

Monitorização de iessotoxinas em mexilhão na Baía de Lisboa

Susana Sousa Gomes, Sofia Palma, Maria João Botelho,
M. Teresa Moita, Paulo Vale
*Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR),
Av. Brasília, s/n, 1449-006, Lisboa, Portugal*

Resumo

A iessotoxina (YTX) e os seus análogos (YTXs) são compostos lipofílicos, poliéteres de dissulfato, produzidos por microalgas como *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* e *Gonyaulax spinifera*. Em Portugal, a pesquisa de YTXs iniciou-se em 2005 recorrendo a um kit de imunoenensaio comercial. O presente trabalho teve como objectivo monitorizar a presença de YTXs em mexilhão colhido na Baía de Lisboa, cujo o lado Norte representa uma zona de concentração e retenção de fitoplâncton. Numa tentativa de explicar a persistência da concentração de iessotoxina em mexilhão realizou-se em laboratório um estudo de destoxificação. Na Baía de Lisboa, o mexilhão apresentou contaminação com YTXs de Maio a Dezembro de 2005 com dois picos máximos, um em Junho com 1.53 mg Kg⁻¹ e outro em Agosto com 1.42 mg Kg⁻¹. Os valores máximos de YTXs foram simultâneos com a presença de *Lingulodinium polyedrum* na água, embora em baixas concentrações. Os ensaios laboratoriais de destoxificação evidenciaram uma lenta eliminação desta toxina o que explica a persistência de YTXs no mexilhão até ao final de 2005. O facto de as elevadas concentrações de YTXs terem sido registadas quando houve baixas concentrações de células na água pode também estar relacionado com a lenta eliminação destas toxinas.

Introdução

A iessotoxina (YTX) e os seus análogos (YTXs) são compostos lipofílicos, poliéteres de dissulfato, produzidos por microalgas como *Protoceratium reticulatum* e *Lingulodinium polyedrum*, espécies que em cultura foram identificadas como as responsáveis pela produção dos análogos de YTX no Japão, Nova Zelândia, Itália e Noruega [1]. Recentemente, na Nova Zelândia foi detectada uma outra microalga produtora de YTXs em cultura, a *Gonyaulax spinifera* [2].

Inicialmente, as YTXs foram incluídas no grupo das toxinas diarreicas (DSP), no entanto, a sua forma química e os seus efeitos toxicológicos diferem grandemente das toxinas DSP [3]. Na Europa, e desde 2002, as YTXs encontram-se separadas das toxinas DSP e regulamentadas ao nível de 1 miligrama de equivalente de YTX por quilograma de parte edível (Regulmento (CE) nº 853/2004 [4]).

Os Laboratórios da Biosense (Bergen, Norway) desenvolveram um kit ELISA, presentemente em validação internacional, recorrendo a um anticorpo desenvolvido pela AgResearch (Hamilton, New Zealand) [5] que detecta todos os análogos de iessotoxina estabelecidos na legislação da União Europeia.

A pesquisa de YTXs através deste kit de imunoensaio comercial foi iniciada em Portugal em 2005. Nesse estudo foi detectada a contaminação de diversas espécies de bivalves da costa noroeste, Ria de Aveiro, e costa sul, Ria Formosa, e respectivas zonas litorais. Nas zonas estuarinas o mexilhão apresentou a contaminação mais elevada, enquanto na zona litoral a amêijoia-branca foi a espécie mais contaminada [6].

O presente trabalho teve como objectivo monitorizar a presença de YTXs em mexilhão colhido na Baía de Lisboa, cujo o lado Norte representa uma zona de acumulação e retenção de células de fitoplâncton [7], e explicar a persistência da concentração de iessotoxina em mexilhão através de um estudo de destoxificação em laboratório.

Material e métodos

Durante o ano 2005, na Baía de Lisboa colheram-se semanalmente à superfície amostras de água para a contagem e identificação de células fitoplanctónicas e mexilhão para monitorização de biotoxinas (YTXs, DSP e ASP) na parte edível.

As amostras de água foram preservadas em formol para uma concentração final de 2,4% e as células fitoplanctónicas foram identificadas e quantificadas pelo método de Utermöhl [8].

Para o estudo de destoxificação colocou-se durante 10 dias mexilhão num tanque de aquacultura com alimentação artificial (*Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, 1:1), com 24°C de temperatura e salinidade 33,5%. A pesquisa de YTXs foi realizada de 2 em 2 dias em hepatopâncreas (HP) de 12 mexilhões.

A extracção das amostras e ensaio por ELISA, para a determinação de YTXs, foi realizada de acordo com as instruções que acompanham o kit [9]. Para a extracção no HP, o volume de metanol aquoso a 90% foi adicionado proporcionalmente à massa de HP retirada dos 12 indivíduos.

Resultados e discussão

Monitorização de Fitoplâncton e YTXs. Na Fig. 1 observa-se que durante o ano de 2005, na zona em estudo as amostras de mexilhão apresentaram contaminação por YTXs, de Maio até final do ano. Os dois picos máximos, que ocorreram em Junho e Agosto, foram de 1,53 mg Kg⁻¹ e de 1,42 mg Kg⁻¹, respectivamente, tendo sido neste período o limite regulamentar de 1 mg Kg⁻¹ excedido em 4 das amostras analisadas. Após

cada máximo de contaminação a concentração de YTXs manteve-se acima de 0,30 mg/kg.

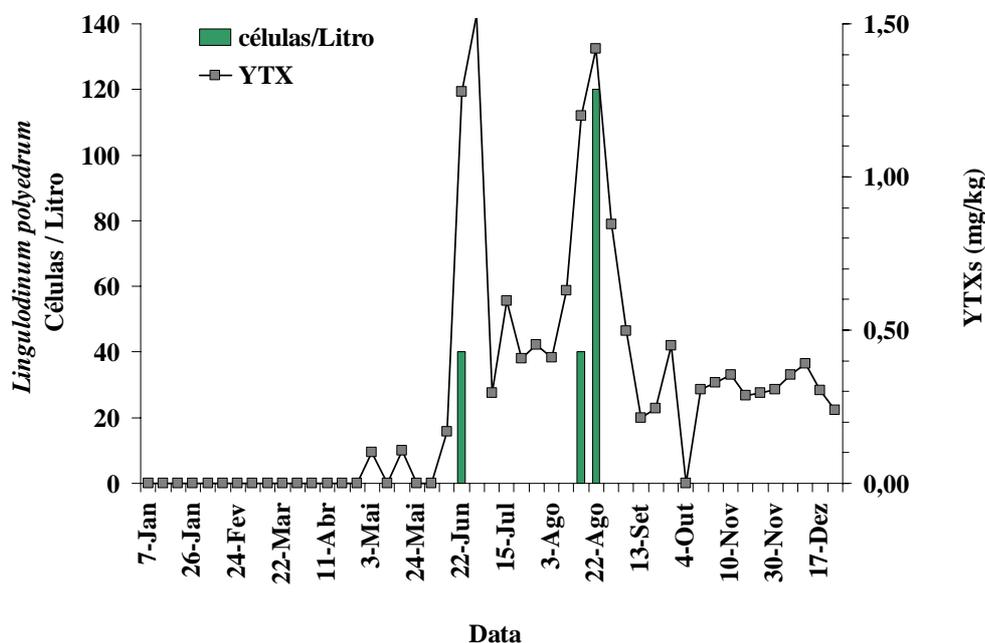


Figura 1. Concentração de um *L. polyedrum* (células/L) e de YTXs no mexilhão (mg/kg) na Baía de Lisboa, em 2005.

A contaminação máxima do mexilhão por YTXs coincide com a presença de *L. polyedrum* na água, em baixas concentrações ($\sim 10^2$ células L^{-1}). Esta espécie de microalga está inserida numa comunidade onde predominam os dinoflagelados, em particular as espécies *Dinophysis acuminata*, *Ceratium fusus*, *Ceratiu furca*, e *Scropsiella cf. trochoideia*. Estudos de produção de YTXs por diferentes estirpes de *L. polyedrum* isolados na costa portuguesa evidenciaram que nenhuma das estirpes era produtora de YTXs, em cultura [10]. Contudo, na Baía de Lisboa a estirpe *L. polyedrum* pode estar associada com a produção de YTXs. Durante o ano de 2005 nunca se registou em Cascais a presença de *Protoceratium* sp. e *Gonyaulax spinifera*, espécies associadas com a produção de YTXs na Ria Formosa e Ria de Aveiro [6].

Estudo comparativo de YTXs e toxinas DSP. Na estação fixa da Baía de Lisboa, verificou-se que a contaminação do mexilhão com YTXs ocorreu simultaneamente com a contaminação por DSP (Fig. 2).

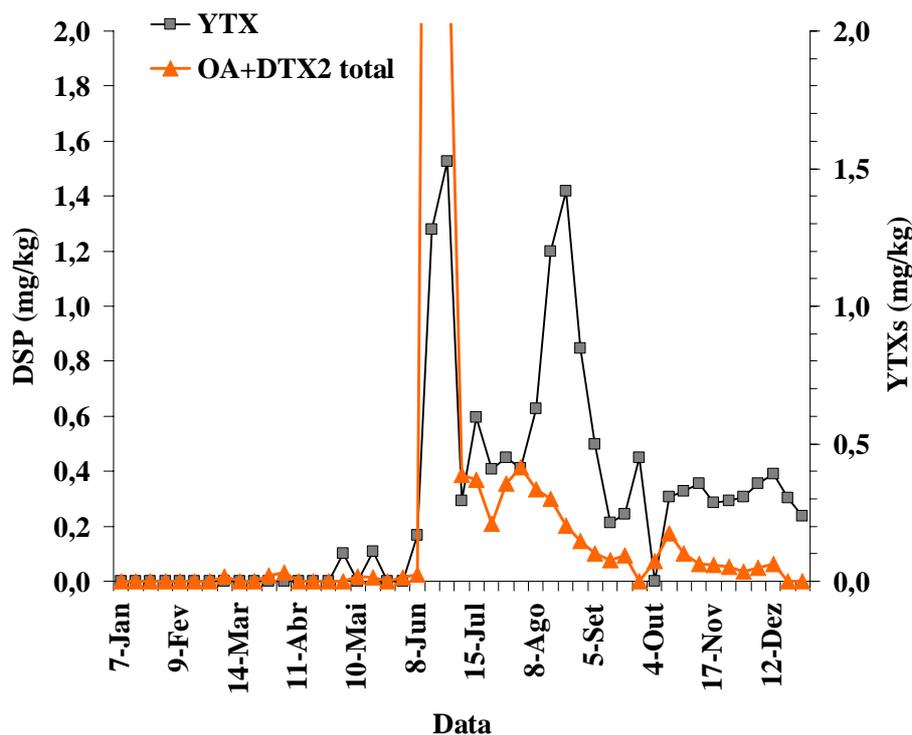


Figura 2. Concentração de DSP e YTXs no mexilhão (mg/kg) colhido na Baía de Lisboa.

No mês de Junho observou-se o máximo de concentração de ácido oadáico (AO) e dinofisistoxina-2 (DTX2) com 7,45 mg/kg, que coincide com a concentração máxima em YTXs, 1,53 mg/kg. Apesar de os máximos destas toxinas terem ocorrido em simultâneo, espécies produtoras podem proliferar independentemente. A contaminação de YTXs esteve associado com *L. polyedrum* e a elevada contaminação com AO esteve associada à presença de *D. acuminata* que atingiu uma concentração de 16.240 células/L.

Em Julho e Outubro registaram-se dois picos mais baixos de DSP com 0,41 mg Kg⁻¹ e 0,17 mg Kg⁻¹, respectivamente, sendo o pico de Outono associado à presença de *D. acuta*. Após cada pico de contaminação ocorreu uma diminuição das toxinas DSP.

Estudo de destoxificação de YTXs. Durante o período em que decorreu a depuração artificial verificou-se um aumento da concentração de YTXs e uma diminuição da massa de hepatopâncreas (HP) (Fig. 3).

A perda de massa do HP poderá estar associada à insuficiente quantidade de alimento fornecido durante o decorrer do estudo, e contribuído para o aumento da concentração de YTXs.

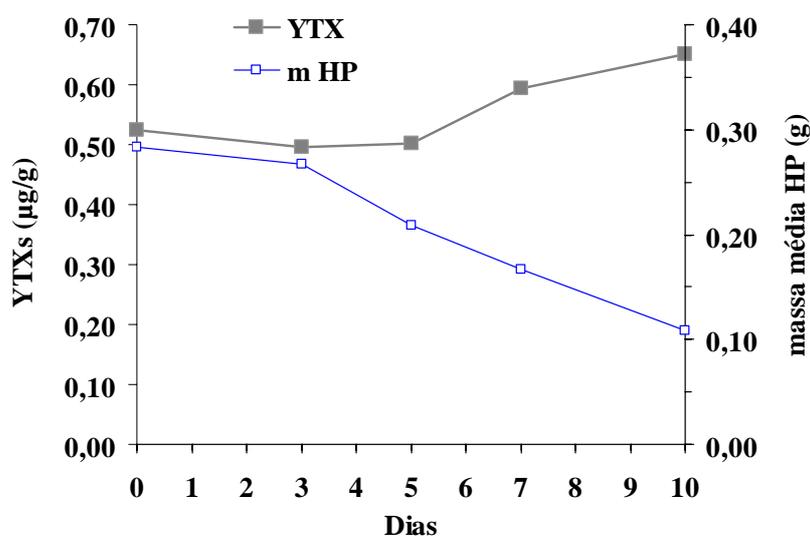


Figura 3. Concentração de YTXs no HP do mexilhão ($\mu\text{g g}^{-1}$) em função da massa média de HP(g) durante o período de destoxificação de 10 dias.

Anteriormente foram realizados ensaios laboratoriais de destoxificação de outras toxinas marinhas com mexilhão contaminado em meio natural. Os diferentes ensaios de destoxificação evidenciaram uma rápida eliminação das pectenotoxinas (PTX2 e PTX2sa), no entanto as dinofisistoxinas (DTXs) e saxitoxinas (STXs) permaneceram com uma concentração residual entre 20 – 38%, após uma semana de depuração [11,12]. Na tabela 1 apresenta-se o resumo destes resultados executados em condições semelhantes ao descrito neste trabalho.

Toxina	Concentração residual (%)
AO	20
DTX2	38
PTX2	<1
PTX2sa	<1
STXs	27
YTXs	> 100

Tabela 1. Concentração de toxina residual, expressa em %, quantificada em mexilhão da costa portuguesa ao fim de uma semana de depuração (dados obtidos em diferentes estudos [11,12]).

As iessotoxinas, surgem assim como as toxinas marinhas de eliminação mais lenta, uma vez que no final dos 10 dias de estudo não se registou qualquer diminuição da sua concentração. Resultados semelhantes foram obtidas num estudo realizado com mexilhão da Noruega, em que se

obtiveram tempos de semi-vida entre 20 e 60 dias, dependendo do análogo da iessotoxina [13].

Conclusão

Na Baía de Lisboa, as elevadas contaminações do mexilhão por YTXs foram associadas à presença da microalga *L. polyedrum*. Contudo, em cultura não se verificou a produção de YTXs pelas diferentes estirpes de *L. polyedrum* colhidas na Costa Portuguesa [10]. As espécies *Protoceratium* sp. e *G. spinifera*, associados com a contaminação registada na Ria de Aveiro, não foram observadas na estação de Lisboa no ano 2005 [6].

As elevadas concentrações de YTXs, em Junho e Agosto, foram associadas a baixas concentrações de células na água. Tal facto poderá estar relacionado com a lenta eliminação destas toxinas, confirmada através da depuração artificial.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelos programas QCAIII /med.4/ MARE – Segurança, Vigilância e Qualidade dos Moluscos Bivalves e QCAIII/POPesca/MARE – Caracterização ecológica da zona costeira – Plataforma Continental.

Os autores agradecem a disponibilidade demonstrada pelos técnicos do Departamento de Aquacultura, IPIMAR.

Referências

- [1] Samdal, I.A., J.A.B., Aasen, L.R. Briggs, E. Dahl, C.O. Miles. 2005. Comparison of ELISA and LC-MS analyses for yessotoxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*. 46:7-15.
- [2] Rhodes, L., P. McNabb, M. Salas, L. Briggs, V. Beuzenberg, Gladstone. 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae*. 5:148-155.
- [3] Aune, T., R. Sorby, T. Yasumoto, H. Ramstad, T. Landsverk. 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of YTX towards mice. *Toxicon*. 40:77-82.
- [4] Jornal Oficial L 139, 30.04.2004, p. 55.
- [5] Briggs, L.R., C.O. Miles, J.M. Fitzgerald, K.M. Ross, I. Garthwaite, N.R. Towers. 2004. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Yessotoxin and its Analogues. *J. Agric. Food Chem.* 52:5836-5842.
- [6] Gomes, S.S., P. Vale, M.J. Botelho, S.M. Rodrigues, M. Cerejo, M.G. Vilarinho. 2006. ELISA screening for yessotoxins in Portuguese shellfish. *Actas da "12th International Conference on Harmful Algae", Setembro de 2006* (aceite para publicação).
- [7] Moita, M.T., P.B. Oliveira, J.C. Mendes, A.S. Palma. 2003. Distribution of chlorophyll A and *Gymnodinium catenatum* associated with coastal upwelling plumes off central Portugal. *Acta Oecologia*. 24:125-132.
- [8] Hasle, G.R. 1978. The inverted microscope method. In: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. Monographs on Oceanic Methodology. Unesco. Paris. 88-96.
- [9] YTX ELISA pilot kit protocol. Biosense Laboratories.
- [10] Reis, M., A.C. Kraberg, K. Erler, B. Luckas, A. Amorim, K.H. Wiltshire. 2006. Ecotoxicology of different strains of *Lingulodinium polyedrum* from Portuguese

- coast. *Actas da "12th International Conference on Harmful Algae", Setembro de 2006* (aceite para publicação).
- [11] Vale, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon*. 44:123-134.
- [12] Artigas, M.L., A. Amorim, P. Vale, S.S. Gomes, M.J. Botelho, S.M. Rodrigues. 2006. Prolonged toxicity of *Scrobicularia plana* after PSP events and its relation to *Gymnodinium catenatum* cyst consumption and toxin depuration. *Actas da "12th International Conference on Harmful Algae", Setembro de 2006* (aceite para publicação).
- [13] Aasen, J., I.A. Samdal, C.O. Miles, E. Dahl, L.R. Briggs, T. Aune. 2005. Yessotoxin in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon*. 45:265-272.