

DETERMINAÇÃO, POR TITULAÇÃO BIOLÓGICA, DE TOXINAS EM MOLUSCOS

Determination of mollusc poisoning by biological titration

Esmerino de Oliveira Magalhães-Neto¹

RESUMO

Este trabalho trata do emprego do método de titulação biológica na detecção de toxinas PSP (paralytic shellfish poisoning) em moluscos bivalves ocorrentes no Estado do Ceará (Brasil). Foram preparados extratos musculares de quatro espécies de moluscos: itã = Iphigenia brasiliana; unha-de-velho = Tagellus plebeus; picholeta (fam. Unionidae); e sururu = Mytella guyanensis. Os extratos foram inoculados por via intraperitoneal em ratos de laboratório (Mus musculus). As cobaias apresentaram elevadas taxas de sobrevivência.

Palavras-chaves: Bivalvia, biotoxinas, ratos de laboratório, titulação biológica.

ABSTRACT

In this study a biological titration method was used in order to detect PSP (paralytic shellfish poisoning) toxins in bivalves collected in the coastal region of Ceará State (Brazil). Extracts were prepared from the edible parts of the following four species: itã = Iphigenia brasiliana; unha-de-velho = Tagellus plebeus; picholeta (family Unionidae); e sururu = Mytella guyanensis. These extracts were injected intraperitoneally in a number of laboratory mice (Mus musculus). The mice submitted to those treatments presented a relatively high survival rate.

Keywords: Bivalvia, biotoxins, mice, biological titration.

¹ Pesquisador do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. Av. da Abolição, 3207 - 60165-081, Fortaleza-Ceará, Brasil.

INTRODUÇÃO

O fitoplâncton faz parte essencial da alimentação de moluscos filtradores, a exemplo das ostras e mexilhões, que concentram ativamente partículas em suspensão na água, inclusive toxinas, algumas das quais acarretam problemas de sanidade pública (Wood, 1976). Felizmente, os aludidos moluscos contam com mecanismos de autodepuração periódica de certas toxinas (Whitaker, 1990), e oferecem maiores riscos quando consumidos *in natura*.

Caracterizadas por sua manifestação esporádica, as biotoxinas podem ser divididas em dois grandes grupos biológicos: fitotoxinas (isto é, os alcalóides) e zootoxinas (orais e parenterais) (Halstead, 1962).

As seguintes toxinas propagadas por moluscos bivalves são de particular relevância para a indústria pesqueira em geral (Wright, 1989):

- PSP (*paralytic shellfish poisoning*), cujos venenos paralisantes - saxitoxina (STX) e tetradoxina - são veiculados por protozoários dinoflagelados.
- ASP (*amnesic shellfish poisoning*), veneno amnésico que tem por princípio tóxico um aminoácido neuroexcitante (*domoic acid*), registrado em *bloom* de diatomáceas.
- DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), cujos venenos diarréicos, propagados por dinoflagelados, são o OKA (*okadaic acid*) e seus derivados DTX - 1 e DTX - 2.

No presente trabalho se intenta verificar casos de biotoxinas em moluscos bivalves consumidos no Estado do Ceará (Brasil), através de bioensaios com ratos de laboratório, utilizando-se uma técnica de titulação biológica específica para PSP.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de junho de 1995 a julho de 1997, foram levados a efeito sete bioensaios, cada um dos quais envolvendo uma amostra constituída de um quilograma de moluscos inteiros e seis ratos brancos (*Mus musculus*) (tabela I).

Os moluscos pertenciam às seguintes espécies: itã = *Iphigenia brasiliensis*; unha-de-velho = *Tagellus plebeus*; picholeta (fam. Unionidae); e sururu = *Mytella guyanensis* (figuras 1 a 4). As duas primeiras espécies foram adquiridas em Fortaleza, e as demais, respectivamente, em Caucaia e Fortim, Estado do Ceará.

O itã foi testado trimestralmente, em um ciclo anual, sendo as três outras espécies consideradas a nível preliminar, ou seja, conduziu-se apenas um ensaio para cada espécie.

Para as análises foram selecionados apenas moluscos vivos, estado comprovado pela reação do animal, que mantinha as conchas fechadas. Em seguida,

estas foram abertas com faca, retirando-se manualmente a carne para elaboração dos extratos (50%, p/v), conforme Wood (1976).

De cada amostra, uma vez descartado o líquido orgânico, retirou-se uma porção de 100 g de músculo, macerando-a em gral de porcelana. Em seguida, o material foi acrescido de 100 ml de HCl 0,1N, e submetido a cocção por 5 minutos. Concluído o processo de digestão, a mistura foi retirada do fogo e deixada em repouso à temperatura ambiente (23 - 24°C). Em seguida, completou-se o volume da mistura para 200 ml, com a solução de ácido clorídrico original, retirando-se uma alíquota de 20 ml, por sua vez centrifugada a 3000 rpm em centrifuga clínica IEC, durante 5 minutos. Finalmente, decantou-se o sobrenadante, que constituiu o extrato ácido, cujo pH foi medido em pHmetro HANNA.

Os 42 ratos, pesando entre 15 e 23 g, foram adquiridos em feiras do município de Fortaleza, sendo, no laboratório, cada grupo de seis animais submetido a um período de adaptação de 24 horas. Nesta fase, foram utilizadas duas gaiolas de tela de arame, medindo 32,0 x 28,0 x 17,5 cm e a proporção de três animais/gaiola, mantendo-os em local ventilado, sob constante vigilância, de modo a não se agredirem. Nesse período, receberam água, queijo e uma mistura aquosa à base de arrozina (20%, p/v), tentando-se atender às suas necessidades nutritivas básicas.

Em cada animal administrou-se, por via intraperitoneal, 1ml do extrato, com o auxílio de uma seringa descartável de 1,5 c.c., da marca Ibrasganma - CBO. Após esta intervenção, cada uma das seis cobaias de cada grupo foi transferida para uma terceira gaiola de 25,0 x 14,5 x 14,0 cm, onde permaneceu sob observação, apreciando-se o tempo transcorrido entre a inoculação do extrato e a reação das cobaias; os casos de óbito foram registrados ao constatar-se a última respiração do animal.

A concentração de toxina pode ser obtida com base na Tabela II, que trata da relação entre o tempo de morte da cobaia e as unidades-camundongo para o extrato de veneno paralisante, devidamente corrigida pelo peso da cobaia. Uma unidade-camundongo corresponde a 0,2 µg de toxina por 100 g de tecido. Segundo Wood (1976), os níveis de PSP inofensivos aos seres humanos devem estar nos níveis de ≤ 400 unidades - camundongo por 100 g de tecido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela I mostra que a maioria das amostras de moluscos estava isenta de toxinas PSP e, considerando-se as quarenta e duas cobaias testadas, houve 95,2% de sobrevivência. Apenas os extratos de itã apresentaram, nos I e IV trimestres de 1996, indícios

Tabela I - Frequência absoluta (x) de sobrevivência (S) e óbito (O) de machos (m) e fêmeas (f) de cobaias tratadas com extratos de moluscos bivalves.

Cobaias			Mytella guyanensis		Fam. Unionidae		Iphigenia brasiliana								Tagellus plebeus	
No	eso (g)	Sexo	II trim./95				I trim./96		II trim./96		III trim./96		IV trim./96		II trim./97	
			S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O
01	23,0	m					X									
02	22,5	f					X									
03	20,0	f						X								
04	22,5	m					X									
05	22,0	f					X									
06	22,5	f					X									
07	20,5	m							X							
08	20,0	f							X							
09	22,0	f							X							
10	22,5	f							X							
11	20,0	f							X							
12	20,0	f							X							
13	22,0	m									X					
14	20,0	f									X					
15	19,0	f									X					
16	21,0	m									X					
17	21,0	m									X					
18	18,0	f									X					
19	23,0	m											X			
20	25,2	m											X			
21	21,0	f											X			
22	20,0	f											X			
23	22,0	m											X			
24	20,0	f											X			
25	22,0	m				X										
26	20,0	m				X										
27	21,0	m				X										
28	20,0	f				X										
29	21,5	f				X										
30	20,5	f				X										
31	20,0	f	X													
32	21,0	f	X													
33	20,0	m	X													
34	22,0	m	X													
35	20,0	f	X													
36	20,5	m	X													
37	20,0	f														X
38	21,0	m														X
39	19,0	f														X
40	21,0	m														X
41	15,0	m														X
42	20,0	m														X

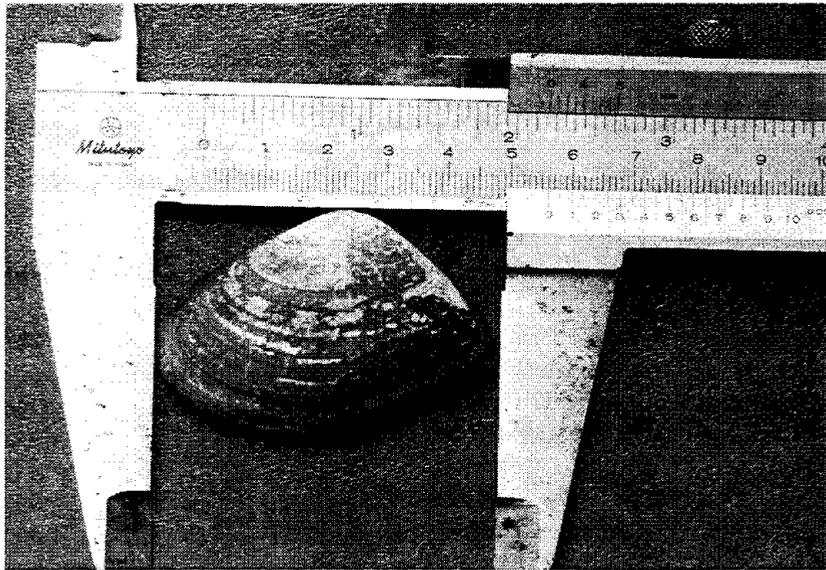


Figura 1 - Itã, *Iphigenia brasiliana*.

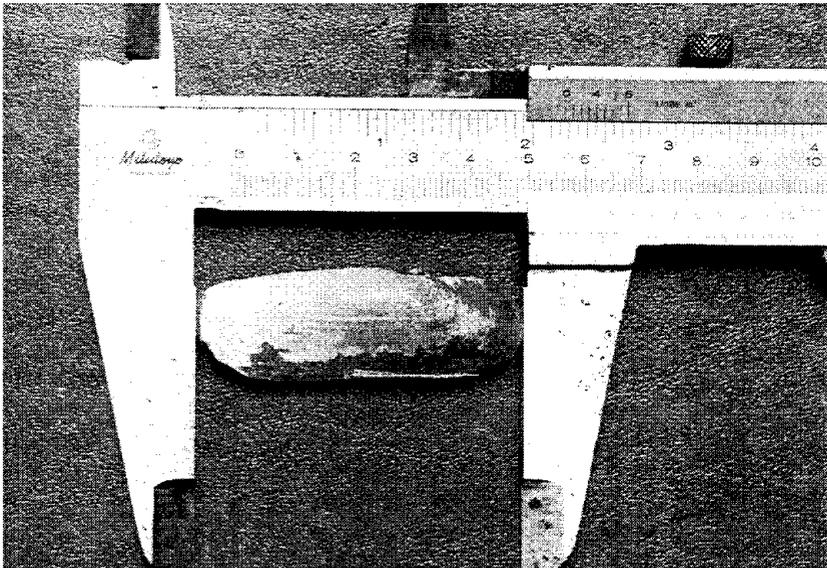


Figura 2 - Unha-de-velho, *Tagellus plebeus*.

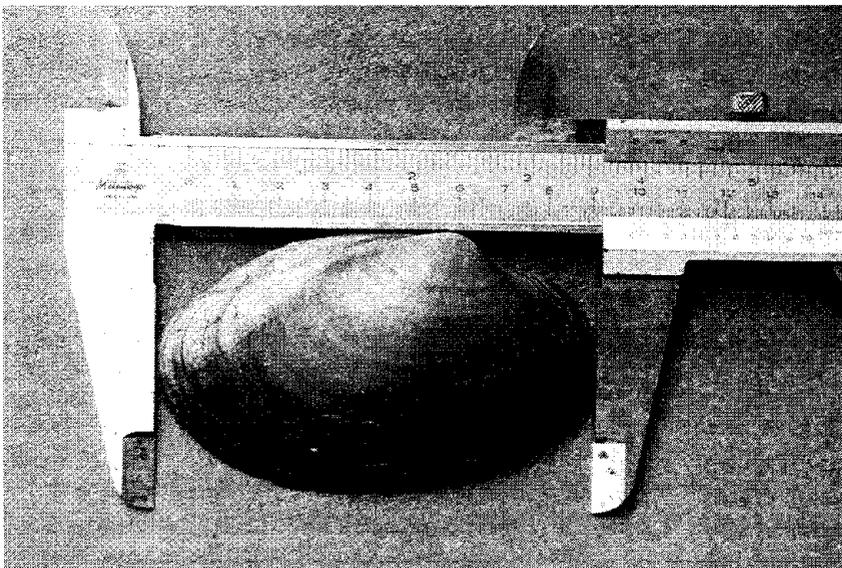


Figura 3 - Picholeta (fam. Unionidae).

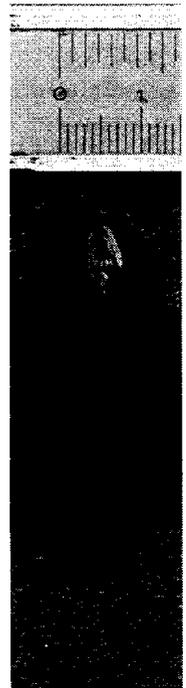


Figura 4 - Sururu, *Mytella guyanensis*

Tabela II - Relação entre o tempo de morte e as unidades - camundongo para os extratos ácidos de veneno paralisante (Wood, 1976).

Tempo de morte (minutos e segundos)	Camundongos de 20g		Camundongos de outros pesos		
	Unidades - camundongo	Tempo de morte (minutos e segundos)	Unidades - camundongo	Peso dos camundongos (g)	Unidades - camundongo
1:8	100	5:00	1,92	10,0	0,50
10	66,2	05	1,89	10,5	0,53
15	38,3	10	1,86	11,0	0,56
20	26,4	15	1,83	11,5	0,59
25	20,7	20	1,80	12,0	0,62
30	16,5	30	1,74	12,5	0,65
35	13,9	40	1,69	13,0	0,68
40	11,9	45	1,67	13,5	0,70
45	10,4	50	1,64	14,0	0,73
50	9,33	6:00	1,60	14,5	0,76
55	8,42	15	1,54	15,0	0,78
2:00	7,67	30	1,48	15,5	0,81
05	7,04	45	1,43	16,0	0,84
10	6,52	7:00	1,39	16,5	0,86
15	6,06	15	1,35	17,0	0,88
20	5,66	30	1,31	17,5	0,90
25	5,32	45	1,28	18,0	0,93
30	5,00	8:00	1,25	18,5	0,95
35	4,73	15	1,22	19,0	0,97
40	4,48	30	1,20	19,5	0,98
45	4,26	45	1,18	-	-
50	4,06	9:00	1,16	20,0	1,00
55	3,88	30	1,13	-	-
3:00	3,70	10:00	1,11	20,5	1,02
05	3,57	30	1,09	21,0	1,03
10	3,43	11:00	1,08	21,5	1,04
15	3,31	30	1,06	22,0	1,05
20	3,19	12:00	1,05	22,5	1,06
25	3,08	13	1,03	23,0	1,07
30	2,98	14	1,02	-	-
35	2,88	-	-	-	-
40	2,79	15	1,00	-	-
45	2,71	-	-	-	-
50	2,63	16	0,99	-	-
55	2,56	17	0,89	-	-
4:00	2,50	18	0,97	-	-
4:05	2,44	19	0,96	-	-
10	2,38	20	0,96	-	-
15	2,32	21	0,95	-	-
20	2,26	22	0,95	-	-
25	2,21	23	0,94	-	-
30	2,16	24	0,93	-	-
35	2,12	25	0,93	-	-
40	2,08	30	0,92	-	-
45	2,04	40	0,90	-	-
50	2,00	60	0,88	-	-
55	1,96	-	-	-	-

dessas toxinas, observando-se para as cobaias uma taxa de sobrevivência da ordem de 91,7%.

Quando o tempo de morte da cobaia é inferior a cinco minutos, Wood (1976) recomenda a diluição do extrato para um tempo de morte entre cinco e dez minutos. No presente trabalho, esta operação foi desnecessária, pois as duas cobaias para que se registrou óbito morreram nesse intervalo.

Os resultados das aplicações de extratos de picholeta, unha-de-velho e sururu, devem ser considerados com certa reserva, por terem sido testados apenas durante um trimestre, conforme já se salientou.

Halstead (1962) se reporta a casos de intoxicação por *Mytilus californianus*, *Mytilus edulis* e *Ostrea edulis*, dentre outros moluscos bivalves.

Conforme Wood (1976), a taxa com que os moluscos se alimentam, estando conseqüentemente sujeitos a se poluírem, varia com inúmeros fatores: temperatura e salinidade da água, etc. A temperatura

da água é mais propícia à contaminação bacteriana no verão do que no inverno.

Em Essex, no Reino Unido, a almeijoa, *Merccenaria mercenaria*, interrompe a alimentação quando a temperatura da água é baixa, não acumula bactérias fecais durante o inverno. Quanto à salinidade da água, para a maioria dos moluscos existe um limite abaixo do qual eles não se alimentam.

Epidemias de PSP têm sido assinaladas em diversas regiões, sobretudo nas costas leste e oeste da América do Norte, nas Ilhas Britânicas, e no norte da Europa. Conforme as estações, moluscos toxicóforos são encontrados na Baía de Fundy (Canadá), apesar de se desconhecer a presença de maré vermelha ("red tidal") (Wood, 1976). Este fenômeno, conforme o referido autor, deve-se a um intenso desenvolvimento ("bloom") de dinoflagelados do gênero *Goniaulax*, sob a influência da conjugação de vários fatores ambientais: temperatura da água do mar, correntes ascendentes, águas de arroios e fortes precipitações no litoral.

Do ponto de vista da higiene dos produtos alimentícios, o acidente de maior importância é a questionada intoxicação paralisante, pela qual, na costa atlântica, são incriminados os dinoflagelados *Goniaulax tamarensis* e *Goniaulax excavata*, este último de registro mais recente (Wood, 1976).

No presente trabalho, as cobaias contaminadas com toxinas PSP apresentaram rodopios seguidos de espasmos; estes últimos sintomas são referidos por Wood (1976).

As biotoxinas PSP são básicas e extremamente sensíveis a meios alcalinos e à oxidação, razão por que, no curso de qualquer ensaio envolvendo sua purificação, requerem um manuseio cuidadoso (Wright, 1989).

Na etapa de preparação de extratos de moluscos bivalves, para emprego em titulação biológica sobre ratos, a técnica exige que o pH do extrato, após a sua cocção, seja ajustado na faixa de 3 - 4 mediante utilização de ácido (HCl 0,1 e 5N) ou de álcali (NaOH 0,1N). No presente trabalho, os extratos apresentaram os seguintes valores de pH: itã = 3,14; unha-de-velho = 3,08; picholeta = 3,00 e sururu = 3,19, de maneira que não foi preciso ajustá-los.

Suas características de decantação foram boas, excetuando-se o de picholeta, em que este processo físico apresentou-se sofrível por causa de certa turbidez.

As biotoxinas PSP são hidrossolúveis e termo-resistentes, de modo que a ingestão do líquido de cocção dos moluscos pode redundar em perigo para o consumidor, mas a operação de enlatamento reduz em 70% a toxidez das mesmas (Tomes & George, 1962).

A técnica mais difundida para a detecção de toxinas em produtos marinhos é o bioensaio com camundongos, com a vantagem de ser não seletivo e por isso adequado à proteção do público (Yasumoto, 1978), embora forneça poucas informações sobre a composi-

ção das toxinas e sofra consideráveis variações (Park *et al.*, 1986, in Wright, 1990). No caso do DA (*domoic acid*), geralmente o limite de detecção ultrapassa o valor legal (20 µg/g de tecido). Por outro lado, há uma tendência para a substituição dos bioensaios por testes químicos e imunológicos, dada a pressão, por parte de agências regulamentadoras de alguns países, de salvar os animais (Marr *et al.*, 1990, in Wright, 1990).

Por diversas razões, segundo este último autor, métodos cromatográficos (cromatografia líquida de alta eficiência) constituem instrumentos valiosos para toxinas polares e não voláteis, permitindo uma admirável precisão quantitativa. No entanto, há certas dificuldades nesse sentido, considerando-se que a maioria das toxinas (PSP e DSP) carece de cromatóforos e, particularmente, DSP apresenta ainda como inconveniente um elevado peso molecular, além de sua natureza lipolítica.

CONCLUSÕES

1. A generalidade das amostras de moluscos bivalves estava isenta de toxinas PSP.
2. Indícios destas só se manifestaram em amostras de itã, *Iphigenia brasiliiana*, no I e IV trimestres de 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Halstead, B. W. Biotoxications, allergies, and other disorders. In: Nutrition, sanitation and utilization. *Fish as Food*. Borgstrom (ed.), V. II. Academic Press, 521 - 510 p. New York, 1962.
- Tornes, E. & George, P. Manipulación de las ostras, y otros mariscos. *Informe Técnico*, Caracas, n. 38, 11p., 1971.
- Whitaker, J. R. *et al.* Components of seafood. In: *Seafood Effects of Technology on Nutrition*, New York, XI + 362 p., 1990.
- Wood, P. C. *Manual de higiene de los mariscos*. Editorial Acribia, 83 p. Zaragoza, 1976.
- Wright, J. L. C. Shellfish toxins: at canadian perspective. In: *Seafood Science and Technology*, Bligh, E. G. (ed.). *Fishing News Books*, 406 p., Halifax, 1989.
- Yasumoto, T. Fluorometric determination of diarrheic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. In: *Agric. Biol Chem.*, Halifax, 877 p., 1978.