

ANÁLISE DE ÁCIDO DOMÓICO EM MOLUSCOS CULTIVADOS NO LITORAL DE SANTA CATARINA.

LUIS ANTÔNIO DE OLIVEIRA PROENÇA & GABRIELA FARIA OLIVEIRA

Centro de Ciências da Terra e do Mar - Universidade do Vale do Itajaí
Rua Uruguai 360 - Itajaí - SC - 88 302-202
proenca@cttmar.univali.br

RESUMO

O ácido domóico é uma neurotoxina produzida por algumas diatomáceas do plâncton marinho. Durante o processo de filtração, no qual moluscos bivalves retiram seu alimento da água, algas e outras partículas orgânicas, o ácido domóico pode ser acumulado em seus tecidos, caso algas tóxicas estejam presentes na água. Conforme os níveis de acumulação de toxinas, os moluscos podem assim se tornarem impróprios para o consumo humano. Este trabalho relata a implantação do método de análise de ácido domóico por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por varredura com foto-diodo (HPLC-DAD) e os primeiros resultados da análise de amostras de moluscos cultivados. Foram tomadas 30 amostras entre os dias 31 de agosto de 1998 e 26 de fevereiro de 1999 em diferentes áreas da cultivo de moluscos no litoral norte do estado de Santa Catarina. Embora os organismos potencialmente produtores de ácido domóico, algas do gênero *Pseudo-nitzschia* ocorram em abundância na coluna de água, até o momento a toxina não foi detectada em moluscos cultivados na região.

Palavras chave: ácido domóico, diatomacea, ficotoxina, neurotoxina, molusco.

ABSTRACT

Domoic acid is a neurotoxin produced by marine diatoms. This toxin can be accumulated through the marine food chain, mainly by filtering mussels, and intoxicate human consumers. This paper reports the settings to determine the presence of domoic acid in mussel tissue by reversed phase liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and the results of analysis of samples from mussel culture in the coast of Santa Catarina. Thirty samples were taken between 31 of August of 1998 and 26 of February of 1999 from Armação do Itapocoroy bight and other culturing areas. Although species from *Pseudo-nitzschia*, a potentially toxin producer diatom, are highly abundant at the water column, until the present no toxin has been found in mussels.

INTRODUÇÃO

O ácido domóico é um aminoácido incluído no grupo kainoides, os quais são análogos ao ácido glutâmico e classificados como neuroexítantes ou exitoxinas, que interferem na neurotransmissão no cérebro (Bates et al. 1998) (Figura 1). O ácido domóico foi primeiramente isolado da macroalga *Condria armata* no final da década de 60 e era usado como emético (Takemoto e Daigo, 1958). Em 1987,

diversas pessoas foram intoxicadas depois de consumirem moluscos (*Mytilus edulis*) na costa leste do Canadá (Todd, 1993). Depois de muitos esforços analíticos, o ácido domóico foi caracterizado como agente causador das intoxicações. Diversos sintomas foram associados à intoxicação por esta toxina, incluindo náusea, vômitos, anorexia, dores abdominais, diarreia, letargia entre outros. Nos casos severos de intoxicação, causou a morte ou perda da memória recente. Este último

sintoma deu nome à síndrome, “envenenamento amnésico” (amnesic shellfish poisoning -ASP) (Todd, 1993). A fonte das toxinas foi identificada naquela época como oriunda da diatomacea planctônica *Nitzschia pungens f multiseriis* (*Pseudo-nitzschia pungens f multiseriis*). Posteriormente, a produção de ácido domóico foi observada em cultura de outras espécies do gênero *Pseudo-nitzschia* ou em amostras naturais do plâncton concentradas em rede. Em 1991, esta toxina foi detectada em anchovetas na costa oeste dos EUA e foi responsável pela mortandade massiva de pelicanos e biguás via bioacumulação (Work et al. 1993). Neste caso, a toxina foi produzida por *P. australis*. Ao mesmo tempo, níveis elevados de ácido domóico foram observados em moluscos filtradores. Frente a esta descoberta, a toxina passou a ser detectada em outras partes do globo (Bates, 1998) e o monitoramento de seus níveis em moluscos destinados ao consumo humano realizado em diferentes países (Andersen, 1996).

Até a descoberta da produção de ácido domóico por diatomáceas, a contaminação de moluscos por ficotoxinas em ambientes marinhos era causada exclusivamente por dinoflagelados. Estas toxinas incluem, por exemplo, toxinas paralisantes do grupo da

saxitoxina, produzidas por dinoflagelados dos gêneros *Gymnodinium*, *Alexandrium*, *Pyrodinium* (Proença et al., 1999); toxinas diarreicas do grupo do ácido okadaico, produzidas pelos gêneros *Prorocentrum* e *Dinophysis* (Proença et al., 1998) e toxinas neurológicas, derivadas da brevetoxina, produzidas pelo dinoflagelado *G. breve*. Com a descoberta da acumulação de ácido domóico em moluscos, a ocorrência de um determinado grupo de diatomacea foi também considerado como preocupante do ponto de vista sanitário.

Diversas espécies do gênero *Pseudo-nitzschia* tem sido identificadas como produtoras de ácido domóico (Villac et al. 1993, Fryxell et al. 1997). O gênero é cosmopolita e ocorre em grande abundância em águas costeiras de Santa Catarina e em regiões destinadas ao cultivo de moluscos (Rörig et al. 1998). Este fato, associado a crescente expansão no cultivo de moluscos marinhos ao longo do litoral catarinense, nos levou a investigar sobre a possível ocorrência do ácido domóico em moluscos cultivados em um projeto piloto de monitoramento de ficotoxinas em área de cultivo (Proença et al. 1997). O presente trabalho descreve a implantação de um método analítico de determinação do ácido domóico por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fotodiodo de varredura (HPLC-DAD) e apresenta os primeiros resultados de seu monitoramento em moluscos cultivados no litoral centro norte de Santa Catarina.

MATERIAIS E MÉTODOS

O método de análise de ácido domóico em moluscos seguiu aquele descrito em Wright e Quillian (1995) com pequenas modificações. O método baseia-se na separação cromatográfica do ácido domóico, com a identificação feita pelo seu tempo de retenção e características espectrais. As amostras de moluscos foram coletadas na região de cultivo de moluscos da Enseada de Armação

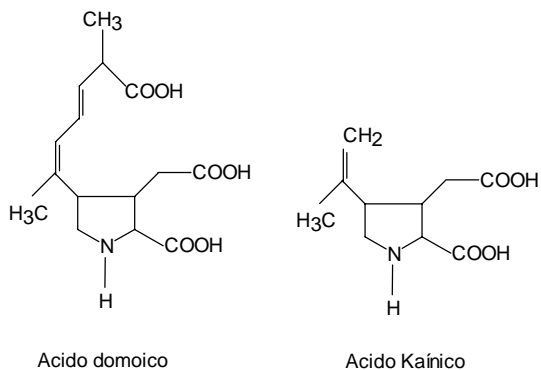


Figura 1: Estruturas do ácido domóico e ácido kainico.

do Itapocoroy, no município de Penha e outras áreas do estado, durante um programa piloto de monitoramento da ocorrência e níveis de ficotoxinas (Proença et al. 1997).

Os moluscos foram limpos externamente e a carne drenada após ser removida da concha. Cerca de 100 g de foram homogeneizadas (tritador Marconi M102). Uma sub-amostra de 4 gramas foi retirada após a homogeneização e analisada imediatamente ou estocada a -15 °C em frasco bem fechado. A sub-amostra foi acondicionada em um tubo de centrifuga graduado ao qual foram adicionados 16 ml de solução de metanol aquoso 50%. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Entre 10 e 15 ml do sobrenadante foram filtrados em filtro de fibra de vidro tipo GF/F (aproximadamente 0,7 µm de poro), acondicionados em frasco bem fechado e analisados imediatamente ou estocados em freezer. Antes da análise, 1 ml do sobrenadante filtrado foi diluído a 5 ml com água.

Para o monitoramento de ácido domóico em moluscos foram analisados extratos da glândula digestiva, hepatopâncreas, uma vez que é neste órgão que as toxinas são primeiramente acumuladas. Para a extração de ácido domóico do hepatopâncreas foram utilizados 4 gramas de tecido, sendo o procedimento igual ao descrito acima. Também foi analisada uma amostra de fitoplâncton com grande abundância de algas do gênero *Pseudo-nitzschia* retirada da coluna de água por concentração em rede de 25 µm. O material concentrado em rede foi retido em filtro de fibra de vidro e fração hidrossolúvel extraída em 2 ml de solução acetonitrila 10% por meio de ultra som (Sonics - Vibra Cell) até rompimento total das células. O aquecimento excessivo do extrato foi evitado por imersão do tubo de extração em água fria. O extrato foi clarificado e analisado conforme descrito abaixo.

A cromatografia foi feita em um sistema de CLAE Shimadzu LC10 composto de: sistema de degassificação por borbulhamento

de hélio, uma bomba de alta pressão LC10-AD, capaz de realizar gradientes quaternários, uma válvula seletora de solventes FLD-10A, um detector de absorvância de fotodiodo SPDM-10A com 512 elementos (resolução de 1 nm), para detecção entre 200 e 600 nm, e uma controladora CBM-10A. As amostras, diluídas na fase móvel, foram injetadas manualmente por meio de um injetor Rheodine 7725i equipado com um *loop* de 20 µl. Os dados gerados durante a cromatografia foram armazenados e processados em micro-computador, utilizando-se o programa de aquisição LC10, também da Shimadzu. A cromatografia ocorreu em uma coluna Waters Nova-pack de 3,9 x 150 mm, empacotada com partículas de 4µ de octadecilsilano (ODS). A fase móvel consistiu em solução de acetonitrila 10% acidificada com ácido trifluoroacético (TFA, 0,1%). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o fluxo da fase móvel em 0,7 ml.min⁻¹. O volume injetado foi de 10 ou 20 µl e o tempo de corrida de 15 minutos. Todos reagentes utilizados foram de grau espectroscópico e a água filtrada em sistema Milli-Q.

O tempo de retenção e o espectro de absorvância do ácido domoico foram obtidos por análise de padrão da toxina (Sigma # D6152). Entre interferentes desta análise se encontra o triptofano. Este aminoácido pode interferir na análise de tecido animal devido a ser eluído em um tempo de retenção próximo ao ácido domóico (Wright e Quillian, 1995). Assim, a cromatografia do triptofano foi realizada para a identificação de seu tempo de retenção no sistema utilizado e eliminação de sua interferência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 (a) mostra os cromatogramas da análise dos padrões de ácido domóico e triptofano. O sistema de cromatografia utilizado separou satisfatoriamente estes dois compostos, comprovando a eliminação de um

possível interferente na análise de tecido (Wright e Quillian, 1995). A confirmação dos compostos foi dada também pelos espectros de absorção, mostrados na Figura 3. Assim, a caracterização do ácido domóico se deu pelo tempo de retenção (aproximadamente 7,8 min) e espectro de absorção, que apresentou um máximo em 241 nm. Já o triptofano, apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 6,3 min e um máximo de absorção em 218 nm. O pico de triptofano foi observado em quase todas as 30 amostras de moluscos analisadas, conforme mostra a Figura 2b.

Para este estudo, amostras de moluscos foram coletadas na Enseada de Armação do Itapocoroy e outras regiões de cultivo de moluscos do litoral Norte de Santa Catarina, de entre os dias 31 de agosto de 1998 e 26 de fevereiro de 1999. Em nenhuma

das amostras analisadas foi detectado o ácido domóico. O limite de detecção do método empregado, que usa fotiodo de varredura, está em torno de $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de tecido, o que equivale a 10 ng.ml^{-1} , conforme a extração (Wright e Quillian, 1995). Este limite está bem abaixo dos $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ de tecido recomendado como seguro para o consumo humano em diferentes países (Andersen 1996). Assim, os moluscos cultivados estariam próprios para o consumo, ao menos no que se refere a presença do ácido domóico, uma vez que outras toxinas podem ocorrer (Proença et al. 1998, Proença et al. 1999). No entanto, estes resultados devem ser vistos com cautela. Trabalhos realizados na região de cultivo e proximidades apontam para a ocorrência de grande abundância de indivíduos do gênero *Pseudo-nitzschia* (Rörig et al. 1998).

Aparentemente, as espécies que ocorrem na região não são produtoras de toxinas, uma vez que não foi encontrado ácido domóico nos moluscos, mesmo em situações de grande abundância de *Pseudo-nitzschia* na água. Porém, este resultado pode não ser definitivo. Os mecanismos de produção de ácido domóico por *Pseudo-nitzschia* ainda são desconhecidos e dados apontam para uma grande variabilidade na produção da toxina

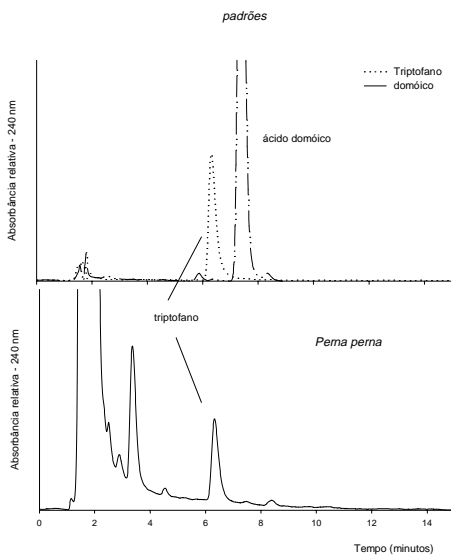


Figura 2: Registro cromatográfico a 240 nm da análise dos padrões de ácido domóico e triptofano (a) e da carne do bivalve *Perna perna* (b). Coluna Whaters Nova-pack de 3,9 x 150 mm, empacotada com partículas de 4 μ de octadecilsilano (ODS). A fase móvel foi constituída de acetonitrila 10% com 0,1 % de ácido trifluoroacético e a corrida mantida em a 40 °C, com um fluxo de 0,7 ml.min⁻¹.

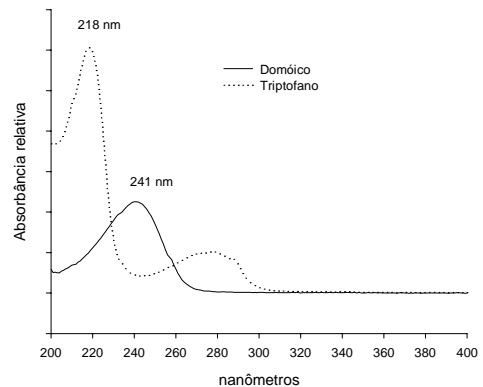


Figura 3: Espectro de absorção do ácido domóico e triptofano em fase móvel.

entre cepas de uma mesma espécie ou mesmo dentro de uma única cepa (Bates, 1998). Clones de *P. australis* mantidos continuamente sob luz não produziram ácido domóico, no entanto, em um ciclo 12:12 horas dia:noite, passaram a produzir a toxina (Villac. et al. 1993). O estado fisiológico dos organismos também é importante. A maior produção de ácido domóico por *P. pungens* cf *multiseries* em cultura ocorreu no período de cessão da divisão celular ou senescência, em presença de luz e excesso de nitrogênio (Bates et al. 1991). Assim, é possível que mesmo sem a produção de ácido domóico, as espécies que ocorrem na região podem se apresentar como tóxicas conforme as condições ambientais.

Um fator de complicação para a abordagem do problema é a identificação das espécies do gênero *Pseudo-nitzschia*, que depende de treinamento específico, preparação de lâminas e, em alguns casos, de observação em microscopia eletrônica. O levantamento das espécies deste gênero que ocorrem na região ainda necessita ser feito. Do ponto de vista de controle sanitário, a exemplo de experiências anteriores em outros países (Andersen, 1996) e na região de estudos (Proença et al. 1998, Proença et al. 1999), o acompanhamento das mudanças da comunidade do plâncton, composição e biomassa, associado a testes de toxicidade em moluscos cultivados, constitui uma importante ferramenta para assegurar a qualidade do produto cultivado.

AGRADECIMENTOS

Parte dos fundos destinados a realização deste trabalho foram financiados pelo Projeto PED-SC, convênio no. 96CV078, MMA, PNMA. Agradecemos a Márcio Silva Tamanaha e Nagibe de Souza pelo valioso auxílio na coleta e análise do material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, P. 1996. Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. 1-102. IOC Technical Series, N 44, UNESCO, 102p.
- Bates, S.S.; De Freitas, A.S.W.; Poklington, R.; Quillian, M.A.; Smith, J.C. & J. Worms. 1991. Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f *multiseries* in culture: nutrients and irradiance. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 48:1136-1144
- Bates, S.S. 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (eds) Physiological ecology of harmful algal blooms. Springer, Berlin, pp 405-426
- Fryxell, G.A.; Villac, M.C. & L.P. Saphiro. 1997. The occurrence of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* (bacillariophyceae) on the West Coast of the USA, 1920-1996: a review. Phycologia. 36:419-437
- Proença, L.A.; Rörig, L.R. & M.A. Barreiros. 1997. A pilot HAB monitoring program in southern Brazil. VIII International Conference on Harmful Algae, Vigo, Epanha. 25-29 de Junho. P. 168
- Proença, L.A.; Lagos, N.; Rörig, L.R.; Silva, M. & S. Guimaraes. 1999. Occurrence of paralytic shellfish poisoning - PSP in Southern Brazilian Waters. Ciência e Cultura. 50:458-462
- Proença L.A.; Schmitt, F.; Costa, T. & L.R. Rörig. 1998. Just a diarrhea? Evidences of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina - Brazil. Ciência e Cultura. 50:458-462
- Rörig, L.; Lugli, D.O.; Guimaraes, S.; Proença, L.A.; Manzoni, G. & A. Marenzi. No prelo. Monitoração de microalgas planctônicas potencialmente tóxicas na área de maricultura da Enseada de Armação de Itapocoroy - Penha - SC. Notas Técnicas da FACIMAR
- Takemoto, T. & K. Daigo. 1958. Constituents of *Chondria armata*. Chem Pharm Bull

6:378-580

Todd, E.C.D. 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - A Review. *Journal of Food Protection*. 56: 69-83.

Villac, M.C.; Roelke, D.L.; Chavez, F.P.; Cifuentes, L.A. & G.A. Fryxell. 1993. *Pseudonitzschia australis* Frenguelli and related species from the west coast of the USA: Occurrence and domoic acid production. *Journal of Shellfish Research* 12:457-465

Work, T.M.; Beale, A.M. & L. Fritz. 1993. Domoic acid intoxication of brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) in California. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, pp 643-649

Wright, J.L.C. & M.A. Quillian. 1995. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (eds). *Manual on harmful marine microalgae*. UNESCO, Paris, pp 113-133