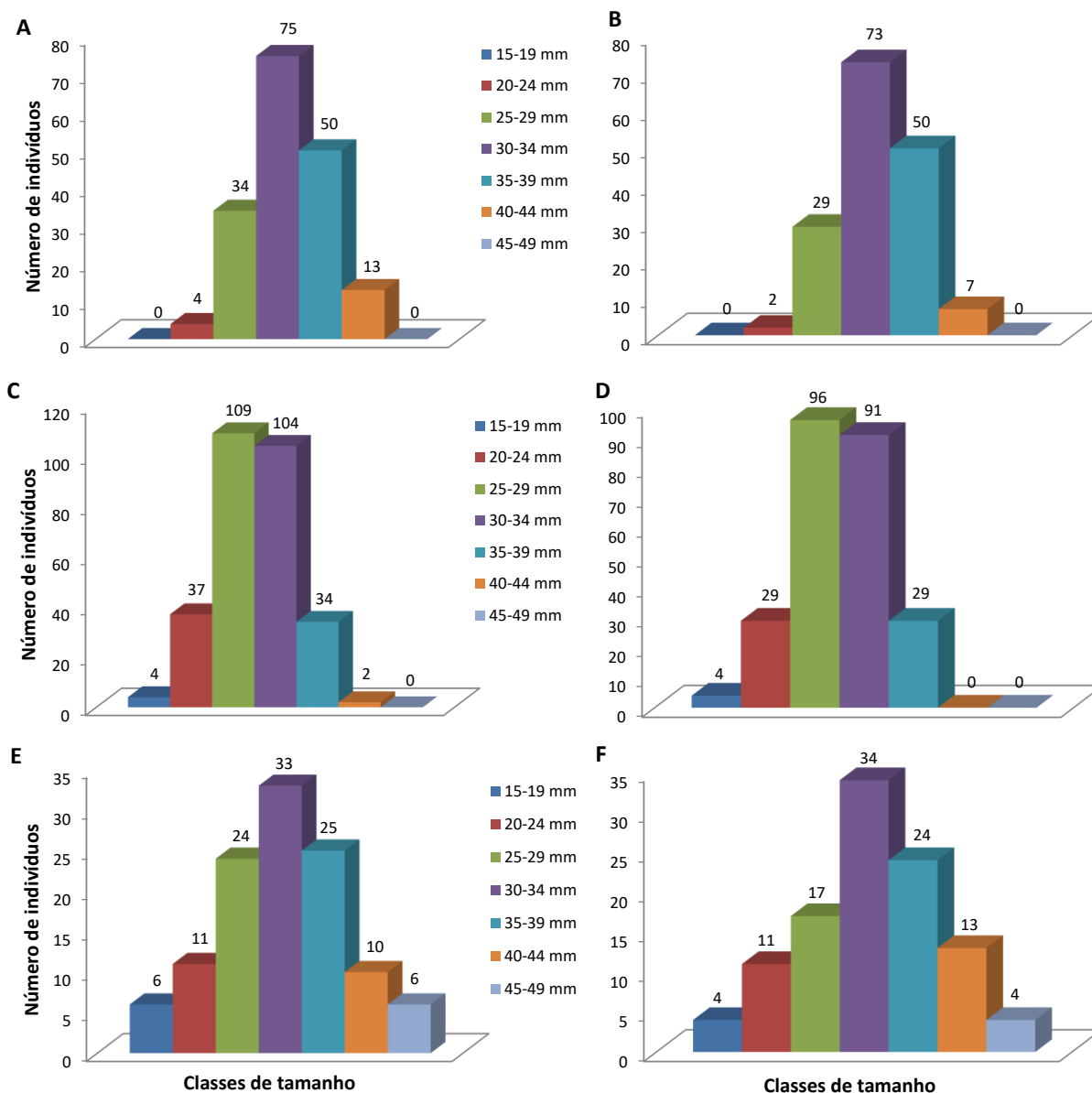


Figura 12. Distribuição de tamanho (altura de concha) dos bivalves no início de fevereiro (A, C, E) e início de maio de 2013 (B, D, F), durante o período de manutenção em laboratório: (A,B) *Crassostrea gigas*, (C,D) *Crassostrea brasiliana*, (E,F) *Perna perna*.

#### 4.2. Sobrevivência e biometria dos bivalves durante o experimento

A taxa de mortalidade dos bivalves durante o experimento foi praticamente nula. Os bivalves selecionados para o experimento de acúmulo e depuração de toxinas diarréicas tiveram altura média de concha semelhante: 29 mm para *Crassostrea*

*brasiliiana* (n = 100), 32 mm para *Perna perna* (n = 50) e 34,3 mm para *C. gigas* (n = 100). Entretanto, *C. brasiliiana* apresentou um peso desconchado médio, tecidos moles somados, quase duas vezes superior ao das demais espécies (Tabela 01). A fração composta pela glândula digestiva ou vísceras representou, em média, 23,4% do peso dos mexilhões e entre 29,5 e 31,4% do peso das ostras (Tabela 01). Contudo, mesmo com essa variação de tamanhos entre as espécies estudadas, segundo Duinkeret *al*, 2007, o tamanho e a idade dos moluscos, não interferem na taxa de depuração da DST.

Tabela 01. Valores médios de peso úmido (g) desconchado total, de glândulas digestivas (*gd*) e outros tecidos (*ot*), percentual do peso da *gd* e altura de concha (mm) dos bivalves utilizados no experimento de acúmulo e depuração de toxinas diarreicas.

ESPÉCIE	Pesodesconchado (g)	Peso <i>gd</i> (g)	Peso <i>ot</i> (g)	<i>gd</i> (%)	altura (mm)	n
<i>Crassostrea gigas</i>	0,49	0,07	0,17	29,45	34,27	100
<i>C. brasiliiana</i>	0,94	0,19	0,40	31,44	29,17	100
<i>Perna perna</i>	0,57	0,10	0,31	23,38	31,99	50

Foram identificadas, com auxílio da especialista Verônica Oliveira do laboratório de Bentos do CEM/UFPR, mais de sete diferentes organismos bentônicos no lote de *C. brasiliiana*. Foram eles os poliquetas: *Nicole auspiana*, *Polydora websteri* ou *Polydora* cf. *haswelli*, *Alitta succinea*, *Nainereis setosa*, *Eumida* sp., *Syllis* sp., *Lumbrineridae* e uma espécie não identificada pertencente ao filo *Nemertea*. Com a infestação dos poliquetas, a capacidade de filtração das ostras *C. brasiliiana* pode ter sido afetada, pois alguns dos organismos perfuraram as conchas e se instalaram dentro do manto das ostras (Figura 13), podendo assim, alterar os resultados da análise de acúmulo e depuração de toxinas.



Figura 13. Conchas da espécie *C. brasiliana* perfuradas pelos poliquetas detectados durante o experimento.

Na fase de acúmulo, durante as primeiras 24 horas do experimento, os bivalves foram expostos a abundâncias relativamente elevadas de *Dinophysis acuminata* (Figura 14). A densidade celular de *D. acuminata* oscilou entre 1.350 e 13.750 células L<sup>-1</sup>, sendo a oscilação resultante do balanço entre a remoção pela filtração dos bivalves e a adição constante de suspensão com novas células por meio da bomba peristáltica e, eventualmente, de volumes maiores com Becker. Na fase de depuração, durante os 7 dias seguintes, os bivalves foram expostos à dieta controle, livre de ácido okadaico, contendo somente a microalga *T. suecica* em densidades celulares que variaram entre 1270 e 5000 células L<sup>-1</sup>, que foram adicionados diariamente com um Becker (300 a 400 ml de cultivo concentrado).

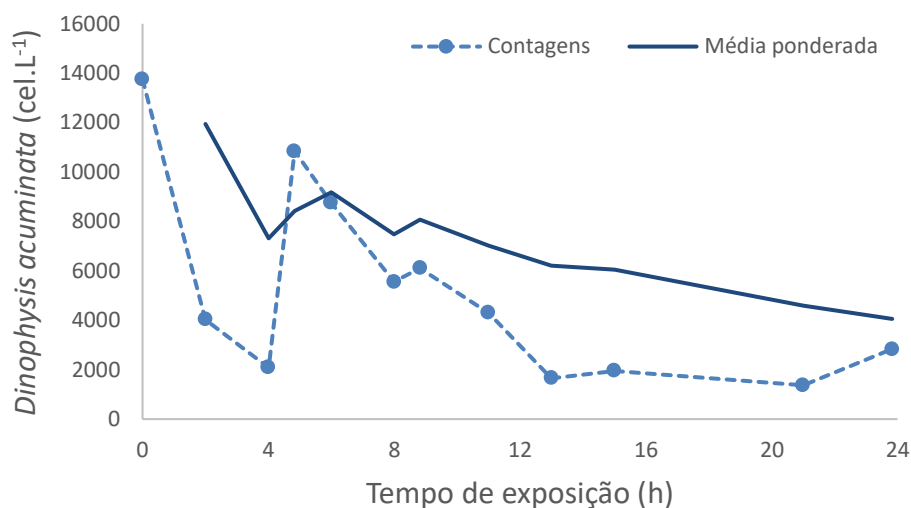


Figura 14. Densidade celular de *Dinophysis acuminata* (células L<sup>-1</sup>) exposta a indivíduos juvenis de *Crassostrea gigas*, *C. brasiliana* e *Perna perna* durante as primeiras 24 horas do experimento de acúmulo e depuração de toxinas diarréicas. A curva da "média ponderada" representa os valores médios cumulativos, ponderados pelo tempo de exposição, ao longo do experimento.

A relevância da pesquisa sobre o mecanismo de acúmulo e a depuração de espécies de moluscos bivalves cultiváveis, tem sido comprovada através de estudos como o de Blanco *et al*, (1999), que afirmam que há vários métodos possíveis de serem utilizados para reduzir os impactos dos episódios de DSP, sendo o principal o da depuração dos bivalves cultivados. Os autores avaliaram também, a interferência dos parâmetros ambientais envolvidos no processo de contaminação, tais como: temperatura e alimento disponível, comprovando a importância do uso de alimento durante o processo de depuração, conforme adotado no presente estudo, para se acelerar o processo de depuração e para dar maior significância ecológica aos resultados de experimentos realizados em laboratório. E de acordo com o método adotado para o tratamento das amostras, este mesmo processo foi utilizado por Lindegarth *et al*, 2009, em um estudo de comparação de acúmulo de toxinas diarréicas entre os bivalves das espécies *Mytilus edulis* e *Ostrea edulis*, na Europa. Sendo assim, recomenda-se o uso de protocolos padronizados, bem planejados para garantir o sucesso e a relevância de estudos desta natureza, adotando-se procedimentos como os descritos a seguir:

#### **4.3. Protocolo de preparo para amostras de bivalves em experimentos de acúmulo e depuração de toxinas.**

*Procedimentos para se realizar antes do recebimento dos organismos testes:*

- ◆ Preparar o ambiente de cultivo (aquários ou tanques) de acordo com as necessidades e especificidades das espécies de bivalves que serão usadas, incluindo: cálculo do tamanho das estruturas, com adaptações se for preciso. Por exemplo: ostras e vieiras devem ficar suspensas em estruturas flutuantes, como bandejas adaptadas com bóias nas laterais; mexilhões, além das bandejas, se adaptam bem em sacos de malhas de nylon; enquanto que berbigões, devem ficar em aquários com substrato arenoso no fundo, por exemplo. O local adequado para a instalação do aquário (iluminação, proteção, manejo, etc.) é muito importante, pois dele dependerá o bom andamento do experimento. A origem, qualidade, quantidade e o tratamento da água que será utilizada durante todo o experimento, devem ser levados em consideração, antes mesmo da preparação da estrutura de cultivo, já que a qualidade sanitária dos organismos dependerá do manejo adequado deste recurso. Antes de ser usada em qualquer procedimento, assim que é captada a água do mar, deve ser armazenada em recipientes, (que podem ser caixas de água comum ou cisternas), em local mais próximo possível do laboratório ou local onde será realizado o experimento, para facilitar o manejo. Toda a água deve ser clorada e em seguida, neutralizada com tiosulfato para eliminar resíduos de cloro.
- ◆ A assepsia correta de toda a estrutura que será usada é muito importante, tomando sempre o cuidado de eliminar (e/ou neutralizar) resíduos químicos (cloro, detergentes), que por ventura, possam ficar nas estruturas após assepsia, para não afetar os bivalves. Recomenda-se como precaução, utilizar somente bucha e água corrente, caso não haja necessidade de desinfecção por químicos.
- ◆ Os parâmetros abióticos da água do cultivo, tais como: oxigênio dissolvido (OD), amônia (A), temperatura (T), salinidade (Sal) e potencial hidrogeniônico (pH), precisam ser adaptados e monitorados, conforme os requerimentos de cada

espécie estudada. Para tanto é preciso a aquisição de toda a aparelhagem necessária para a medição e monitoramento, inclusive aeradores, importante para manter os níveis de OD na água. Neste caso, um oxímetro será preciso para se medir a quantidade de OD e se determinar quantos aeradores ou bombas propulsoras serão necessárias para se alcançar um nível seguro de OD ( $> 5 \text{ mg L}^{-1}$ ) para os bivalves. Outros materiais e equipamentos necessários para esta fase são: um Kit comercial para medir a concentração de A (deve permanecer  $< 0,50$ ); termômetro para medir a T (ideal manter entre 20 e 24°C); refratômetro ou salinômetro para medir a Sal (28 a 32), e um pHmetro para medir o pH, que deve permanecer entre 6,5 e 8,5. Importante ter sempre em mãos, desde o início, um caderno de anotações para que não se perca nenhum dado.

- ◆ Adquirir um número de organismos que possa garantir o sucesso do experimento, levando em consideração todos os processos que os mesmos terão que passar, incluindo o número de réplicas que serão necessárias. Recomenda-se selecionar indivíduos de uma mesma classe de tamanhos para padronizar as amostras. Não esquecer que há uma grande variação na taxa de alimentação de indivíduo para indivíduo, o que pode gerar problemas para a análise de acúmulo e depuração de toxinas, se analisados individualmente. Essa característica é mais acentuada em espécies de ostras, devido ao hábito de abrir e fechar as valvas periodicamente. Portanto, cada amostra deve ser composta por um número de bivalves ( $>2$ ) que assegure que os resultados finais sejam representativos de toda a população investigada. Recomenda-se, para uma boa margem de segurança, adquirir no mínimo, duas a três vezes a quantidade de indivíduos necessária para o experimento.
  
- ◆ Conhecer o hábito alimentar da (s) espécie (s) de bivalve (s) que será usada, para inocular a (s) microalga (s) que irá (ão) compor a dieta de manutenção, em uma quantidade suficientemente segura para a aclimação e manutenção dos organismos, desde o momento em que chegarem ao laboratório até o dia do experimento. Por exemplo, as ostras do gênero *Crassostrea* e o mexilhão da

espécie *Perna perna*, podem ser mantidos com a combinação das microalgas: *Tetraselmis suecica* (clorofícea) e *Chaetoceros muelleri* (diatomácea). Esta combinação de uma diatomácea e uma microalga flagelada garante um perfil nutricional mais rico e adequado à sobrevivência dos bivalves.

*Procedimentos após a chegada dos organismos testes:*

- ◆ **Aclimação:** é de extrema importância que o ambiente esteja de acordo com as necessidades do organismo teste recebido, caso contrário, pode-se por em risco a sobrevivência de todo o lote de bivalves. Esta é uma fase crucial, a qual exigirá muito cuidado e atenção por parte do responsável pelo monitoramento dos parâmetros abióticos, que devem ser medidos com uma maior frequência nesta fase, principalmente a A, pois dependendo da densidade de estocagem dos organismos no aquário, ela pode subir muito rapidamente, causando intoxicação e morte dos bivalves.
- A troca de água ou renovação parcial, nesta fase, deverá ser controlada e determinada de acordo com a densidade de indivíduos e os parâmetros abióticos, principalmente a A e Sal. Portanto, não há como definir uma quantidade exata de renovação de água sem se conhecer as necessidades de cada espécie de bivalve e as condições que foram submetidos até chegar ao laboratório (estresse, que pode alterar o metabolismo, produzindo mais ou menos A). Com o tempo de duas a três semanas, e um maior controle sobre os parâmetros abióticos, é possível se estabelecer uma rotina segura de renovação de água. Recomenda-se a cada 3 dias, fazer troca de 20 a 50 % da água; e a cada uma semana, troca de 100% da água, podendo se aproveitar deste momento para fazer a assepsia do aquário e das estruturas que ficam submersas (bandejas, aeradores, etc). Um cuidado muito importante que deve ser tomado no momento da troca de água é a esterilização da água, para que não sejam dispensados no ambiente os organismos usados em laboratório e seus resíduos, principalmente quando se tratam de espécies exóticas. Sendo assim, a água deve ser retirada do aquário, colocada em outro recipiente

reserva (aquário ou galões de 20 L), clorada e neutralizada com tiosulfato, antes de ser dispensada.

- A alimentação deve ser controlada de acordo com o comportamento (hábito alimentar) e a idade dos indivíduos. Recomenda-se oferecer uma quantidade suficiente para o número de organismos (conforme o tamanho da espécie), e através de contagens de células, feitas por amostras de microalgas retiradas regularmente do aquário, adaptar a quantidade certa que possa suprir a necessidade dos bivalves, sem que haja excesso de alimento, podendo contribuir para o aumento da A. Para um controle adequado da quantidade de alimento ofertado, recomenda-se o uso de uma bomba peristáltica, que faz a alimentação automaticamente na quantidade desejada.
- Assim que os bivalves estiverem aclimatados, recomenda-se fazer biometria em todos os indivíduos ou se for um lote muito grande, fazer no mínimo de 50 indivíduos, para que tenha um número amostral bastante representativo. Os equipamentos necessários são: um paquímetro digital e uma balança digital de três casas de precisão. A biometria pode ser de dois tipos: (a) medida de altura de concha (mm) de todos os indivíduos, para se obter uma curva de crescimento desde a chegada até o momento do experimento; (b) medida de altura de concha e peso desconchado (g) de alguns indivíduos de cada espécie e de classes de tamanhos distintas, o que ajudará na escolha do tamanho dos indivíduos que serão utilizados no experimento. Neste último tipo de biometria utiliza-se ainda, bisturi, pinças e papel toalha para se obter o peso desconchado.
- ◆ **Manutenção:** No período de manutenção os indivíduos já estarão aclimatados, estabilizados e devem estar com todos os parâmetros abióticos sob controle, verificados através do monitoramento diário. Nesta fase, que antecede o experimento, o fator mais importante é a sobrevivência dos organismos, o que implica, além do controle dos parâmetros e da qualidade da água, em uma

alimentação em quantidade adequada às condições em que estão submetidos. Por exemplo, se a quantidade de alimento for escassa no laboratório, recomenda-se baixar a temperatura da água (nível suportável à espécie), para reduzir a atividade metabólica dos organismos, reduzindo também, o consumo de alimento. As biometrias continuam sendo importantes nesta fase. Deve-se determinar a frequência, de acordo com o tempo de manutenção até a data do experimento e a relevância da quantidade dos dados a serem coletados.

*Procedimentos de preparo para a execução do experimento:*

- ◆ **Organismos testes:** Separar a quantidade necessária de bivalves que será utilizada durante todo o experimento. Deve-se levar em consideração o número de réplicas, quantidade de indivíduos que devem compor cada amostra (dependendo da idade e da espécie) e a taxa de mortalidade. Ter sempre indivíduos de sobra, para que não falem amostras em casos de eventuais incidentes durante o transcorrer do experimento.
- ◆ **Ambiente de cultivo:** Neste momento o ambiente (aquário) deve estar preparado para receber os bivalves testes. Toda a estrutura necessária para executar o experimento deve ser devidamente conferida.
- ◆ **Dieta controle:** Determinar uma dieta controle para alimentar os bivalves no período de 24 horas que antecede o experimento, como aclimação ao ambiente experimental. Esta dieta, que poderá ser a mesma que voltará a ser ofertada na fase de depuração, pode ser composta por uma ou mais espécies de microalgas. Por exemplo, pode-se usar qualquer combinação das seguintes microalgas: os flagelados, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, e a diatomácea *Chaetoceros muelleri*, , que são de fácil manutenção em laboratório e proporcionam um balanço nutricional adequado.

- ◆ **Dieta teste:** No caso de se usar microalgas provenientes do ambiente, a coleta do concentrado, contendo a microalga produtora de toxina, que irá compor a dieta para a fase de acúmulo, deve ser feita no dia anterior ao experimento. Para garantir que a microalga tóxica esteja presente e em quantidade suficiente para simular uma floração, é imprescindível que seja analisada uma alíquota representativa do concentrado, antes de iniciar o experimento. O mesmo é válido para o caso de se usar microalgas produtoras de toxinas cultivadas – a quantidade cultivada deverá ser planejada com antecedência. A quantidade (em L) que será retirada dos galões para abastecer o tanque experimental dependerá do tempo de duração da fase acúmulo do experimento. Para o tempo de 24 horas, por exemplo, 80 L é o suficiente, podendo-se dividir o volume em 4 galões de 20 L para facilitar o transporte ou o cultivo.

*Material necessário para o experimento:*

- Aquário;
- Água do mar filtrada;
- Aeradores e bomba de propulsão;
- Bandejas flutuadoras (quantidade – número de indivíduos e de espécies);
- Bomba peristáltica;
- Balança digital (3 casas de precisão);
- Paquímetro digital;
- Becker;
- Tubos Falcon de 15 ml (quantidade - número de amostras de bivalves);
- Tubos Falcon de 50 ml (quantidade - número de amostras de bivalves);
- Microtubos Eppendorf de 0,50 ml (quantidade - número de amostras de bivalves);
- Vidros âmbar 30 ml (quantidade – número de amostras de microalgas)
- Bisturi;
- Pinças;

- Tesoura cirúrgica;
- Luvas;
- Bandejas plásticas;
- Papel alumínio;
- Papel toalha;
- Etiquetas;
- Caneta marcadora permanente;
- Caderno de anotações;
- Pipetas.

### *Procedimentos para a realização do experimento*

- ◆ Vinte e quatro horas antes do experimento, transferir os bivalves selecionados para o aquário definitivo, contendo água do mar filtrada e, para a aclimação, submeter os bivalves a uma dieta monoespecífica controle, por exemplo: a microalga *Tetraselmis suecica*.
- ◆ Para dar início a fase de acúmulo, é necessária a troca total de água do aquário, para uma nova água filtrada, para daí então, ser feita a oferta da dieta teste. Neste momento é retirada a primeira amostra de bivalves (amostra 0 ou controle) antes da oferta da dieta teste, para garantir que os organismos estavam livres de toxinas no início do experimento. Para este fim, esta pode ser uma amostra simples, sem réplicas. Antes de retirar qualquer amostra de bivalve do aquário, é importante, primeiramente, identificar os frascos que serão usados. Usar siglas para facilitar identificação. Ex.: tubo Falcon 15 ml que receberá a segunda réplica (2) da amostra de glândula digestiva (*gd*) da espécie *Crassostrea gigas* (CG), às 5 horas (5h) da fase acúmulo (A): pode receber a sigla – CG5hAgd2. E assim, todos os tubos que forem usados naquele lote de amostras, devem estar previamente identificados. Cada tubo deve conter uma quantidade de indivíduos suficiente para compor cada amostra/réplica. Por exemplo, amostras das ostras do gênero *Crassostrea*, que possuem o hábito de abrir e fechar a concha ao longo do dia, e isso faz com que haja uma grande variação da taxa de filtração de um indivíduo

para outro, necessitam ser compostas por material, de no mínimo, 4 ostras em cada amostra; mexilhões da espécie *Perna perna* possuem taxas de filtração mais homogêneas, precisando somente de 2 indivíduos em cada amostra.

- **Coletadas amostras de bivalves:** procedimentos a seguir com cada bivalve que compõe a amostra (tenha caderno e caneta em mãos para anotar todos os dados):
  1. **Medida de altura da concha (mm):** com o paquímetro, medir do umbo à região posterior;
  2. **Abertura da concha, com bisturi e luvas:** tomar sempre o cuidado de não danificar os tecidos moles do bivalve;
  3. **Drenagem ou secagem do bivalve desconchado em papel toalha:** retirar o excesso de água para minimizar o erro na quantificação das toxinas por interferência da água aderida aos tecidos, (o papel toalha deve ser trocado sempre que estiver saturado com água);
  4. **Medida de peso desconchado:** cortar um pedaço quadrado (5 cm x 5 cm) de papel alumínio para usar como base, zerar a balança digital, primeiro com o papel alumínio sozinho e, depois, com o auxílio de uma pinça, colocar o bivalve em cima do papel alumínio para obter o peso úmido;
  5. **Secção da glândula digestiva (gd) e dos outros tecidos (ot):** com pinça e tesoura cirúrgica, seccionar a *gd* (tomando o devido cuidado para não perder tecido), e separá-la do restante dos tecidos moles *ot*. Na maioria dos bivalves a *gd* é o órgão onde se acumulam as maiores concentrações das mais variadas toxinas;
  6. **Pesagem do material separadamente:** pesar somente a *gd*, lembrando sempre de zerar a balança com o peso do papel alumínio antes, para depois colocar o material para pesar. Zerar a balança com o peso do tubo (previamente identificado) que receberá o material e colocar a *gd* dentro do tubo, que deverá ser colocado em um estrado, facilitando o depósito do material (*dg*) proveniente dos outros bivalves que irão compor a amostra. O mesmo procedimento deverá ser feito com o restante dos tecidos (*ot*), que serão colocados em outro tubo, à

espera do material dos outros bivalves. Ex.: a espécie de mexilhão *Perna perna*, precisa de dois indivíduos para compor uma amostra. Portanto, cada amostra será composta por material de duas *gds* ou dois *ots*.

7. **Armazenamento em freezer:** assim que cada lote de amostras estiver completo, deve ser levado imediatamente ao freezer, onde permanecerá até a próxima etapa do preparo.
- ◆ **Iniciando a fase acúmulo:** após a retirada da amostra inicial de bivalves, começa a oferta da dieta teste, composta pela microalga produtora de toxina. Utilizando uma bomba peristáltica, com calibres diferenciados, programar a quantidade necessária para simular uma floração tóxica, baseada na amostra quantitativa (previamente analisada) da alíquota (10 ml) que foi retirada, assim que foi feita a coleta do concentrado para compor a dieta teste. Recomenda-se estipular horários variados para a retirada das próximas amostras de bivalves, priorizando os primeiros momentos, quando grandes variações nas concentrações de toxinas são esperadas. Por exemplo, em um período de 24 horas de acúmulo, retirar amostras por volta das 4, 8, 12 e 24 horas após o início. Na fase depuração, que pode ter uma duração curta (e. g., sete dias) ou mais longa (e. q., dois meses), dependendo da natureza da toxina e sua afinidade pelos tecidos dos bivalves, amostras deverão ser retiradas periodicamente, também priorizando os primeiros momentos, já que a desintoxicação de toxinas em bivalves tende a ocorrer de forma exponencial.
  - ◆ **Iniciando a fase depuração:** seguindo o mesmo exemplo, após o período da fase de acúmulo, suspender a dieta teste, retirar os bivalves remanescentes do aquário para fazer a assepsia de toda a estrutura e dos bivalves, que neste momento devem ser lavados em água corrente para eliminar células da microalga nociva. Feita a assepsia, recolocar os bivalves em água do mar filtrada, para em seguida, fornecer a dieta controle, usando-se uma bomba peristáltica e/ou a adição periódica de volumes maiores com um Becker.

- ◆ **Coleta de amostras de microalgas:** assim que o concentrado com a dieta teste (ou o cultivo da microalga produtora de toxina) for trazido ao local do experimento, deve-se retirar alíquotas de 40 ml de cada galão estoque, que devem ser filtradas em filtros de microfibras de vidro GF/C (Whatman) e congeladas para posterior análise de toxinas. Durante todo o experimento é necessário que se faça coletas regulares de alíquotas de 10 ml da água do aquário, para que seja feita a análise quantitativa das células de microalgas que estão compondo as dietas. Devem ser colhidas amostras em horários importantes como: Início e fim das fases do experimento, antes e depois que a alimentação for ofertada em volumes maiores, além de outros horários variados para um bom controle da variação da densidade celular ao longo do experimento. Variações significativas devem ser corrigidas por meio de alteração do fluxo da bomba peristáltica e/ou com adição de volumes adicionais (reforço). Cada alíquota coletada deve ser acondicionada em vidro âmbar e fixada com três gotas de solução de lugol 1 %. Todas as amostras devem ser contadas em triplicata, com auxílio de microscópio ótico e câmaras Sedgewick-Rafter ou em microscópio ótico invertido, usando o método de Utermöhl (1958), com câmaras de sedimentação.

*Procedimentos para extração de toxinas das amostras:*

- ◆ Nesta fase final de preparo, as amostras devem ser descongeladas e processadas em lotes, para preservar a qualidade do material. Para facilitar a manipulação, podem ser enumeradas, quando o número de amostras for grande. Ex.: uma amostra que tem uma sigla: *CG5hAgd2* passa a ser amostra 1. Muito importante fazer uma tabela que contenha siglas e números correspondentes.
  - Para as toxinas lipossolúveis, o metanol é o meio utilizado para se fazer a extração, portanto, para este tipo de toxinas, incluindo as toxinas diarréicas, cada amostra deve receber uma quantidade de metanol de acordo com o seu peso individual, numa razão de 9:1 (v:v). Para as toxinas amnésicas, acrescentam-se às amostras, solução de metanol aquoso 50 %, e para toxinas paralisantes, solução aquosa de ácido clorídrico a um pH final em torno de 3-4.

- Com o auxílio de uma sonda de ultrassom (20 Hz), cada amostra deve ser triturada de 2 a 3 minutos, com pulsos de 3 segundos com intervalos de 1 segundo, com potência de 70 %, para a quebra das células, liberando as possíveis toxinas dos tecidos dos bivalves. Uma alternativa é o uso de homogeneizadores / trituradores de tecidos, mas neste caso ocorre a desvantagem da perda de material e o peso da amostra triturada deve ser aferido novamente antes da adição do solvente. As amostras contendo os filtros de fibra de vidro, os quais foram usados para reter as células e calcular a toxicidade da dieta oferecida durante a fase de acúmulo, também devem ser preparadas nesta fase: cada um dos filtros deve ser cortado em quatro partes e receber 3 ml de metanol e em seguida, o mesmo tratamento que as demais amostras. Durante todo o processo de trituração, deve-se evitar que a temperatura do extrato suba excessivamente por ação da sonda ultrassônica, devendo-se manter os tubos imersos em um Becker com água e gelo. Após a trituração, as amostras devem ser centrifugadas por 2 minutos a uma velocidade de 2.400 rpm, para decantação dos resíduos sólidos. Com auxílio de uma pipeta, retirar uma alíquota de 0,25 a 0,50 ml do sobrenadante de cada amostra e filtrar em filtros de membrana para seringas ou filtros de centrífuga montados sobre tubos de Eppendorf (tipo Millipore Ultrafree-MC), de material compatível ao solvente utilizado. Caso os filtros de centrífuga, tipo Eppendorf ou filtros de seringa, não sejam encontrados, as amostras podem ser processadas seguindo o método de filtração a vácuo, com filtro de fibra de vidro Whatman GF/F (#0,7 $\mu$ m).
- O extrato líquido filtrado (contendo metanol neste caso) deve passar pelo processo de secagem, caso seja necessário se enviar as amostras para análises em locais distantes. Tal procedimento deve ser conduzido com a utilização de um jato de nitrogênio gasoso, manualmente a cada amostra, por 5 minutos, até evaporação de toda a porção líquida. Antes da análise, os extratos secos devem ser recompostos com o mesmo volume de solvente que

foi evaporado. Caso não seja necessário o envio, a análise poderá ser feita usando-se diretamente o filtrado.

- ◆ Após o preparo, as amostras, tanto evaporadas quanto as amostras líquidas, devem ser acondicionadas em um recipiente identificado e armazenadas em freezer, de onde sairão somente para serem encaminhadas para a análise de toxinas.

## 5. CONCLUSÃO

Com este estudo, foi possível comprovar que organismos juvenis (< 30 mm), das espécies pesquisadas, *C. gigas*, *C. brasiliiana* e *P. perna* podem ser mantidos em laboratório e utilizados para testes de contaminação que representam indivíduos adultos de tamanho comercial (> 50 mm), pois demonstram uma vantagem quanto à facilidade de se manter em laboratório e de não produzirem material reprodutivo, o que poderia interferir nos resultados do experimento.

Além disso, através das técnicas de pesquisa utilizadas, demonstrou-se que é possível simular uma floração de *Dinophysis acuminata* em laboratório, para investigar simultaneamente as taxas de acúmulo e de depuração de toxinas algais em espécies de bivalves que não co-ocorrem no ambiente de cultivo. Com o monitoramento contínuo da densidade celular, foi possível minimizar a variação do aporte de toxinas, o que é muito importante para a eficiência da pesquisa.

Desta forma, um bom planejamento amostral e logístico foi fundamental para o sucesso do experimento. Finalmente, através da criação de um protocolo, foi possível padronizar os procedimentos de obtenção e preparo de amostras para pesquisas de acúmulo e depuração de toxinas, que pode ser aplicado a várias espécies de moluscos bivalves, usando-se algumas pequenas adaptações inerentes a cada espécie. Assim, o uso de um protocolo de preparo, se apresenta como uma forma eficaz de garantir a qualidade das amostras, contribuindo assim como uma importante ferramenta, para auxiliar na pesquisa e em programas de monitoramento e controle da qualidade sanitária dos moluscos bivalves cultiváveis.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. P.; SCHARAMM, 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**, 2010.

BARBIERI, E. **O PERIGO DAS BIOTOXINAS MARINHAS. As biotoxinas marinhas são causadoras de uma forma de intoxicação associada ao consumo de frutos do mar, principalmente moluscos e crustáceos**, 2009.

BLANCO, J.; FERNANDEZ, M. L.; MIGUEZ, A.; MOROÑO, A. **Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions**, 1999.

BRITO, L. **Efeito da salinidade sobre o crescimento da ostra nativa *Crassostrea* sp. como subsídio ao desenvolvimento da maricultura de espécies nativas em mar aberto**. Dissertação de mestrado, 2008.

**Certificado de Ensaio nº 097/2013, de 16/04/2013**. Emitido pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina CIDASC. Disponível em:

<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/10/certificado-097.pdf>.

Acesso em 08/05/2013.

CORDIER, S.; MONFORT, C.; MIOSSEC, L.; RICHARDSON, S.; BELIN, C. **Ecological Analysis of Digestive Cancer Mortality Related to Contamination by Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins along the Coasts of France**, 2000.

DUINKER, A.; BERGSLIEN, M.; STRAND, Ø.; OLSENG, C. D.; SVARDAL, A. **The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.), 2007.**

FAO. **Biotoxinas marinas. ESTUDIO FAO: ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN. Organización de las Naciones Unidas para La Agricultura y La Alimentación, 2005.**

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. **Cultivo de mexilhões.** Disponível em: <<http://bгнаescola.files>>. Acesso em 20/11/2013.

FERREIRA, V. M.; OLIVEIRA, G. M.; PEREIRA, M. M. D.; SILVA, P. P. O.; BORBA, H. R.; LOURENÇO, A. J.; SILVA, P. F. **Produção da ficotoxinadiarréica ácido okadaico associada à microalga *Dinophysis acuminata* (Ehrenberg 1839) na baía de Sepetiba, RJ e sua implicação para a saúde pública.** R. bras. Ci. Vet., v. 17, n. 2, p. 87-90, maio/ago. 2010.

HALVER, J. E.; RONALD, H. W. **Fish nutrition.** Third edition, 2002.

HARAGUCHI, L.; ODEBRECHT, C. **Dinophysiales (Dinophyceae) no extremo Sul do Brasil (inverno de 2005, verão de 2007).** *Biota Neotrop.* Jul/Set 2010 vol. 10, no. 3, 2010.

LEE, J. S.; IGARASHI, T.; FRAGA, S.; DAHL, E.; HOVGAARD, P.; YASUMOTO, T. **Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species, 1989.**

LINDEGARTH, S.; TORGERSEN, T.; LUNDVE, B.; SANDVIK, M. **Differential retention of okadaic acid (oa) group toxins and pectenotoxins (ptx) in the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.), and European flat Oyster, *ostrea edulis* (L.), 2009.**

MAFRA, L. L. J. **Acúmulo e depuração de toxinas algais em espécies cultiváveis de moluscos bivalves.** Proposta de pesquisa apresentada ao CNPq no Edital Universal 2010-2012, aprovada sob o número de processo 481759/2010-7, 2010.

OLIVEIRA, M. M.; SILVA FILHO, M. V.; BASTOS, J. C.; NEVES, M. H. C. B. **Toxinas de cianobactérias e microalgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática**, 2010.

PROENÇA, L. A. O.; MAFRA, L. L. J. **Ocorrência de ficotoxinas na Costa Brasileira**, 2005.

PROENÇA, L. A. O.; OLIVEIRA, G. F. **Análise de ácido domóico em moluscos cultivados no litoral de Santa Catarina**, 1999.

**Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves – PNCMB.** Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controlempa/sanidade-pesqueira/programas-sanitarios/pncmb/sobre-pncmb>>. Acesso em: 21/11/2013.

REGUERA, B., ALONSO, R., MOREIRA, A., MÉNDEZ, S. **Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas.** COI de UNESCO y OIEA, Paris y Viena 2011. Manuales y Guías de La COI, p. 59, 2011.

SCHIMITT, F.; PROENÇA, L. A. O. **Ocorrência de dinoflagelados do gênero *Dinophysis* (ENRENBURG, 1839) na Enseada de Cabeçudas (verão e outono de 1999).** (CTTMar – UNIVALI - NOTAS TÉCN. FACIMAR, 4: p. 49-59), 2000.

VALE, P. **Biotoxinas marinhas.** Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 2004.

YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; SUGAWARA, W.; FUKUYO, Y.; OGURI, H.; IGARASHI, T.; FUJITA, N. **Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning**, 1980.