

Biotoxinas marinhas

Marine biotoxins

Paulo Vale*

Laboratório Nacional de Referência para Biotoxinas Marinhas
Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas – IPIMAR - Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

Resumo: Certas microalgas produzem compostos bioativos – as biotoxinas marinhas – capazes de causar intoxicações agudas no Homem quando concentrados por certos animais. Nas regiões temperadas do planeta os bivalves são os principais vectores de intoxicações esporádicas. Peixes de recife de diversas regiões tropicais e semi-tropicais são vectores da ciguatera. Alguns peixes, como o peixe-balão, podem causar intoxicações fatais. Entre os compostos envolvidos encontram-se alcalóides, poliéteres e aminoácidos. Os sintomas são na generalidade perturbações do tipo gastrointestinal e/ou neurológico, sendo raramente fatais excepto no caso da PSP e do peixe-balão. A investigação utilizando HPLC permitiu identificar quais os perfis de toxinas e a sazonalidade com que ocorrem em Portugal, e as biotransformações envolvidas desde a microalga ao bivalve. A intoxicação do tipo diarreico - DSP - é a principal causadora da contaminação dos bivalves, apresentando uma sazonalidade bastante alargada com particular incidência nos meses estivais. A intoxicação do tipo paralisante - PSP - já é reconhecida em Portugal desde 1946, tendo já causado algumas mortes. Esta contaminação manifesta-se entre o final do Verão e o Outono, mas não é recorrente todos os anos. A intoxicação do tipo amnésico - ASP - surge entre a Primavera e o Outono, mas raramente os seus níveis excedem o máximo permitido. São descritos alguns casos clínicos de intoxicação humana do tipo PSP e DSP. O risco de intoxicação por azaspirácido - AZP - parece ser muito baixo.

Summary: Certain microalgae produce bioactive compounds – marine biotoxins – capable of causing acute human poisonings when concentrated by certain animals. In temperate regions of the planet shellfish are the main vectors of sporadic poisonings. Reef fish in certain tropical or semi-tropical areas are vectors of ciguatera. Certain puffer fish are among the deadliest seafood. Compounds involved range from alkaloids to amino acids and polyethers. The symptoms include gastrointestinal and/or neurological disturbances, seldom are fatal except in PSP and puffer fish poisoning. In Portugal, studies with HPLC have confirmed toxin's profile and seasonality and some biotransformations that occur from the producing microalgae to shellfish. DSP is the main cause of shellfish contamination, presenting a wide seasonality, mainly in summer months. PSP is known since 1946, and has originated some fatalities. It appears usually in late summer and autumn, but is not recurrent every year. ASP occurs between spring and autumn, but levels rarely surpass the allowable level. Confirmed episodes of human intoxications by PSP or DSP are described. Risk of azaspiracid poisoning seems to be negligible

Proliferações de microalgas nocivas

As proliferações de certas algas microscópicas (microalgas), marinhas ou de água doce, podem causar diversos efeitos que são percebidos pelo homem como nocivos, sendo por isso designadas por “Harmful Algal Blooms” ou HABs (‘proliferações de algas nocivas’). O fenómeno que apresenta o maior impacto visual de todos – a maré vermelha – é uma alteração da cor da água, que pode tomar tonalidades como verde, castanho, vermelho ou amarelo (Figura 1a). A proliferação maciça de microalgas pode ter aparentemente poucos efeitos no ecossistema ou afectar fortemente diversos organismos aquáticos por mecanismos diversos: anoxia, produção de toxinas (ictiotoxinas), efeito mecânico da estrutura anatómica da sua parede celular nos tecidos delicados das brânquias. As HABs têm um pesado impacto negativo na pesca, especialmente quando causam extensa mortalidade de espécies cultivadas em gaiolas, como o salmão, que não podem escapar da zona onde decorre o fenómeno (Landsberg, 2002).

A contaminação esporádica com biotoxinas em animais que têm uma alimentação filtradora, como é o caso dos moluscos bivalves, pode originar intoxicações agudas no Homem embora não afectando aparentemente o animal contaminado. Neste caso particular, podem ser suficientes proliferações diminutas de células que não chegam a alterar a cor da água. O fenómeno é devido essencialmente a microalgas do grupo dos dinoflagelados. A maior parte são planctónicas (livre-nadadoras na água) e as suas toxinas atingem o Homem directamente através dos moluscos bivalves. No entanto, em zonas circuntropicais existe um importante fenómeno associado a microalgas bentónicas e epifíticas (não são geralmente nadadoras, mas vivem sobre substratos como corais ou macroalgas): a ciguatera. A toxina é transferida das microalgas para peixes herbívoros, que por sua vez a transferem para os seus predadores, atingindo assim o consumidor humano via concentração ao longo da cadeia trófica.

Das mais de 5.000 espécies de fitoplâncton conhecidas, somente cerca de 300 podem ocorrer por vezes em números tão elevados que alteram a cor da água,

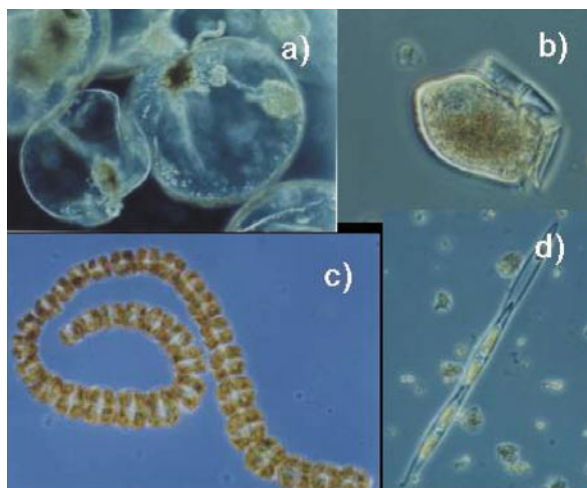


Figura 1 – Microalgas causadoras de HABs: a) *Noctiluca scintillans*, causadora de maré vermelha; b) *Dinophysis acuta*, produtora de DTXs e PTXs; c) *Gymnodinium catenatum*, produtora de PSP; d) *Pseudonitzschia* spp., produtora de ASP. As fotos não estão todas na mesma escala, mas as dimensões de cada célula são entre 0,005-0,100 mm (fotos: M.A. Sampayo).

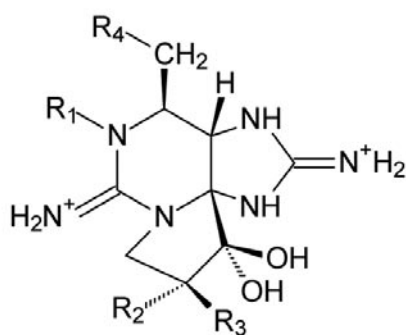


Figura 2 - Estrutura das toxinas PSP. R1 = H ou OH; R2 e R3 = H ou OSO₃⁻; R4 = NH₂CO₂⁻ nas toxinas carbamato, SO₃NHCO₂⁻ nas toxinas N-sulfocarbamoyl, OH nas toxinas decarbamoyl, H nas toxinas deoxydecarbamoyl. Há pelo menos 21 toxinas caracterizadas estruturalmente.

enquanto que somente cerca de 40 têm a capacidade de produzir toxinas potentes que podem entrar na cadeia alimentar (Hallegraef, 1993). As proliferações de HABs são fenômenos naturais que ocorrem há milênios. Prendem-se com os ciclos marinhos de nutrientes, temperatura, salinidade, correntes, etc., que em determinadas circunstâncias favorecem o crescimento de certas espécies, embora os pormenores que favorecem cada espécie das HABs em particular ainda não sejam perfeitamente conhecidos. A eutrofização de origem antropogénica parece estar ligada em algumas regiões do planeta a um aumento das HABs. O aumento do potencial científico e o crescente desenvolvimento da aquacultura está certamente ligado ao maior conhecimento e atenção dadas a este fenómeno. Outro factor apontado para uma expansão do fenómeno, é o transporte de quistos de microalgas na água de balastro dos navios, que conduz à disseminação das espécies das HABs (Hallegraef, 1993).

Cabe ainda uma breve referência às HABs de ciano-

bactérias ('algas-azuis') tóxicas em sistemas de água doce. Estas podem afectar o homem ou os animais, directamente por contacto causando irritação na pele, ou através da ingestão da água de beber, aumentando a taxa de incidência de cancro do fígado em regiões endémicas (hepatotoxinas), como parece ter sido demonstrado em algumas regiões da China com elevada incidência deste tipo de cancro (Charmichael, 1994); ou mais raramente ainda causar a morte (neurotoxinas). Algumas das neurotoxinas são comuns com as encontradas em dinoflagelados marinhos (saxitoxinas, ver adiante), outras são específicas (anatoxinas). Dedicar-nos-emos aqui somente aos fenómenos que ocorrem em meio marinho.

As síndromes de intoxicação humana

As biotoxinas marinhas são compostos de natureza não-péptidica, e que em grande parte actuam através da modulação de canais iónicos nas células, i.e., são neurotoxinas. Diversas microalgas marinhas, em particular do grupo dos dinoflagelados, produzem potentes compostos bioactivos, que quando extraídos e concentrados a partir de animais marinhos que delas se alimentam primária ou secundariamente como bivalves, esponjas, peixes, etc., originam a morte do murganho após administração intraperitoneal (i.p.) (Yasumoto e Murata, 1993). São compostos extremamente interessantes para estudos de fisiologia celular, que auxiliam na compreensão do funcionamento de determinados mecanismos das células, devido à sua acção como inibidores específicos. Muitos destes compostos não têm expressão na saúde humana, mas sobre alguns deles ainda se têm dúvidas. Trataremos aqui das síndromes que têm maior expressividade a nível mundial, nomeadamente sobre a sua sintomatologia, características químicas, modo de acção e técnicas mais vulgares empregues na rotina para a sua investigação e gestão dos recursos contaminados a fim de prevenir intoxicações. Não sendo essenciais ao funcionamento das células – são metabolitos secundários – a finalidade da sua produção pelas algas permanece um 'certo mistério'. Suspeita-se que nalguns casos a sua finalidade seja conferir vantagens na competição (alelopatia), ou na defesa contra a predação (Landsberg, 2002).

Geralmente a água do mar não apresenta coloração diferente do normal quando o marisco está contaminado, nem este apresenta odor, cor, ou sabor diferentes do marisco não tóxico. A cozedura ou a congelação também não diminuem o grau de toxicidade. Devido à reduzidíssima mobilidade dos bivalves, a sua contaminação é um fenómeno passível de ser monitorizado através de contagem microscópica das espécies tóxicas conhecidas na água do mar concentrada, em simultâneo com testes de toxicidade a uma amostra de animais de uma dada zona. Estes dados servem por sua vez para alertar para o perigo da apanha de marisco dessa mesma zona.

A intoxicação paralisante por marisco (PSP)

A “paralytic shellfish poisoning” (PSP) é reconhecida de há longa data devido à sua elevada taxa de mortalidade. Começou a ser estudada aprofundadamente na América do Norte. Em 1927, Sommer e colaboradores relacionaram pela primeira vez a intoxicação e morte de consumidores de mexilhão na Califórnia, EUA, com a presença na água do mar de uma microalga: *Alexandrium catenella* (Schantz, 1984). A natureza esporádica destas contaminações dificultava a caracterização química do veneno. Os trabalhos desenvolvidos entre 1944 e 1954 levaram à purificação da saxitoxina (STX), derivado do nome latim da ameijoia-amarela do Alasca que apresentava níveis recorrentes de contaminação – *Saxidomus giganteus*; mas foi só em 1974 que a sua estrutura química foi apresentada definitivamente (Schantz, 1984) (Figura 2).

A intoxicação do tipo PSP caracteriza-se por um quadro neurológico. O quadro ligeiro apresenta cerca de 5 a 30 minutos após o consumo, formigueiro ou dormência nos lábios, gengivas e língua. Segue-se dormência ou formigueiro nas extremidades dos dedos das mãos e pés, e nas 4 a 6 horas seguintes verifica-se progressão das mesmas sensações para os braços, pernas e pescoço, tornando os movimentos voluntários muito difíceis, e ainda uma sensação de flutuação. O quadro extremo caracteriza-se por fraqueza muscular e dificuldade respiratória acentuada. A morte por paralisia respiratória pode ocorrer desde algumas dezenas de minutos até algumas horas. A respiração artificial é imperativa para salvar o paciente. Normalmente os efeitos desaparecem totalmente ao fim de alguns dias (Kao, 1966; Baden *et al.*, 1995a). A PSP actua por inibição do influxo de sódio nos canais de sódio, impedindo a propagação do impulso nervoso (Baden *et al.*, 1995a). A paralisia da musculatura torácica é a causa directa de morte por asfixia. São necessários entre 1 a 4 mg de PSP para causar a morte (Schantz, 1984).

Apesar de ser estudada há relativamente bastante tempo, não deixa de continuar a ser uma das principais intoxicações a forçar a introdução de programas de vigilância onde antes não existiam. Assim se passou por exemplo em Julho de 1987 nas cercanias da aldeia de Champerico, Guatemala, quando amêijoas contaminadas causaram cerca de 187 intoxicações registadas oficialmente, das quais 26 (14%) foram fatais. A taxa de mortalidade foi de 50% nas crianças entre 0-6 anos e 5% nas vítimas acima de 18 anos (Rosales-Loessener *et al.*, 1989).

A evolução dos métodos de análise química permitiu reconhecer que a saxitoxina não era o único alcalóide envolvido na PSP (Schantz, 1984). Conhecem-se hoje mais de uma vintena de análogos da saxitoxina (Figura 2). Destes, há três sub-famílias que mundialmente têm sido encontradas com grande frequência: as toxinas N-sulfocarbamoiladas apresentam baixa toxicidade, as

carbamato toxicidade elevada, e as descarbamoiladas toxicidade intermédia (Oshima, 1995). O perfil de toxinas encontrado nos bivalves depende da espécie de alga ingerida e das biotransformações que o próprio bivalve realiza: as toxinas N-sulfocarbamoiladas são largamente convertidas nos seus análogos mais tóxicos – as carbamato. A PSP tem uma distribuição mundial extremamente ampla. As principais algas produtoras são *Alexandrium spp.* e *Gymnodinium catenatum* em regiões temperadas e, *Pyrodinium bahamense var. compressum* em regiões tropicais (Bricelj e Shumway, 1998). A possibilidade de bactérias intracelulares ou extra-celulares associadas a estas algas poderem sintetizar estas toxinas faz parte de um longo debate começado 40 anos atrás por uma investigadora portuguesa (Silva, 1962).

A detecção de rotina para protecção da saúde pública recorreu inicialmente à administração i.p. de extractos ácidos de bivalves em murganhos. Na década de 50 foi efectuado um estudo intercolaborativo utilizando o bioensaio em murganho calibrado com o veneno purificado de *Saxidomus* (Schantz, 1958; McFarren, 1959), que originou o primeiro método de análise para uma biotoxina marinha adoptado pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 1995a).

Seguidamente vulgarizaram-se diversos métodos de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), que permitem conhecer rapidamente o perfil de toxinas nos bivalves e nas microalgas (Sullivan e Wekell, 1987; Oshima, 1995; Lawrence *et al.*, 1995). A disponibilidade de soluções de calibração para todas as toxinas conhecidas tem impedido que estes métodos se vulgarizem para a monitorização, continuando a maior parte dos países a basearem-se no método do bioensaio com murganhos. Outros métodos muito promissores baseiam-se no desenvolvimento de anticorpos específicos. Alguns chegaram à escala comercial sob a forma de imunoenaios do tipo ELISA (Usleber *et al.*, 1997). A limitação destes tem sido a sua reacção demasiado selectiva para a toxina com que foram desenvolvidos, e baixa reacção cruzada para outras toxinas igualmente muito potentes. Recentemente surgiu no mercado um teste rápido baseado em imunocromatografia de fluxo lateral que apresenta um conjunto de 8 anticorpos, e permite uma resposta rápida do tipo sim/não (Jellet *et al.*, 2002).

A intoxicação neurotóxica por marisco (NSP)

A “neurotoxic shellfish poisoning” (NSP), embora reconhecida há bastante tempo, parece restringir-se unicamente à região do Golfo do México e Caraíbas, embora esporadicamente já tenha causado intoxicações na Nova Zelândia. É causada pelo dinoflagelado *Ptychodiscus brevis*, produtor de toxinas hemolíticas e neurotóxicas. Aquando da ocorrência de marés vermelhas desta alga, as hemolíticas causam extensa mortali-

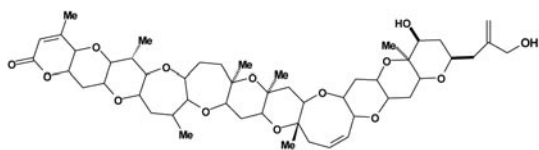


Figura 3 - Estrutura da PbTx-3, do grupo das brevetoxinas PbTx-2.

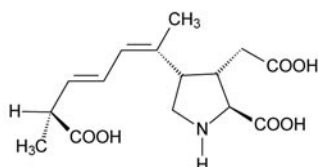


Figura 4 - Estrutura da principal toxina ASP: ácido domóico.

dade de peixes e complicações respiratórias reversíveis nas populações costeiras através da inalação do aerossol marinho. As neurotoxinas provocam, por ingestão de bivalves (em cerca de 3 horas), paraestésias, percepção calor/frio invertida, náuseas, diarreia, dilatação da pupila, vertigens, vômitos, aperto na garganta e ataxia. Não ocorre paralisia muscular, e não se conhecem casos fatais (Baden *et al.*, 1995a).

As brevetoxinas dividem-se em dois grupos de poliéteres: os análogos da brevetoxina PbTx-1 contêm um esqueleto de 10 anéis fundidos, os análogos da brevetoxina PbTx-2 contêm 11 anéis fundidos (Figura 3) (Baden *et al.*, 1995b). Na Nova Zelândia foram descobertos novos análogos (Satake *et al.*, 1996). As toxinas nos bivalves são diferentes das encontradas em culturas *in vitro* da microalga. Os bivalves efectuem conversão metabólica que difere consoante a espécie (Satake *et al.*, 1996). As brevetoxinas actuam por activação persistente do canal de sódio, originando uma descarga eléctrica contínua (Baden *et al.*, 1995a). A detecção tradicional recorre ao bioensaio em murganho – método de APHA (Irwin, 1970). Tem-se recorrido também à aplicação de imunoenaios para detecção rápida (Naar *et al.*, 2000).

A intoxicação amnésica por marisco (ASP)

A “amnesic shellfish poisoning” (ASP) foi descoberta pela primeira vez em 1987 aquando de um surto de toxinfecções causado por mexilhões oriundos da costa nordeste do Canadá, em que mais de uma centena de pessoas foram afectadas e registou-se a morte de três idosos. Desencadeia um quadro gastrointestinal nas primeiras 24 horas: náuseas, vômitos, diarreia, cólicas abdominais; ou, dentro de 48 horas um quadro neurológico: reacção à dor aguda diminuída, vertigens, alucinações, confusão e perda de memória temporária, donde advém o nome desta intoxicação. Em pacientes idosos surgiram ainda lesões cerebrais, coma e morte.

Existiu uma associação entre perda de memória e idade: os pacientes com menos de 40 anos tiveram predominantemente diarreia e os doentes acima de 50 anos tiveram perda de memória (Todd, 1993).

Rapidamente foi descoberto que o composto tóxico era um aminoácido invulgar: o ácido domóico ou DA (Figura 4) (Wright *et al.*, 1989). Este tinha sido isolado no Japão como sendo o princípio antihelmíntico de uma macroalga vermelha, *Chondria armata*, empregue como desparasitante (Daigo, 1959). Esta foi a primeira vez que o composto esteve associado a um surto de intoxicações humanas. No entanto, o produtor do composto era agora uma diatomácea marinha: *Pseudo-nitzschia pungens* (Bates *et al.*, 1989). A descoberta de uma diatomácea envolvida na produção de biotoxinas que afectem o Homem foi uma surpresa, e continua a ser uma excepção no protagonismo ocupado pelos dinoflagelados. Um pouco por todo o mundo têm vindo a ser identificadas outras algas produtoras de DA pertencentes ao mesmo género, bem como bivalves contaminados com DA, o que significa que o risco de intoxicações humanas está bastante disseminado. No entanto, o DA tem vindo a ser implicado em mortalidades de aves marinhas (Work *et al.*, 1993) e leões marinhos (Lefebvre *et al.*, 2000), mas não em surtos de intoxicação humana. Os vectores são peixes herbívoros como a anchova que, aparentemente não afectados pela toxina, acumulam níveis suficientes para dizimarem aves e mamíferos que se alimentam à base de peixe.

Conhecem-se outros isómeros do DA, mas têm uma contribuição minoritária na contaminação dos recursos marinhos. Podem surgir espontaneamente a partir de DA purificado, por exposição a altas temperaturas ou condições ácidas (Quilliam *et al.*, 1989). Em macroalgas foram identificados outros isómeros que não se conhecem nas diatomáceas nem em bivalves contaminados (Zaman *et al.*, 1997b). O DA é um aminoácido neuroexcitatório, que potencia o efeito de aminoácidos excitatórios naturais como o glutamato. Actua nos receptores do glutamato a nível do sistema nervoso central, induzindo despolarização na membrana pós-sináptica (Todd, 1993). Devido à natureza solúvel em água do DA, tinham sido observadas na altura do incidente canadiano reacções invulgares no bioensaio em murganho empregue de rotina para monitorizar as toxinas PSP. Este bioensaio pode fornecer uma indicação de contaminação elevada com DA. No entanto, os estudos mostraram que os roedores são bastante resistentes ao DA, pelo que foi considerado que este bioensaio não garante um nível adequado de protecção humana (Todd, 1993). Assim, logo de início os métodos empregues no Canadá foram baseados em HPLC, metodologia que foi rapidamente validada por um estudo intercolaborativo (Lawrence *et al.*, 1991) e adoptada como método oficial pela AOAC (1995b). Para além de metodologias de HPLC, estão também a ser desenvolvidos e comercializados imunoenaios para esta toxina (Garthwaite, 1998).

A intoxicação diarreica por marisco (DSP)

A “diarrhetic shellfish poisoning” (DSP), apresenta exclusivamente um quadro gastrointestinal: diarreia, vômitos, dores epigástricas, dores abdominais, fraqueza muscular, cefaleias. A diarreia pode surgir entre 1-2 horas até às 24 horas seguintes à ingestão, e a sua frequência pode chegar às 10 a 20 vezes por dia nos casos graves. Os sintomas cessam ao fim de três dias (Yasumoto *et al.*, 1978). Na Europa já desde a década de 1960 que se suspeitava de intoxicações por mexilhões que não eram atribuíveis à contaminação por bactérias (Kat, 1979). Foi só a seguir a um surto de intoxicações no Japão em 1976 que foi definitivamente afastada a hipótese bacteriana e se chegou à conclusão de que se tratava de um composto químico termoresistente de origem marinha. A contaminação foi atribuída à *Dinophysis fortii* (Yasumoto *et al.*, 1980), a produtora do poliéter dinofisistoxina-1 ou DTX1 (Figura 5) (Murata *et al.*, 1982). Descobriu-se mais tarde que os bivalves também podiam conter um composto semelhante, designado ácido ocadáico (OA) devido à esponja marinha, *Halichondria okadai*, da qual tinha sido previamente isolado (Tachibana *et al.*, 1981). Na Europa foi identificada uma outra toxina semelhante a estas e designada dinofisistoxina-2 ou DTX2 (Hu *et al.*, 1992). Sabe-se ainda que nos bivalves qualquer destas toxinas podem existir conjugadas com ácidos gordos, formando os ésteres acilo ou DTX3 (Marr *et al.*, 1992). Estes ésteres não existem nas microalgas, mas são metabolitos dos bivalves (Suzuki *et al.*, 1999).

Sabe-se que algumas microalgas bentónicas e epifíticas do género *Prorocentrum* também produzem estas toxinas (Murakami *et al.*, 1982), no entanto, raramente têm sido associadas à contaminação dos bivalves (Lawrence *et al.*, 1998). Esta é causada exclusivamente por algas planctónicas do género *Dinophysis*. A Europa é uma das regiões mundialmente mais afectadas pela DSP, sendo o OA a principal toxina implicada, seguida da DTX1 e DTX2 (van Egmond *et al.*, 1993). O OA é um inibidor potente de uma classe de enzimas - as fosfatases proteicas do tipo PP2A e PP1 (Bialojan e Takai, 1988) - e leva à acumulação na célula de proteínas hiperfosforiladas, alterando numerosos processos metabólicos. A acumulação, por exemplo, de actina hiperfosforilada, leva à desorganização do citoesqueleto da célula causando a perda da forma das células animais em cultura, o que é também uma maneira de diagnosticar a presença desta toxina (Amzil *et al.*, 1992). O despiste de rotina desta toxina tem sido efectuado principalmente por bioensaios em murganhos ou em cobaias (Yasumoto *et al.*, 1978; Kat, 1979). Em alguns programas de monitorização e testes ao produto final emprega-se um imunoensaio comercial - o DSP-Check (Usagawa *et al.*, 1989). As análises por HPLC têm-se vulgarizado bastante empregando uma detecção por fluorescência através do acoplamento com um reagente fluorescente (Lee *et al.*, 1987), ou directamente re-

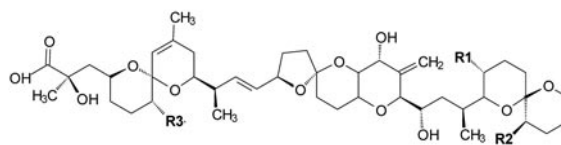


Figura 5 - Estrutura do ácido ocadáico e derivados mais vulgares encontrados em bivalves. OA: R1 = CH₃, R2 = H; DTX1: R1 = R2 = CH₃; DTX2: R1 = H, R2 = CH₃; ‘DTX3’: R3 = acilo. Nas restantes R3 = OH.

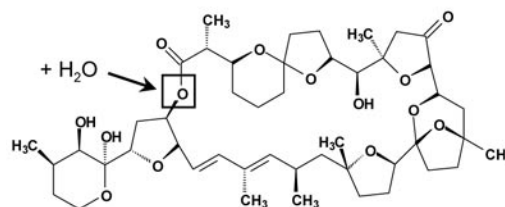


Figura 6 - Estrutura da pectenotoxina-2 (PTX2) encontrada em plâncton. A PTX2sa encontrada em bivalves possui o anel aberto na região indicada pelo quadrado.

correndo a um detector de massa - LC-MS (Quilliam, 1995). A detecção recorrendo à inibição enzimática da PP2A é também um método de despiste rápido (Simon e Vernoux, 1994), ainda muito pouco vulgarizado mas com grande potencial.

O estudo de bivalves contaminados levou ainda à descoberta de outras duas famílias de toxinas: pectenotoxinas e iessotoxinas. As pectenotoxinas são poliéteres macrocíclicos (Figura 6), também originários de *Dinophysis* spp (Lee *et al.*, 1989), que não têm acção diarreica, sendo principalmente hepatotóxicas em modelos animais (Terao *et al.*, 1993). As iessotoxinas são poliéteres de anéis fundidos à semelhança das brevetoxinas (Murata *et al.*, 1987), que não são produzidos pelas *Dinophysis*, mas por *Protoceratium reticulatum* (Satake *et al.*, 1997). Também não têm acção diarreica, mas efeitos cardiotoxicos em modelos animais, no entanto a sua acção por administração oral é muito fraca (Tubaró *et al.*, 2003). Devido à sua frequente coexistência com as toxinas comprovadamente diarreicas, desconhecem-se os verdadeiros riscos para a saúde humana.

A intoxicação por azaspirácido (AZP)

A “azaspiracid poisoning” (AZP), é uma síndrome exclusivamente gastrointestinal idêntica à DSP: náuseas, vômitos, diarreia abundante e dores abdominais. Foi registada pela primeira vez em 1995 na Holanda devido ao consumo de mexilhões contaminados provenientes da Irlanda (McMahon e Silke, 1996). Na própria Irlanda também já se registaram intoxicações devidas à AZP (McMahon e Silke, 1998). A toxina é um poliéter ácido contendo um anel azaspiro pouco vulgar, donde deriva o seu nome: azaspirácido-1 ou AZA1 (Figura 7) (Satake *et al.*, 1998). Já se conhecem dois análogos AZA2 e AZA3 (Ofuji *et al.*, 1999), e formas hidroxiladas dos três: AZA4 a AZA11 (James *et al.*, 2003b).

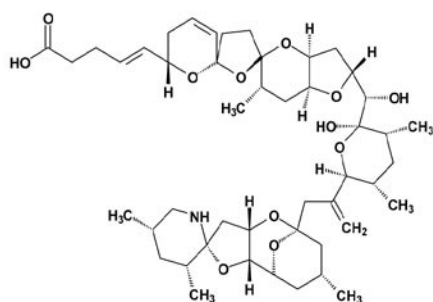


Figura 7 - Estrutura da principal toxina AZP: azaspirácido-1.

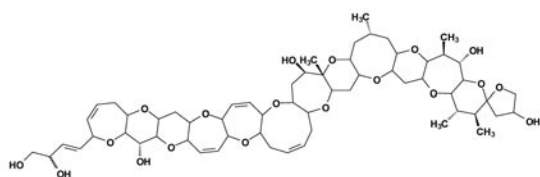


Figura 8 - Estrutura da CTX-1, um membro do grupo das ciguatoxinas do Pacífico.

A espécie produtora parece ser *Protoberidinium crassipes*, um género que até agora nunca tinha estado implicado na produção de biotoxinas. A principal toxina encontrada no plâncton tem sido o AZA1, seguido pelo AZA2 e AZA3. Pensa-se que as formas hidroxiladas surgem por biotransformação nos bivalves (James *et al.*, 2003a). Sabe-se ainda pouco dos alvos celulares do AZA: não altera o potencial de membrana celular, não sendo neurotóxico; altera a concentração de F-actina, tendo portanto o citoesqueleto como um dos alvos; aumenta o nível de iões cálcio no citosol celular (Román *et al.*, 2002). Devido à fraca letalidade do AZP no murganho, a monitorização na Irlanda tem recorrido recentemente à técnica de LC-MS que apresenta uma sensibilidade muito superior. Ainda não existe outra técnica disponível para detectar rapidamente os azaspirácidos. O AZA já foi detectado em bivalves da Inglaterra, Noruega, França e Galiza (James *et al.*, 2002; Magdalena *et al.*, 2003).

A intoxicação ciguatérica por peixe (CFP)

A “ciguatera fish poisoning” (CFP) (nome de origem Caraibiana) afecta uma grande diversidade de peixes de recife geralmente confinados a regiões discretas do Oceano Pacífico, Oceano Índico ocidental e Mar das Caraíbas. No Pacífico são afectadas particularmente as ilhas de atóis, pois o peixe é a principal fonte proteica (Lewis, 2001), sendo por isso a intoxicação alimentar causada por biotoxinas mais comum a nível mundial. A toxicidade é detectada laboratorialmente em barracuda, moreia, mero, peixe-cirurgião, peixe-papagaio, turbo, etc. (Yasumoto *et al.*, 1977). Pode apresentar um quadro gastrointestinal que dura alguns dias e surge entre 30 minutos a 24-48 horas, manifestando-se nos

casos ligeiros por: diarreia, vômitos, náuseas, dores abdominais. O quadro neurológico é mais característico e dura entre algumas semanas a meses: dormência nos lábios, mãos e pés, percepção invulgar da temperatura, comichão severa localizada na pele, fadiga, dores musculares e nas articulações. A administração intravenosa de manitol alivia os sintomas. Raramente ocorrem casos fatais (Lewis, 2001).

Quadro 1 - Resumo de diversas intoxicações humanas raras causadas por animais marinhos.

Síndrome	Vector	Taxa de mortalidade
Carchatoxismo	Tubarões (gén. <i>Carcharhinus</i>)	7-30%
Chelonitoxismo	Tartarugas (<i>Eretmochelys imbricata</i> e <i>Chelonia mydas</i>)	7-28%
Clupeotoxismo	Sardinhas (fam. Clupeídeos: <i>Amblygaster sirm</i> , <i>Herklosichtys quadrimaculatus</i> , <i>H. puntactus</i>)	20%
Ictioalienotoxismo	Peixes herbívoros (famílias Siganídeos, Mugilídeos, Acanturídeos)	Nula (essencialmente efeitos alucinogénicos)
Xantitoxismo	Caranguejo 11 pintas (<i>Carpillus maculatus</i>)	50%

No Oceano Pacífico predominam os sintomas neurológicos enquanto no Mar das Caraíbas os sintomas gastrointestinais são dominantes. A explicação reside em diferentes perfis de toxinas nas duas regiões (Hamilton *et al.*, 2002). As ciguatoxinas são poliéteres que causam activação selectiva dos canais de sódio (Baden *et al.*, 1995a). A ciguatoxina-1 (CTX1) é das toxinas mais potentes e contribui com cerca de 70% da toxicidade encontrada em peixes carnívoros do Pacífico (Figura 8) (Lewis, 2001). Para além dos peixes, foi descoberta uma elevada toxicidade em detritos de corais e macroalgas originárias das Ilhas Gambier. Isto levou à descoberta de uma microalga extremamente abundante e que se veio a revelar a produtora da toxina: *Gambierdiscus toxicus* (Yasumoto *et al.*, 1977a). Esta produz variantes pouco oxidadas de baixa toxicidade, que são oxidadas à medida que são transferidas ao longo da cadeia alimentar adquirindo maior toxicidade. Assim, além da bioacumulação, existe um fenómeno de bioamplificação da toxicidade que aumenta o risco.

Nos peixes carnívoros as ciguatoxinas são encontradas em baixas concentrações mas são extremamente potentes. Isto torna a sua detecção difícil, e só recorrendo a imunoenaios de elevada sensibilidade se poderá obter uma detecção eficaz dos exemplares de risco antes do seu consumo (Hokama *et al.*, 1998), pois devido à elevada mobilidade dos peixes não é possível saber exactamente quais as zonas onde não se deve

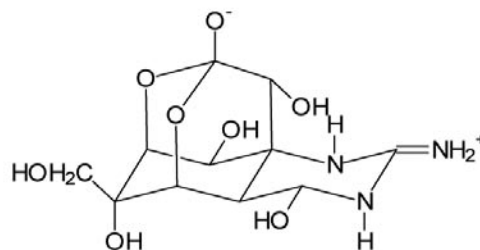
Quadro 2 - Resumo da legislação comunitária referente a biotoxinas marinhas.

Tópico	Designação / Jornal Oficial	Título
PSP	Directiva do Conselho 79/923/CEE JO N° L 281, 10.11.79, p. 47	Directiva do Conselho 79/923/CEE de 30 outubro 1979 relativa à qualidade exigida às águas conquícolas
monitorização PSP, DSP	Directiva do Conselho 91/492/CEE JO N° L 268, 24.09.91, p. 1	Directiva 91/492/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991, que estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos
CFP	Directiva do Conselho 91/493/CEE JO N° L 268, 24.09.1991, p. 15	Directiva 91/493/CEE do Conselho, de 22 de Julho de 1991, que adopta as normas sanitárias relativas à produção e à colocação no mercado dos produtos da pesca
PSP: <i>Acantocardia</i>	Decisão da Comissão 96/77/CE JO N° L 120, 20.01.96, p. 46	Decisão da Comissão 96/77/CE, de 18 de Janeiro de 1996, que estabelece as condições de colheita e transformação de determinados moluscos bivalves provenientes de zonas em que os níveis de toxinas paralisantes excedem o limite fixado pela Directiva 91/492/CEE do Conselho
ASP	Directiva do Conselho 97/61/CE JO N° L 295, 29.10.97, p. 35	Directiva 97/61/CE do Conselho de 20 de Outubro de 1997 que altera o anexo da Directiva 91/492/CEE que estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos
Lipossolúveis	Decisão da Comissão 2002/225/CE JO N° L 75, 16.03.2002, p. 62	Decisão da Comissão 2002/225/CE, de 15 Março 2002, que define regras pormenorizadas para a aplicação da Directiva 91/492/CEE do Conselho no que se refere a níveis máximos e métodos de análise de determinadas biotoxinas marinhas presentes em moluscos bivalves, equinodermes, tunicados e gastrópodes marinhos
ASP: pectinídeos	Decisão da Comissão 2002/226/CE JO N° L 75, 16.03.2002, p. 62	Decisão da Comissão 2002/226/CE, de 15 Março 2002, que estabelece controlos sanitários especiais para a colheita e transformação de determinados moluscos bivalves com um nível de toxina ASP que ultrapassa o estabelecido na Directiva 91/492/CEE do Conselho
Planos de amostragem	Proposta de Regulamento COM/2002/377 JO N° C 262 E, 29.10.2002, p. 449	Proposta de Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho COD 2002/0141 (COM/2002/377 final de 11.07.2002), que estabelece as regras específicas de execução dos controlos oficiais dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano
1ª LNRs	Decisão do Conselho 93/383/CEE JO N° L 166, 08.07.93, p. 31	Decisão do Conselho 93/383/CEE de 14 Junho 1993 relativa aos laboratórios de referência para o controle das biotoxinas marinhas
2ª LNRs	Decisão do Conselho 99/312/CE JO N° L 120, 08.05.99, p. 37	Decisão do Conselho 1999/312/CE de 29 Abril 1999 que altera a Decisão 93/383/CEE relativa aos laboratórios de referência para o controle das biotoxinas marinhas

pescar. A prevenção passa por proibir por exemplo o comércio de barracudas e seríolas de idade avançada ou, consumir pequenas doses dos peixes de maior risco (Hungerford e Wekell, 1993). Existe um bioensaio em murganho para confirmação do diagnóstico da doença. Recentemente, métodos de LC-MS têm sido também usados permitindo detectar simultaneamente diversos análogos (Hamilton *et al.*, 2002).

A intoxicação por peixe-balão

O consumo de peixe-balão (ou *Fugu*) origina esporadicamente intoxicações fatais em países do Pacífico, particularmente no Japão e China, onde abundam espécies tóxicas. Apesar de altamente tóxicos, são dos peixes mais valiosos no Japão devido ao bom gosto que possuem. O problema circunscreve-se aos peixes da ordem dos Tetraodontiformes, especialmente da família *Tetraodontidae*, donde deriva o nome da toxina principal – tetrodotoxina (Figura 9), e do síndrome - tetrodotoxismo. Os principais órgãos tóxicos são os ovários e o fígado, seguido da pele e dos intestinos. A estação de maior toxicidade é o Inverno, coincidente com o desenvolvimento dos ovários para a reprodução (Kao, 1966). No entanto, os ovos vão perdendo toxicidade à medida que se desenvolvem e nos juvenis a toxicidade desapa-

**Figura 9** - Estrutura da tetrodotoxina.

rece alguns dias após a eclosão (Matsui *et al.*, 1982). A toxicidade de peixes da mesma espécie apanhados em diferentes regiões do Japão varia enormemente. Estes dados apontam para uma origem exógena da toxina. Descobriu-se que a produção dos alcalóides tetrodotoxina (TTX) e análogos se deve a bactérias colonizadoras destes órgãos, como *Shewanella putrefaciens* (Matsui *et al.*, 1989), entre outras.

A sintomatologia é neurológica e semelhante à da PSP, excepto na hipotensão arterial acentuada (Baden *et al.*, 1995a). O modo de acção celular é também semelhante ao da PSP: inibição do transporte de iões nos canais de sódio (Baden *et al.*, 1995a). Apesar da elevada letalidade, é um problema de saúde pública relativamente circunscrito devido ao cuidado que existe em não consumir peixes deste grupo, ou à preparação

cuidadosa de modo a evitar os órgãos contaminados (Kao, 1966). Peixes-balão de água-doce podem também originar esporadicamente intoxicações (Zaman *et al.*, 1997a). Recentemente sucedeu um surto de intoxicações na costa atlântica dos EUA, onde derivados da saxitoxina estavam presentes mas não a TTX (Quilliam *et al.*, 2002). As TTXs podem ser detectadas por bioensaio em murganhos ou por HPLC (Nagashima *et al.*, 1987), mas estes são empregues unicamente com fins de estudo e confirmatórios e não de monitorização preventiva.

Outros vectores

Para além de bivalves como agentes de intoxicação humana, outros vectores são possíveis bastando pensar por exemplo nas espécies predadoras de bivalves como búzios ou caranguejos. No entanto, intoxicações por predadores de bivalves felizmente parecem ser mais raras do que pelos próprios bivalves (Shumway, 1995). Outros animais marinhos são causadores de invulgares neurointoxicações, por vezes fatais. Devido à sua natureza esporádica e rara ainda se conhece muito pouco sobre a origem e transferência destas toxinas na teia alimentar. Por exemplo, só em Madagáscar e ilhas circundantes do Oceano Índico, para além da ciguatera e do tetrodotoxismo, estão descritos mais 5 síndromes envolvendo animais marinhos, que mencionamos sumariamente no Quadro 1 (Turquet *et al.*, 2003).

Segurança alimentar: legislação comunitária e portuguesa

O número de países possuidores de legislação específica e de programas de monitorização tem vindo a aumentar. Quanto à PSP, quase todos os países seguem o método oficial norte-americano (van Egmond *et al.*, 1991), baseado na extracção aquosa acidificada e administração i.p. em murganhos, sendo o valor máximo admissível de 400 unidades-murganho ou 80 µg STX/100 g de carne (AOAC, 1995a). Para toxinas de natureza lipossolúvel (CFP, NSP, DSP, AZP), empregam-se extracções acetónicas ou etéricas, seguidas de evaporação a vácuo, e administração i.p. em murganhos do resíduo seco ressuspenso num detergente suave ou óleo de girassol ou algodão (Irvin, 1977; Yasumoto *et al.*, 1978; Hannah, 1995).

A vulgarização de técnicas alternativas vai-se fazendo lentamente. Os bioensaios são fáceis e baratos de implementar, não requerendo pessoal muito especializado nem equipamento dispendioso. Mas apresentam numerosas desvantagens, tais como: falta de especificidade (interferência de numerosos compostos que são co-extraídos e concentrados = falsos positivos); falta de sensibilidade (= falsos negativos); não são quantitativos; não são rápidos (longo tempo de preparação e longo tempo de observação); é difícil aumentar o número de análises em períodos de proliferação de micro-

algas tóxicas; exigem o sacrifício de animais; empregam grandes quantidades de solventes tóxicos. Como já referido, a disponibilidade comercial de soluções de calibração para as técnicas de HPLC tem limitado a sua implementação.

Até ao início da década de 1990 a legislação comunitária sobre biotoxinas marinhas era escassa. A Directiva 79/923/CEE, relativa à qualidade exigida às águas conquícolas, faz uma breve menção ao parâmetro «saxitoxina», sem especificar a obrigatoriedade da sua medição, o método ou a frequência de amostragem (Quadro 2). É com a Directiva 91/492/CEE que se estabelecem as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos no espaço comunitário. No Anexo fixa-se o limite máximo de PSP em 80 µg/100 g utilizando um método biológico, complementado por um método químico, sendo o biológico de referência. Quanto ao DSP fixa, com carácter vago, que «os métodos de análise biológica habituais não devem produzir reacção positiva». Impõe ainda que a autoridade competente deve estabelecer uma vigilância periódica no intuito de controlar a presença possível de plâncton tóxico nas águas de produção e de transposição e de biotoxinas nos moluscos bivalves vivos.

Durante a década seguinte são introduzidos diversos complementos a esta legislação. A Espanha conseguiu uma legislação para a pesca excepcional de *Acanthocardia tuberculata* excedendo 80 µg de PSP/100 g, mas inferior a 300 µg/100 g, desde que exclusivamente destinada à indústria conserveira (Decisão 96/77/CE). A Directiva 97/61/CE especifica que o teor de ASP não deve exceder 20 µg de ácido domóico por grama de parte comestível, segundo o método de HPLC. A Decisão 2002/226/CE permite a colheita excepcional de duas espécies de pectinídeos contaminados com ASP acima de 20 µg de ácido domóico/g, mas não excedendo 250 µg/g, desde que destinados ao processamento posterior (que consiste na remoção da glândula digestiva) em estabelecimento licenciado.

A regulamentação sobre «DSP» tornou-se obsoleta com o avançar dos conhecimentos científicos. Conhecem-se várias famílias de toxinas que são regularmente co-extraídas com as toxinas DSP na preparação da amostra, mas que não são diarreicas. Para dificultar, surgiu recentemente a AZP que também pode ser detectada pela mesma metodologia. Na Europa o método biológico da DSP varia consoante o país quanto: à preparação (glândula digestiva ou corpo inteiro, solvente de extracção), via de administração (i.p. ou *per os*) e critério de positividade (morte em 5, 12 ou 24 horas; consistência das fezes). Assim, com a Decisão 2002/225/CE foi dado um grande passo para o melhoramento do controlo das toxinas lipossolúveis. Esta Decisão define os níveis máximos para as toxinas do complexo das DSP (ácido ocadáico [OA] e dinofisistoxinas [DTXs]), bem como as iessotoxinas (YTX), as pectenotoxinas (PTX) e os azaspirácidos (AZA). As-

sim, para as DTXs e PTXs define um nível conjunto de 16 µg/100 g; AZAs: 16 µg/100 g e YTXs: 100 µg/100 g. Para além do bioensaio em murgancho, permite o recurso a um conjunto de métodos como a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção fluorimétrica, a cromatografia líquida - espectrometria de massa (LC-MS), imunoenaios e ensaios funcionais tais como o ensaio de inibição de fosfatases.

Outra lacuna da Directiva 91/492/CEE são os detalhes sobre os planos de amostragem. Um dos aprimoramentos presentemente em discussão e, que aqui destacamos, é sobre a frequência de amostragem que se recomenda semanal (COM/2002/377).

Quanto às toxinas em peixes, estas estão legisladas na Directiva 91/493/CEE que adopta as normas sanitárias relativas à produção e à colocação no mercado dos produtos da pesca. Assim, são proibidos os peixes venenosos das famílias Tetraodontidae, Molidae, Diodontidae, Canthigasteridae (que contêm TTXs) e, produtos da pesca que contenham biotoxinas, tais como a ciguatoxina ou as toxinas do tipo paralisante (da musculatura).

Existe ainda legislação comunitária que nomeia os laboratórios nacionais de referência para o controlo das biotoxinas marinhas: a Decisão 93/383/CEE, revista pela Decisão 99/312/CE.

A legislação portuguesa transpõe pela primeira vez para direito interno a Directiva 91/492/CEE relativa aos moluscos bivalves com a Portaria nº 552/95 de 8 de Junho de 1995 (DR I Série B, nº 133 de 8.06.95, p. 3730-3737). A versão consolidada desta Directiva, incluindo a toxina ASP, foi transposta para o Decreto-Lei nº 293/98 de 18 de Setembro de 1998 (DR I Série A, nº 216 de 18.09.98, p. 4828-4838), que é o actualmente em vigor. A Directiva 91/493/CEE relativa aos peixes foi transposta para a Portaria nº 553/95 de 8 de Junho de 1995 (DR I Série B, nº 133 de 8.06.95, p. 3737-3745).

As biotoxinas em Portugal

O primeiro relato de 'envenenamentos verdadeiros' reporta-se a fins de Janeiro de 1946 quando «um caso raro de intoxicação alimentar colectiva, (...) em cerca de 100 pessoas surgiram perturbações, todas elas tendo ingerido mariscos, num raio, em volta da Lagoa (de Óbidos), duns 30 quilómetros. (...) Raras pessoas tiveram vômitos e diarreia. Muitas tiveram vertigens. Sintomas predominantes gerais ou quase gerais: parésias, paraplegias, ou perturbações neuro-musculares, dando a impossibilidade ou a dificuldade de os doentes se manterem de pé. Em certos casos, apenas surgiram formigueiros nos dedos das mãos, ou astenia. (...) Galinhas, gatos e cães que comiam os mariscos, deitados fora depois de cozinhados, morriam. (...) Os óbitos (6) foram quase todos de crianças.» (Correia, 1946). A doença foi atribuída ao "mitilismo", intoxicação já descrita na América do Norte. Este fenómeno era mui-

to peculiar desta Lagoa, e só ocorria quando estava obstruída durante muito tempo a ligação com o mar. Em Novembro de 1955 foram novamente descritos 21 casos e 1 óbito de criança, o que levou ao estudo dos dinoflagelados que ocorriam na Lagoa e à realização dos primeiros bioensaios em murganchos específicos para pesquisa da PSP (Pinto e Silva, 1956).

Para permitir a exploração destes recursos marinhos, garantindo a protecção dos consumidores, foi estabelecido em 1986 o Programa Nacional de Vigilância dos Moluscos Bivalves e do Fitoplâncton Tóxico. Este Programa abrange todas as zonas de produção da costa portuguesa, que estão presentemente demarcadas e publicadas no Despacho nº 13433/2003 de 9 de Julho de 2003, relativo à classificação das zonas de produção de moluscos bivalves (DR II Série, nº 156 de 09.07.03, p. 10309-10316). Os Centros Regionais e Delegações do IPIMAR-INIAP enviam semanal ou quinzenalmente amostras de bivalves e de água do mar de todo o país para os laboratórios da Sede em Lisboa (Laboratório Nacional de Referência para Biotoxinas Marinhas - Decisão 93/383/CEE - e Laboratório de Fitoplâncton Tóxico). Quando são detectados valores de toxina acima dos limites permitidos é desencadeada a proibição da pesca através de um edital que é afixado na Capitania do Porto da região onde foi detectada a contaminação. Quando os valores diminuem é libertada a pesca de bivalves de modo similar.

PSP

A sintomatologia das intoxicações de Óbidos correspondia exactamente à PSP. Os estudos levaram ao isolamento de uma microalga, *Alexandrium minutum*, que em cultura *in vitro* produz toxinas paralisantes. Mas em 1986 as preocupações com PSP direccionaram-se para *Gymnodinium catenatum* que originou contaminação generalizada dos bivalves na costa noroeste em Outubro e Novembro (Franca e Almeida, 1989). Esta microalga pode apresentar-se sob a forma de longas cadeias de células de tonalidade amarelada (Figura 1c). A partir de 1992 a sua proliferação atingiu a costa sudoeste e sul. A contaminação dos bivalves tem ocorrido geralmente entre meados do Verão até final do Outono. De 1986 até 1996 ocorreram proliferações desta alga em alguns anos mas não em todos. Os anos em que se detectou toxicidade mais alta foram em 1986, 1990, 1994 e 1995 (Sampayo *et al.*, 1997). Em Outubro e Novembro de 1994 a costa portuguesa chegou a estar totalmente interdita à apanha de bivalves. Em 1995 e 1996 foi especialmente afectada a costa algarvia. Desde então nunca mais ocorreram interdições pela PSP. Em estuários, os bivalves mais afectados foram o mexilhão e o berbigão, seguidos das amêijoas (Franca e Almeida, 1989). Na Península Ibérica, *Gymnodinium catenatum* tem afectado a norte, a costa da Galiza desde 1976 (Estrada *et al.*, 1984); a sul, a costa da Andaluzia (Maman *et al.*, 2000); e ainda a costa mediterrânica de

Marrocos, onde ainda causa habitualmente contaminação dos bivalves na costa mediterrânica entre Janeiro e Abril (Taleb *et al.*, 2001).

A PSP tem sido monitorizada empregando o bioensaio com murganhos de 1986 até 2002 (AOAC, 1995a). Em 1996 implementou-se uma técnica de HPLC (método de Lawrence *et al.*, 1995), e a partir de 2003 tem-se recorrido a esta para a despistagem, pois foi encontrada uma boa equivalência entre os dois métodos (Vale e Sampayo, 2001a). Os estudos dos perfis de toxinas revelaram uma contaminação complexa dos bivalves, com numerosas toxinas paralisantes presentes. Isto é típico da própria microalga que produz cerca de uma dúzia de toxinas quando em cultura *in vitro*. *Alexandrium minutum* não tem sido associada a contaminação dos bivalves detectável pelo bioensaio, mas muito esporadicamente têm-se detectado em algumas amostras as toxinas típicas da espécie em cultura: goniautoxinas 1, 2, 3 e 4. O conhecimento da complexidade do perfil de toxinas é importante, pois na aplicação de técnicas de imunoensaio pode ocorrer subavaliação da toxicidade por o anticorpo falhar no reconhecimento de todas as toxinas presentes (Vale, 2002).

A técnica de HPLC auxiliou na compreensão da contaminação persistente observada pelo bioensaio em alguns bivalves (Vale e Sampayo, 2001a). Na lambujinha do estuário do Mondego, o HPLC mostrou uma contaminação complexa, tipicamente derivada de *Gymnodinium catenatum*. Nesta zona era habitual a proliferação desta alga. Pensa-se que isto seja devido ao seu peculiar hábito alimentar de filtrador de sedimento. Os quistos produzidos após o crescimento vegetativo da microalga depositam-se no sedimento e servem de semente para o início do seu florescimento noutra estação favorável, mas entretanto podem ser ingeridos pela fauna bentónica. Estes quistos têm sido encontrados no sedimento marinho, e têm desaparecido à medida que a alga tem deixado de florescer no litoral (Amorim e Dale, 1998). A lambujinha oriunda do estuário do Sado, por exemplo, onde nunca foi detectada esta microalga, nunca apresentou toxicidade persistente. A captura no mediterrâneo de berbigão-de-bicos, *Acanthocardia tuberculata*, tem sido problemática pois apresenta retenção prolongada, principalmente no pé, originando a interdição excessivamente prolongada da sua pesca (Marquez, 1993). Estudámos este berbigão quatro anos e meio após a última ocorrência de PSP em 1996. Foi ainda possível detectar vestígios desta toxina, principalmente no pé (Vale e Sampayo, 2002b). Embora não seja habitual haver pesca dirigida a esta espécie, é importante saber algo da sua toxicidade pois pode representar uma alternativa ao esforço de pesca dirigido excessivamente a outras espécies.

DSP

A monitorização de DSP começou em 1987 utilizando o bioensaio com murganhos. A primeira confirma-

ção de DSP foi feita recorrendo ao ensaio dos murganhos lactentes, por observação directa da acumulação de fluído no intestino (Alvito *et al.*, 1990). A técnica de preparação e os critérios de positividade do bioensaio com murganhos têm sido alterados ao longo dos anos, adoptando-se modificações empregues por outros colegas europeus (Vale, 1999). Em 1994 implementou-se a técnica de HPLC com detecção fluorimétrica (Lee *et al.*, 1987) e, em 2000, a de LC-MS (Suzuki e Yasumoto, 2000), que permitiram aprofundar enormemente a compreensão desta toxicidade. Os bivalves podem apresentar contaminação exclusivamente por ácido ocadáico (OA) ou simultaneamente por OA e dinofisistoxina-2 (DTX2). As toxinas OA e DTX2 são estruturalmente semelhantes e toxicologicamente equivalentes (Figura 5). A diferença de perfil é explicada pela alternância de duas microalgas. Da Primavera até ao Outono ocorre frequentemente *Dinophysis acuminata*, que só contribui com OA. No final do Verão e Outono, prolifera por vezes *Dinophysis acuta* (Figura 1b) que contribui com OA, DTX2 e ainda PTX2 (Vale e Sampayo, 2000, 2002c). Nos bivalves a PTX2 (Figura 8) encontra-se convertida no seco-ácido da pectenotoxina-2 (PTX2sa) (Vale e Sampayo, 2002d).

Embora ainda pouco estudados na Europa, verificou-se desde logo que os bivalves podiam conter quantidades importantes de ésteres acilo destas toxinas, que surgem nos bivalves por conjugação com ácidos gordos. Estes não eram detectáveis utilizando a preparação rotineira, mas recorrendo a hidrólise em meio alcalino, OA e DTX2 eram separadas das cadeias de ácidos gordos possibilitando a detecção da toxicidade total (Vale e Sampayo, 1999a). Verificou-se ainda que a conjugação depende da espécie de bivalve. Em mexilhão e conchilha encontram-se percentagens bastante variáveis entre toxinas livres e esterificadas, aumentando normalmente a concentração de esterificadas à medida que os animais se encontram expostos a mais toxina. No entanto existem sempre toxinas livres. Em berbigão, lingueirão, amêijoas (branca, macha, boa), ostra, etc., a percentagem de toxinas esterificadas está habitualmente acima de 98% (Vale e Sampayo, 2002a). As toxinas livres são eliminadas mais lentamente do que as toxinas esterificadas (Vale, 2004), o que ajuda a explicar porque mexilhões e conchilhas são das melhores espécies indicadoras da contaminação com DSP (Vale e Sampayo, 1999b, 2002a). A detecção directa dos ésteres por LC-MS mostrou que existem numerosas conjugações: por exemplo com ácido mirístico, palmitoleico, palmítico, oleico, esteárico ou palmítico (Quilliam *et al.*, 2003). O conhecimento detalhado do perfil de toxinas tem grande importância para que, ao aplicarem-se técnicas de detecção químicas ou bioquímicas se possa detectar a toxicidade total em qualquer espécie de bivalve, tendo já sido demonstrado por diversas vezes que podem ser as principais formas de OA responsáveis por intoxicações humanas (Vale e Sampayo, 1999a, 2002d). Baseando-nos neste conhecimento avaliámos um teste

ELISA comercial (DSP-Check), empregando extractos preparados com hidrólise alcalina. Foi encontrada uma boa correlação entre o método imunoenzimático e as análises por HPLC com detecção fluorimétrica (Vale e Sampayo, 1999a). A partir de 2003 este imunoensaio comercial tem vindo a ser comparado satisfatoriamente com LC-MS e simultaneamente empregue de rotina de modo a obterem-se resultados rápidos e quantitativos da toxicidade DSP.

ASP

A monitorização de ASP começou em 1996, a seguir à sua detecção em estudos preliminares por HPLC em 1995. Inicialmente empregou-se a técnica de extracção ácida (Lawrence, 1991), mas em 1999 mudou-se para a extracção metanólica que permite conhecer melhor o verdadeiro grau de contaminação (Vale e Sampayo, 2002e). A toxina encontrada maioritariamente é o ácido domóico (DA). Os seus isómeros D, A e epi-DA são componentes minoritários e são desprezados na vigilância de rotina dos bivalves (Vale e Sampayo, 2001b). Os bivalves mais contaminados são geralmente os dos fundos – bentónicos – como o berbigão ou a amêijoia-macha, sendo o mexilhão colhido no nível intertidal um mau indicador de ASP. Isto é devido à alga ter pouca capacidade natatória e afundar facilmente. Isto é exactamente o oposto do que sucede com PSP e DSP, ambas produzidas por dinoflagelados, que são excelentes nadadores e procuram subir activamente na coluna de água em direcção à luz solar para realizarem a fotossíntese.

A detecção da(s) alga(s) causadora(s) por microscopia óptica é difícil devido às suas reduzidas dimensões (Figura 1d). O reconhecimento das características da parede celular que permitem a sua identificação só pode ser realizada adequadamente por microscopia electrónica. Em Portugal ocorre pelo menos uma espécie tóxica - *Pseudo-nitzschia australis* (Palma, 2003). A monitorização do plâncton dá-nos unicamente uma ideia se pode ocorrer ou não possibilidade de contaminação. Somente a medição do DA no bivalve permite evitar uma interdição da pesca desnecessária. Normalmente a contaminação por ASP é um fenómeno muito rápido e raramente os valores detectados ultrapassam o limite regulamentar. Os períodos em que surge são entre a Primavera e o Outono. Uma única excepção é conhecida: os pectinídeos como a vieira *Pecten maximus*, apresentam retenção prolongada de DA. Como a toxina está restringida particularmente à glândula digestiva e esta tem elevadas dimensões, é segura a comercialização de pectinídeos após a sua remoção. No entanto, em Portugal não existem ainda estabelecimentos licenciados para o fazerem.

Tendo em atenção as mortalidades maciças de mamíferos e aves relatadas noutras partes do globo, pesquisámos o DA numa espécie de peixe bastante abundante e com alimentação fitoplânctónica – a sardinha. Foram

analisados exemplares colhidos em simultâneo em toda a costa (Vale e Sampayo, 2001b). O grau de contaminação encontrado no animal inteiro foi da mesma ordem de grandeza da encontrada nos bivalves. Como os níveis encontrados nos bivalves não são geralmente muito elevados, espera-se que também não seja fácil ocorrerem mortalidades maciças de fauna. Quanto ao risco para o homem, no músculo só foram detectados vestígios da toxina. A toxina encontra-se quase totalmente localizada nas vísceras, o que possibilita a sua eliminação aquando da evisceração. Em peixes pequenos em que se consome por vezes o animal inteiro, a fragilidade do abdómen ao manuseamento com o fogo, bem como a grande solubilidade da toxina em água, explicam porque será difícil ocorrerem intoxicações através de peixes.

Epidemiologia e análise de risco

Em Portugal as intoxicações por biotoxinas são geralmente diagnosticadas conjuntamente com quaisquer outro tipo de toxinfecção alimentar, sendo escassos os registos que permitam avaliar qual o real impacto global destas na saúde pública. Relatos de profissionais da saúde chegam esporadicamente ao Laboratório, acompanhados por vezes de restos alimentares.

Além dos relatos de 1946 e 1955 já mencionados, aquando da primeira proliferação de *G. catenatum* na costa noroeste em 1986 ocorreram intoxicações em duas famílias, mas apesar da elevada toxicidade atingida, estas não foram mais generalizadas devido ao programa de monitorização implementado (Franca e Almeida, 1989). Aquando da extensa contaminação com PSP em 1994, tivemos pelo menos um relato detalhado de nove pacientes que tiveram internamento hospitalar devido a mexilhões apanhados na costa de Ericeira (Sampayo *et al.*, 2001). No Outono de 1994 a contaminação em Marrocos foi tão grave que se registaram 64 intoxicações, 23 hospitalizações e 4 óbitos (Tagmouti-Talha *et al.*, 1996). Concentrações acima de 3000 µg PSP/100g foram registadas por diversas vezes (por ex., em 1955 e 1994), o que explica os graus de intoxicações ocorridos.

Relatos de DSP pessoais, por contactos telefónicos e por registos médicos têm sido muito numerosos. O primeiro registo detalhado que foi acompanhado de confirmação química ocorreu em 1998 com 18 intoxicados entre funcionários e familiares do Centro de Saúde de Loulé. Tinha permanecido congelada conquiha do mesmo lote do adquirido pelas vítimas e foi-nos enviada pela Delegada de Saúde. Foi possível detectar apenas 10 µg/100 g de OA livre e, 120 µg/ 100 g adicionais após o tratamento alcalino. Nos pacientes que comeram cerca de meio quilo de conquiha, estimou-se uma ingestão de 130 µg de equivalentes de OA (Vale e Sampayo, 1999a). No primeiro surto registado no Japão, cerca de 50 µg foram suficientes para causar gastroenterite em 24 horas (Yasumoto *et al.*, 1978). Outros surtos foram registados: em 2001 na Ria de Aveiro (Vale e Sampayo, 2002d), em 2002 na região

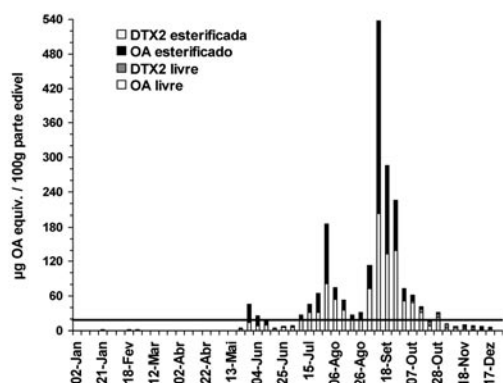


Figura 10 – Contaminação de mexilhão da Ria de Aveiro com OA livre e OA esterificado em 2002. Neste ano, a contaminação com DTX2 teve comparativamente pouca importância. A linha mostra o limite regulamentar de 16 µg DSP/100g.

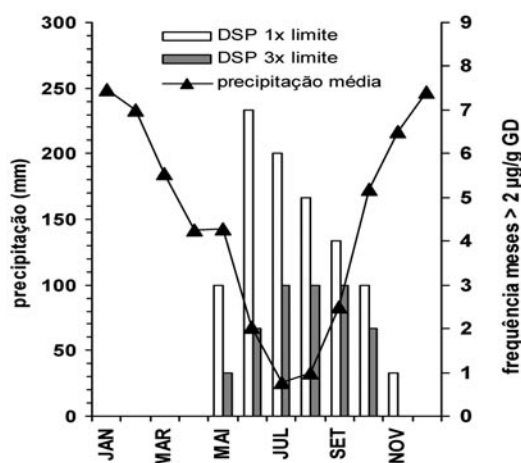


Figura 11 – Frequência de meses entre 1994 e 2002 que ultrapassaram o limite de 2 µg DSP/g glândula digestiva (valor equivalente ao actual limite regulamentar de 16 µg DSP/100 g parte edível) no mexilhão de Aveiro, uma espécie indicadora de uma região fortemente endémica. A curva da média histórica de precipitação mensal obtida com os dados entre 1940/41-1997/98 está sobreposta.

de Peniche, Figueira da Foz, Aveiro e Póvoa de Varzim (Vale *et al.*, 2003).

A contaminação com DSP é muito recorrente. A Figura 10 ilustra o exemplo de uma zona severamente afectada por DSP, num ano de toxicidade particularmente elevada em toda a costa noroeste. No pico máximo registado em Setembro chegou a ultrapassar 30 vezes o limite regulamentar! É assim fácil entender porque pode ser tão frequente a ocorrência de gastroenterites derivadas do consumo de bivalves oriundos de certas zonas do nosso país.

Uma análise retrospectiva dos valores mensais máximos das 3 toxicidades conhecidas no mexilhão colhido na Ria de Aveiro, mostra que para a DSP são encontrados valores excedendo pelo menos três vezes o limite regulamentar com uma frequência de 33% em 3 dos 12 meses do ano, de 9 anos estudados (1994 a 2002) (Figura 11). Para as toxinas PSP, somente 12% de 3 dos 12

meses do ano, excederam o triplo do limite em 17 anos estudados (1986 a 2002). Para a ASP ainda não foram encontrados valores excedendo o triplo do limite em 6 anos estudados (1997-2002), nem no berbigão espécie habitualmente mais contaminada. A distribuição dos valores máximos de DSP está muito confinada aos meses em que se verifica o mínimo de precipitação, e consequentemente de escoamento de água doce para as zonas costeiras (Figura 11). Somente nestes podem surgir condições costeiras ideais para o florescimento maciço das microalgas produtoras. Curiosamente, estes meses apresentam uma notável semelhança com os meses tabu do marisco (os «meses sem R»), à excepção de Setembro, onde o risco de intoxicações é ainda apreciável (Vale e Sampayo, 2003a, 2003b). Se a sazonalidade de DSP ocorre temporalmente confinada nas zonas estuarinas e lagunares da costa noroeste, em bivalves de mar aberto tem-se encontrado contaminação e intoxicações em períodos mais alargados, como sucede com a conquitilha no Algarve (Vale e Sampayo, 1999a).

Concluindo, em Portugal existe um elevado risco recorrente de intoxicações por DSP, seguido pelo risco esporádico por PSP. O risco parece ser baixo para a ASP. Dados recentes apontam que é baixíssimo para a AZP, pois ainda não foi possível confirmar a presença de azaspirácidos por LC-MS em 2002 ou 2003 (Vale, dados em publicação). Quanto à PTX2sa, estudos recentes de toxicologia parecem indicar que apresentam baixa toxicidade por administração oral (Miles *et al.*, 2004). Sendo assim, a conversão efectuada pelos bivalves da PTX2 ingerida das microalgas em PTX2sa, diminuirá o risco para a saúde humana proveniente das pectenotoxinas. A microalga produtora de iessotoxinas – *Protoceratium reticulatum* – ocorre esporadicamente no nosso país. A toxicidade oral destas é também muito baixa.

Agradecimentos

A todos os que ao longo de muitos anos contribuíram para a incansável recolha de amostras e análises laboratoriais, contribuindo para a defesa da saúde pública e investigação nesta área, permitindo por sua vez um crescente melhoramento dos serviços de protecção do consumidor a virem a ser prestados nesta área. A todos os profissionais de saúde que nos têm alertado para a gravidade das intoxicações que por vezes sucedem. À Dr^a Paula Ramos do IPIMAR por uma revisão ao manuscrito.

Bibliografia

- Alvito, P., Sousa, I., Franca, S. e Sampayo, M.A.M. (1990). Diarrhetic shellfish toxins in bivalve molluscs along the coast of Portugal. In: Toxic Marine Phytoplankton. Editores: E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler e D.M. Anderson. Elsevier (New York), 443-448.
- Amorim, A. e Dale, B. (1998). Distribution of cysts from toxic or potentially toxic dinoflagellates along the Portuguese coast.

- In: Harmful Algae. Editores: B., Reguera, J., Blanco, M.L. Fernández, e T. Wyatt. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO (Spain), pp. 64-65.
- Amzil, Z., Pouchus, Y.F., Le boterff, J., Roussakis, C., Verbist, J.F., Marcaillou-Le Baut, C. e Masselin, P. (1992). Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon*, 30 (11), 1419-1425.
- AOAC (1995a). Method n° 959.08 - Paralytic shellfish poison, biological method, final action. In: Official Methods of Analysis, 15ª edição. Editor: AOAC International (Arlington, VA). Cap. 49, 46-47.
- AOAC (1995b). Method n° 991.26 - Domoic acid in mussels, liquid chromatographic method, first action 1991. In: Official Methods of Analysis, 15ª edição. Editor: AOAC International (Arlington, VA). Cap. 49, 48.
- Baden, D.G., Fleming, L.E. e Bean, J.A. (1995a). Marine toxins. In: Handbook of clinical neurology, Vol. 21 - Intoxications of the nervous system, Part III. Editor: F.A. Wolf. Elsevier Science (B.V.), pp. 141-174.
- Baden, D.G., Melinek, R., Sechet, V., Trainer, V.L., Shultz, D.R., Rein, K.S. Tomas, C.R., Delgado, J. e Hale, L. (1995b). Modified immunoassays for polyether toxins: implications of biological matrices, metabolic states, and epitope recognition. *J. AOAC Internat.*, 78 (2), 499-508.
- Bates, S.S., Bird, C.J., de Freitas, A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., McCulloch, A.W., Odenise, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A. e Wright, J.L.C. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46, 1203-1215.
- Bialojan, C. e Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.*, 256, 283-290.
- Bricelj, V.M. e Shumway, E. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.*, 6, 315-383.
- Carmichael, W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, Jan 1994, 64-72.
- Correia, F.S. (1946). Um caso raro de intoxicação alimentar colectiva. *Bol. Inst. Sup. Higiene Dr. Ricardo Jorge*, n° 3, 216-221.
- Daigo, K. (1959). Studies on the constituents of *Chondria armata*. III. Constitution of domoic acid. *J. Pharm. Soc. Japan*, 79, 356-360.
- Estrada, M., Sanchez, F.J. e Fraga, S. (1984). *Gymnodinium catenatum* (Graham) en las rias gallegas (NO de España). *Inv. Pesq.*, 48 (1), 31-40.
- Franca, S. e Almeida, J.F. (1989). Paralytic shellfish poisons in bivalve molluscs on the Portuguese coast caused by a bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In: Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology. Editores: T. Okaichi, D.M. Anderson e I. Nemoto. Elsevier (New York), 89-92.
- Garthwaite, I., Ross, K.M., Miles, C.O., Hansen, R.P., Foster, D., Wilkins, A.L. e Towers, N.R. (1998). Polyclonal antibodies to domoic acid, and their use in immunoassays for domoic acid in seawater and shellfish. *Nat. Toxins*, 6, 93-104.
- Hallegraeff, G.M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32, 79-99.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Jones, A. e Lewis, R.J. (2002). Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish, *Toxicon*, 40 (9), 1347-1353.
- Hannah, D.J., Till, D.G., Deverall, T., Jones, P.D. e Fry, J.M. (1995). Extraction of lipid-soluble marine biotoxins. *J. AOAC Internat.*, 78 (2), 480-483.
- Hokama, Y., Nishimura, K., Takenaka, W. e Ebesu, J.S.M. (1998). Simplified solid-phase membrane immunobead assay (MIA) with monoclonal anti-ciguatoxin antibody (MAB-CTX) for detection of ciguatoxin and related polyether toxins. *J. Nat. Toxins*, 7, 1-21.
- Hu, T., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A. e Wright, J. L.C. (1992). Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, 39-41.
- Hungerford, J.M. e Wekell, M.M. (1993). Control measures in shellfish and finfish industries in the USA. In: Algal toxins in seafood and drinking water. Editor: I.R. Falconer. Academic Press (London), 117-128.
- Irwin, N. (1970). Recommended procedures for the examination of seawater and shellfish. American Public Health Association, Inc., Washington DC, 4th ed., pp. 61-65.
- James, K.J., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., Aune, T., Hovgaard, P., Morris, S., Higman, W., Satake, M. e Yasumoto T. (2002). First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon*, 40 (7), 909-915.
- James, K.J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A. (2003a). Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon*, 41 (2), 145-15.
- James, K.J., Sierra, M.D., Lehane, M., Magdalena, A.B. e Furey, A. (2003b). Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon*, 41 (3), 277-283.
- Jellett, J.F., Roberts, R.L., Laycock, M.V., Quilliam, M.A. e Barrett R.E. (2002). Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert™, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC® mouse bioassay. *Toxicon*, 40 (10), 1407-1425.
- Kao, C.Y., (1966). Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.*, 18, 997-1049.
- Kat, M. (1979). The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In: Toxic Dinoflagellate Blooms. Editores: D. Taylor e H. Seliger. Elsevier (New York), 215-220.
- Landsberg, J.H. (2002). Effects of algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.*, 10 (2), 113-390.
- Lawrence, J.F., Charbonneau, C.F. e Ménard, C. (1991). Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure: collaborative study. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 74, 68-72.
- Lawrence, J.F., Ménard, C. e Cleroux, C. (1995). Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. *J. AOAC Internat.*, 78 (2), 514520.
- Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A. e Cembella, A.D. (1998). *Prorocentrum lima*: a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Harmful Algae. Editores: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández e T. Wyatt. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO (Spain.), 78-79.
- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R. e Yasumoto, T. (1987). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51 (3), 877-881.
- Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P. e Yasumoto, T. (1989). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, 1: 147-152.
- Lefebvre, K.A., Powell, C.L., Busman, M., Doucette, G.J., Moller, P.D.R., Silver, J.B., Miller, P.E., Hughes, M.P., Singaram, S., Silver, M.W. e Tjeerdema, R.S. (1999). Detection of

- domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Nat. Toxins*, 7, 85-92.
- Lewis, R.J. (2001). The changing face of ciguatera. *Toxicon*, 39 (1), 97-106.
- Magdalena, A.B., Lehane, M., Krys, S., Fernández, M.L., Furey, A. e James, K.J. (2003). The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon*, 42 (1), 105-108.
- Maman, L., Fernandez, L., Ocaña, A., Marco, J., Morales, J., Caballos, M., Márquez, I. e Aguilar, M., 2000. Seguimiento de fitoplancton toxico en la costa de Andalucía. Incidencias durante los años 1997 y 1998. In: VI Reunión Iberica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Editor: I. Márquez. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Congresos y Jornadas 55, 41-49.
- Márquez, I. (1993). Presencia de PSP en el corruco (*Acanthocardia tuberculata*) en el litoral de la provincia marítima de Malaga y distritos marítimos de la línea y Algeciras. In: III Reunión Iberica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Editores: J. Mariño e J.C. Maneiro. Consejería de Agricultura y Pesca, Xunta de Galicia, pp. 27-33.
- Marr, J.C., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M.A. e Wright, J.L.C. (1992). Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*, 30 (12), 1621-1630.
- Matsui, T., Sato, S., Hamada, S. e Shimizu, C. (1982). Comparison of toxicity of the cultured and wild puffer-fish Fugu niphobles. *Nippon-Suisan-Gakkaishi*, 48 (2), 253.
- Matsui, T., Taketsugu, S., Kodama, K., Ishii, A., Yamamori, K. e Shimizu, C. (1989). Production of tetrodotoxin by the intestinal bacteria of a puffer fish Takifugu niphobles. *Nippon-Suisan-Gakkaishi*, 55 (12), 2199-2203.
- McFarren, E.F. (1959). Report on collaborative studies of the bioassay for paralytic shellfish poison. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 42 (2), 263-271.
- McMahon, T. e Silke, J. (1996). Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News*, 14, 2.
- McMahon, T. e Silke, J. (1998). Re-occurrence of winter toxicity. *Harmful Algae News*, 17, 12.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Dines, M., Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., Mackenzie, L., Beutzenberg, V. e Towers, N.R. (2004). Isolation of pectenotoxin-2 and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* (in press).
- Murakami, Y., Oshima, Y. e Yasumoto, T. (1982). Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48 (1), 69-72.
- Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y. e Yasumoto, T. (1982). Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48(4), 549-552.
- Murata, M., Kumagai, M., Lee, J.S. e Yasumoto, T. (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.*, 28, 5869-5872.
- Naar, J., Bourdelais, A., Tomas, C., Lancaster, J. e Baden, D.G. (2000). Brevetoxin analysis in seawater, mammalian body fluid and shellfish homogenate using the brevetoxin-ELISA test Kit. Proceedings of the 114th meeting of AOAC international, Philadelphia, PN, 12 September 2000.
- Nagashima, Y., Maruyama, J., Noguchi, T. e Hashimoto, K. (1987). Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography. *Nippon-Suisan-Gakkaishi*, 53 (5), 819-823.
- Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K.J., Naoki, I., Oshima, Y. e Yasumoto, T. (1999). Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat. Toxins*, 7, 99-102.
- Oshima, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Internat.*, 78 (2), 5285-532.
- Palma, S. (2003). Estudo de um ciclo anual de sucessão fitoplancónica na baía de Cascais. Tese de Mestrado. Fac. Ciências Univ. Porto, 65pp.
- Pinto, J.S., e Silva, E.S. (1956). The toxicity of *Cardium edule* L. and its possible relation to the dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehr. *Notas e Estudos Inst. Biol. Marít.*, 12, 21 pgs.
- Quilliam, M.A. (1995). Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Internat.*, 78 (2), 555-570.
- Quilliam, M., Wechsler, D., Marcus, S., Ruck, B., Wekell, M. e Hawryluk, T. (2002). Detection and identification of paralytic shellfish poisoning toxins in Florida pufferfish responsible for incidents of neurologic illness. In: Xth International Conference on Harmful Algae, Florida, USA, 21-25/October/2002.
- Quilliam, M.A., Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2003). Direct detection of acyl esters of OA and DTX2 in Portuguese shellfish by LC-MS. In: Molluscan Shellfish Safety. Editores: A. Villalba, B. Reguera, J.R. Romalde, R. Beiras. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, pp. 67-73.
- Román, Y., Alfonso, A., Louzao, M.C., de la Rosa, L., Leira, F., Vieites, J.M., Vieytes, M.R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T. e Botana, L.M. (2002). Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cell. Signalling*, 14, 703-716.
- Rosales-Loessener, F., Porras, E. e Dix, M.W. (1989). Toxic shellfish in Guatemala. In: *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Editores: T. Okaichi, D.M. Anderson e I. Nemoto. Elsevier (New York), 113-116.
- Sampayo, M.A.M., Franca, S., Sousa, I., Alvito, P., Vale, P., Botelho, M.J., Rodrigues, S. e Vieira, A. (1997). Dez anos de monitorização de biotoxinas marinhas em Portugal (1986-1996). *Arq. Inst. Nacional Saúde*, 23, 187-194.
- Sampayo, M.A.M., Vale, P., Rodrigues, S., Botelho, M.J. (2001). Two confirmed cases of human intoxication by marine biotoxins in Portugal. In: *Harmful Algal Blooms 2000*. Editores: G. Hallegraef, S. Blackburn, C. Bolch e R. Lewis. I.O.C. of UNESCO (Paris), 436-437.
- Satake, M., Morohashi, A., Murata, K., Kaspar, H.F. e Yasumoto, T. (1996). Chemical studies on the NSP toxins in the green-shell mussels from New Zealand. In: *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Editores: T. Yasumoto, Y. Oshima e Y. Fukuyo. I.O.C. of UNESCO (Paris), 487-490.
- Satake, M., MacKenzie, L. e Yasumoto, T. (1997). Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins*, 5, 164-167.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, I., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J. e Yasumoto, T. (1998). Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 9967-9968.
- Schantz, E.J. (1984). Historical perspective on paralytic shellfish poison. In: *Seafood Toxins* American Chemical Society, Washington, DC, pp. 99-111.
- Schantz, E.J., McFarren, E.F., Schaffer, M.L. e Lewis, K.H. (1958). Purified shellfish poison for bioassay standardization. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 41 (1), 160-168.
- Shumway, S.E. (1995). Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sci.*, 3, 1-31.

- Silva, E.S., 1962. Some observations on marine dinoflagellate cultures. III. *Goniaulax spinifera* (Clap. and Lach.) Dies., *Goniaulax tamarensis* Leb. and *Peridinium trochoideum* (Stein) Lemm. *Notas e Estudos Inst. Biol. Marít.*, nº 26, 34 pgs.
- Simon, J.F. e Vernoux, J.P. (1994). Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate. *Nat. Toxins*, 2, 293-301.
- Sullivan, J.J. e Wekell, M.M. (1987). The application of high performance liquid chromatography in a paralytic shellfish poisoning monitoring program. In: *Seafood Quality Determination*. Editores: D.E. Kramer and J. Liston. University of Alaska (Anchorage, USA), 357-371.
- Suzuki, T., Ota, H. e Yamasaki, M. (1999). Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon*, 37 (1), 187-198.
- Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Engen, D.V., Clardy, J., Gopichand, Y. e Schmitz, F.J. (1981). Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2469-2471.
- Tagmouti-Talha, F., Chafak, H., Fellat-Zarrouk, K., Talbi, M., Blaghen, M., Mikou, A. e Guittet, E. (1996). Detection of toxins in bivalves on the Moroccan coasts. In: *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Editores: T. Yasumoto, Y. Oshima e Y. Fukuyo. I.O.C. of UNESCO (Paris), pp. 85-87.
- Taleb, H., Vale, P., Jaime, E., e Blaghen, M. (2001). Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. *Toxicon*, 39 (12), 1855-1861.
- Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M. e Yasumoto, T. (1993). A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Editores: T.J. Smayda e Y. Shimizu. Elsevier (New York), 581-586.
- Todd, E.C.D. (1993). Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - a review. *J. of Food Protection*, 56 (1), 69-83.
- Tubaro, A., Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake M., Yasumoto T. (2003). Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon*, 41 (7), 783-792.
- Turquet, J., Pannetier, S., Ramialiharisoa, A., Ranaivoson, G., Quod, J.P., Jeanoda, V., Hurbungs, M. (2000). Suivi et prevention des intoxications par consommation d'animaux marins dans le sud-ouest de l'Océan Indien. *Commission de l'Océan Indien (Quatre-Bornes, Île Maurice)*. 50 pp.
- Usagawa, T., Nishimura, M., Itoh, Y., Uda, T. e Yasumoto, T. (1989). Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halichondria okadae*. *Toxicon*, 27, 1323-1330.
- Usleber, E., Donald, D., Straka, M. e Martlbauer, E. (1997). Comparison of enzyme immunoassay and mouse bioassay for determining paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Food Addit. Contam.*, 14 (2), 193-198.
- Vale, P. (1999). Caracterização de toxinas DSP na costa Portuguesa. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa. 204 págs.
- Vale, P. (2002). Development of commercial immunoassays for seafood poisonings. In: *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 7 (Seafood safety and human health). Editores: M. Fingerman e R. Nagabhushanam. Science Publishers, Inc. (New Hampshire, USA) pp. 89-106.
- Vale, P., 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. In press in *Toxicon*.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (1999a). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37 (8), 1109-1121.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (1999b). Comparison between HPLC and a commercial immunoassay kit for detection of okadaic acid and esters in Portuguese bivalves. *Toxicon*, 37 (11), 1565-1577.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2000). Dinophysistoxin-2: a rare diarrhetic toxin associated with *Dinophysis acuta*. *Toxicon*, 38 (11), 1599-1606.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2001a). Determination of paralytic shellfish toxins in Portuguese shellfish by automated pre-column oxidation. *Toxicon*, 39 (4), 561-571.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2001b). Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon*, 39 (6), 893-904.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2002a). Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS a widespread phenomenon. *Toxicon*, 40 (1), 33-42.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2002b). Evaluation of marine biotoxin's accumulation by *Acanthocardia tuberculatum* from Algarve, Portugal. *Toxicon*, 40 (5), 511-517.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2002c). Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. *Toxicon*, 40 (7), 979-987.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2002d). First confirmation of human diarrhetic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro Lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon*, 40 (7), 989-996.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2002e). Evaluation of extraction methods for analysis of domoic acid in naturally contaminated shellfish from Portugal. *Harmful Algae*, 1 (2), 127-135.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2003a). Seasonality of diarrhetic shellfish poisoning at a coastal lagoon in Portugal: rainfall patterns and folk wisdom. *Toxicon*, 41 (2), 187-197.
- Vale, P. e Sampayo, M.A.M. (2003b). Seasonality of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Portugal: an hint into risk assessment. *Atlantic Diet, I International Congress, Viana do Castelo, Portugal, 17-19/Julho/2003*.
- Vale P., Maia A.J., Correia A., Rodrigues S.M., Botelho M.J., Casanova, G., Silva, A., Vilarinho M.G., Silva, A.D. (2003). An outbreak of Diarrhetic Shellfish Poisoning after ingestion of wild mussels at the northern coast in summer 2002. *Atlantic Diet, I International Congress, Viana do Castelo, Portugal, 17-19/Julho/2003*.
- van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. e van den Top, H.J. (1992). Current situation on worldwide regulations for marine phyco toxins. *J. Nat. Toxins*, 1 (1), 69-85.
- van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G.J.A. e Waldock, M. (1993). Paralytic and diarrhetic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulations. *J. Nat. Toxins*, 2 (1), 41-83.
- Work, T.M., Beale, A.M., Fritz, L., Quilliam, M.A., Silver, M., Buck, K. e Wright, J.L.C. (1993). Domoic acid intoxication of brown pelicans and cormorants in Santa Cruz, California. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Editores: T.J. Smayda e Y. Shimizu. Elsevier (New York), 643-650.
- Wright, J.L.C., Boyd, R.K., de Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M. V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V.P., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J.A. e Dewar, D. (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.*, 67, 481490.
- Yasumoto, T. e Murata, M. (1993). *Marine Toxins*. *Chem. Rev.*, 93, 1897-1909.
- Yasumoto, T., Bagnis, R., Thevenin, S. e Garcon, M. (1977a). A survey of comparative toxicity in the food chain of ciguatera. *Nippon-Suisan-Gakkaishi*, 43 (8), 1015-1019.

- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R. e Adachi, R. (1977b). Finding a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Nippon-Suisan-Gakkaishi*, 43 (8), 1021-1026.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. e Yamaguchi, M. (1978) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44 (11), 1249-1255.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H. Igarashi, T. e Fujita, N. (1980). Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46 (11), 1405-1411.
- Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A. e Onoue, Y. (1997a). Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers. *Toxicon*, 35, 423-431.
- Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A., Onoue, Y., Nishio, S., Shida, Y. e Noguchi, T. (1997b). Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon*, 35, 205-212.