

Investigação da presença de Azaspirácidos em recursos pesqueiros do Canal do Linguado⁽¹⁾.

Amanda Massucatto⁽²⁾; Anyele Liann Siqueira Pilotto⁽²⁾; Mathias Alberto Schramm⁽³⁾.

Resumo Expandido

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do Edital Universal 12/2013, da Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação; ⁽²⁾ Estudante do curso técnico em Aquicultura; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina; Itajaí, SC; amanda.mscto@hotmail.com; ⁽³⁾ Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina;

RESUMO: O grupo dos Azaspirácidos é um grupo de ficotoxinas lipofílicas de importância para a saúde pública pois podem acumular em organismos aquáticos, principalmente em filtradores, e provocar intoxicações alimentares em humanos que deles se alimentam. A produção dessas toxinas é atribuída ao dinoflagelado *Azadinium spinosum*, com ocorrência ainda não registrada em águas brasileiras. Entretanto, já foram detectadas as variantes AZA-1 e AZA-2 em amostras de mexilhão originárias da Armação do Itapocorói. Desde 2012 a legislação brasileira exige a análises desses compostos na carne de moluscos bivalves destinados ao consumo humano. A pesquisa foi conduzida no Canal do Linguado, importante sistema aquático do litoral norte de SC, com características favoráveis ao aparecimento de espécies de dinoflagelados como o *Azadinium* sp. O Canal do Linguado, é utilizado como área de cultivo de moluscos bivalves e para a extração de diferentes recursos pesqueiros. O objetivo da pesquisa foi investigar a presença de azaspirácidos na água e na carne de recursos pesqueiros desse local, através de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas. Extratos de amostras de siri e ostras foram analisadas preliminarmente em espectrômetro de massas Q-TOF cedido pela AB Sciex do Brasil, indicando a presença dos seguintes análogos de Azaspirácidos: AZA-2, AZA-5, AZA-13, AZA-17, AZA-21 e AZA-25.

Palavra Chave: Ficotoxinas; Qualidade do pescado.

INTRODUÇÃO

As toxinas lipofílicas associadas a moluscos e peixes são em sua maioria poliéteres, não polares ou com baixa polaridade, facilmente solubilizados em solventes orgânicos como metanol e clorofórmio. Essas toxinas são divididas em diferentes grupos de acordo com as suas estruturas químicas e características toxicológicas em diferentes grupos, dentre os quais citamos o do Ácido Okadáico, da Pectenotoxina, da Yessotoxina e dos Azaspirácidos.

As ficotoxinas do grupo Azaspirácidos apresentam em sua estrutura química uma amina heterocíclica terminal e um grupo funcional carboxílico alifático. Atualmente, mais de 20 compostos análogos fazem parte desse grupo, provocando náuseas, vômitos, diarreias e cólicas abdominais agudas nos consumidores de moluscos como ostras, mexilhões, vieiras (Coquiles) e berbigões (Vôngoles).

Os azaspirácidos foram descobertos em 1995 na Irlanda devido a investigação de casos de intoxicação alimentar e diarreias provocadas pelo

consumo de mexilhões contaminados, entretanto, desde então novas ocorrências tem sido raras, sendo encontradas na costa atlântica da Europa, desde a Noruega até Portugal e também no Marrocos. A produção dessas toxinas é atribuída ao dinoflagelado *Azadinium spinosum*, sendo esse organismo ainda não descrito para águas brasileiras. Porém, é provável que essa ou outra espécie ocorra na costa do Brasil, pelo menos em Santa Catarina, onde já foram detectadas em *P. perna* as variantes AZA-1 e AZA-2.

O limite máximo permitido na regulamentação brasileira é de 160µg/Kg, expressos em equivalentes de AZA-1 por quilograma de carne de molusco, sendo as metodologias de LC-MS/MS as mais adequadas para a detecção e quantificação de azaspirácidos, por isso utilizadas como referência.

O Canal do Linguado está localizado no litoral norte do Estado de Santa Catarina, no limite territorial dos municípios de Balneário Barra do Sul e São Francisco do Sul e integra a Baía de Babitonga, um complexo estuarino listado como Área Prioritária para conservação do Bioma Mata Atlântica por ser

considerada de importância biológica extremamente alta.

A extensão do Canal do Linguado é de aproximadamente 15 km, com 500 metros de largura média e área aproximada do espelho d'água de 12,5 km². A economia da região está relacionada a atividades ligadas a pesca artesanal e esportiva, e ainda de serviços de turismo.

A Legislação brasileira que trata da sanidade de moluscos é recente. O Ministério da Pesca e Aquicultura em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicaram a Instrução Normativa Interministerial n.7 de 8 de maio de 2012, que institui o Programa Nacional de Controle Higiênico e Sanitário de Moluscos Bivalves. Essa INI estabelece os parâmetros de controle e seus limites máximos permitidos na carne de moluscos ainda em seu ambiente de cultivo ou produção, entre eles estão as biotoxinas marinhas. Além disso, a Portaria 204 de 28 de junho de 2012 estabelece os procedimentos de coleta de amostras, bem como as metodologias analíticas para biotoxinas em moluscos. No caso do grupo azaspirácidos, a metodologia de referência é a espectrometria de massas.

Devido à importância ecológica e o intenso uso múltiplo da água no Canal do Linguado, torna-se fundamental a avaliação da qualidade dos recursos pesqueiros desse ambiente. Nesse contexto, a investigação da presença de ficotoxinas na carne de moluscos e outros tipos de pescado torna-se importante para o monitoramento da qualidade dos produtos destinados ao consumo humano e da saúde pública, associando as alterações ao risco potencial de contaminação do pescado provenientes do Canal do Linguado. A presença de ficotoxinas lipofílicas na carne de moluscos já é registrada a vários anos, sendo que as que mais ocorrem são o ácido okadáico e as dinophysitoxinas. Entretanto, são escassos os registros de azaspirácidos. O objetivo geral é identificar e quantificar, através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, as ficotoxinas lipofílicas do grupo azaspirácidos em amostras de água e de moluscos e outros recursos pesqueiros presentes no Canal do Linguado.

METODOLOGIA

As amostras de água foram coletadas aproximadamente a cada 15 dias durante o período de 10 meses, nas profundidades de superfície e fundo em quatro pontos e apenas em superfície em um ponto, devido a baixa profundidade. Os pontos foram selecionados ao longo de toda extensão do canal para incluir o gradiente de salinidade

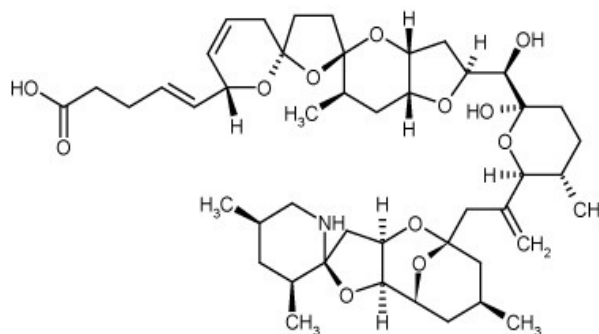
observado. Simultaneamente, conforme disponibilidade dos recursos, amostras de moluscos bivalves (ostras, berbigões e bacucus) e outros recursos pesqueiros foram coletados, armazenadas em caixas térmicas com gelo e transportadas ao Laboratório de Pesquisa e Monitoramento de Algas Nocivas e Ficotoxinas do IFSC.

No laboratório, volumes aferidos das amostras de água foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 47mm de diâmetro e 0,3µm de poro, seguida de armazenagem em congelador para posterior extração de toxinas. Os filtros de microalgas sofrem processos de extração em 10mL de metanol, uma única vez, com auxílio de sonda ultrasônica de ruptura celular, com posterior centrifugação e filtração em filtros de 0,22µm diretamente em vial de 1,5mL.

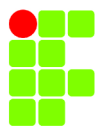
As amostras dos recursos pesqueiros tiveram suas partes comestíveis dissecadas e homogeneizadas em triturador mixer pesando em seguida 2,5g do homogeneizado em tubo Falcon de 45mL, adicionados 10mL de metanol e submetidos novamente a homogeneização em vortex. Em seguida os extratos são centrifugados por 10 minutos e o sobrenadante transferido para balão volumétrico de 25mL. Posteriormente, adicionados mais 10mL de metanol seguido de homogeneização no triturador Turrax, o extrato é centrifugado por 10 minutos e em seguida o sobrenadante também transferido para o balão volumétrico. No final, o volume dos balões é aferido e uma alíquota é filtrada através de filtros de seringa de 0,22µm, diretamente em vial de 1,5mL, para posterior estocagem em congelador.

A partir dos extratos obtidos dos filtros de microalgas e dos recursos pesqueiros coletados, as ficotoxinas lipofílicas do grupo azaspirácidos são identificadas e quantificadas através de cromatografia líquida rápida acoplada a detector Triploquadropolo (QqQ) de espectrometria de massas, conforme metodologia descritas por M. Garcia-Altare, J. Diogene e P. de la Iglesia (2013).

Figura 1. Estrutura molecular do Azaspirácido



Fonte: Wikipedia



RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de setembro de 2013 a junho de 2014, foram coletadas 30 amostras de recursos pesqueiros provenientes do Canal do Linguado, sendo que 2 foram de ascídias, 1 de bacucu, 5 de berbigões, 1 de caranguejo, 12 de ostras, 9 de siris.

Extratos de amostras de siri e ostras foram analisadas preliminarmente em espectrômetro de massas Q-TOF cedido pela AB Sciex do Brasil, indicando a presença dos seguintes análogos de Azaspirácidos: AZA-2, AZA-5, AZA-13, AZA-17, AZA-21 e AZA-25.

CONCLUSÕES

Os resultados preliminares demonstram a presença de azaspirácidos na água e nos recursos pesqueiros coletados no Canal do Linguado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFSC, através de sua Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, pela viabilização de recursos para o desenvolvimento da pesquisa e para bolsas de alunos. E a AB Sciex do Brasil por realizar as análises preliminares de algumas amostras.

REFERÊNCIAS

- GARCIA-ALTARES, M.; DIOGENE, J.; DE LA IGLESIA, P. The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: Single-laboratory validation under four chromatographic condition. *Journal of Chromatography A*, 1275, 48–60, 2013.
- HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. & ENEVOLDSEN, H.O. **Manual on harmful marine microalgae**. Paris, IOC-UNESCO, 2003.
- MAFRA JÚNIOR, L. L. Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá, PR: subsídios para o monitoramento. 158p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- MAFRA JÚNIOR, L. L.; PROCOPIAK, L. K.; FERNANDES, L. F.; PROENÇA, L. A. O. Harmful algae and toxins in Paranaguá Bay, Brazil: Bases for the monitoring. *Brazilian Journal of Oceanography*, v.54, n.1/2, p.107-121, 2006.
- MAFRA, L. L.; TAVARES, C. P. DOS SANTOS; SCHRAMM, M. A. Diarrhetic toxins in field-sampled and cultivated *Dinophysis* spp. cells from southern Brazil. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p. 1573-5176, 2013.
- MENEZES, M.; BRANCO, S.; PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A. Bloom of *Alexandrium minutum* Halim on Rio de Janeiro coast: occurrence and toxicity. *Harmful Algae News*, n.34, p.7-9 (October), 2007.
- PROENÇA, L. A. O.; MAFRA JR., L. L. Ocorrência de ficotoxinas na costa brasileira. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FICOLOGIA, 10, 2004, Salvador. Formação de ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos: anais. Rio de Janeiro: Museu Nacional. P. 57-77. Org. **Sociedade Brasileira de Ficologia**(Série Livros: 10), 2005.
- PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A.; TAMANAHA, M. S.; ALVES, T. P. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in subtropical southwest Atlantic. *Harmful Algae News* n.33, p19-20, (june) 2007.
- PROENÇA, L. A. O.; TAMANAHA, M. S.; SOUZA, N. P. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. *Atlântica*, v.23, p. 59-65, 2001.
- PROENÇA, L. A. O.; TAMANAHA, M. S.; RESGALLA Jr., C. Toxicity of the aqueous extract of *Alexandrium fraterculus* Balech. In: X International Conference on Harmful Algae, St. Petersburg. (Abstracts) St. Petersburg: International Society for the Study of Harmful Algae, p.235, 2002.
- PROENÇA, L.A.O.; FONSECA, R.S. & PINTO, T.O. **Microalgas em áreas de cultivo do litoral de Santa Catarina**. São Carlos: RiMa, 2011.
- SCHRAMM, M. A.; ALVES, T. P.; HONORATO, M. C.; PROENÇA, L. A. O. Primeira detecção de ficotoxinas lipofílicas em mexilhões da Armação do Itapocoró em Santa Catarina através de LC-MS/MS. **Resumos do XIII CBFic**, 2010, p. 381.
- SCHRAMM, M. A.; PROENÇA, L. A. O., Biotoxinas Marinhas em Pescado. In: **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. Alex Augusto Gonçalves (Editor). Editora Atheneu, São Paulo, 2011, 608p.
- SILVA, L. F. **Alterações morfodinâmicas no Canal do Linguado pela remoção do dique que o separa da Baía da Babitonga (SC)**. 2011. 198 f. Tese (Doutorado em Geociências) - Programa de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/56281/0/00859900.pdf?sequence=1>. Acesso em: 18 mar. 2013.