

PESQUISA DE TOXINA PARALISANTE DOS MOLUSCOS EM PESCADO *

Leda C.A. LAMARDO **
Dilma Scala GELLI ***
Myrna SABINO **

RIALA6/614

LAMARDO, L.C.A.; GELLI, D.S. & SABINO, M. — Pesquisa de toxina paralisante dos moluscos em pescado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):87-90, 1986.

RESUMO: A toxina paralisante dos moluscos foi pesquisada em amostras de ostras, mariscos e peixes, colhidas em diferentes praias do litoral paulista. Foram empregados dois procedimentos analíticos: o químico e o bioensaio. Em decorrência do aparecimento de manchas avermelhadas nas águas e mortalidade de peixes na região, no período de agosto a setembro de 1983, suspeitou-se do fenômeno de "maré vermelha". A toxina não foi detectada em nenhuma das amostras, pelos dois métodos empregados, que permitem segurança dos resultados, considerando que os testes foram realizados com o padrão de saxitoxina.

DESCRITORES: toxina paralisante dos moluscos, em peixe; saxitoxina, determinação em ostras, mariscos, peixes; espectrofluorimetria e bioensaio.

INTRODUÇÃO

A toxina paralisante dos moluscos é uma substância não-protéica responsável por intoxicações letais^{9, 21}. Esta toxina é formada por um grupo bem caracterizado de tetraidropurinas. Destas, a saxitoxina foi a primeira a ser conhecida. Posteriormente 12 outros componentes com estrutura química bastante próxima da saxitoxina foram descritos, tendo recebido designações diferentes, tais como: neosaxitoxina e gonyautoxina^{7, 11}.

A toxina paralisante dos moluscos é uma neurotoxina produzida por algas da família dos dinoflagelados, em especial do gênero *Gonyaulax* (*G. catenella*, *G. tamarensis*)^{9, 11, 21, 25}. Em determinadas condições ambientais (temperatura, salinidade, luz), a população de dinoflagelados pode aumentar desproporcionalmente em relação aos demais organismos marinhos, componentes do plâncton. A toxina é, então, produzida, liberada e se solubiliza na água. Como os moluscos bivalvos (mexilhões, mariscos, ostras) conse-

guem sua alimentação por sifonagem da água e retenção dos substratos dispersos na mesma, acumulam nos seus organismos esta toxina produzida pelas algas. Se ingeridos, estes moluscos veiculam a toxina ao organismo do animal predador e/ou consumidor humano. Ainda, outros organismos que compõem o plâncton marinho podem também atuar como veículo. Neste caso, a toxina pode também ser encontrada em outro pescado, como caranguejos, lagostas, peixes (de pequeno e médio porte). Os peixes são afetados por esta toxina que é causa de mortalidade desses animais. Além disso, aves marinhas e mamíferos são, também, sensíveis a esta classe de substância tóxica.

A toxina paralisante dos moluscos atua no organismo sensível bloqueando o impulso dos nervos periféricos e dos músculos do esqueleto, por interferir no balanço do sódio a nível de transmissão nervosa^{9, 11, 12, 13, 27, 28}.

As primeiras observações e investigações laboratoriais foram feitas na Califórnia¹⁷,

* Realizado nas Seções de Química Biológica e de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Da Seção de Química Biológica.

*** Da Seção de Microbiologia Alimentar.

em 1928. A extração da toxina foi efetuada nos moluscos marinhos *Saxidomus giganteus* (Alaska) e *Mytilus californianus* (Califórnia), tendo, por isto, recebido a denominação geral de saxitoxina^{4, 5, 18, 23}. Posteriormente, verificou-se que a saxitoxina não é a única toxina produzida no ambiente marinho pela explosão demográfica de determinadas algas^{20, 21}. A multiplicação dessas algas se dá por fatores climáticos, hidrográficos e necessidades nutricionais específicas de cada grupo de organismo, originando o fenômeno conhecido como "maré-vermelha"^{9, 10, 11, 20, 21, 22}.

As intoxicações por esta etiologia são caracterizadas por sensação de entorpecimento dos lábios, da língua, da garganta e das extremidades do corpo, acompanhada de náuseas, vômitos e dificuldade respiratória, podendo levar à paralisia respiratória e/ou cardíaca, que se segue(m) após cerca de 30 minutos da ingestão de moluscos e crustáceos marinhos contaminados, podendo levar a casos fatais^{8, 9, 21}.

Em maio de 1978, na Cidade do Cabo (África), 17 pessoas foram afetadas após a ingestão de produtos marinhos, apresentando sintomas típicos daquele tipo de intoxicação¹⁹. O mesmo aconteceu em 1980, no Uruguai, onde cerca de 60 pessoas foram afetadas pelos mesmos sintomas, logo após a ingestão de moluscos. Levantamento realizado de 1980 a 1982, neste país, mostrou maior número de pessoas contaminadas em 1980⁷. O diagnóstico laboratorial pode ser feito através de testes químicos^{3, 4, 15, 16, 26}, biológicos^{1, 2, 14, 22, 24} e, mais recentemente, imunoenzimático (ELISA⁶), para determinação da presença da toxina paralisante nas amostras.

No período de agosto a setembro de 1983, no litoral Sul paulista, foi constatada a mortalidade de peixes e o aparecimento de manchas avermelhadas nas águas costeiras. Amostras de peixes, ostras e mariscos desta região foram coletadas e encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para verificar se estava presente a toxina paralisante dos moluscos, relacionada com o fenômeno "maré-vermelha".

MATERIAL

Foram analisadas 32 amostras, sendo 16 de peixes, 4 de ostras e 12 de mariscos. As unidades que compunham cada amostra eram variáveis, pois dependiam do tipo e dimensões do material colhido, e pesavam por volta de 2 quilogramas por espécie.

As amostras foram coletadas por barcos pesqueiros, em várias praias do litoral paulista, Indaiá, São Lourenço, Itaguaré, Pere-

quê, Tombo, Guarujá, Ilha Monte de Trigo, pelos Agentes de Saneamento de Vigilância da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, e no comércio destas localidades. Foram acondicionadas em sacos plásticos, transportadas e entregues sob refrigeração (4-10 °C), em 3 remessas diferentes.

As amostras enviadas receberam o seguinte tratamento: os peixes foram limpos, escamados, e sua pele retirada; as vísceras e a carne foram moídas e analisadas separadamente; os moluscos foram limpos e separados das valvas e suas vísceras e carne foram moídas e analisadas como um todo. As alíquotas retiradas para análise foram de 2,0 g para a determinação química e de 100,0 g para o bioensaio.

MÉTODO

Para a extração e determinação química da toxina foi utilizado o método preconizado por BATES & RAPOPORT^{3, 4} e, para o bioensaio, foram usados os métodos da APHA¹ e da AOAC².

a) Preparo da coluna de troca iônica

Foi utilizada uma coluna de polipropileno*, empacotada com 2 ml de resina de troca iônica (Bio-Rex 70, 50-100 mesh) previamente equilibrada com solução-tampão de acetato de sódio 0,2 M e pH 5,0.

A resina foi preparada com sucessivas lavagens com água, solução de ácido clorídrico, hidróxido de sódio, água e finalmente com vários volumes de solução de ácido acético 0,2 M, acertando o pH a 5,0 com ácido clorídrico. A seguir, lavou-se com solução-tampão de acetato de sódio 0,2 M e pH 5,0. A resina foi então estocada nesta solução-tampão³.

b) Procedimento analítico da amostra

Para o método químico, foi feita a extração e oxidação da toxina, observada a fluorescência do composto formado. Para o bioensaio, foi feita a inoculação do extrato final em camundongos. Baseou-se na seguinte sequência: a 2,0 g de amostra moída e homogeneizada adicionar 2,0 ml de ácido tricloroacético 0,5 M, misturar e aquecer a 85-90 °C, por 10 minutos. Misturar novamente por 5 a 10 minutos. Esfriar em banho de gelo a 20 °C. Adicionar 0,2 ml de solução de hidróxido de sódio a 10% com agitação até pH 5,0-5,5. Centrifugar durante 10 minutos. Transferir o sobrenadante para a coluna de troca iônica, previamente equilibrada. Eluir a coluna com 30 ml de solução-tampão de acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0, e com 25 ml de água e 1,0 ml de solução de ácido clorídrico 0,5 M. Descartar os eluentes. Eluir a coluna com 4,0 ml de solução de ácido clorídrico

* Coluna de polipropileno (10 mm diam. int. x 50 mm), equipada com filtro plástico e reservatório.

0,5 M, coletar o eluente e dividir em 2 porções iguais. Numa destas porções fazer o bioensaio com injeções intraperitoneais em camundongos. Na outra porção restante, proceder à análise química, subdividindo-a novamente em 2 porções; a uma destas, adicionar 2,0 ml de solução de hidróxido de sódio 1,2 M e 0,05 ml de água, misturar e centrifugar; este será o branco utilizado no espectrofluorímetro Perkin-Elmer 204-A 0333). À outra porção restante, adicionar 2,0 ml de solução de hidróxido de sódio 1,2 M e 0,5 ml de água oxigenada a 10%. Misturar e centrifugar. Transferir o sobrenadante para cubetas do espectrofluorímetro e, 40 minutos após a adição da água oxigenada, acertar o pH com ácido acético glacial (aproximadamente 0,15 ml). Observar a fluorescência do composto formado.

c) *Bioensaio*

Foi realizado em alíquota retirada a partir de outra porção da amostra, com 100 g de material homogeneizado e triturado, à qual se adicionaram 100 ml de ácido clorídrico 0,1 N, acertando-se o pH a 3. Quando necessário, o pH era ajustado da seguinte maneira: aquecer a mistura durante 5 minutos, esfriar a baixa temperatura e acertar

o pH entre 2 a 4 (nunca maior que 4,5). Diluir até 200 ml. Centrifugar. Inocular o sobrenadante limpo em camundongos, intraperitonealmente, observar a reação do animal para verificação da ocorrência do óbito por intoxicação. Proceder da mesma maneira com o padrão da saxitoxina em condições apropriadas.

RESULTADO E CONCLUSÃO

A toxina paralisante dos moluscos (saxitoxina) não foi detectada nos peixes e moluscos analisados. A mortalidade dos peixes pode ter tido outra causa, não estando relacionada com o fenômeno "maré-vermelha". Isto não significa a inexistência de organismos produtores e veiculadores da toxina no nosso ambiente. No entanto, estes fatos não excluem a necessidade de manutenção da vigilância sanitária das praias e dos produtos marinhos.

Agradecimento

Agradecemos à Sra. Ofelina Felix Roberto, pelo auxílio prestado na elaboração deste trabalho.

RIALA6/614

LAMARDO, L.C.A.; GELLI, D.S. & SABINO, M. — Search for paralytic shellfish poison in fish. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):87-90, 1986.

ABSTRACT: The paralytic shellfish poison was searched in samples of oysters, shellfishes and fishes caught in various beaches of São Paulo state's shore. Two analytical procedures, one chemical and a bioassay, were employed. Red spots in water and dead fishes appeared in August to September, 1983. This was suspicious of "red tide" occurrence. It was not detected toxin by the performance of the two methods. The results are considered significant, because it was used a saxitoxin standard for control of the tests.

DESCRIPTORS: paralytic shellfish poison in fish, determination; saxitoxin, determination in oysters, shellfishes and fishes; fluorimetric method, bioassay.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — *Recommended procedures of the examination of sea water and shellfish*. 4thed. New York, N.Y., APHA, 1970. p. 57-66.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of the Association of Official analytical chemists*. 12thed. Washington, D.C., AOAC, 1975. p. 319-21. [itens 18.070-18.076]
3. BATES, H.A.; KOSTRIKEN, R. & RAPOPORT, H. — A chemical assay for saxitoxin improvements and modifications. *J. agric. Food Chem.*, 26:252-4, 1978.
4. BATES, H.A. & RAPOPORT, H. — A chemical assay of saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J. agric. Food Chem.*, 23: 237-9, 1975.
5. BORDNER, J.; THIESSAN, W.E.; BATES, H.A. & RAPOPORT, H. — The structure of a crystalline derivative of saxitoxin. The structure of saxitoxin. *J. am. chem. Soc.*, 97:6008-12, 1975.

6. CHU, F.S. & FAN, T.S.L. — Indirect enzyme immunosorbent assay of saxitoxin in shellfish. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 68:13-16, 1985.
7. DAVISON, P. & MEDINA, D. — Control de la toxina paralitica de los moluscos en el Uruguay. *Higiene alim.*, São Paulo, 3: 38-43, 1984.
8. DEWBERRY, E.B. — *Food poisoning. Food-born infection and intoxications nature, history, and causation, measures for prevention and control.* 4th ed. London, Leonard Hill, 1959. p. 274-8.
9. HALSTEAD, B.W. & SCHANTZ, E.J. — *Paralytic shellfish poisoning.* Geneva, World Health Organization, 1984. 60 p. (WHO offset publ. n.º 79)
10. HUGHES, J.M. & MERSON, M.H. — Fish and shellfish poisoning. *New Engl. J. Med.*, 295:1117-20, 1976.
11. INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS) — *Aquatic (marine and freshwater) biotoxins.* Geneva, WHO, 1984. p. 9-13; 29-41. (Environmental Health Criteria 37)
12. KAO, C.Y. — Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. *Fed. Proc.*, 31:1117-23, 1972.
13. KAO, C.Y. & NISHIYAMA, A. — Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. *J. Physiol.*, 180:50-66, 1965.
14. McFARREN, E.F. — Report on collaborative studies of the bioassay for paralytic shellfish poison. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 42:263-71, 1959.
15. McFARREN, E.F.; SCHANTZ, E.J.; CAMPBELL, J.E. & LEWIS, K.H. — Chemical determination of paralytic shellfish poison in clams. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 41:168-77, 1958.
16. McFARREN, E.F.; SCHANTZ, E.J.; CAMPBELL, J.E. & LEWIS, K.H. — A modified Jaffe test for determination of paralytic shellfish poison. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 42:399-404, 1959.
17. MEYER, K.F.; SOMMER, H. & SCHOEHNHOLZ, P. — Mussel poisoning. *J. Prev. Med.*, 2:365-94, 1928.
18. MOLD, J.D.; BOWDEN, J.P.; STANGER, D.W.; MAURRER, J.E.; LYNCH, J.M.; WYLER, R.S.; SCHANTZ, E.J. & RIEGEL, B. — Paralytic shellfish poison. VII. Evidence for the purity of the poison isolated from toxic clams and mussels. *J. am. chem. Soc.*, 79:5235-8, 1957.
19. POPKISS, M.E.E.; HORSTMAN, D.A. & HARPUR, D. — Paralytic shellfish poisoning: a report of 17 cases in Cape Town. *Shouth afr. med. J.*, 55:1017-1023, 1979.
20. RIEGEL, B.; STANGER, D.W.; WIKHOLM, D.M.; MOLD, J.D. & SOMMER, H. — Paralytic shellfish poison. V. The primary source of the poison, the marine plankton organism, *Gonyaulax catenella.* *J. biol. Chem.*, 177:7-11, 1949.
21. SCHANTZ, E.J.; LYNCH, J.M.; VAYVADA, G.; MATSUMOTO, K. & RAPOPORT, H. — The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture. *Biochemistry*, 5: 1191-5, 1966.
22. SCHANTZ, E.J.; McFARREN, E.F.; SCHAFER, M.L. & LEWIS, K.H. — Purified shellfish poison for bioassay standardization. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 41:160-8, 1958.
23. SCHANTZ, E.J.; MOLD, J.D.; STANGER, D.W.; SHAVEL, J.; RIEL, F.J.; BOWDEN, J.P.; LYNCH, J.M.; WYLER, R.S.; RIEGEL, B. & SOMMER, H. — Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissues. *J. amer. chem. Soc.*, 79:5230-5, 1957.
24. SOMMER, H. & MEYER, K.F. — Paralytic shellfish poisoning. *Arch. Pathol.*, 24: 560-98, 1937.
25. SOMMER, H.; WHEDON, W.F.; KOFOID, C.A. & STOHLER, R. — Relation of paralytic shellfish poison to certain plankton organisms of the genus *Gonyaulax.* *Arch. Pathol.*, 24:537-59, 1937.
26. SULLIVAN, J.J. & IWAOKA, W.T. — High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 66:297-303, 1983.
27. WATTS, J.S.; REILLY, J.; COSTA, F.M. & KROP, S. — Acute toxicity of paralytic shellfish poison in rats of different ages. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 8:286-94, 1966.
28. WIBERG, G.S. & STEPHENSON, N.R. — Toxicologic studies on paralytic shellfish poison. *Toxicol. appl. Pharmac.*, 2:607-15, 1960.