

RESUMO

A intoxicação diarreica por molusco (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* ou abreviadamente **DSP**) é uma doença gastrointestinal devida à ingestão de moluscos contaminados por toxinas provenientes de dinoflagelados. Os principais sintomas da síndrome DSP são diarreia, vômitos e dores abdominais, que ocorrem poucas horas após a ingestão dos bivalves. Este trabalho visou inicialmente a introdução de uma técnica cromatográfica (HPLC com detecção por fluorescência) para descrever o complexo de toxinas diarreicas (DSP) nos bivalves da costa portuguesa. Tentou-se também avaliar a capacidade deste método para detectar a ocorrência de toxinas DSP, de modo a substituir com segurança o bioensaio com ratos, usado para prevenção de intoxicações nos consumidores de moluscos bivalves.

A toxina diarreica detectada mais frequentemente foi o ácido ocadaico (OA), associado à ocorrência de *Dinophysis acuminata* no plâncton. Esta é a toxina diarreica também mais vulgar na Europa. Associado à ocorrência no plâncton de *D. acuta*, encontrou-se contaminação simultânea com OA e dinofisistoxina-2 (DTX2), esta última sendo mais rara na Europa, tendo sido descrita unicamente em bivalves da Irlanda e da Galiza, no norte de Espanha.

Este trabalho confirmou que o DSP é uma das toxicidades que mais afecta os bivalves em Portugal, principalmente devido à sua ocorrência temporal prolongada, à semelhança do que acontece nos outros países da Europa. O OA foi detectado mais frequentemente desde a Primavera até ao Outono, e excepcionalmente no Inverno, podendo inclusive nesta estação causar surtos de DSP nos consumidores de bivalves. A DTX2 surge predominantemente do meio do Verão até ao meio do Outono, mas algumas vezes mais cedo. Tendo em atenção que os teores de toxinas diarreicas das espécies planctónicas produtoras pode ser variável e a acumulação de DSP pelos bivalves pode ser bastante rápida, é pois desaconselhável a monitorização unicamente quinzenal (ou mensal) dos bivalves.

O aprofundamento das análises cromatográficas recorreu à hidrólise alcalina para detectar a presença de ésteres das toxinas do grupo do ácido ocadaico que, de outro modo, não seriam detectáveis pelo método de HPLC-FLU usado. Foram inicialmente encontradas grandes quantidades de ésteres de baixa polaridade na fracção hexânica, em mexilhões da Ria de Aveiro, num ano de grande toxicidade por DSP, 1995. Resultados tão elevados como os aqui encontrados, só tinham sido inicialmente descritos pelos investigadores japoneses em vieiras, mas nunca em mexilhões.

Estas toxinas não provêm directamente das microalgas ingeridas pelos bivalves, mas são resultado de um processo de biotransformação por estes (combinação do OA e DTX2 com ácidos gordos, designadas globalmente por DTX3). Foi ainda encontrada uma maior acilação do ácido ocadaico em relação à dinofisistoxina-2, para a qual não encontramos nenhuma explicação aparente. O aprofundamento destes resultados poderá ser importante para a compreensão de como os organismos marinhos se adaptam a estes compostos nocivos e, qual o papel exacto destes no ecossistema marinho.

Em 1998, foi possível estudar conchas da região de Faro/Olhão, no Algarve, responsáveis por intoxicações humanas em consumidores dessa região. Encontrámos também aqui um elevado teor de ésteres de baixa polaridade do ácido ocadaico, e ainda um elevado teor de ésteres de elevada polaridade, não extraíveis com hexano. A presença de todos estes ésteres foi responsável pelas intoxicações; a toxina livre – OA – encontrava-se em doses muito baixas para justificar por si só a ocorrência de síndromes diarreicas. Estes resultados levaram-nos a supor da existência de um novo tipo de éster em moluscos bivalves. Ésteres de elevada polaridade, como DTX4/5, só foram anteriormente descritos no dinoflagelado bentónico, *Prorocentrum lima*.

A cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC-MS) permitiu confirmar a ocorrência de OA, DTX2 e ésteres acilo de ambas. Esclareceu ainda que os ésteres de cadeias acilo longas são preferencialmente solúveis no hexano, enquanto aqueles com cadeias mais curtas permanecem também na fase metanol aquosa. Estes últimos explicam as toxinas de elevada polaridade anteriormente encontradas. No entanto, foi detectado nas amostras portuguesas um novo tipo de toxinas análogas às pectenotoxinas, mas possuidoras de um grupo ácido livre à semelhança do ácido ocadaico: o seco-ácido da pectenotoxina-2 (PTX2SA) e a 7-*epi*PTX2SA. Estas estiveram recentemente associadas com intoxicações humanas na Austrália. Encontraram-se também ésteres acilo destas toxinas, mas a elucidação da sua estrutura ainda não está concluída.

Todos estes ésteres das toxinas DSP são potencialmente diarreicos, devendo ser determinados por qualquer método que se venha a adoptar como substituto oficial do bioensaio com ratos. A técnica de HPLC-FLU é relativamente morosa, pois além das extracções líquido-líquido, inclui passos de derivatização química e de extracção em fase-sólida. Para uma monitorização mais frequente e rápida avaliou-se as capacidades de previsão de um método de imunoensaio do tipo ELISA (kit comercializado com a designação: “DSP-Check”) de

determinação rápida, em que se incluiu os passos de hidrólise, necessários à conversão das toxinas DSP, e as extracções líquido-líquido usadas em LC-FLU. Devido à elevada especificidade do anticorpo usado para o OA, as formas ésteres não podem ser detectadas quantitativamente. Recorrendo à hidrólise obteve-se uma óptima correlação entre ambos os métodos. As amostras contendo DTX2 apresentaram uma ligeira subestimação em relação ao LC-FLU, mas isto não invalida a extrema versatilidade do kit para um processamento rápido de um grande número de amostras. Uma desvantagem é o seu elevado custo.

A comparação dos resultados de HPLC com o bioensaio com ratos permitiu justificar algumas das mortes observadas. Outras não eram atribuíveis às toxinas do grupo do ocadaico, o que era concordante com as observações da sintomatologia, que diversas vezes não correspondia ao esperado para o OA, como prostração e fraqueza. O emprego de técnicas tão específicas permite por um lado separar as mortes acidentais das que verdadeiramente correspondem à presença de toxinas diarreicas, mas não permite detectar outras toxinas perigosas para o consumidor. No futuro, devem estabelecer-se outros métodos expeditos para toxinas como o azaspirácido, que ocorrem na Europa, de modo a evitar o uso de animais em testes de rotina.

O uso de ensaios mais sensíveis (principalmente ELISA, ensaios de inibição das fosfatases proteicas, LC-MS) é importante para facilitar a preparação dos tecidos para análise (menor quantidade) e uniformizar os critérios entre os bivalves de pequenas dimensões e os restantes (analisar somente a parte edível total e não recorrer ao hepatopâncreas onde as toxinas estão mais concentradas).

ABSTRACT

Diarrhetic shellfish poisoning (**DSP**) is a gastrointestinal illness due to ingestion of shellfish contaminated by dinoflagellate toxins. The main DSP symptoms are diarrhea, vomiting and abdominal cramps, which occur shortly after shellfish consumption. This work aimed at introducing a chromatographic technique (HPLC with Fluorescence Detection) to describe the complex of diarrhetic toxins in shellfish from the Portuguese coast. We also tried to evaluate the predicting capability of this method to detect the occurrence of DSP toxins, in order to replace the mouse bioassay, used to prevent intoxications in shellfish consumers.

Okadaic acid (OA) was the diarrhetic toxin most often found, associated with the occurrence in the plankton of *Dinophysis acuminata*. This is also the most frequent toxin in European shellfish. Associated with the occurrence in the plankton of *Dinophysis acuta*, we found simultaneous occurrence of OA and dinophysistoxin-2 (DTX2), this last toxin being more rare in Europe, having only being detected until now in Irish and Galician shellfish.

This work confirmed that DSP is one of the main toxicities affecting shellfish in Portugal, due to its prolonged temporal occurrence, like in other European countries. OA was detected mainly from spring until autumn, and more exceptionally in winter, having caused human poisonings in this season. DTX2 occurs mostly from middle summer until middle autumn, and sometimes sooner. Taking into account that DSP levels in planktonic producing microalgae can be variable and toxin accumulation by shellfish can be quite fast, it is not advisable to monitor shellfish only fortnightly (or monthly).

We used an alkaline hydrolysis step to detect okadaic acid and DTX2 esters, which otherwise could not be detected by the HPLC-FD method used. In 1995, a year of long lasting toxicity, we found a high level of low polar ester derivatives of okadaic acid and DTX2 in the hexane fraction of Aveiro Ria blue mussel (*Mytilus edulis*). Results as high as those here found (50% of total DSP), had only being described in Japanese scallops.

These toxins are not produced by the microalgae, but result from shellfish metabolism of DSP toxins with free fatty acids (also named DTX3). A curious result found, was the higher acylation of OA in relation to DTX2 acylation. The future study of these findings might help explain how marine organisms deal with these harmful compounds, and what is their exact role in the marine environment.

In 1998, it was possible to study Donax clams (*Donax trunculus*) from Faro/Olhão, at Algarve south coast, responsible for an outbreak of human poisonings. Here we found also a high level of low polar esters, and a high level of high polar esters, not extracted with hexane.

The summing of all these ester forms was the main responsible for the diarrhea syndrome – the free toxin (OA) was detected in low amounts. These HPLC-FD results led us to suppose of the existence of a new kind of high polar ester derivatives in shellfish. High polar esters, like DTX4/5 had only been found in strains of the bentonic microalgae *Prorocentrum lima*.

Liquid chromatography associated with mass spectrometry (LC-MS) allowed us to confirm the presence of OA, DTX2 and acyl esters of both of these. It also pointed out that short chain acyl esters are not so extractable with hexane as those with a longer fatty acid moiety. This explained our previous results obtained with LC-FD. This technique also detected the occurrence of a recently discovered analogue of pectenotoxins, pectenotoxin-2 seco acid (PTX2SA) and its epimer 7-epi-PTX2SA. Acyl esters of these were also discovered, but their structure is not still fully elucidated.

All these DSP ester toxins are potentially diarrheic, and thus must be determined by any method that will eventually be adopted to replace the mouse bioassay. The HPLC-FD is quite labor intensive, because it includes several liquid-liquid partitioning steps, and lengthy chemical derivatization and solid-phase extraction clean-up steps. For a monitoring with a faster response we evaluated the predicting capabilities of a commercial immunoassay kit (“DSP-Check”, Panapharm Co.) for okadaic acid. In order to detect DSP esters we assayed the same hydrolyzed extracts used for HPLC. Due to the high specificity of the antibody used, OA esters can not be detected. Using hydrolysis a good correlation between both methods was obtained. Samples containing DTX2 presented a slight underestimation in relation to HPLC, but this does not invalidate the high versatility of the kit for a faster and higher sample through-output.

Liquid chromatography could explain part of the mouse bioassay results observed. Some mice deaths observed did not correspond to typical DSP symptomatology (like prostration and weakness), and correspondingly HPLC did not found enough DSP toxins to justify the results. The employment of such specific techniques, can separate artefactual deaths from those corresponding to the presence of DSP toxins, but can not detect other unrelated toxins dangerous for the human consumer. Other expeditious methods are needed for toxins like azaspiracid, which occurs in Europe, in order to avoid animal testing.

The wide disseminated usage of more sensible assays (mainly ELISA, protein phosphatase inhibition assays, LC-MS) is important in order uniformize and speed-up tissue preparation by employing in the analyses only edible parts instead digestive glands, where toxins are normally more concentrated. In the Portuguese shellfish, this is particularly relevant, as many of the most important commercial shellfish are very small in size.