

Toxinas de cianobactérias e microalgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática

Toxins of cyanobacteria and microalgae: a challenge for aquatic ecotoxicology

Manildo Marcião de Oliveira*
Moacelio Veranio Silva Filho**
Jayme da Cunha Bastos***
Maria Helena Campos Baeta Neves****

Resumo

O objetivo desta revisão é de chamar a atenção para o crescente número de metabólitos secundários produzidos por microrganismos em ambientes aquáticos. Em especial pelas cianobactérias e pelas microalgas marinhas. O primeiro grupo é produtor de toxinas que têm por alvo o fígado, os nervos e a pele. As cianobactérias são as maiores responsáveis por eventos de intoxicação em ambientes aquáticos epicontinentais. Em ambientes marinhos, microalgas eucariotas como as diatomáceas e principalmente os dinoflagelados são produtores de ampla variedade de ficotoxinas. Ficotoxinas são causadoras de síndromes após consumo de mexilhão contaminado ou intoxicação ciguatérica por consumo de peixe (CFP). O quadro atual sinaliza atenção, pois muitas florações ocorrem sem notificação, o que impede importantes estudos sobre a história de florações sazonais. Aspectos metodológicos e de mão de obra qualificada também dificultam diagnósticos mais precisos sobre as florações. A cooperação entre profissionais com distintas formações como taxonomistas, químicos, biólogos e engenheiros ambientais é a base para estudos ecotoxicológicos que possam avaliar o risco destas florações e sugerir adaptações na legislação ambiental.

Palavras-chave: Toxinas. Cianobactéria. Algas nocivas.

Abstract

The purpose of this review is to draw attention to the growing number of secondary metabolites produced by microorganisms in aquatic environments, specially cyanobacteria and marine microalgae. The first group is a producer of major hepatotoxins, neurotoxins and dermatotoxins. Cyanobacteria are responsible for most

* Núcleo de Pesquisa em Gestão Ambiental – Unidade de Pesquisa e Extensão Agro-Ambiental – Instituto Federal Fluminense - IFP campus Campos Centro.

** Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - ENSP/Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

*** Laboratório de Bioquímica Toxicológica – IBRAG – Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

**** Departamento de Oceanografia Biológica – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM

poisoning events in epicontinental aquatic environments. Eukaryotic microalgae, in marine environments such as diatoms and dinoflagellates, are great producers of a variety of phycotoxins. These syndromes are caused by consumption of contaminated mussels or ciguatera intoxication by consumption of fish (CFP). The current situation demands attention because many events occur and are not notified for important historical studies on seasonal flower blooms. Methodological issues and skilled labor also hinder more precise diagnosis of the blooms. The cooperation between different professionals with different backgrounds as taxonomists, chemists, biologists and environmental engineers is essential for ecotoxicological studies on the risk assessment of these blooms and suggest changes in environmental legislation.

Key words: Toxins. Cyanobacteria. Harmful algae.

Introdução

Nos últimos anos, microrganismos, antes só lembrados em publicações escolares e acadêmicas, vêm tomando lugar de destaque nos noticiários e hoje estão entre as preocupações dos órgãos ambientais sobre a qualidade da água. O fenômeno das florações de cianobactérias e de microalgas marinhas ganhou destaque devido, em grande parte, ao risco de intoxicação existente para os organismos aquáticos (moluscos, crustáceos e peixes) e também para os seres humanos. Esses microrganismos possuem capacidade de se multiplicar, produzindo biomassa considerável, além de metabólitos secundários com alto poder toxicológico.

As intoxicações humanas sempre chamam a atenção. Contudo, em se tratando das toxinas desses microrganismos, o maior risco pode não estar nos grandes eventos de intoxicações; mas sim, em contaminações crônicas que podem afetar populações inteiras, tanto de organismos silvestres como de seres humanos. O objetivo desta revisão é de chamar a atenção para o crescente número de metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e microalgas marinhas em ambientes aquáticos. Para tanto, disponibilizamos informações sobre a toxicologia humana e sobre a ecotoxicologia deste que é considerado um relevante tema das ciências ambientais.

Causas e efeitos ambientais das florações de cianobactérias e microalgas marinhas

A eutrofização caracteriza-se pelo enriquecimento da água por nutrientes, principalmente compostos de nitrogênio e fósforo, que promovem uma alteração no equilíbrio dos organismos e na qualidade da água de um ambiente aquático (WHO, 2002). Eutrofização é a condição que favorece o desenvolvimento de florações de cianobactérias e microalgas, secundada pelas condições de luz, temperatura e pH convenientes.

Florações de algas nocivas (FAN) estão relacionadas a um aumento vertiginoso de algumas espécies de microalgas, detectadas por contagem de células, análise de clorofila a e biomassa, associado a uma produção de efeitos deletérios ao ambiente. O aumento na frequência das florações tem produzido efeitos negativos na economia pesqueira, no turismo e na saúde humana.

No ambiente marinho, não só a eutrofização pode fomentar o aparecimento de FAN. A bioinvasão aparece, no ambiente marinho, como um importante fator de disseminação de espécies que podem desencadear florações em novos ambientes (PROENÇA *et al.*, 2004). Dois processos podem promover a dispersão de organismos para ambientes novos (bioinvasão). O primeiro refere-se às alterações das condições ambientais, como eventos climatológicos anômalos (ex.: *El Niño*) e mudanças nas correntes marinhas superficiais; o segundo decorre das introduções antrópicas, como a navegação marítima (água de lastro) e a maricultura (NAYLOR *et al.*, 2001; RUIZ *et al.*, 1997). O transporte de microalgas por água de lastro de navios atingiu proporções alarmantes, pois tais embarcações tornaram-se mais numerosas, velozes e com maior volume de casco e carga. Acresce que algumas formas planctônicas são capazes de formar células de resistência que podem sobreviver nos tanques de água de lastro por um longo período (ZHANG; DICKMAN, 1999).

Existem três tipos de efeitos nocivos causados por microalgas: (1) aqueles gerados por espécies não tóxicas, cuja floração pode ocasionar anoxia na coluna d'água, levando à morte peixes e invertebrados; (2) os gerados por espécies produtoras de ficotoxinas¹, as quais podem chegar ao homem via cadeia trófica; e (3) aqueles gerados por espécies não tóxicas ao homem, mas nocivas aos peixes ou invertebrados por danificarem as brânquias ou obstruírem os sistemas de filtração. Dentre as espécies que produzem ficotoxinas, podemos citar diferentes grupos taxonômicos como as diatomáceas, cianobactérias e os dinoflagelados (HALLEGRAEFF *et al.*, 1995).

Principais tipos de toxinas produzidas por cianobactérias e seus efeitos em humanos

As cianobactérias são procariotos gram-negativos, portadores de características que as tornam verdadeiras máquinas de adaptação. Sua presença no planeta ocorre desde o surgimento da vida há 3,5 bilhões de anos. Como foram os primeiros seres a realizar fotossíntese, esses organismos são registros vivos da evolução, que ocorreu em nosso planeta. Nos dias atuais, encontramos cianobactérias em praticamente todos os ambientes terrestres, sobretudo nos aquáticos. Para vencer a competição por alimentos, sempre acirrada nas águas do planeta, algumas adaptações foram surgindo, tais como, os heterocistos e os acinetos. Os primeiros são responsáveis pela captura de nitrogênio

¹ Toxinas produzidas por microalgas.

do ar (N₂), e os segundos são células que armazenam reservas de proteínas sob a forma de grânulos de cianoficina e são altamente resistentes ao dessecação (CALIJURI *et al.*, 2006).

Em águas epicontinentais, as florações de cianobactérias são preocupantes, em especial as dos gêneros *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* (AZEVEDO, 1998). Os fatores físico-químicos envolvidos nestas florações são: temperatura acima dos 25° C, proporção nitrogênio e fósforo entre 20:1 e 10:1 e pH acima de 7,5 (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2001).

As toxinas de cianobactérias podem ser agrupadas em três categorias: hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (PEARSON, 1990). As hepatotoxinas produzidas por espécies de *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Nodularia* são as mais bem estudadas e são causadoras da maioria dos incidentes ambientais com cianobactérias tóxicas. As toxinas deste grupo são conhecidas como microcistinas, nodularinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas. As mais estudadas deste grupo são as microcistinas produzidas pelos gêneros *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria/Planktothrix*, *Anabaena* e *Anabaenopsis* (SIVONEN; JONES, 1999). São peptídeos cíclicos formados por sete aminoácidos (cinco D-aminoácidos e dois L-aminoácidos), sendo que duas posições na cadeia (2 e 4) podem ser ocupadas por diferentes aminoácidos, formando uma série de variantes da molécula. A mais comum e a mais tóxica é a microcistina-LR, que apresenta, nas posições variáveis, os aminoácidos leucina e arginina (MACKINTOSH *et al.*, 1990). A microcistina-LR (Figura 1) tem-se mostrado um potente inibidor das fosfatases 1 e 2A em mamíferos e plantas superiores (MACKINTOSH *et al.*, 1990), e seus efeitos crônicos são similares àqueles obtidos com substâncias conhecidas como carcinogênicas (FUJIKI *et al.*, 1992).

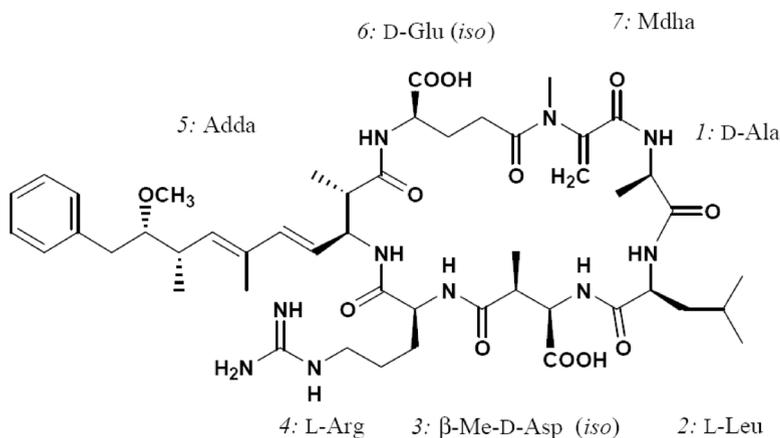


Figura 1: Microcistina - LR

Fonte: Harada *et al.*, 2004

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é o causado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta que as neurotoxinas e mais rápida que a cilindrospermopsina, causando a morte entre poucas horas e poucos dias, em decorrência de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. Os sinais observados pós-ingestão dessas hepatotoxinas são prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia (CARMICHAEL; SCHWARTZ, 1984). A DL_{50} intraperitoneal (i.p.) para camundongos é de 25^{-150} μg de microcistina-LR por kg de peso (MIURA *et al.*, 1996; FAWELL *et al.*, 1996).

As nodularinas (figura 2) são pentapeptídeos hepatotóxicos marinhos produzidos por certas cepas de *Nodularia* sp. Na forma conjugada com a glutiona, já foi encontrada em mexilhões e peixes marinhos (KANKAANPÄÄ, 2002). A DL_{50} (i.p.) para camundongos é de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

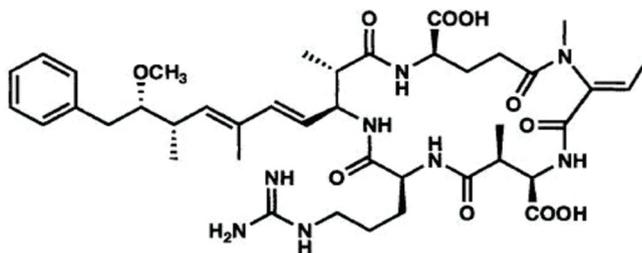


Figura 2: Nodularina
Fonte: Harada *et al.*, 2004

As cilindrospermopsinas (Figura 3), produzidas por cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis* sp, são alcaloides guanidínicos. No Brasil, este gênero de cianobactéria produz majoritariamente saxitoxina. A cilindrospermopsina inibe a síntese proteica e causa necrose no fígado, tendo sido observados danos em células renais, cardíacas, pulmonares e em células da mucosa gástrica de camundongos (KUIPFER-GOODMAN *et al.*, 1999). A DL_{50} (i.p.) para camundongos é de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (após 24h) e $0,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (após cinco dias) (FALCONER *et al.*, 1999; TERA0 *et al.*, 1994).

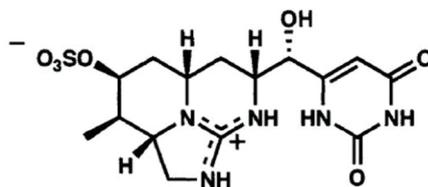


Figura 3: Cylindrospermopsina
Fonte: Harada *et al.*, 2004

As neurotoxinas são produzidas por espécies e cepas incluídas nos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* e *Cylindrospermopsis*. Já são conhecidas pelo menos cinco neurotoxinas produzidas a partir de espécies desses gêneros (AZEVEDO, 1998). As neurotoxinas anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxina são produzidas, principalmente, pelos gêneros *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*.

As cianobactérias de *Anabaena* sp parecem ser típicas de águas paradas e barragens (YUNES, 2003). A anatoxina-a (Figura 4a) é um alcaloide neurotóxico, potente bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos. Esta ação se dá, porque a anatoxina-a liga-se irreversivelmente aos receptores de acetilcolina, pois não é degradada pela acetilcolinesterase. Os sinais clínicos de intoxicação mostra um agravamento de fasciculação muscular, decréscimo de movimentos, respiração abdominal exagerada, cianose, convulsão e morte. A DL_{50} intraperitoneal (i.p.) em camundongos, para a toxina purificada, é de $200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso corpóreo, com um tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos (CARMICHAEL, 1992; 1994). Outra neurotoxina, posteriormente caracterizada, que apresenta os mesmos sinais de intoxicação da anatoxina-a, acrescidos de intensa salivação, foi designada como anatoxina-a(s) (Figura 4b). Essa neurotoxina tem um mecanismo de ação análogo ao da anatoxina-a, porque inibe a acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina ligada aos receptores. Estruturalmente é caracterizada como um N-fosfato de metila de hidroxiguanidina (MATSUNAGA *et al.*, 1989). A DL_{50} (i.p.) em camundongos é de $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso corpóreo e, portanto, dez vezes mais potente que a anatoxina-a (BEASLEY *et al.*, 1989).

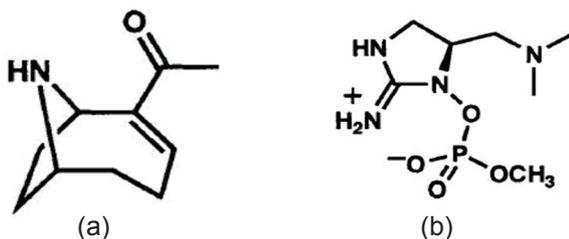


Figura 4: Anatoxina-a (a) e anatoxina-a(s)(b)

Fonte: Harada *et al.*, 2004

A saxitoxina (figura 5) e seus análogos são responsáveis por efeito paralisante. O efeito tóxico decorre do bloqueio dos canais de sódio em células nervosas, impedindo a progressão do potencial de ação para o funcionamento normal da célula nervosa. Baixas concentrações desta toxina provocam, dentro de 5 a 30 minutos após o consumo, formigamento ou dormência nos lábios, gengivas e língua. Segue-se dormência ou formigamento nas extremidades dos dedos das mãos e dos pés e, entre as 4 e 6

horas seguintes, ocorre progressão das mesmas sensações para os braços, pernas e pescoço, tornando os movimentos voluntários muito difíceis com uma sensação de estar flutuando. 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 após alguns dias (KAO, 1966; BADEN *et al.*, 1995a).

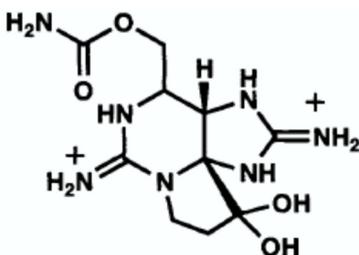


Figura 5: Saxitoxina
Fonte: Harada *et al.*, 2004

O β-metilamino L-alanina (BMAA) (figura 6) é um aminoácido neurotóxico agonista de receptores de glutamato (COX *et al.*, 2005; MURCH *et al.*, 2004). Sua distribuição é ubíqua em todos os grupos de cianobactérias, o que torna este composto fonte importante de intoxicação neurotóxica. A relação do BMAA com importantes doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson fez dessa cianotoxina alvo de importantes estudos sobre seus mecanismos toxicológicos e sua detecção ambiental (MURCH *et al.*, 2004; COX *et al.*, 2003).

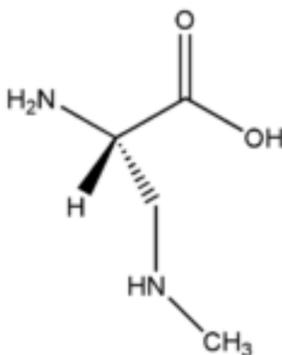


Figura 6: β-metilamino L-alanina (BMAA)
Fonte: <http://www.umwelttoxicologie.uni-konstanz.de/Forschu>

Os lipopolissacarídeos (LPS) são dermatotoxinas produzidas por todas as espécies de cianobactérias. Segundo Kuiper-Goodman *et al.* (1999), as LPS de cianobactérias são menos tóxicas que as de bactérias gram-negativas. O contato dos LPS de cianobactérias com a pele humana pode provocar vermelhidão e lesões na pele, irritação nos olhos, conjuntivite, urticária, obstrução nasal e asma (CARMICHAEL, 1981 *apud* CALIJURI *et al.*, 2006) (figura 7).

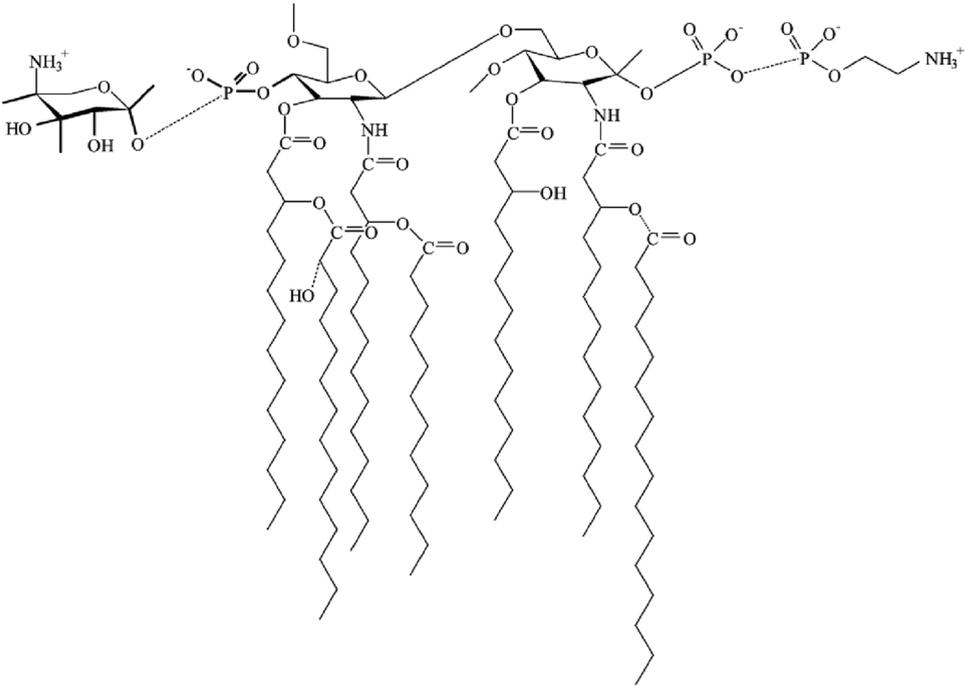


Figura 7: Lipopolissacarídeo de parede celular de cianobactérias
Fonte: Wiegand; Pflugmacher, 2005

Impactos ecotoxicológicos relacionados a florações de cianobactérias

A ecotoxicologia se apresenta como uma ciência multidisciplinar, que se detém na produção de informações sobre a exposição e o efeito de compostos químicos naturais e ou sintéticos em organismos. Nos fenômenos relacionados às florações de cianobactérias, o desafio é desvendar a dimensão dos efeitos das cianotoxinas em plantas, invertebrados e outros organismos aquáticos.

O contato de variantes de microcistina (LR ou RR) com macrófitas aquáticas pode reduzir os teores de clorofila *a* e *b*, interferindo na fotossíntese de muitas espécies com concentrações entre 1-5µg.L⁻¹ por pelo menos três semanas de contato (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). Outro efeito relaciona-se ao incremento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) responsáveis por alterações bioquímicas que inativam enzimas, promovem mutações no DNA e peroxidação de lipídios de membrana (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005).

Em moluscos bivalves, os efeitos da exposição a cianobactérias ganham maior impacto pelo fato desses organismos filtrarem volume muito grande de água, bioacumulando toxinas (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). Todavia, a capacidade de depuração de alguns moluscos impressiona. A espécie *Dreissena polymorpha*, durante um período de floração de cianobactérias tóxicas, é capaz de produzir pseudofeces e eliminar células produtoras de toxinas (DIONÍSIO-PIRES; VAN DONK, 2002).

Os peixes são normalmente afetados por florações de cianobactérias. Seus fígados e rins são alvos toxicológicos das microcistinas. Estudos com trutas, carpas, tilápias e paulistinhas com microcistinas contribuíram para mostrar os aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos desta toxina (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). Entretanto, são necessários mais estudos para verificação das suscetibilidades específicas, tanto para microcistinas quanto para as demais cianotoxinas.

Principais tipos de toxinas produzidas por microalgas e seus efeitos em humanos

Em ambiente marinho, a grande parte dos eventos de *Harmful Algal Blooms* (HAB, sigla em inglês para florações de algas nocivas) é causada por microalgas eucariotas. As cianobactérias também possuem espécies marinhas ou estuarinas envolvidas em eventos por todo o planeta (CARMICHAEL; LI, 2006). Contudo, os impactos relacionados às microalgas têm amplo registro histórico. As marés vermelhas (“red tides”) foram registradas na Bíblia Sagrada:

Eis aqui pois o que diz o Senhor: nisto conhecerás tu que eu sou o Senhor: eis que ferirei eu a água do rio com a vara, que tenho na minha mão, e essa água se converterá em sangue. Os peixes também, que estão no rio, morrerão; as águas se corromperão; e os egípcios, que beberem, serão atormentados (Moisés, Velho Testamento, Êxodo apud ROCHA et al., 2004).

A maioria das microalgas que produzem toxinas nocivas à saúde humana é de dinoflagelados. Os dinoflagelados são móveis, possuem dois flagelos de tamanhos diferentes (dimórficos), alimentam-se por fotossíntese (autotrofismo), fagocitose

(heterotrofismo) ou combinação de ambos (mixotrofismo) (MORIS Jr, 1999). Esse grupo é responsável pela produção de importantes toxinas responsáveis por síndromes de intoxicação em humanos.

O envenenamento paralisante por consumo de mariscos, a PSP (*Paralytic shellfish poisoning*), é uma síndrome caracterizada por uma parestesia² e paralisia respiratória, em casos severos. Esses efeitos são oriundos da presença de saxitoxinas e seus derivados em moluscos marinhos. Estas toxinas também podem ser encontradas em cianobactérias como mencionado anteriormente (figura 5 e figura 8). No ambiente marinho, as principais microalgas produtoras de saxitoxina são dinoflagelados do gênero *Alexandrium* sp e as espécies *Gymnodinium catenatum* nas regiões temperadas, e *Pyrodinium bahamense* variante *compressum* nas regiões tropicais, além de *Spondylus butter* e *Zosimos acnus* (CAMPÀS et al., 2007; BRICELJ; SHUMWAY, 1998). A possibilidade de bactérias intracelulares ou extracelulares associadas a essas algas poderem sintetizar tais toxinas faz parte de um longo debate (VALE, 2004).

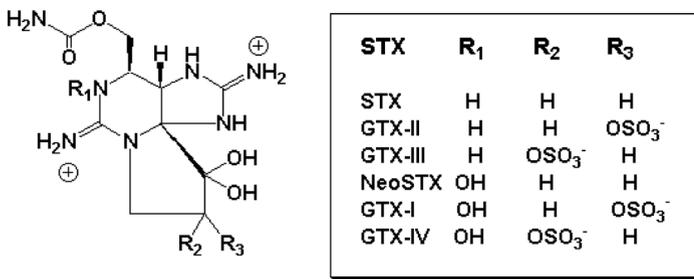
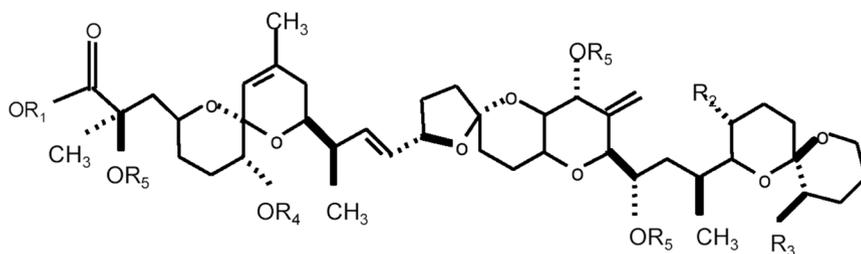


Figura 8: Saxitoxina e derivados. A substituição dos grupamentos R1, R2 e R3 determina o derivado específico. STX – saxitoxina; GTX – goniautoxina; NeoSTX – neosaxitoxina
Fonte: <http://www.asanltr.com/newsletter/02-2/articles/Neurotoxins.htm>

A síndrome identificada como envenenamento diarreico por consumo de mariscos, conhecido como DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), é causada pelo ácido ocadaico e dinofisistoxinas que são poliéteres (figura 9). O ácido ocadaico é um potente promotor de tumor (FUJIKI et al., 1992) e um específico inibidor da atividade das proteínas fosfatase 1 e 2A (MELLGREN et al., 1993). Até o momento, as propriedades tóxicas do ácido ocadaico foram atribuídas à sua capacidade de inibir a atividade dessas enzimas,

² Sensações cutâneas subjetivas (ex: calor, frio, formigamento, pressão, etc.) que são vivenciadas espontaneamente na ausência de estimulação. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Parestesia>

o que causa efeitos em processos intracelulares e em diversas etapas metabólicas necessárias para estruturas contráteis, genes de transcrição, estrutura de manutenção do citoesqueleto, receptor intermediário de tradução de sinal e divisão celular. Essa toxina marinha passa pela barreira placentária e entra no ciclo entero-hepático em camundongos (MATIAS; CREPPY, 1996a). Matias e Creppy (1998a) mostraram que o ácido ocadaico altera a metilação biológica do DNA, induzindo uma hipermetilação da m5dC, o que elucidou um dos mecanismos de ação dessa toxina marinha promotora de tumores. Também foi mostrado que o ácido ocadaico induz a lipoperoxidação (MATIAS; CREPPY, 1998b), conhecida como uma manifestação de danos oxidantes e causadora de efeitos de toxicidade e carcinogênese.



	R1	R2	R3	R4	R5
AO	H	CH3	H	H	H
DTX-1	H	CH3	CH3	H	H
DTX-2	H	H	CH3	H	H
DTX-3	H	CH3	CH3	acil	H

Figura 9: Estrutura de alguns poliéteres causadores de DSP. A substituição dos grupamentos R1, R2, R3 e R5 determina derivado específico. AO – ácido Ocadaico; DTX – dinofisistoxina

Fonte: Adaptado de Van Dolah, 2000

A DSP apresenta, exclusivamente, um quadro gastrointestinal composto por diarreia, vômitos, dores epigástricas, dores abdominais, fraqueza muscular e cefaleias. A diarreia pode surgir entre 1-2 horas até as 24 horas seguintes à ingestão, e a sua frequência pode ser de 10 a 20 vezes por dia, nos casos graves. Os sintomas cessam, em

geral, ao fim de três dias (YASUMOTO *et al.*, 1978). Os organismos causadores de DSP são algumas espécies de dinoflagelados dos gêneros *Prorocentrum* sp e *Dinophysis* sp.

A síndrome identificada como envenenamento amnésico por consumo de mariscos, conhecido como ASP (*amnesic shellfish poisoning*), é um efeito amnésico também produzido por microalgas, cuja substância responsável é o ácido domoico (Figura 10). O mecanismo de ação do ácido domoico é realizável devido à sua similaridade estrutural com o neurotransmissor excitatório ácido glutâmico. Os neurônios afetados são localizados principalmente no hipocampo, o que explica o mais característico efeito do envenenamento por ácido domoico, que é a perda de memória recente. Ao consumir mexilhões contaminados, nas primeiras 24 h, a toxina desencadeia distúrbios gastrintestinais: náuseas, vômitos, diarreias, cólicas abdominais e, após 48 h, surgem os efeitos neurológicos citados acima (VALLE, 2004). Isso foi observado em 25% das pessoas afetadas no evento de contaminação por moluscos em 1987 no Canadá, no primeiro caso confirmado de envenenamento humano por essa toxina (TODD, 1993).

Microalgas planctônicas do grupo das diatomáceas, especificamente o gênero *Pseudo-nitzschia*, são as principais produtoras de ácido domoico.

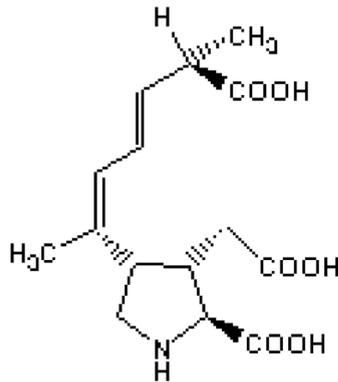


Figura 10: Ácido domoico

Fonte: <http://www.aims.gov.au/arnat/arnat-0005.htm>

O envenenamento neurotóxico por consumo de mariscos, o NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*), é causado pela brevetoxina. Trata-se de uma ficotoxina produzida por algumas espécies de dinoflagelados e, entre elas, destaca-se a espécie *Gymnodinium breve* (HALLEGRAEFF, 1995). Por ingestão de bivalves, as neurotoxinas provocam (em cerca de 3 horas) parestesias, inversão da percepção de calor e frio, náuseas, diarreia,

dilatação da pupila, vertigens, vômitos, aperto na garganta e ataxia (BADEN *et al.*, 1995a). A brevetoxina atua por ativação do canal de sódio, o que provoca uma descarga elétrica contínua na célula nervosa (BADEN *et al.*, 1995a).

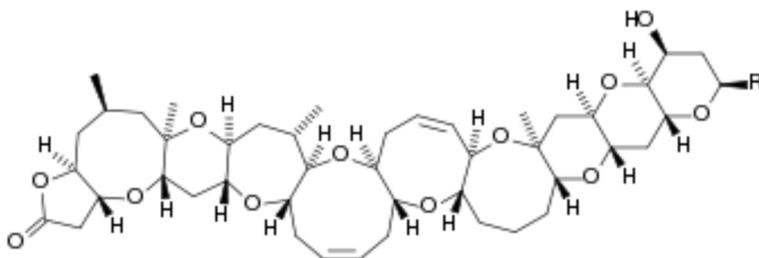


Figura 11: Brevetoxina (PbTx-3)

Fonte: Campàs *et al.*, 2007

A ciguatoxina é a causa da intoxicação ciguatérica por peixe (*ciguatera fish poisoning*- CFP). Diferentemente das demais toxinas apresentadas que afetam mariscos, a ciguatoxina afeta peixes, em especial os recifais (VALLE, 2004). Essas toxinas apresentam mecanismo de intoxicação semelhante ao da brevetoxina, mas mostrando diferentes afinidades aos receptores dos canais de sódio e, como consequência, interferem na homeostase de íons cálcio para as células (CAMPÀS *et al.*, 2007). Consumo de peixes contaminados por ciguatera provoca diarreia, vômitos, náuseas, dor abdominal, dormência e formigamento na boca, mãos e pés, câibras, temporária cegueira, dores articulares, cianose, depressão, ansiedade, hipotensão, bradicardia, ataxia e paralisia (CAMPÀS *et al.*, 2007). O dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* é associado à produção dessa ficotoxina.

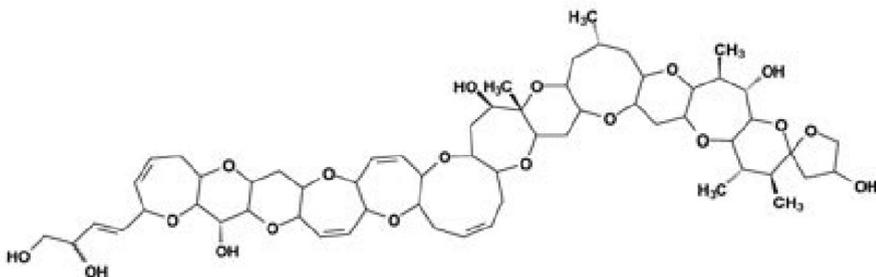


Figura 12: Ciguatoxina - CTX-1

Fonte: Valle, 2004

A intoxicação por azaspirácido, a AZP (*azaspiracid poisoning*), apresenta os mesmos sintomas das DSP. A intoxicação está relacionada ao consumo de mariscos contaminados pela ficotoxina produzido pelo dinoflagelado *Protoperdinium crassipes*. Embora o primeiro registro oficial tenha ocorrido na Holanda em 1995, hoje já se conhecem pelo menos doze variantes desses compostos. Alguns trabalhos mostram que os AZP apresentam propriedades citotóxicas (MCMAHON; SILKE, 1996). Estudo *in vitro* indica seu efeito sobre o citoesqueleto e a morfologia celular (VILARIÑO *et al.*, 2007).

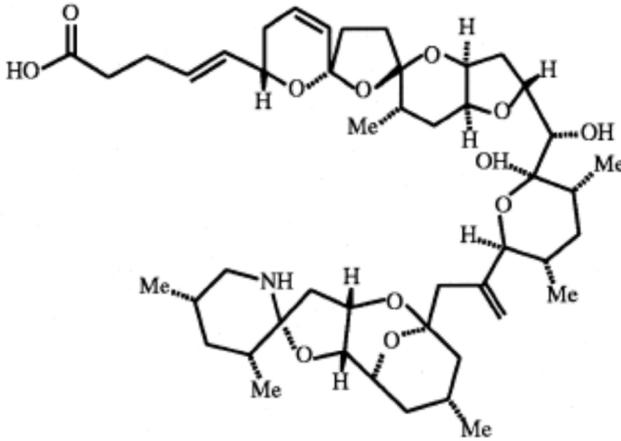


Figura 13: Um Azaspirácido, AZP-1

Fonte: ITO *et al.*, 2000

A palitoxina é uma ficotoxina neurotóxica, que apresenta atividade toxicológica em baixas concentrações (WANG, 2008). Isolada, inicialmente, do coral *Palythoa tóxica*, em seguida foi encontrada em algas e mariscos. O dinoflagelado bentônico *Ostreopsis siamensis* está relacionado à contaminação e morte de moluscos, equinodermos e causa de intoxicação humana na Europa (WANG, 2008). Devido ao seu efeito letal, mesmo em baixas doses, em camundongos (DL_{50} – 0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e outros animais como macacos, porcos-da-índia e ratos (DL_{50} – 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$), é considerada uma das mais potentes toxinas. O mecanismo toxicodinâmico da palitoxina ainda não foi totalmente desvendado. Contudo, esta toxina interfere no influxo e efluxo de íons Na^+ , K^+ e Ca^{+2} para o interior das células, o que compromete a despolarização de membrana, que, em tese, está relacionada ao efeito neurotóxico (WANG, 2008).

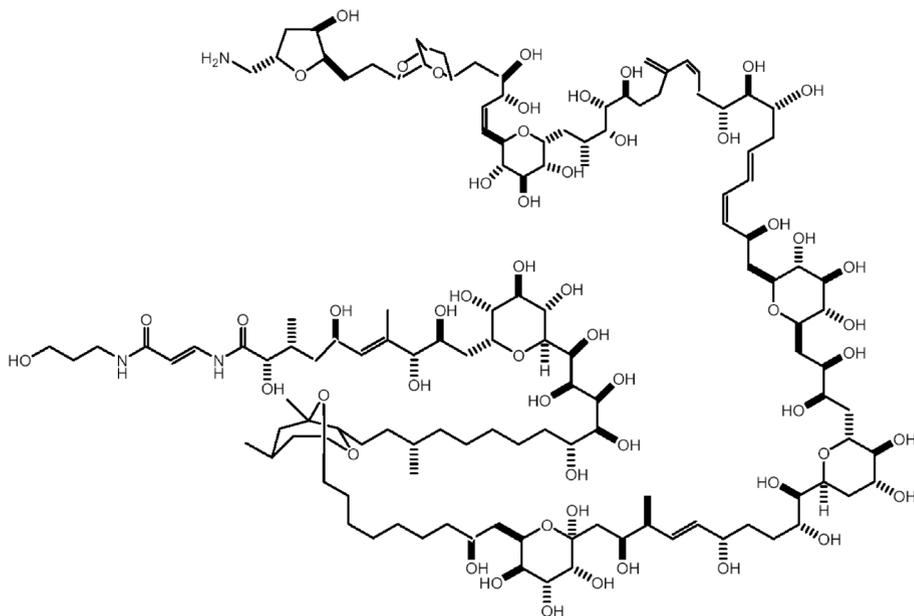


Figura 14: Estrutura da palitoxina

Fonte: Wang, 2008

Impactos ecotoxicológicos relacionados às florações de microalgas marinhas

A presença de florações de microalgas marinhas é registrada em muitas partes do mundo. Essas florações podem produzir ficotoxinas, que, por sua vez, podem se acumular principalmente em mexilhões e peixes. Os efeitos agudos do ácido ocadaico, do ácido domoico e das neurotoxinas são conhecidos. Contudo, as exposições subletais ainda são pouco compreendidas. A preocupação inicial recaiu sobre os efeitos subletais das ficotoxinas lipofílicas, pois podem se acumular e desencadear processos deletérios nos tecidos e em importantes biomoléculas. Estes efeitos crônicos podem prejudicar populações de organismos aquáticos pelo aumento da incidência de doenças.

Alguns eventos registrados no Brasil

Os eventos no Brasil com cianobactérias em ambientes continentais são mais comuns. As regiões sul e sudeste possuem mais registros de florações. Damos destaque aos estudos do Laboratório de Toxicologia e Ecofisiologia de Cianobactérias do IBCCF/UFRJ e da Unidade de Pesquisas em Cianobactérias da FURG. Ambos possuem importantes relatos de detecção de cianotoxinas em mananciais de água de abastecimento, bem como

estudos de laboratório que avaliam o efeito toxicológico de microcistinas e anatoxinas em organismos aquáticos (SOTERO-SANTOS *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2004; YUNES *et al.*, 2003). No entanto, na região nordeste do Brasil, em 1988, foi constatada uma correlação entre a floração de cianobactérias no reservatório de Itaparica, BA, e a morte de 88 pessoas, entre duas mil intoxicadas (TEIXEIRA *et al.*, 1993). Um dos episódios mais graves, envolvendo intoxicação por cianotoxina, foi o caso ocorrido na cidade de Caruaru (PE) em 1996, quando mais de 60 pacientes renais morreram porque havia microcistina na água utilizada nas sessões de hemodiálise (AZEVEDO *et al.*, 2002; JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

Em relação às microalgas marinhas, as informações se concentram também nas regiões sul e sudeste. Mariné *et al.* (2009) detecta a presença de ácido ocadaico em mexilhões de cultivo coletados em Angra dos Reis. Em Santa Catarina, Proença *et al.* (2007; 1998; 1996) apresentam estudos sobre a detecção de ácido ocadaico em mexilhões de cultivo.

Impactos Econômicos

Em países onde as florações de cianobactérias e microalgas marinhas ocorrem sazonalmente, impactos de toda ordem são medidos. Nos Estados Unidos, uma avaliação destes impactos, realizado por Anderson *et al.* (2000), estimou um gasto anual em torno de 50 milhões de dólares divididos entre os impactos para a saúde pública, a atividade pesqueira, o turismo, a recreação, o manejo e o monitoramento.

Realidades e perspectivas da detecção de toxinas

A maioria dessas ficotoxinas e cianotoxinas são detectadas por meio de técnicas cromatográficas por HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) ou HPLC-MS, uma coluna de cromatografia é acoplada a um detector de massa (MERILUOTO, 1997). O alto custo de execução e manutenção desses equipamentos é um limitador para a equipagem de mais centros de coletas de dados sobre florações que estejam em curso.

A identificação taxonômica, embora de grande importância, por si, não é capaz de identificar cepas tóxicas, diferenciando-as das não tóxicas. Testes de toxicidade com camundongos são eficientes, porém não identificam presença de variantes das toxinas, ou se outras toxinas estão sendo produzidas (AUNE; BERG, 1986), bem como os métodos com sacrifício de animais são cada vez mais desaconselhados para uso de rotina. Testes enzimáticos e imunoenzimáticos apresentam vantagens relacionadas a um custo mais baixo e não necessitam de profissionais com alto nível de especialização para realizar os testes (METCALF; CODD, 2003; RIVASSEAU *et al.*, 1999; TUBARO *et al.*, 1996). Contudo, esses testes enzimáticos também não identificam variantes das toxinas, e não detectam outras toxinas presentes, que não inibam a enzima ou para as quais não exista

anticorpo. Com frequência, um imunoteste apresenta resultado falso positivo, devido a ligações cruzadas com metabólitos não excluídos durante o processo de extração. Os marcadores moleculares são uma boa alternativa para a determinação da presença de cianobactérias e microalgas com o potencial para a produção das toxinas. Entretanto, ainda é pequeno o número de microrganismos que possuem *primers* específicos que possam ser utilizados nessa técnica.

Apesar desses empecilhos metodológicos, o problema precisa ser equacionado com bom senso e cooperação. Uma alternativa seria criar redes de cooperação que envolvam órgãos ambientais, universidades e institutos de pesquisas para realizarem as análises cromatográficas de confirmação da presença de toxinas, e eventos que possam ser monitorados mais de perto por secretarias de meio ambiente e pesca dos municípios. Inicialmente, pessoal treinado para coletar e realizar uma análise microscópica, ou teste com enzimas ou anticorpos, seria necessário para fazer uma triagem. As amostras, triadas como positivas, deveriam ser encaminhadas para as universidades a fim de confirmar o resultado e analisá-lo mais detalhadamente.

Conclusão

Grande parte das toxinas de cianobactérias ou de microalgas marinhas ainda não foram suficientemente estudadas quanto às suas toxicocinética e toxicodinâmica em espécies nativas, nem tampouco em humanos. Tratando-se de Brasil, ainda existem carências de laboratórios equipados para análises suficientemente adequadas. A coordenação de dados sobre eventos de florações ainda é muito precária. Nossa legislação contempla o monitoramento de cianobactérias em água doce pela portaria 518 de 2004 do Ministério da Saúde para microcistina, saxitoxina e cilindrospermopsina; mas não, para anatoxina-a, anatoxina-a(s) e BMAA. Em relação aos ambientes estuarinos e marinhos, uma regulamentação nacional para microalgas e ficotoxinas torna-se necessária, sendo que o estado de Santa Catarina já apresenta lei estadual sobre o assunto. Para os profissionais e pesquisadores atuantes em ecotoxicologia aquática o tema FAN oferece amplas possibilidades e instigantes desafios que envolvem estudos de hidrobiologia, taxonomia de cianobactérias e microalgas, otimização de métodos cromatográficos, ensaios biológicos, genética molecular, toxicologia bioquímica e química de produtos naturais. Nos próximos anos, a visão de sustentabilidade econômica poderá indicar soluções para as questões que envolvam melhoramentos quanto à qualidade da água; mas, para atendermos às demandas de conhecimentos que serão então imprescindíveis, precisaremos de numerosos profissionais capacitados em ecotoxicologia.

Referências

ANDERSON, D.M.; HOAGLAND, P.; KAORU, Y.; WHITE, A.W. Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States. Woods Hole Oceanographic Institution, p.97, 2000.

AUNE, T., BERG, K. Use of freshly prepared rat hepatocytes to study toxicity of blooms of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria agardhii* I. Journal of Toxicology and Environmental Health, v.19, p. 325–336. 1986.

AZEVEDO, S. M.F.O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L. ; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology, v.181-182, p.441-446, 2002.

AZEVEDO, S.M.F.Q. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. Medicina on Line, v.1, p.1-24. 1998.

BADEN, D.G., FLEMING, L.E.; BEAN, J.A. Marine toxins. In: WOLF, F.A. (Ed.). Handbook of clinical neurology. New York: Elsevier Science, 1995a. v.21: Intoxications of the nervous system, Part III. p. 141-174.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M. HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A.; VALENTINE, W.M. Intoxication in livestock and water fowl. Clinical Toxicology Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, v.5, p.345-361, 1989.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.C.; YUNES, J.S. Cianobactérias tóxicas. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento, v. 23, p. 44-47, 2001.

BRICELJ, V.M.; SHUMWAY, E. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. Reviews in Fisheries Science, v.6, p. 315-383, 1998.

CALJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; SANTOS, A.C.A. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. São Carlos. RIMA, 2006. 118p.

CAMPÀS, M.; PRIETO-SIMÓN, B.; MARTY, J.L. Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety. Talanta, v. 72, p. 884–895, 2007.

CARMICHAEL WW. Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology, v.72, p.445-59, 1992.

CARMICHAEL WW. The toxins of Cyanobacteria. Scientific American, v.270, n.1, p.78-86, 1994.

CARMICHAEL, W.W.; LI, R. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. Saline Systems, v.2, n.5, p.1746-1448, 2006.

CARMICHAEL, W.W.; SCHWARTZ, L.D. Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. Farmers Bulletin, Washington, DC: US Dept. of Agriculture, v. 2275, 1984.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences-PNAS, v. 100, n. 23, 13380–13383, 2003.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J.; RASMUSSEN, U.; TIEN, G.; BIDIGARE, R. R.; METCALF, J. S.; MORRISON, L. F.; CODD, G. A.; BERGMAN, B. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS, v. 102, n. 14, p.5074–5078, 2005.

DIONISIO-PIRES, L.M.; VAN DONK, E. Comparing grazing by *Dreissena polymorpha* on phytoplankton in presence of toxic and non-toxic cyanobacteria. Freshwater Biology, v.47, p. 1855-1865, 2002.

FALCONER, I.R.; HARDY, S.J.; HUMPAGE, A.R.; FROSCIO, S.M.; TOZER, G.J.; HAWKINS, P.R. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (*cyanobacterium*) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male swis albino mice. Toxicology, v.14, n.1, p. 143-150, 1999.

FAWELL JK, MITCHELL RE, EVERETT DJ, HILL RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. Human & Experimental Toxicology, v.18, n.3, p.162-7, 1999.

FUJIKI, H.; SUGANUMA, M.; NISHIWAKI, S.; YOSHIZAWA, S.; YATSUNAMI, J.;

MATSUSHIMA, R.; FURUYA, H.; OKABE, S.; MATSUNAGA, S.; SUGIMURA, T.. Specific mechanistic aspects of animal tumor promoters: the okadaic acid pathway. Relevance of animal studies to the evaluation of human cancer risk. 1992. p. 337-350.

HALLEGRAEFF, G.M. Harmful algal blooms. A global overview. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, D.M. Manual on harmful marine microalgae. Intergovernmental Oceanographic commission/UNESCO, Paris, p.1-22, 1995.

HARADA, K.; NAKANOA, T.; FUJII, K.; SHIRAI, M. Comprehensive analysis system using liquid chromatography–mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. Journal of Chromatography A, v.1033, p.107–113, 2004.

ITO, E.; SATAKE, M.; OFUJI, K.; KURITA, N.; MCMAHON, T.; JAMES, K.; YASUMOTO, T. Multiple Organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. Toxicon, v. 38, p. 917-930, 2000.

JOCHIMSEN, E.M.;CHARMICHAEL, W.W.; DM CARDO, J.A.N.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B. DE C.; M. FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. New England Journal of Medicine, v.338, n.13, p. 873-878, 1998.

KANKAANPÄÄ, H.; VUORINEN, P. J.; SIPIÄ, V.; KEINÄNEN, M. Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta L.*) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. Aquatic Toxicology, v.61, p.155-168, 2002.

KAO, C.Y. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. Pharmacology Review, v.18, p.997-1049, 1966.

KUIPFER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD, J. Human health aspects. In: CHORUS, I.; BARTREM, J. (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health. Consequences, monitoring and management. Londres: E & FN Spon, 1999. p.114-153.

MACKINTOSH, C.; BEATTI, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN P.; CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS, v.264, n.2, p.187-192, 1990.

MARINÉ, G. F.; SILVA, P. P. O.; OLIVEIRA, G. M.; FERREIRA, V. M. Detecção de ácido okadaico em cultivo de mexilhões *Perna perna*, Angra dos Reis, RJ. Ciência Rural, [Online], 2009. ISSN 0103-8478.

MATIAS, W. G., CREPPY, E. E. . Lipoperoxidação Induzida Pelo Ácido Okadaico, Uma Toxina Marinha. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento, v.4, p.40 – 44, 1998b.

MATIAS, W.G.; CREPPY, E.E. 5- Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. Environmental Toxicology and Water Quality, v.13, p. 83-88, 1998a.

MATIAS, W.G.; CREPPY, E.E. Transplacental passage of [3H] okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and performance liquid chromatography. Human & Experimental Toxicology, v.15, p. 226-230, 1996a.

MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E.; NIEMCZURA, W.P.; CHARMICHAEL, W.W. Anatoxina(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena-flos-aquae*. Journal of American Chemical Society, v.111, p.8021-8023, 1989.

MCMAHON, T; SILKE, J. Winter toxicity of unknown a etiology in mussels. Harmful Algae News, v.14, n.2, 1996.

MELLGREN, G.;VINTERMYR, O.K. BOE, R.; DOSKELAND, S.O. Hepatocyte DNA republication is abolished by inhibitors selecting protein phosphatase 2A rather than phosphatase. Experimental Cell Research, v.205, p.293-301, 1993.

MERILUOTO, J. Chromatography of microcystins. Analytica Chimica Acta, v.352, p.277-298, 1997.

METCALF, J.S.; CODD, G.A. Analisis of cyanobacterial toxins by immunological methods. Chemical Research in Toxicology, v.16, n.2, p.103-112, 2003.

MIURA GA, ROBINSON NA, LAWRENCE WB, PACE JG. Hepatotoxicity of MCLR in fed and fasted rats. Toxicon, v.29, n. 3, p.337-46, 1991.

MORIS Jr., J. G. Harmful algal blooms: An Emerging Public Health Problem with Possible Links to Human Stress on the Environment. Annual Review of Environment and Resources, v.24, p.367–90, 1999.

MURCH, S. J.; COX, P. A.; BANACK, S. A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.101, n.33, p.12228–12231, 2004.

NAYLOR, R.L.; WILLIAMS, S.L.; STRONG, D.R. Aquaculture: a gateway for exotic species. Science, v.294, p.1655-1657, 2001.

PEARSON, M.J. Toxic blue-green algae. Report of the national rivers Authority. UK, 1990. 127p. (Water Quality Series, 2).

PROENÇA, L.A.; RÖRIG, L.; BARREIROS, M.A. & LAGOS, N. First occurrence of okadaic acid, a diarrhetic shellfish toxin in cultured mussels in the brasilian coast. In: 4., CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE FICOLOGIA, 4., Caxambú, ago. 1996.

.PROENÇA, L.A.; SCHMITT, F.; COSTA, T. & RÖRIG, L. Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. Ciência e Cultura, v.50, n.6, p.458-462,1998.

PROENÇA, L.A.O. *et al.* Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. Harmful algae news, IOC/UNESCO, n.33, p.19-20, 2007.

PROENÇA, L.A.O.; FERNANDES, L.F. Introdução de microlgas no ambiente marinho: impactos negativos e fatores controladores. In: VIANNA da SILVA, J.S. & LUZ de SOUZA (Org.) Água de lastro e bioinvasão. Rio de Janeiro: Ed. Interciência 2004. p. 77-97.

RIVASSEAU, C.; RACAUD, P.; DEGUIN, A.; HENNION, M.C. Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. Analytica Chimica Acta, v.394, p.243-257, 1999.

ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; CARDOSO, A.A. Introdução à química ambiental. Porto Alegre: Bookman, 2004. 154p.

RUIZ, G.M.; CARLTON, J.T.; GROSHOLZ, E.D.; HINES, A.H. Global invasions of marine and estuarine habitats by nonindigenous species: mechanisms, extent and consequences. American Zoologist, v.37, n. 6, p.621-632, 1997.

SIVONEN, K., JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). Toxic Cyanobacteria in Water. London and New York: World Health Organization, E & FN Spon, 1999. p. 41–110.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation and depuration of microcystins (*cyanobacteria hepatotoxins*) in *Tilapia rendalli* (*Cichlidae*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, v. 70, p.1–10, 2004.

SOTERO-SANTOS, R. B.; SILVA, C. R. S. E.; VERANI, N. F.; NONAKA, K. O. ROCHA, O. Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.64, p. 163–170, 2006.

TEIXEIRA, M. G. L. C., COSTA, M. C. N., CARVALHO, V. L. P. *et al.* Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, v.27, p.244-253, 1993.

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; ITO, E.; WATANABE, M. Light and electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from *blue-green algae Umezakia natans*. *Toxicon*, v.32, p.833, 1994.

TODD, E.C.D. Domoic acid and Amnesic Shellfish Poisoning – a review. *Journal of Food Protection*, v.56, p. 69-83, 1993.

TUBARO, A.; FLORIO, C.; LUXICH, E.; SOSA, S.; LOGGIA R. D. AND YASUMOTO, T. A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon*, v.34, n.7, p.743-752, 1996.

VALE, P. Biotoxinas Marinhas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.99, n.549, p. 3-18, 2004.

VAN DOLAH, F.M. Diversity of marine and freshwater algal toxins. In: BOTANA, L.M. (Ed.). *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. New York: Ed. Marcel Dekker Inc., 2000. (Food Science and Technology Series, v.103).

VILARIÑO, N.; NICOLAOU, K.C.; FREDERICK, M. O.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, L. M. Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during in vitro azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells. *Biochemical pharmacology*, v.74, p. 327–335, 2007.

WANG, D.Z. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review. *Marine Drugs*, v.6, p.349-371, 2008.

WHO. Eutrofication and Health. Regional office for Europe. 2002. p. 128.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology, v.203, p. 201– 218, 2005.

YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y.; YAMAGUCHI, M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. Bulletin Japan Society Science Fisheries, v.44, n.11, p.1249-1255, 1978.

YUNES, J.S. Programa Aguaan: agilização do gerenciamento e utilização de águas com algas nocivas. Biológico, São Paulo, v.65, n.1/2, p. 117-119, 2003.

YUNES, J.S.; CUNHA, N.T.; BARROS, L. P.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazil. Comments on Toxicology, v. 9, p. 103-115, 2003.

ZHANG, F.; DICKMAN, M. Mid-ocean exchange of container vessel ballast water: 1 Seasonal factors affecting the transport of harmful diatoms and dinoflagellates. Marine Ecology Progress Series, v.176, p. 243-251, 1999.