



<https://doi.org/10.15202/1981996x.2016v10n3p1>

FICOTOXINAS: REVISÃO SOBRE UM PERIGOSO GRUPO DE CONTAMINANTES PARA O PESCADO BRASILEIRO

PHYCOTOXINS : REVIEW ON A DANGEROUS GROUP OF CONTAMINANTS FOR BRAZILIAN SEAFOOD

CLÁUDIO ROBERTO RIBEIRO BOBEDA

Professor Doutor do Instituto Federal do Rio de Janeiro – Campus Nilópolis, RJ, Brasil
claudio.bobeda@ifjf.edu.br

HELENA DE SOUZA TORQUILHO

Professor Doutor do Instituto Federal do Rio de Janeiro – Campus Nilópolis, RJ, Brasil

SIDNEY PACHECO

Analista Doutor da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba, RJ, Brasil

RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY

Pesquisador Doutor da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba, RJ, Brasil

RESUMO

Este artigo se propõe a contribuir com o estudo das ficotoxinas, abordando uma revisão de conceitos, classificações e métodos analíticos já disponíveis para a análise deste tipo de substâncias, mostrando a necessidade de disponibilização de orientações e procedimentos para a produção de alimentos seguros à base de pescado, através do controle analítico destes contaminantes. Assim, garante-se ao mercado consumidor a confiabilidade deste tipo de alimento, o que contribuirá com a expansão do consumo de pescado no Brasil. A contaminação do pescado e da água em ambientes marinhos e lacustre por ficotoxinas tem recebido a atenção de cientistas e autoridades ambientais, de saúde e sanitárias, em diversas regiões do mundo. Em condições ambientais ainda pouco conhecidas, diversas espécies de microalgas podem produzir uma variedade de ficotoxinas capazes de contaminar a água e o pescado consumidos por seres humanos, representando perigo para a saúde e desequilíbrio ao próprio meio ambiente. A proliferação de microalgas nocivas aumentou consideravelmente nos últimos anos devido ao fenômeno de eutrofização dos ecossistemas aquáticos, pela expansão das atividades de aquicultura ou maricultura, em que ocorre a introdução de nutrientes e espécies de pescado alóctone, causando danos econômicos e ambientais ou de saúde pública, já que podem ser absorvidas pelo homem através do consumo de

pescado contaminado.

Palavras-chave: Pescado. Microalgas. Ficotoxinas. Neurotoxinas. Hepatotoxinas.

ABSTRACT

This paper proposes to contribute to the study of phycotoxins, addressing a review of concepts, classifications and analytical methods already available for the analysis of this type of substances, showing the need to provide guidelines and procedures for the production of safe food based on Fish through the analytical control of these contaminants to guarantee to the consumer market the reliability of this type of food and to contribute to the expansion of seafood consumption in Brazil. The contamination of fish and water in marine and freshwater environments by phycotoxins has received the attention of scientists and environmental health and sanitary authorities due to the incidence of intoxication in animals and humans in several regions of the world. Under unfavorable environmental conditions, various microalgae species can produce a variety of phycotoxins capable of contaminating water and seafood consumed by humans, performing a health hazard and imbalance to the environment. The proliferation of harmful microalgae has increased considerably in recent years due to the eutrophication phenomena of aquatic

ecosystems, the expansion of aquaculture or mariculture activities where the introduction of allochthonous nutrients and fish species occurs causing economic and environmental damage or public health damage which can be absorbed by humans through the consumption of contaminated fish.

Keywords: Seafood. Microalgae. Phycotoxins. Neurotoxins. Hepatotoxins.

1 INTRODUÇÃO

Os organismos microscópicos fotossintéticos que vivem em ambientes aquáticos marinhos e lacustres denominados microalgas são importantes sob vários aspectos e representam a base da cadeia trófica, pois servem de alimento para diversos animais aquáticos. Além disso, destacam-se na manutenção do equilíbrio do ambiente aquático, uma vez que participam dos ciclos biogeoquímicos do carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício. No entanto, em determinadas condições, a presença e a proliferação de certas espécies de fitoplâncton pode representar perigo para a saúde humana e desequilíbrio ao próprio meio ambiente.

Nos últimos anos, a atenção de cientistas e autoridades ambientais no que diz respeito ao problema da proliferação de microalgas nocivas aumentou consideravelmente, devido à expansão da incidência de casos em todo o mundo. Os fatores que contribuem para essa situação podem estar ligados principalmente à eutrofização dos ecossistemas aquáticos pela expansão da atividade de aquicultura e da introdução de espécies originárias de outras regiões, além de fenômenos climáticos globais.

É de conhecimento do meio científico que os danos causados por microalgas nocivas podem ser: econômicos, ambientais ou de saúde pública. Por exemplo, as microalgas podem causar a morte de organismos já existentes no ambiente ou daqueles cultivados na aquicultura. Substâncias tóxicas produzidas por estes organismos, chamadas de ficotoxinas, podem chegar ao homem por via direta ou indireta. O exemplo mais comum de intoxicação humana por ficotoxinas ocorre pelo consumo de frutos do mar contaminados. Moluscos como mexilhões e ostras retiram seu alimento das partículas em suspensão na água. Se alguma microalga tóxica estiver presente, ela pode ser acumulada nos tecidos desses animais e intoxicar seus consumidores. Assim, disponibilizar

no mercado interno orientações e procedimentos para a produção de alimentos seguros intensificará a fiscalização, o controle de qualidade, além de contribuir para a expansão do consumo por meio da confiança do consumidor. Tal procedimento faz parte da segurança alimentar que caracteriza o balanço social e garante ao consumidor brasileiro a confiabilidade no alimento adquirido.

A sustentação e o aumento da participação brasileira no mercado internacional de alimentos implicam na melhoria da capacidade de sobrepor as barreiras técnicas ou não tarifárias impostas por países importadores. As barreiras técnicas constituem medidas relacionadas a regulamentos técnicos, normas sanitárias e fitossanitárias ou procedimentos para avaliação da conformidade que podem criar obstáculos ao comércio e serem usadas como barreiras comerciais e protecionismo. O enfoque sobre barreiras não tarifárias vem ganhando importância no comércio internacional de alimentos, pois as políticas de liberalização dos mercados eliminam gradativamente as barreiras tarifárias no mundo globalizado. Desta forma, visando diminuir ao máximo a perda de confiança internacional nos produtos agroindustriais brasileiros e também o fechamento de nichos de mercado importantes, como a União Européia, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA estabeleceu metas para a implantação de métodos analíticos mais precisos e modernos, que utilizam sistemas avançados de análise a fim de criar e adaptar técnicas de maior sensibilidade e rapidez de acordo com as demandas de suporte tecnológicos necessárias à superação das barreiras não tarifárias e à garantia de alimentos mais seguros no mercado doméstico e internacional.

Assim, como uma forma de contribuir para o estudo da contaminação de alimentos por ficotoxinas e facilitar futuras abordagens de um assunto tão amplo, este trabalho possui como objetivo apresentar uma descrição geral de ficotoxinas produzidas por microalgas incluídas nas divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Dinophyta* (dinoflagelados), seus efeitos toxicológicos e os métodos analíticos que são usados para sua detecção.

2 DESCRIÇÃO GERAL E EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE FICOTOXINAS

Ficotoxinas são um grupo complexo de substâncias químicas produzidas por determinadas espécies de fitoplânctons marinhos ou

lacustres, que podem intoxicar mamíferos, peixes e até mesmo seres humanos (CAMACHO et al., 2008).

Ostras, mexilhões, camarões, entre diversos outros tipos de organismos filtradores, alimentam-se de fitoplâncton, acumulando uma série de toxinas em seu organismo, principalmente nas vísceras, no caso de peixes. Esses animais indiretamente acabam agindo como vetores das ficotoxinas quando estes servem de alimento para outros animais, atuando como fatores de transferência e bioacumulação dessas substâncias tóxicas para níveis mais elevados da cadeia trófica (FREER & VARGAS-MONTEIRO, 2003).

A ingestão de moluscos e peixes contaminados com ficotoxinas, por seres humanos, pode ser extremamente nociva uma vez que estas biotoxinas podem causar uma série de efeitos tóxicos que vão de simples náusea, desconforto abdominal, diarreia, perda de memória, paralisia e em alguns casos até mesmo a morte (MOS, 2001). As ficotoxinas descritas na literatura que estão relacionadas à contaminação de pescado podem ser classificadas de acordo com a divisão botânica na qual o microrganismo produtor da toxina está incluído: Dinophyta (dinofisitoxinas) e Cyanophyta (cianotoxinas) e quanto a suas sintomatologias de intoxicação em: neurotoxinas e hepatotoxinas

2.1 TOXINAS PRODUZIDAS POR MICROALGAS DA DIVISÃO DINOPHYTA (DINOFISITOXINAS)

Segundo WANG (2008), as toxinas produzidas por dinoflagelados são um grupo variado de neurotoxinas com características químicas e farmacológicas diversas. Seus mecanismos de ação e efeitos biológicos são distintos e estão relacionados a sua grande variedade de estruturas moleculares.

Desta forma, ficotoxinas produzidas por dinoflagelados estão incluídas nos seguintes grupos: grupo NSP (envenenamento por neurotoxinas); grupo DSP (envenenamento por toxinas diarreicas); grupo PSP (envenenamento por toxinas paralisantes); grupo ASP (envenenamento por toxinas amnésicas); grupo CFP (envenenamento por ciguateratoxinas).

2.1.1 Toxinas do grupo NSP

As toxinas pertencentes ao grupo NSP são poliéteres lipossolúveis. A intoxicação de seres

humanos ocorre quando da ingestão de bivalves (ostras e mexilhões) contaminados por brevetoxina (BTX). Os sintomas de intoxicação pela ingestão dessas toxinas manifestam-se através de falta de coordenação motora, paralisia e convulsões em camundongos. Essas toxinas podem ser produzidas por microrganismos marinhos das espécies *Gymnodinium brevis*, *Kerenea brevis*, *Chatonella marina*, *Chatonella antiqua*, *Fibrocapsa japônica* e *Heterosigma akashiwo* e possuem a capacidade de matar milhares de peixes quando há uma grande proliferação, entretanto, apesar da morbidade associada, nunca foi relatada morte de humanos devido à sua ingestão (WANG, 2008).

Os bioensaios em camundongos mostraram uma LD₅₀ de 170 µgkg⁻¹ de peso corpóreo, intraperitonealmente (i.p.), 94 µgkg⁻¹ de peso corpóreo, por via endovenosa e 520 µgkg⁻¹ de peso corpóreo, por via oral.

2.1.2 Toxinas do grupo DSP

Pertencem ao grupo DSP, a toxina lipossolúvel ácido ocadaico (AO) e seus análogos, assim como as substâncias correlatas dinofisitoxinas-1, 2 e 3 (DTX-1, 2 e 3), bem como yessotoxina e seus homólogos (YTXs) e pectenotoxina-1, 2, 3 e 6 (PTX-1, 2, 3 e 6) (AMZIL et al., 2008). O principal sinal da intoxicação é a diarreia. Há indícios de que além do dano à mucosa intestinal, o AO e as DTX são promotores de tumores intestinais (MANERIO et al., 2008).

2.1.3 Toxinas do grupo PSP

A síndrome de PSP é causada por um grupo com mais de vinte substâncias hidrossolúveis, a saber: saxitoxina (STX), neosaxitoxina (*neoSTX*), goniautotoxina-1, 2, 3, e 4 (GTX-1, 2, 3 e 4) e substâncias análogas, sendo causadoras de uma síndrome de intoxicação extremamente perigosa, pois inibem a condução nervosa, bloqueando os canais de sódio sem afetar a permeabilidade para o potássio, o potencial transmembrana ou a resisitência da mesma (ADELMAN et al., 1982; CARMICHAEL, 1992; DIETRICH et al., 2008). Os sintomas iniciais são neurológicos, incluindo queimação dos lábios e da pele, ataxia, entorpecimento, formigamento e febre, passando para uma geral falta de coordenação motora, ocasionando a morte por parada respiratória. O tratamento existente é apenas sintomático, pois não existe antídoto (VALE,

2008). Vale ressaltar que esse grupo de toxinas também podem ser produzidas por espécies de microalgas da divisão *Cyanophyta* (cianobactéria) incluídas nos gêneros *Aphanizomena*, *Anabaena* e *Lyngbya* (SAWYER *et al.*, 1968; CARMICHAEL *et al.*, 1997, JAISWAL *et al.*, 2008).

2.1.4 Toxinas do grupo ASP

São responsáveis por este tipo de síndrome de intoxicação o grupo de neurotoxinas hidrossolúveis ácido domóico (AD) e seus análogos, contando 10 estruturas diferentes. Seus sintomas de intoxicação inclui a perda de equilíbrio, náuseas, vômitos, dores de cabeça e desorientação. Os sintomas podem ser seguidos de perda passageira ou permanente da memória (KIRKPATRICK *et al.*, 2004).

2.1.5 Toxinas do grupo CFP

Ficotoxinas deste grupo são os casos de envenenamento mais relatados na literatura, com uma estimativa de 10 a 50 mil/ano. Ciguatoxina (CTX) é a única ficotoxina originada de uma alga bentônica e que pode causar intoxicação a partir da ingestão de peixes por seres humanos. Os sinais e sintomas se assemelham ao da NSP, entretanto é mais severa e potente. Casos típicos envolvem vômitos e diarreia, além disso, pode ser fatal (BURGESS & SHAW, 2001).

Mais recentemente as toxinas denominadas azaspirácidas (AZAs) e as toxinas de ação rápida, giminodimina, espirolídeos e pinnatoxinas, foram incluídas na lista do grupo CFP, sendo que as AZAs têm sintomas parecidos com os das toxinas do grupo DSP, com a diferença da capacidade altamente hepatotóxica (AMZIL *et al.*, 2008).

2.2 TOXINAS PRODUZIDAS POR MICROALGAS DA DIVISÃO *Cyanophyta* (CIANOTOXINAS)

Muitos espécies de cianofíceas incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*, *Coelosphaeriuni*, *Fisóherella*, *Gloeotrichia*, *Gomphosphaeria*, *Hapaisiphon*, *Microcoleus*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Symplocos*, *Tolypothrix* e *Trichodesmium*, são repon-

sáveis pelo aparecimento de intensas florações tóxicas em corpos d'água eutrofizados, causando muitos casos de envenenamento animal e mesmo humano, ocorridos- após a ingestão de água ou alimentos contendo células tóxicas ou toxinas por elas liberadas. Estas cianotoxinas podem ser separadas em dois grupos: as que afetam o sistema nervoso, atuando como fatores de morte rápida (neurotoxinas); e aquelas que afetam o sistema hepático, atuando como fatores de morte lenta, (hepatotoxinas) (CARMICHAEL, 1992).

2.2.1 Neurotoxinas

As neurotoxinas podem ser produzidas por espécies de cianofíceas incluídas nos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomena*, *Oscillatoria* e *Trichodesmium*. A primeira neurotoxina quimicamente e funcionalmente definida, foi *anatoxin-a*, isolada de *Anabaena flos-aquae*. Esta biotoxina é uma amina secundária, 2-acetii-9-azabiciclo[4.2.1]non-2-eno, de massa molecular 165 m/z (HUBER, 1972).

Este alcalóide neurotóxico atua fisiologicamente como um agente despolarizante neuromuscular, com efeito pós-sináptico sobre receptores nicotínicos, não sendo suscetível à hidrólise por acetilcolinesterase (CARMICHAEL *et al.*, 1975; COLLINS, 1978; SPIVAK *et al.*, 1980, CARMICHAEL, 1992).

A produção de *anatoxin-a* também está associada com o crescimento intenso, em corpos d'água, de *Anabaena spiroides* ou *Anabaena circinalis*. SIVONEN *et al.* (1989a) demonstrou que *Oscillatoria* sp e *Aphanizomena flos-aquae* também produzem *anatoxin-a* e SKULBERG *et al.* (1992) isolou um homólogo metilênico natural de *anatoxin-a*, que possui uma toxicidade menor, denominado *homoanatoxin-a*.

Outra neurotoxina produzida por espécies do gênero *Anabaena* foi definida estruturalmente por MATSUNAGA *et al.* (1989), denominada *anatoxin-a(S)*. *Anatoxin-a(S)* é um fosfato de N-hidroxiguanidina e metila, de massa molecular 252 m/z, que se decompõe rapidamente em soluções alcalinas e atua farmacologicamente como uma anticolinesterase irreversível MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986 e 1987; MAHMOOD *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1989; MATSUNAGA *et al.*, 1989; CARMICHAEL, 1992; PETERSON *et al.*, 2010).

Estudos comparativos entre *anatoxin-a(s)* e diidopropylfluorophosphate (DFP), um organofosforado sintético e inibidor potente de acetilcolinesterase, demonstraram ser aquela biotoxina 22 vezes mais potente que o DFP (CARMICHAEL, 1992). Este organofosforado natural possui propriedades semelhantes aquelas de inseticidas organofosforados sintéticos; assim, é possível utilizar, terapêuticamente, atropina como antagonista de sua toxicidade (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; PETERSON *et al.*, 2010).

2.2.2 Hepatotoxinas

Outro grande grupo de cianotoxinas são as hepatotoxinas. Estas biotoxinas são produzidas por várias espécies incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomena*, *Gloeotrichia* e *Coelosphaerium* (CARMICHAEL, 1992).

A primeira hepatotoxina a ser identificada como um peptídeo foi a biotoxina isolada de *Microcystis aeruginosa* (BISHOP *et al.*, 1959). Esta toxina foi posteriormente denominada microcystina (MCYST) por KONST *et al.* (1965). Vários isolamentos de microcystinas foram realizados posteriormente (MURTHY & CAPINDALE 1970; ELLEMAN *et al.*, 1978; KRISHNAMURTHY *et al.*, 1986; SIVONEN *et al.*, 1990, 1992; NAMIKOSHI *et al.*, 1992a, b e c; STOTTS *et al.*, 1993), demonstrando a existência de diferentes microcystinas e que cepas diferentes de uma mesma espécie seriam capazes de produzir tipos diferentes de microcystinas (BOTES *et al.*, 1982, 1982a e 1982b; CARMICHAEL, 1992).

Microcystinas são peptídeos monocíclicos formados por sete aminoácidos, sendo cinco na forma dextrógira (D) e dois na forma levógira (L), que possuem como esqueleto base a estrutura ciclo-D-Ala-L-X-aitro--metilisoAsp-L-Y- ADDA-D-isoGlu-N-metiidesidroAla. Dois dos D-aminoácidos são os inéditos N-metildesidroalanina (Mdha) e o ácido 3-amino-9--mëtoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico (ADDA) com massa molecular 313 m/z. Os dois L-aminoácidos variam, diferenciando 40 estruturas de microcystinas com dose letal média (DL50) variando de 50-250 µg/Kg, intraperitoneal (i.p.) em camundongos (BOTES *et al.*

, 1985; KRISHNAMURTHY *et al.*, 1986., HARADA *et al.*, 1988a, 1988b; MERILUOTO & ERICKSON, 1988; PAINULY *et al.*, 1988; RINEHART *et al.*, 1988; ;MERILUOTO, J; 1990; SIVONEN *et al.*, 1990; CARMICHAEL, 1992; SMITH *et al.*, 2008).

Uma variação estrutural destes peptídeos hepatotóxicos é produzida por *Nodularia spumigena*. A estrutura da toxina produzida por *N. spumigena* foi estabelecida como sendo um pentapeptídeo cíclico, de massa molecular 824 m/z, cuja estrutura química é ciclo D-eritro-β-metilAsp-L-Arg-ADDA-D-Glu-ácido-N--metil-desidro-aminobutirico, denominado nodularina (NODLN), que possui propriedades toxicológicas semelhantes aquelas às MCYST e DL50 de 50 pg/Kg, (i.p.) em camundongos (SANDSTRÖM *et al.*, 1990; SIVONEN *et al.*; 1989a e 1989b).

A síntese química do componente ADDA de MCYST mostrou ser este o responsável pela atividade biológica destas hepatotoxinas, pois a ozonólise das ligações duplas de ADDA produziu este aminoácido livre mais o correspondente peptídeo cíclico e os bioensaios com esta última estrutura, em animais de laboratório, não demonstraram toxicidade alguma (NAMIKOSHI *et al.*, 1989).

Estudos biossintéticos (MOORE *et al.*, 1991), realizados com precursores marcados, indicam que o esqueleto carbônico de ADDA resulta da condensação de fenilacetato com 4 acetatos e metilação C1 da cadeia polipeptídica nas posições C-2, C-6 e C-8, mostrando também que a unidade ácido metilaspártico é formada a partir de acetato e piruvato, similar à biossíntese da leucina. Os sinais clínicos de intoxicação hepática que tem sido observados em animais domésticos e selvagens incluem fraqueza, anorexia, palidez, vômito, resfriamento das extremidades e diarreia. A morte ocorre poucas horas ou poucos dias após a exposição inicial às hepatotoxinas e resulta de hemorragia intrahepática e choque hipovolêmico, que fica evidenciado por um aumento de 100% do peso do fígado, verificado em testes com animais de laboratório (THEISS *et al.*, 1988; CARNICHAEL, 1992; SMITH *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação de MCYST e NODLN são semelhantes e tem sido objeto de estudo em muitos laboratórios e pode ser descrito sumariamente da seguinte forma: (I) a hepa-

totoxina seria absorvida para o sangue do íleo, já que nesta região do intestino existe grande atividade de ácidos biliares que transportariam a hepatotoxina através da mucosa intestinal (DAHLEM *et al.*, 1988); (II) evidências demonstram que a toxina é transportada, preferencialmente, para os hepatócitos (DABHOLKAR & CARMICHAEL, 1987; MERILUOTO, *et al.*, 1990), acreditando-se que a absorção pelos hepatócitos seja feita com o auxílio dos ácidos biliares (RUNNEGAR & FALCONER., 1986; ERIKSSON *et al.*, 1990); (III) a hepatotoxina induz mudanças nos microfilamentos de actina, um dos componentes do citoesqueleto celular, levando a uma desagregação destes próximo ao centro da célula (RUNNEGAR & FALCONER, 1986; ERICKSON *et al.*, 1989; HOOSER *et al.*, 1991). Este processo leva à perda de suporte celular pela destruição do sinusóide endotelial da célula. Com a destruição do parênquima e sinusóide celulares do fígado ocorre hemorragia intra-hepática e/ou insuficiência hepática.

Diversos trabalhos têm demonstrado que microcystinas e nodularina são inibidores potentes e específicos de proteína fosfatases dos tipos 1 e 2A (PP1 e PP2A) (FALCONER & BUCLEY, 1989; ERICKSON *et al.*, 1990; HONKANEN *et al.*, 1990; MACKNITOSH *et al.*, 1990). Assim, microcystinas e nodularina podem atuar como aceleradoras do crescimento de tumores hepáticos e epiteliais, já que PP1 e PP2A são, provavelmente, as enzimas chaves na reversão de proteína quinases C (FALCONER, 1991; CARMICHAEL, 1992; SMITH *et al.*, 2008).

Certos fármacos têm sido usados experimentalmente como antagonistas de hepatotoxicoses provocadas por MCYST e NODLN, em animais de laboratório, como ciclosporina-A, rifampina e silymarina. Estes antagonistas têm sido utilizados com sucesso quando administrados antes ou coadministrados com a hepatotoxina, desconhecendo-se, até agora, como estes fármacos atuam sobre o mecanismo de ação tóxica das mesmas (SMITH *et al.*, 2008; MES-SINEO *et al.*, 2009; PEARSON *et al.*, 2010).

3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECÇÃO DE FICOTOXINAS

O desenvolvimento de técnicas analíticas para a detecção, quantificação rápida e confiável de ficotoxinas tem sido uma preocupação

de instituições governamentais para o controle sanitário da segurança dos alimentos de origem marinha ou de água doce e, segundo FREMY *et al.* (1999), embora um grande número de métodos tem sido desenvolvidos, ainda não existe uma metodologia analítica oficial validada. Atualmente, os diversos procedimentos analíticos para a detecção de toxinas produzidas por microalgas podem ser incluídos em 3 categorias: métodos biológicos; métodos bioquímicos ou imunológicos e métodos físico-químicos.

3.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS

A literatura informa que o princípio dos métodos biológicos está baseado na análise dos efeitos toxicológicos das fitotoxinas em animais (camundongos, peixes, microcrustáceos) ou no crescimento de algumas linhagens de células normais ou tumorais (fibroblastos, células KB, células HeLa, células BGM).

A técnica de bioensaios em camundongos é realizada através da injeção intraperitoneal da suspensão do extrato das toxinas em solução de cloreto de sódio 9mg mL⁻¹ em 3 animais. O extrato de substâncias bioativas é obtido por extração com solventes de sua matriz, que pode ser um tecido animal ou uma cultura de células do microrganismo produtor da toxina (YASUMOTO *et al.*, 1978). Este procedimento demonstra uma informação generalizada do aspecto toxicológico do alimento contaminado, sendo muito utilizado em abordagens de rastreamento para a possibilidade da presença de ficotoxinas, confirmando ou não sua presença pela existência dos sintomas associados a este tipo de intoxicação pelos animais usados no ensaio. O limite de detecção para DSP é de 0,8g g⁻¹; para MCYST, a dose letal média (DL₅₀) neste tipo de ensaio pode variar de 50 a 250g Kg⁻¹ (SIVONEN *et al.*, 1992); para NODLN, a DL₅₀ é de 50g Kg⁻¹ (SANDSTRÖM *et al.*, 1990).

Diversos outros tipos de técnicas de bioensaios foram desenvolvidas utilizando diferentes tipos de animais, outros sistemas de solventes para extração ou formas desiguais de administração; entretanto as respostas observadas são muito discordantes, exibindo baixa especificidade e sensibilidade, mostrando a falta de robustez analítica desses métodos, o que inviabiliza procedimentos de validação (FREMY *et al.*, 1999).

O cultivo de células para serem usadas na determinação da atividade toxicológica de alimentos contaminados por ficotoxinas pode ser uma técnica alternativa aos procedimentos com animais, e seu princípio está baseado na observação da alteração da taxa de crescimento ou na modificação da morfologia celulares. Em 1996, FIRORENTINI e colaboradores propuseram o uso de linhagens de células de intestino como um sistema de ensaio in vitro adequado para DSP. No mesmo ano, AMZIL e colaboradores descreveram uma simplificação para essa metodologia utilizando células KB para a detecção de OA e seus análogos em mexilhões (POUCHUS *et al.*, 1997 apud FREMY *et al.*, 1999) confirmou a especificidade dos bioensaios realizados com células KB para a detecção destes inibidores lipofílicos de proteínas fosfatases. CROCI *et al.* (1997) desenvolveu um método no qual utiliza a microscopia ótica para a observação de alterações morfológicas em células BGM por extratos de mexilhão contaminados por ácido ocaído e maitotoxina. Estes ensaios citotóxicos apresentam limites de detecção de 0,05g g⁻¹ (FREMY *et al.*, 1999).

3.2 Métodos Bioquímicos e Imunoquímicos

Os princípios dos métodos bioquímicos baseiam-se na capacidade de ficotoxinas atuarem como inibidores das proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2A). Apresentam este tipo de atividade OA, DTX-1 e 2, as 80 variedades de MCYST e as variedades de NODLN. (TAKAI *et al.*, 1995; GUPTA *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2008). Ensaios da atividade inibitória de PP2A foram otimizados por TUBARO *et al.* (1996) para avaliar a presença de OA em extratos de mexilhões. HONKANEN *et al.* (1996) utilizou esse mesmo ensaio para avaliar a presença de OA em extratos de ostras, determinando o limite de detecção do ensaio em 0,2µg g⁻¹. Outro ensaio bioquímico usando a medida da atividade de inibição de proteína fosfatase 2A foi realizado para OA e DTX-1 e 2, sendo determinado o limite de detecção de 0,01µg g⁻¹ (FREMY *et al.*, 1999). MCYST e NODLN, bem como suas variações homólogas podem ser detectados através de suas atividades de inibição para as proteínas fosfatases 1 e 2A, com limites de concentração de 0,25 e 0,10 µg L⁻¹ para os

métodos imunoquímicos colorimétricos e fluorimétricos, respectivamente (BOUAICHA *et al.*, 2002).

Os métodos imunoquímicos podem ser usados para verificar a contaminação de alimentos por ficotoxinas como o OA e DTX-1 e 2, além de MCYST e NODLN e suas variantes análogas. O princípio de sua técnica está fundamentado em ensaio do tipo ELISA, que utiliza anticorpos monoclonais específicos para revelar a presença destes contaminantes. Por meio deste tipo de ensaio, estas toxinas podem ser detectadas em concentrações de 0,04µg g⁻¹ (FREMY *et al.*, 1999), enquanto microcistinas e nodularinas, em extratos celulares ou água contaminada, são detectadas em concentrações que variam de 0,26 a 0,38µg L⁻¹ (RAPALA *et al.*, 2002).

3.3 Métodos Físico-Químicos

Os métodos físico-químicos usados na detecção de ficotoxinas em décadas recentes vêm utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a uma variedade de técnicas de detecção, como a fluorescência (CLAE-FL), o ultravioleta com comprimento de onda fixo (CLAE-UV/VIS), o ou com arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD) e a espectrometria de massas (CLAE-EM e CLAE-EM/EM). Recentemente, com o aperfeiçoamento da tecnologia, surgiu a cromatografia líquida de ultra-performance-espectrometria de massa com ionização por eletrospray (CLUE-ESI-MS e CLUE-ESI-MS/MS) vem sendo utilizada com resultados analíticos robustos. Outra técnica analítica que também pode ser usada é a eletroforese capilar acoplada ao detector de ultravioleta (EC-UV/VIS).

O primeiro método cromatográfico foi desenvolvido por LEE e colaboradores em 1987 e vem sendo utilizado largamente para a detecção e quantificação de OA e seus derivados DTX-1 e 2. Este método é constituído de três etapas: (1) o preparo do extrato metanólico; (2) a derivatização das biotoxinas com 9-anthryldiazomethane (ADAM) e (3) a separação e detecção dessas substâncias por um sistema cromatográfico com fluorescência e limite de detecção (LD) de 0,4µg g⁻¹. Posteriormente, CROCI *et al.* (1995), propôs modificação no sistema de extração por solventes desse método, o que proporcionou taxas de recuperação adequadas destas ficoto-

xinas, além de eliminar os efeitos de matriz, entretanto a etapa de derivatização com ADAM continuou a possuir desvantagens de instabilidade e interferência química, além do seu custo elevado, o que levou diversos grupos de pesquisa a buscar novos reagentes substitutos para a segunda etapa do método (SHEN *et al.*, 1996; LAWRENCE *et al.*, 1996; KELLY *et al.*, 1996). Com o objetivo de aperfeiçoar o procedimento analítico e os resultados para os métodos por CLAE, AASE e ROGSTAD (1997) propuseram a adição de uma etapa de purificação do extrato metanólico através de extração em fase sólida (EFS), diminuindo desta forma a influência do solvente na instabilidade química das ficotoxinas. Em 1999, PUECH e colaboradores utilizando CLAE por imuno-afinidade para a etapa de purificação do método de Lee demonstrou um LD de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$.

O uso da espectrometria de massas na detecção de ficotoxinas permitiu a identificação rápida destas substâncias. A utilização da técnica de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CL-ESI-MS e CL-ESI-MS/MS) a pressão atmosférica mostrou-se adequada para uma variedade de ficotoxinas, o que possibilitou obter informações sobre a massa e estrutura das diversas toxinas, mostrando elevada sensibilidade e a robustez analítica dessas metodologias, sendo os LD da ordem de 0,008 $\mu\text{g g}^{-1}$ (QUINLAN *et al.*, 1993; FREMY *et al.*, 1999; CHRISTIAN & LUCKAS, 2008).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento das técnicas de cromatografia líquida de ultraperformance com detecção de arranjo de diodos (CLUE-DAD) e cromatografia líquida de ultraperformance com detecção de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CLUE-ESI-MS ou CLUE-ESI-MS/MS), a sensibilidade, a resolução e a velocidade de separação destes métodos foram muito aperfeiçoados quando comparados aos sistemas de cromatografia de alta eficiência convencionais (CLAE). SPOOF *et al.* (2009), utilizando um sistema de separação por UPLC-PDA conseguiu 461 separações em 24h, com um tempo total para cada análise de 3,12 minutos para 10 variantes de MCYST e 3 de NODLN. OEHRLE *et al.* (2010) utilizando um sistema de separação por CLUE-ESI-MS/MS mostrou alta resolução e especificidade para diferentes MCYST, anatoxina-a e

cylindrospermopsina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ADELMAN**, W. J. *et al.* Sodium-channels blocked by aphantoxin obtained from the blue-green-alga, *Aphanizomenon-flooaquae*. **Toxicicon**, v. 20, n. 2, p. 513-516, 1982.
- **ABNT** (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. 2ª edição, 2005.
- **AMZIL**, Z. *et al.* First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in french shellfish. **Toxicicon**, v. 52, n. 3, p. 39-48, 2008.
- **BOTES**, D. P. *et al.* Isolation and characterization of 4 toxins from the blue-green-alga, *Microcystis-aeruginosa*. **Toxicicon**, v. 20, n. 6, p. 945-954, 1982.
- **BOTES**, D. P. *et al.* Configuration assignments of the amino-acid-residues and the presence of n-methyldehydroalanine in toxins from the blue-green-alga, *Microcystis-aeruginosa*. **Toxicicon**, v. 20, n. 6, p. 1037-1042, 1982a.
- **BOTES**, D. P. *et al.* Structure of toxins of the blue-green-alga *Microcystis-aeruginosa*. **South African Journal of Science**, v.78, n. 9, p. 378-379, 1982b.
- **BOUAÏCHA** *et al.* A colorimetric and fluorometric microplate assay for the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 40, p. 1677-1683, 2002.
- **BURGESS**, V.; **SHAW**, G. Pectenotoxins -- An issue for public health: a review of their comparative toxicology and metabolism. **Environment International**, v. 27, p. 275-283, 2001.
- **CAMACHO**, F.G. *et al.* Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 176-194, 2007.
- **CARMICHAEL**, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 445-459, 1992.
- **CARMICHAEL**, W. W. *et al.* Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. **Science**, v. 187, n. 4176, p. 542-544, 1975.
- **CARMICHAEL**, W. W. *et al.* Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena-flos-aquae* NRC-44-1. **Toxicicon**, v. 17, n. 3, p. 229-236, 1979.
- **CHRISTIAN**, B.; **LUCKAS**, B. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 117-134, 2008.
- **COLLINS**, M. Algal toxins. **Microbiological Reviews**, v.42, n. 4, p. 725-746, 1978.
- **COOK**, W. O. *et al.* Consistent inhibition of pe-

- ripheral cholinesterases by neurotoxins from the fresh-water cyanobacterium *Anabaena-flos-aquae* - Studies of ducks, swine, mice and a steer. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 915-922, 1989.
- CROCI et al. Influence of the extraction procedure on recovery of okadaic acid from experimentally contaminated mussels. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1511-1518, 1995.
 - CROCI et al. A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 223-230, 1997.
 - DABHOLKAR, A. S.; CARMICHAEL, W. W. Ultrastructural-changes in the mouse-liver induced by hepatotoxin from the fresh-water cyanobacterium *Microcystis-aeruginosa* strain-7820. **Toxicon**, v. 25, n. 3, p. 285-292, 1987.
 - DAHLEM, A. M. et al. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-Lr, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis-aeruginosa*. **Pharmacology and Toxicology**, v. 64, n. 2, p. 177-181, 1989.
 - DEMOTT, W. R. et al. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and 3 species of *Daphnia*. **Limnology and Oceanography**, v. 36, n. 7, p. 1346-1357, 1991.
 - DIETRICH, D. R. et al. Toxin mixture in cyanobacterial blooms - a critical comparison of reality with current procedures employed in human health risk assessment. In: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**, 2008. p. 885-912.
 - ELLEMAN, T. C. et al. Isolation, characterization and pathology of toxin from a *Microcystis-aeruginosa* (*Anacystis-cyanea*) bloom. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 209-218, 1978.
 - ERIKSSON, J. E. et al. Hepatocellular uptake of H-3 dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1025, n. 1, p. 60-66, 1990.
 - ERIKSSON, J. E. et al. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Experimental Cell Research**, v. 185, n. 1, p. 86-100, 1989.
 - FALCONER, I. R. Tumor promotion and liver-injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 6, n. 2, p. 177-184, 1991.
 - FALCONER, I. R.; BUCKLEY, T. H. Tumor promotion by *Microcystis* sp. a blue-green-alga occurring in water-supplies. **Medical Journal of Australia**, n. 150, n. 6, p. 351-351, 1989.
 - FREER, E.; VARGAS-MONTEIRO, M. Floraciones algales nocivas em la costa pacifica de costa rica: toxicologia y sus efectos em el ecosistema y salud pública. **Acta Médica Costarricense**, v. 45, n. 4, p. 158-164, 2003.
 - FREMY et al. Recent advances in analytical procedures for detection of diarrheic phycotoxins: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 377-384, 1999.
 - GILBERT, J. J. Differential-effects of *Anabaena affinis* on cladocerans and rotifers - mechanisms and implications. **Ecology**, v. 71, n. 5, p. 1727-1740, 1990.
 - GUPTA et al. A model for binding of structurally diverse natural product inhibitor of protein phosphatases PP1 and PP2a. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 20, p. 3199-3206, 1997.
 - HARADA, K. I. et al. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 448, n. 2, p. 275-283, 1988.
 - HARADA, K. I. et al. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. **Toxicon**, v. 26, n. 5, p. 433-439, 1988.
 - HELDMAN, C. J. et al. New measurements of cyanobacterial toxins in natural waters using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, n. 5, p. 1817-1824, 2008.
 - HENNING, K. et al. Detection of a cytotoxic substance produced by the cyanobacterium *Microcystis-aeruginosa* strain PCC-7806 - Isolation and differentiation from the peptide toxin microcystin-LR by cytotoxicity assays. **Current Microbiology** 25(3): 129-134, 1992.
 - HILLER, S. et al. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42: p. 1238-1250, 2007.
 - HONKANEN, R. E. et al. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type-1 and type-2a protein phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 32, p. 19401-19404, 1990.
 - HONKANEN et al. Detection of DSP-toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1 in shellfish by serine-threonine protein phosphatase assay. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 6, p. 1336-1343, 1996.
 - HOOSER, S. B. et al. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced invivo and invitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green-alga, *Microcystis-aeruginosa*. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 4, p. 259-266, 1991.
 - KELLY et al. Isolation of dinophysistoxin-2 and the high- performance liquid chromatography analysis of diarrhetic shellfish toxins using derivatization with 1-bromoacetylpyrene. **Journal of Chromatography A**, v. 749, n. 12, p. 33-40, 1996.
 - KIVIRANTA, J. et al. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain-205. **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 1093-1098, 1992.
 - KONST, H. et al. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in labo-

- ratory and domestic animals. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 29, n. 9, p. 221-228, 1965.
- KRISHNAMURTHY, T. et al. Toxic peptides from fresh-water cyanobacteria (blue-green-algae) - Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis-aeruginosa* and *Anabaena-flos-aquae*. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 865-873, 1986.
 - LABINE, M. A.; MINUK, G. Y. Cyanobacterial toxins and liver disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 10, p. 773-788, 2009.
 - LAWRENCE et al. Liquid chromatography determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in shellfish after derivatization with 9-chloromethylanthracene. **Journal of Chromatography A**, v. 721, p. 359-364, 1996.
 - LEE et al. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 877-881, 1987.
 - LIMA, R.C.A., **Medidas sanitárias e fitossanitárias na OMC, neoprotecionismo ou defesa de objetivos legítimos**. São Paulo: Ed. Aduaneiras, 2005. 313p.
 - LIQIANG X.; HO-DONG, P. Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. **Aquaculture**, v. 271, p. 530-536, 2007.
 - MACKINTOSH, C. et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a from both mammals and higher-plants. **Febs Letters**, v. 264, n. 2, p. 187-192, 1990.
 - MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the fresh-water cyanobacterium *Anabaena-flos-aquae* NRC 525-17. **Toxicon**, v. 24, n. 5, p. 425-434, 1986.
 - MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. Anatoxin-a(S), an irreversible anticholinesterase from the blue-green-algae *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 148-148, 1987.
 - MAHMOOD, N. A. et al. Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green-algae) bloom dominated by *Anabaena-flos-aquae*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 4, p. 500-503, 1988.
 - MANERIO, E. et al. Shellfish consumption: a major risk factor for colorectal cancer. **Medical Hypotheses**, v. 70, p. 409-412, 2008.
 - MERILUOTO, J. A. O.; ERIKSSON, J. E. Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria. **Journal of Chromatography**, v. 438, n. 1, p. 93-99, 1988.
 - MERILUOTO, J. A. O. et al. Internal surface reversed-phase high-performance liquid-chromatographic separation of the cyanobacterial peptide toxins microcystin-LA, microcystin-LR, microcystin-YR, microcystin-RR and nodularin. **Journal of Chromatography**, v. 509, n. 2, 390-395, 1990.
 - MERILUOTO, J. A. O. et al. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of 2 tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. **Toxicon**, v. 28, n. 12, p. 1439-1446, 1990.
 - MESSINEO, V. et al. Cyanobacterial toxins in italian freshwaters. **Limnologist**, v. 39, n. 2, p. 95-106, 2009.
 - METCALF, J. S.; CODD, G. A. Cyanobacteria, neurotoxins and water resources: are there implications for human neurodegenerative disease? **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, v. 10, p. 74-78, 2009.
 - MOORE, R. E. Toxins from blue-green-algae. **Bioscience**, v. 27, n. 12, p. 797-802, 1977.
 - MOORE, R. E. et al. Biosynthesis of microcystin-LR - Origin of the carbons in the ADDA and masp units. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 13, p. 5083-5084, 1991.
 - MOS, L. Domoic acid: a fascinating marine toxin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 9, p. 79-85, 2001.
 - MURTHY, J.R.; CAPINDALE J.B. a new isolation and structure for endotoxin from *Microcystis-aeruginosa* NRC-1. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 508-510, 1970.
 - NAMIKOSHI, M. et al. Total synthesis of ADDA, the unique C20 amino-acid of cyanobacterial hepatotoxins. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 33, p. 4349-4352, 1989.
 - NAMIKOSHI, M. et al. Structures of 3 new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena* sp. strain 66. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 5, p. 661-666, 1992.
 - NAMIKOSHI, M. et al. Two new L-serine variants of microcystins-LR and microcystins-RR from *Anabaena* sp. strains 202-a1 and 202-a2. **Toxicon**, v. 30, n. 11, p. 1457-1464, 1992.
 - NAMIKOSHI, M. et al. Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). **Toxicon**, v. 30, n. 11, p. 1473-1479, 1992.
 - OEHRLE et al. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v. 55, p. 965-972, 2010.
 - PAINULY, P. et al. The structure of a cyclic peptide toxin, cyanogenosin-RR from *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 29, n. 1, p. 11-14, 1988.
 - PARDO, O.; YUSÀ, V.; LEÓN, N.; PASTOR A. Development of a pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass. **Chromatography A**, v. 1154, p. 287-294, 2007.

- PEARSON, L. et al. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1650-1680, 2010.
- POUCHUS et al. Specificity of the test based on modification of cell morphology for detection of lipophilic inhibitors of protein phosphatases. **Toxicon**, v. 35, n. 7, p. 1137-1142, 1997.
- PUECH et al. Use of immunoaffinity columns for clean up of dsp toxin extracts from shellfish prior to their analysis by hplc-fluorimetry. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 239-254, 1999.
- QUILLIAM, M.A. analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometry detection. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 555-569, 1995.
- RABIN, P.; DARBRE, A. Improved extraction procedure for endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Biochemical Society Transactions**, v. 3, n. 3, p. 428-430, 1975.
- RAPALA, J. et al. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-uv detection and enzyme-linked immunosorbent assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, p. 213-231, 2002.
- REPAVICH, W. M. et al. Cyanobacteria (blue-green-algae) in wisconsin waters - acute and chronic toxicity. **Water Research**, v. 24, n. 2, p. 225-231, 1990.
- RICUPERO, R. Os estados unidos e o comercio mundial: protecionistas ou campeões do livre comércio. **Estudos Avançados**, v. 16, n. 46, p. 7-18, 2002.
- RINEHART, K. L. et al. Nodularin, microcystin, and the configuration of ADDA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 25, p. 8557-8558, 1988.
- ROGSTAD, A. Optimization of sample clean up procedure for determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins by use of experimental design. **Journal of Chromatography A**, v. 764: p. 223-231, 1997.
- RUNNEGAR, M. T. C.; FALCONER, I. R. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon**, v. 24, n. 2, p. 109-115, 1986.
- SANDSTROM, A. et al. Structure of a hepatotoxic pentapeptide from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **Toxicon**, v. 28, n. 5, p. 535-540, 1990.
- SAWYER, P. J. et al. Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L) ralfs. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 1199-1204, 1968.
- SAYFRITZ, S.; AASEN, J.; AUNE, T. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. **Toxicon**, v. 52, p. 330-340, 2008.
- SHEN et al. Sensitive HPLC-fluorimetric and HPLC-MS determination of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins as 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin esters. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 357, p. 101-107, 1996.
- SHILO, M. Formation and mode of action of algal toxins. **Bacteriological Reviews**, v. 31, n. 3, p. 180-193, 1967.
- SIVONEN, K. et al. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous fresh-water cyanobacterium *Nostoc sp. strain-152*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2650-2657, 1990.
- SIVONEN, K. et al. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from finland. **Toxicity Assessment**, v. 4, n. 3, p. 339-352, 1989.
- SIVONEN, K. et al. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the baltic sea and structure of the toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1990-1995, 1989.
- SIVONEN, K. et al. Isolation and structures of 5 microcystins from a russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU-972. **Toxicon**, v. 30, n. 11, p. 1481-1485, 1992.
- SIVONEN, K. et al. Toxic cyanobacteria (blue-green-algae) in finnish fresh and coastal waters. **Hydrobiologia**, v. 190, n. 3, p. 267-275, 1990.
- SKULBERG, O. M. et al. Investigations of a neurotoxic oscillatoriacea strain (cyanophyceae) and its toxin - isolation and characterization of homoanatoxin-A. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 321-329, 1992.
- SMITH, J. L. et al. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. **Aquaculture** 280(14): 5-20, 2008.
- SPIVAK, C. E. et al. Potencies and channel properties induced by semirigid agonists at frog nicotinic acetylcholine-receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 337-343, 1983.
- SPOOF et al. SEPARATIONS OF MICROCYSTINS AND NODULARINS BY ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. **Journal of Chromatography B** 877:3822-3830, 2009.
- STOTTS, R. R. et al. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis spp.* **Toxicon**, v. 31, n. 6, p. 783-789, 1993.
- SUZUKI, T. et al. LC-MS/MS analysis of okadaic acid analogues and other lipophilic toxins in single-cell isolates of several dinophysis species collected in hokkaido, japan. **Harmful Algae**, v. 8, p. 233-

- 238, 2008.
- **TAKAI** *et al.* Affinity of okadaic acid to type 1 and type 2a protein phosphatases is markedly reduced by oxidation of 27-hydroxyl groups. **Biochem. J.** 306:657-662, 1995.
 - **THEISS**, W. C. *et al.* Blood-pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the fresh-water cyanobacterium (blue green-alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 603-613, 1988.
 - **TUBARO** *et al.* 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. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *gymnodinium catenatum* identified by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 85-93, 2008.
 - **YASUMOTO** *et al.* Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the tokohu district. **Bulletin**