

## TOXINAS DE DINOFLAGELADOS MARINHOS

Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira<sup>(1)</sup>

Laboratório de Ciências do Mar  
Universidade Federal do Ceará  
Fortaleza – Ceará – Brasil

### INTRODUÇÃO

A ação tóxica de certos organismos marinhos é conhecida desde épocas remotas, quando a prática mística e supersticiosa era evocada para explicar os efeitos oriundos de causas desconhecidas.

Devido ao pouco ou nenhum conhecimento dos efeitos fisiológicos resultantes do contato com plantas e animais tóxicos, os antigos cercavam as biotoxinas com uma aura de mistério, superstição e religião (Halstead, 1965).

Embora a biotoxicologia tenha experimentado um progresso relativamente grande neste século, a importância científica das biotoxinas ainda é freqüentemente mal entendida. Em geral, a atitude é que, sendo substâncias letais que causam intoxicação e morte, devem ser evitadas. Considerando somente este caráter nocivo, a pesquisa seria justificada desde que abordasse aspectos químicos e farmacológicos com um objetivo último de desenvolver uma antitoxina capaz de combater os efeitos deletérios do agente etiológico. Entre-

tanto, há outros aspectos meritórios a considerar relacionados com outras atividades biológicas das toxinas, ainda muito pouco conhecidos. Dos milhares de organismos marinhos tidos como portadores ou produtores de compostos biotóxicos, menos de 1% tem sido estudado quanto às suas outras atividades biológicas.

Halstead (1981) enfatiza que as toxinas marinhas não são apenas de interesse médico e científico por causa de sua significação na saúde pública e na economia, mas estão se tornando de alto valor como instrumento molecular para a elucidação de muitas funções neuromusculares. Além disto, várias substâncias marinhas consideradas tóxicas têm apresentado propriedades farmacológicas variadas, como fungicida, antiviral, antibiótica, inibidora de crescimento, antitumorífera, hemolítica, analgésica, cardioinibidora e até com propriedades psicofarmacológicas.

O estudo destes compostos faz parte da ciência chamada de Biotoxicologia Marinha que, segundo Halstead (1981), é a ciência das toxinas produzidas por plantas e animais marinhos, suas causas, efeitos, natureza, detecção e tratamento das intoxicações por elas produzidas. A Biotoxicologia Marinha pode ser dividida em duas categorias: (1) fitotoxicologia, a qual trata de toxinas produzidas por

(1) Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

vegetais marinhos; e (2) zootoxicologia, que trata de animais marinhos produtores de toxinas. Os dinoflagelados, apesar de considerados como vegetais por alguns autores, são, em geral, classificados como protozoários, tendo uma importância destacada por serem produtores de toxinas de alta periculosidade e seivem de alimento para vários organismos marinhos, fazendo parte da cadeia trófica como produtores primários e, em particular, como alimento para os moluscos, que são organismos filtrantes, consumidores de plancton.

Muitos membros dos protozoários da ordem Dinoflagellata estão envolvidos com o fenômeno comumente denominado de maré vermelha (red tide). Este termo, segundo Martin & Padilla (1974) é, em geral, aplicado a manchas que aparecem subitamente na superfície das águas marinhas, ocasionadas por um intenso desenvolvimento (*bloom*) no número de flagelados. Baslow (1969) refere-se à maré vermelha como um desenvolvimento rápido do fitoplancton, algumas vezes representado por espécies unicelulares com exclusão de outras espécies fitoplanctônicas, causando mudanças de coloração da água, que pode tornar-se amarela, vermelha, marrom, verde ou de outras cores, dependendo dos organismos envolvidos, predominando na maioria das vezes a coloração vermelha. Alguns dinoflagelados produzem metabólitos tóxicos os quais são liberados na água, ocasionando uma grande mortalidade de peixes e outros organismos marinhos.

A presente monografia trata das toxinas produzidas por dinoflagelados, especificamente aquelas transmitidas ao homem por moluscos e causadoras do fenômeno conhecido mundialmente pelo termo *paralytic shellfish* (molusco paralisante). Serão considerados suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, os principais produtores e, finalmente, alguns aspectos médicos relacionados com sintomas clínicos, tratamento, prevenção e importância na saúde pública.

No Brasil pouca atenção é dirigida a este tema, quer pelos pesquisadores quer pelas autoridades higieno-sanitárias. É nisto que se baseia a relevância do trabalho além de que a matéria é de suma importância para a saúde pública, para a medicina e para a economia, visto que todos os anos os dinoflagelados são responsáveis pela mortalidade de inúmeros organismos marinhos, em particular peixes.

## HISTÓRICO DA PESQUISA

Phillips & Brady, citados por Halstead (1965), afirmam que o fenômeno da maré vermelha foi registrado em 208 A. C., sendo que o termo foi aplicado por antigos autores gregos para explicar um fenômeno que ocorria com certa frequência na costa da Arábia, causado por uma abundância de água vermelha. Ainda Halstead (1965), citando Chevalier & Duchense, relata que o primeiro registro de um caso de intoxicação por dinoflagelados no homem, ocorreu em 1689.

Se não era evidente para os antigos que o agente etiológico fosse uma toxina oriunda de dinoflagelados, entretanto, já faziam correlação entre modificações na coloração da água do mar com a periculosidade dos moluscos quando ingeridos nesta época.

Meyer *et al.* (1928), em trabalho sobre a toxidez dos mexilhões, salientam que em épocas muito quentes aparece uma luminescência nas águas, fenômeno causado por dinoflagelados, entre eles o *Noctiluca*, que frequentemente acompanha, o *Gonyaulax catenella*, fonte da toxina do tipo paralisante — saxitoxina.

Recentemente, foram verificadas oito ocorrências de maré vermelha no Equador, sendo implicados vários dinoflagelados, com maior incidência de *Mesodinium rubrum*, *Prorocentrum* sp., *Gonyaulax* sp. e *Gonyaulax monilata* (Arcos, 1982). Halstead (1965) refere-se a numerosos surtos de intoxicação causados por moluscos, ocorridos na Europa

e Grã-Bretanha, principalmente no período de 1827 a 1909. Isto teria provocado uma atenção especial ao problema e estimulado os cientistas a desenvolverem pesquisas nas áreas de química, farmacologia, terapêutica e toxicologia.

Segundo Meyer *et al.* (1828), provavelmente a mais significativa epidemia que estimulou as pesquisas modernas sobre intoxicação por toxinas paralisantes foi uma série de 14 surtos que aconteceram nas vizinhanças de São Francisco, Califórnia (USA), em julho de 1927, envolvendo 102 pessoas, resultando em seis mortes. O fato teve grande repercussão na imprensa e recebeu uma atenção especial por parte das autoridades sanitárias que formaram um grupo para estudar o problema, desencadeando, então, uma série de pesquisas sobre a toxicidade de organismo marinhos. Após vários estudos o grupo levantou algumas possibilidades sobre a origem do "molusco paralisante": (1) absorção de sais de cobre das rochas; (2) trocas de pós-morte ou autólise dos mexilhões; (3) influência do meio, como água estagnada; (4) resultado de uma doença no mexilhão, possivelmente devido a bactérias patogênicas; (5) possibilidade de uma toxina metabólica.

A partir dos estudos de Sommer *et al.* (1937) foi, finalmente, demonstrado o agente etiológico da intoxicação por mexilhão (*mussel poisoning*) ao longo da costa do Pacífico da América do Norte. Estes pesquisadores observaram, experimentalmente, que o mexilhão *Mytilus californianus*, após perder sua toxidez quando colocado em água do mar filtrada, a retomava quando alimentado por 16 dias com água do mar não filtrada. O aumento da toxidez foi proporcional ao número de *Gonyaulax catenella* na água.

Um fato que tem suscitado discussão refere-se às áreas geográficas sujeitas a surtos de moluscos paralisantes. McFarren *et al.* (1961), analisando os dados sobre a ocorrência do fenômeno, constata-

taram que entre 1793 e 1958, epidemias de intoxicação do tipo paralisante têm sido registradas em países como a Inglaterra, Irlanda, Noruega, França, Bélgica, Alemanha, África do Sul e Nova Zelândia. Não há trabalho publicado sobre qualquer caso epidêmico nas áreas do Mar Mediterrâneo e Mar Vermelho, e somente casos esporádicos no Golfo do México.

Os fatores responsáveis por esta distribuição não são claros, mas Kao (1966) cita que no Golfo do México, por exemplo, a captura de molusco não é feita nos meses de verão, época em que os mexilhões encontram-se mais "intoxicados" e, dessa forma, os efeitos da intoxicação não seriam transmitidos ao homem. A falta de diagnóstico e a pouca atenção para o fenômeno também estariam colaborando na sua ocorrência restrita.

No Brasil, no que pese a suspeita de ocorrência não muito rara de maré vermelha nas regiões Sul e Sudeste, não há notificação pública sobre casos de intoxicação por moluscos paralisantes. A não obrigatoriedade de notificação desse tipo de intoxicação, compulsória em países como Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, Alemanha e outros, impossibilita que a saúde pública brasileira tenha um controle sobre o número de casos, que certamente ocorrem anualmente.

Não são raros os relatos sobre enfermidades advindas logo após a ingestão de produtos do mar, cujas características clínicas sugerem a participação de toxinas de origem marinha. Pela precariedade de diagnóstico, esse tipo de moléstia é tratada como um quadro de gastroenterite ou como uma intoxicação inespecífica. Muitos casos têm tido um desfecho fatal como ocorreu em Aracati (Ceará), em fevereiro de 1980, com a morte de duas pessoas. Nesta região é de praxe os habitantes não consumirem moluscos no período de chuvas, pois segundo os pescadores, os mexilhões estão "bêbados" e podem ser maléficos à saúde.

## ORGANISMOS PRODUTORES E TRANSMISSORES

Vários efeitos tóxicos, incluindo paralisia muscular, têm sido registrados após a ingestão de certos moluscos. Compostos nigrogenados, tais como tetrodotoxina, gonyautoxinas e ciguatoxina, são conhecidos como causadores desses envenenamentos, tendo sido isolados, caracterizados quimicamente e sujeitos a avaliação farmacológica (Younggen & Shimizu, 1975).

Situando-se entre os principais organismos da cadeia alimentar dos oceanos, como produtor primário e participando da dieta de grande parte de peixes, crustáceos e moluscos, o plancton marinho é composto de algas, animais microscópicos e dinoflagelados, sendo estes últimos mais frequentemente envolvidos na síntese dessas toxinas.

A tetrodotoxina é obtida dos ovários e ovos de várias espécies de peixes infláveis da subordem Gymnodontes (Mosher *et al.*, 1964). Por esse motivo não se constitui objeto deste trabalho, contudo informações sobre seu isolamento, purificação e identificação estrutural podem ser consultados em Buchwald *et al.* (1964), Woodward (1964), Goto *et al.* (1965) e Kao (1966). A ciguatoxina, que também está nesta condição, é um termo que tem sido relacionado a um tipo particular de neurointoxicação a qual resulta da ingestão de muitas espécies de peixes tóxicos que ocorrem em regiões tropicais e temperadas do mundo (Baslow, 1969). Informações sobre suas propriedades químicas e fisiológicas podem ser encontradas em Kwan-Ming (1965), Scheuer (1967), Rayner *et al.* (1968), Ohizumi *et al.* (1981) e Ohizumi *et al.* (1982).

A toxina de molusco paralisante (*paralytic shellfish poison* — PSP), produzida por dinoflagelados do gênero *Gonyaulax*, tem sido pesquisada em outros dinoflagelados. Segundo Halstead (1981) as toxinas PSP incluem a saxitoxina, goniautoxina II, goniautoxina III

e neosaxitoxina, e suas estruturas já são conhecidas. Há evidência de ocorrências de outras toxinas, cujas estruturas ainda não foram determinadas, mas em que algumas propriedades físicas e químicas indicam uma grande semelhança com a saxitoxina.

Segundo Martin & Padilla (1974), os principais dinoflagelados envolvidos na produção de toxinas incluem *Gonyaulax catenella*, *Gonyaulax monilata*, *Gonyaulax acatenella*, *Gonyaulax tamarensis*, *Gymnodinium breve*, *Gymnodinium veneficum* e *Prymnesium porvum*. Destes organismos, os que têm sido mais estudados são o *Gonyaulax catenella*, *G. tamarensis* e *Gymnodinium breve*, pela sua grande abundância, distribuição e ligação com o fenômeno da maré vermelha, além da potência de suas toxinas. Halstead (1981) cita que o dinoflagelado *Gymnodinium breve* é responsável pela morte de aproximadamente 100 toneladas de peixes por dia.

Na tabela I estão relacionados os principais dinoflagelados produtores de toxinas, sua distribuição geográfica e tipo de toxina, dados retirados de Schantz (1980).

A primeira toxina foi isolada de um molusco do Alaska, *Saxidomus giganteus*, e recebeu o nome de saxitoxina. Posteriormente, várias toxinas paralisantes foram isoladas de moluscos, culminando com a purificação de uma toxina oriunda de cultura axênica de uma alga, *Gonyaulax catenella*, a qual tem se mostrado quimicamente igual à saxitoxina (Schantz *et al.*, 1966).

Os dinoflagelados, dentro da taxonomia, pertencem ao Reino Protista, Filo Protozoa, Classe Mastigophora e Ordem Dinoflagellata. Muitos são produtores primários possuindo, portanto, clorofila embora pertençam, como vimos acima na classificação, ao reino animal.

As espécies da Ordem Dinoflagellata são principalmente marinhas e geralmente se revestem de uma armadura de substância semelhante à celulose, com duas ou mais placas, possuindo dois

TABELA I

Dinoflagelados conhecidos como produtores de toxinas.

Dinoflagelado	Distribuição	Toxina
<i>Gonyaulax catenella</i>	Costa do Pacífico norte, Califórnia ao Japão, China e África do Sul	Causa PSP. Estrutura determinada
<i>Gonyaulax tamarensis</i>	Costa da Nova Inglaterra, Canadá, Mar do Norte	Causa PSP. Estrutura determinada
<i>Gonyaulax acatenella</i>	Costa da Colúmbia Britânica (Canadá)	Causa PSP. Toxina não isolada
<i>Pyrodinium phoneus</i>	Mar do Norte	Causa PSP.
<i>Gonyaulax monilata</i>	Golfo do México	Tóxico a peixes, mas não a animais de sangue quente. Toxina não isolada
<i>Gonyaulax polyedra</i>	Costa do sul da Califórnia	Toxina registrada mas não verificada
<i>Gymnodinium breve</i>	Golfo do México	Tóxico a peixes, aves e ratos. Toxina parcialmente purificada
<i>Gymnodinium veneficum</i>	Canal da Mancha	Tóxico a peixes e camundongos
<i>Exuviaella mariaelebouriae</i>	Japão	Causa degeneração dos tecidos do fígado e baço. Toxina parcialmente purificada

Fonte: Schantz (1980), Phycotoxin from dinoflagellates.

flagelos, um longitudinal e outro transversal, com finalidade de locomoção e captura de alimentos. A nutrição é basicamente holofítica, na qual os alimentos são sintetizados dentro do próprio corpo, por fotossíntese, como nas plantas verdes, através da ação da clorofila na presença da luz e água (Storer & Usinger; 1978). A reprodução é frequentemente por divisão binária longitudinal. O núcleo divide-se em dois por mitose, então as organelas — flagelo, blefaroblasto, citofaringe, reservatório e estigma — são duplicadas e o organismo fende-se em dois longitudinalmente (Amabis *et al.*, 1974; Storer & Usinger; 1978). Nas figuras 1, 2 e 3 são mostrados os principais dinoflagelados produtores de toxinas e utilizados pelos moluscos como alimento, ou sejam, *Gymnodinium breve*, *Gonyaulax catenella* e *Gonyaulax tamarensis*. *Gymnodinium breve* não apresenta placas de celulose, sendo considerados nus, enquanto as espécies do gênero *Gonyaulax* contêm várias placas e são denominados tecados. *Gonyaulax*

*catenella* em cultura tende a agrupar-se em fila, como mostra a figura 4.

Os moluscos envolvidos na transmissão das toxinas dos dinoflagelados ao homem pertencem à classe Pelecypoda, cujos membros (mexilhões, ostras e outros bivalves) são caracterizados por apresentarem duas conchas usualmente com uma abertura dorsal simétrica, unidas por um ou dois músculos adutores. Na figura 5 são mostrados alguns aspectos anatômicos internos do mexilhão *Mytilus edulis*, com as valvas separadas, e nas figuras 6, 7 e 8 apresentamos os principais moluscos bivalves relacionados com a transmissão de toxinas.

O molusco, ao consumir dinoflagelados, acumula suas toxinas nas glândulas digestivas, podendo alguns mexilhões do tipo *Saxidomus giganteus* acumulá-las nos sifões. Essas substâncias podem permanecer várias semanas estocadas nesses órgãos e, pela ingestão do molusco contaminado, as toxinas são transferidas ao homem.

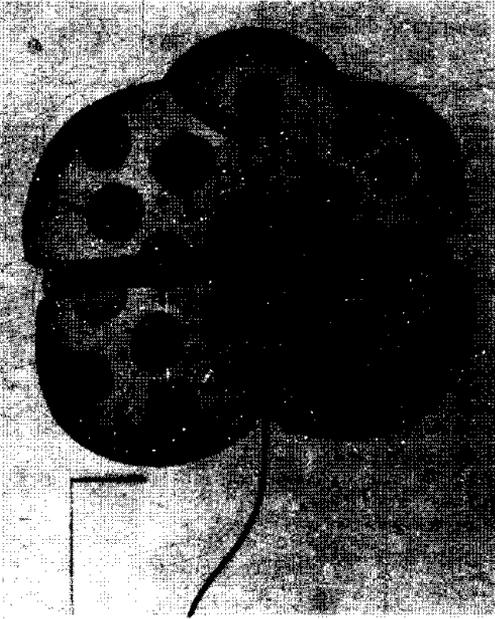


Figura 1 — *Gymnodinium breve* Davis, aumentado de 1.800 vezes.

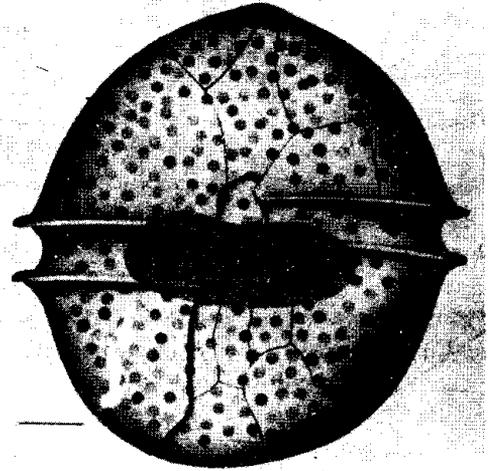


Figura 3 — *Gonyaulax tamarensis* Lebour, aumentado de 1.500 vezes.

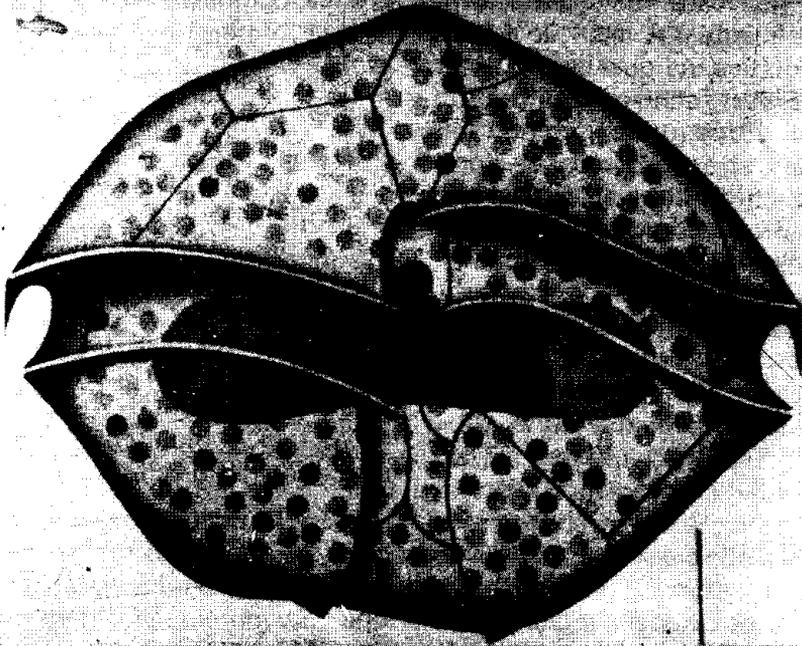


Figura 2 — *Gonyaulax catenella* Whedon e Kofoid, aumentado de 1.800 vezes.

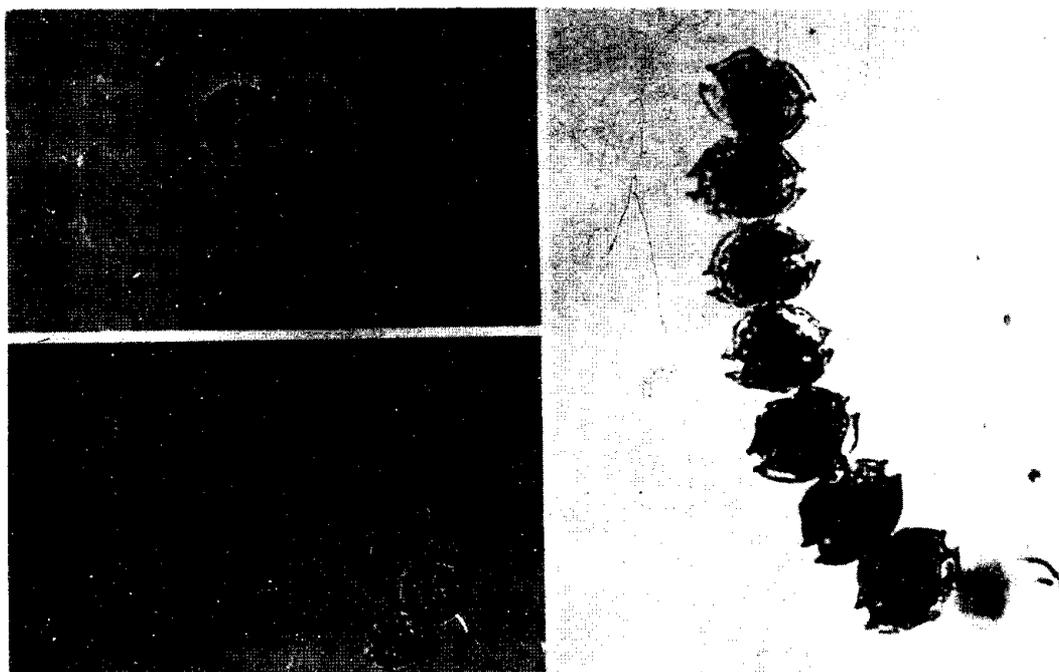


Figura 4 — *Gonyaulax catenella* em cultura, formação típica em cadeia, aumentado de 550 vezes.

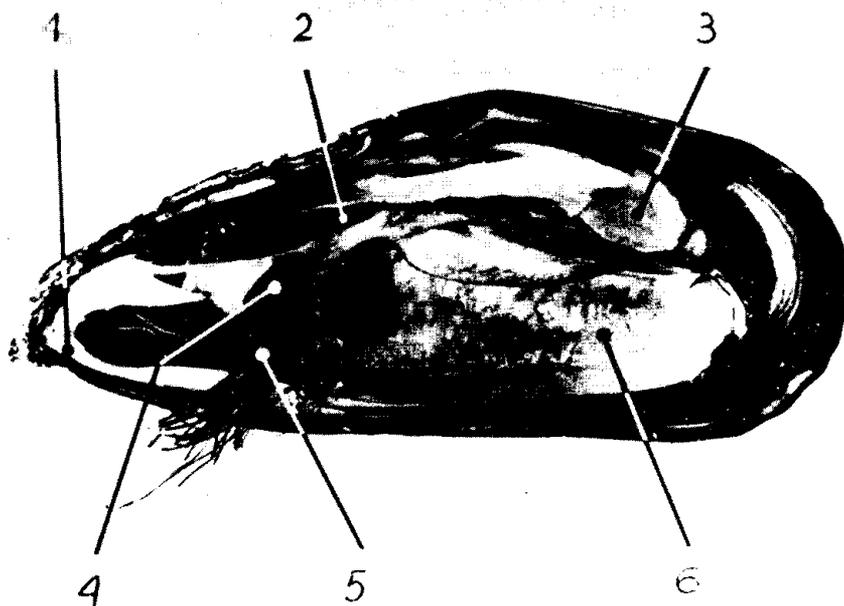


Figura 5 — Aspectos anatómicos internos de molusco do gênero *Mytilus*. 1 — músculo adutor anterior; 2 — fígado e intestinos; 3 — músculo adutor posterior; 4 — pé; 5 — bisso; 6 — brânquias.

## PROPRIEDADES QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS

Apesar dos registros sobre a sintomatologia provocada por ingestão de moluscos "intoxicados" datarem de 1689 e casos fatais serem notificados

desde 1793, somente a partir de 1885 foram iniciados os estudos para isolamento das substâncias causadoras de intoxicação. Entretanto, foi somente em 1937 que Sommer & Meyer correlacionaram a causa do envenenamento do molusco a uma microalga *Gonyaulax*

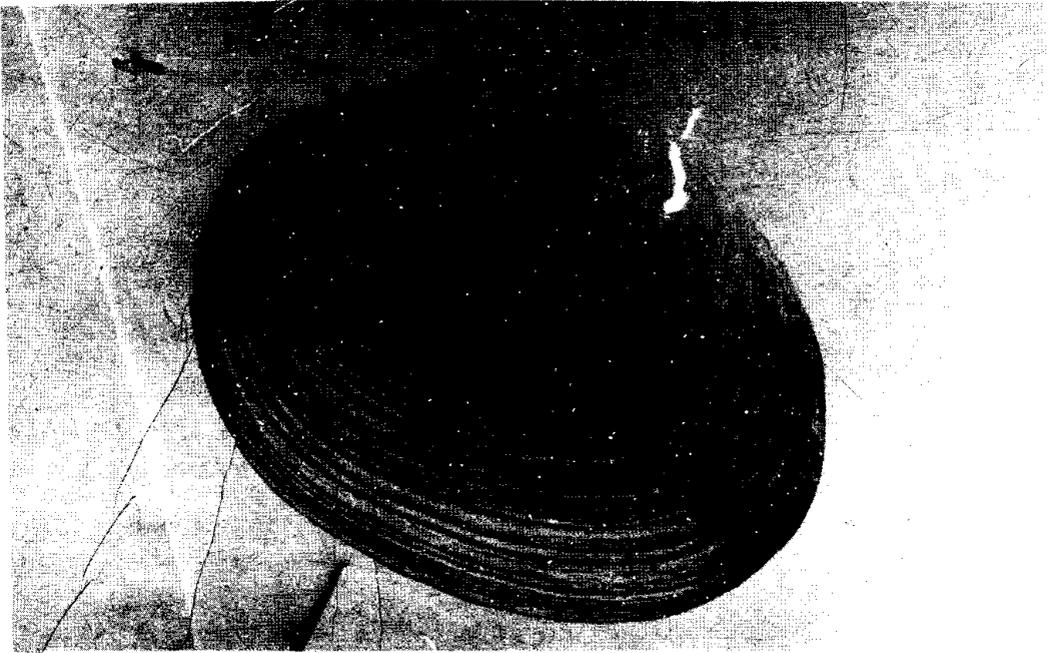


Fig. a 6 — *Saxidomus giganteus* (Deshayes), aumentado de 0,7 vezes.

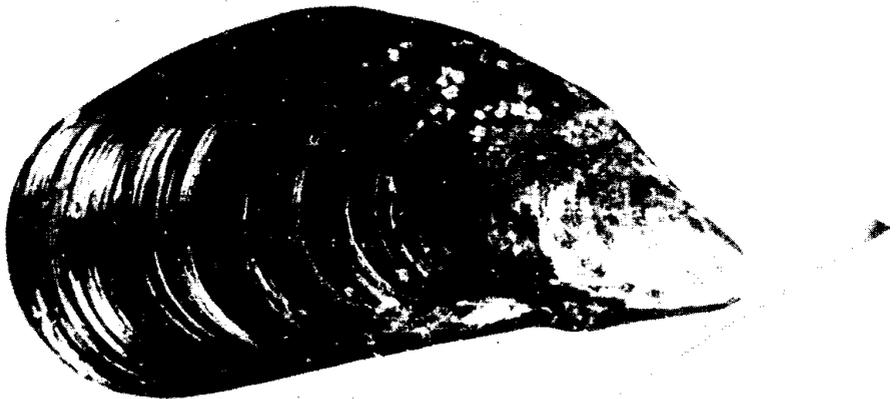


Figura 7 — *Mytilus edulis* Linnaeus, aumentado de 0,9 vezes.



Figura 8 – *Mya arenaria* Linnaeus, aumentado de 0,2 vezes.

*catenella* (Youngken & Shimizu, 1975). Posteriormente muitos estudos foram realizados visando à purificação e isolamento de várias toxinas produzidas por dinoflagelados (Mold *et al.*, 1957; Schantz *et al.*, 1957; McFarren *et al.*, 1958; Sasner *et al.*, 1972; Schantz *et al.*, 1975; Shoptaugh *et al.*, 1981).

O problema inicial para o estudo das toxinas dos dinoflagelados dizia respeito à metodologia para sua extração. Müller (1935) observou que éter e clorofórmio não eram bons solventes para este fim, sendo usados para remover impurezas, como material lipídico e alguns pigmentos. Em seguida, foram utilizados vários solventes visando a selecionar aqueles mais eficientes. Dos solventes estudados, os quais incluem álcool butílico, álcool propílico, álcool etílico, piridina, álcool metílico e ciclohexanol, foi o metanol levemente acidificado o melhor extrator. Mais recentemente, a extração tem sido feita com ácido a baixa concentração (Schantz *et al.*, 1957; White, 1977), etanol a 80% acidificado com ácido clorídrico (Ghazarossian *et al.*, 1974;

Shimizu *et al.*, 1975; Boyer *et al.*, 1978), sendo todos bastantes eficientes.

As primeiras tentativas de purificação dos extratos preparados a partir da porção comestível de moluscos, empregando agentes precipitantes, não tiveram êxito. Müller (1935) introduziu os adsorventes para a purificação, especificamente o hidróxido de alumínio, terra diatomácia, kaolim e permutite, obtendo bons resultados. Posteriormente, foram empregados métodos mais sofisticados e eficientes notadamente aqueles cromatográficos utilizando as resinas trocadoras de íons. Os sistemas cromatográficos usados com mais sucesso na purificação das toxinas de moluscos têm sido aqueles que utilizam amberlite IRC – 50, amberlite XE – 64, sephadex L – 20, sephadex G – 10 e G – 15 e coluna de ácido silícico. A combinação seqüencial de mais de um sistema cromatográfico, na maioria das vezes, aumenta a eficiência da purificação (Schantz *et al.*, 1957; Sasner *et al.*, 1972; Shimizu *et al.*, (1975).

A primeira toxina a ter estrutura e propriedades químicas estabelecidas foi a saxitoxina. Este composto tem sido detectado em extratos principalmente de *Gonyaulax catenella*, *Gonyaulax tamaris* e *Gonyaulax acatenella* em extratos de mexilhões, em especial, das espécies *Mytilus californianus*, *Saxidomus giganteus* e *Mytilus edulis*.

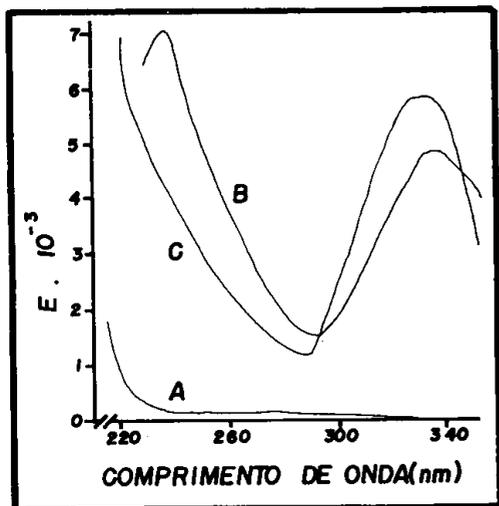


Figura 9 — Espectro de absorção ultravioleta de toxina de mexilhão: A — em forma de dihidrocloridrato; B — em forma oxidada alcalina (hidróxido de bário 0,25 N); C — produto da oxidação alcalina em solução ácida (Schantz *et al.*, 1961).

Em consequência dos estudos de vários pesquisadores, entre os quais Schantz *et al.*, (1957), Schantz *et al.*, (1961) e Wong *et al.*, (1971), ficou esclarecida que a fórmula empírica da saxitoxina, em forma de cloridrato, é  $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2 HCl$  e tem um peso molecular de 372. Purificada, a toxina é um sólido branco, solúvel em água, levemente solúvel em metanol mas insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, principalmente naqueles imissíveis em água tais como éter etílico, éter de petróleo e clorofórmio. A molécula tem dois grupos tituláveis, pka 8,2 e 11,5. Reage com o reagente de Benedict-Behre (ácido trinitrobenzólico) e com o reagente de Jaffe (trinitrofenol), para produzir uma coloração azul e laranja, respectivamente.

A toxina purificada não apresentou pico de absorção na região do ultravioleta acima de 220 nm. Contudo, quando tratada com solução alcalina e exposta ao ar, absorveu em 235 nm e 333 nm (figura 9). Na região do infravermelho ocorre absorção no intervalo de 1600 a 1700  $cm^{-1}$  (figura 10), devido aos grupos guanidina e carbâmico (Schantz *et al.*, 1961).

Em meio ácido a saxitoxina resiste a temperaturas elevadas, perdendo esta estabilidade com o tempo de exposição

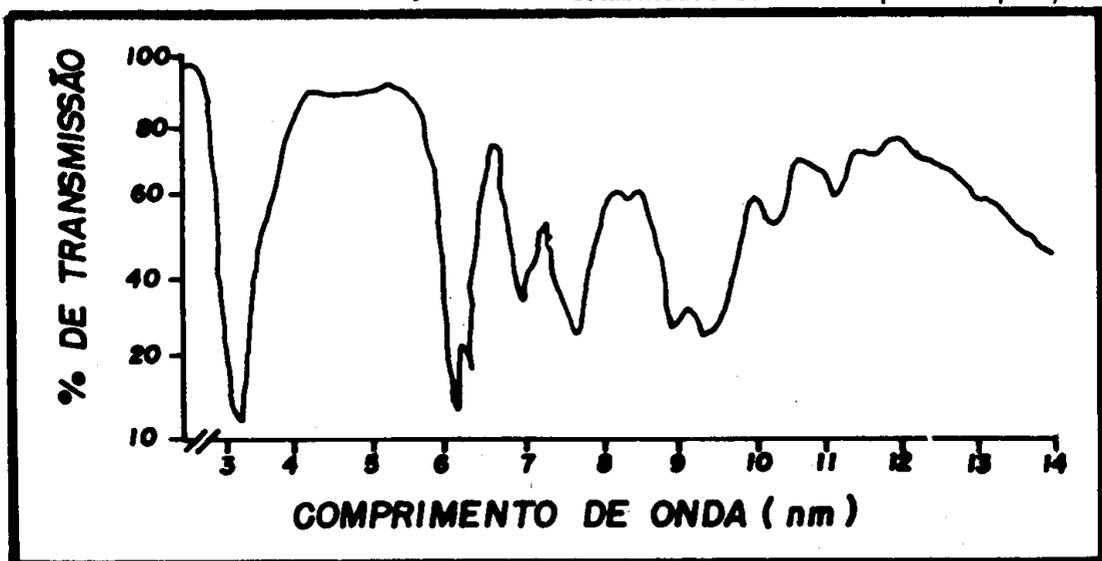


Figura 10 — Espectro de absorção no infravermelho de toxina de mexilhão em forma de dihidrocloridrato.

ao calor. A toxina, quando no mexilhão, resiste a temperatura de cocção e só é destruída quando tratada por agentes alcalinos do tipo hipoclorito de sódio. Chin (1970) observou que a toxina não perdia o seu efeito após a autoclavação a 121°C por 24 horas, mas foi neutralizada rapidamente quando tratada com hipoclorito de sódio (NaCl) a 5000 ppm.

Na tabela II são sumarizadas as principais propriedades químicas das toxinas paralisantes, retiradas dos trabalhos de Schantz *et al.* (1966) e Russel (1975).

Estes conhecimentos, somados àqueles oriundos dos estudos de difração de raio X e ressonância magnética nuclear, permitiram que Schantz *et al.* (1975) demonstrassem a estrutura química da saxitoxina, confirmada posteriormente por Bordner *et al.* (1975) e Sullivan & Iwaoka (1983). A sua configuração química é apresentada na figura 11 e mostra ser um derivado dihidropurina com grupo guanidínico.

Outras toxinas bastante semelhantes à saxitoxina têm sido encontradas em mexilhões que consomem dinoflagelados produtores destas substâncias.

White & Maranda (1978), trabalhando com o dinoflagelado *Gonyaulax excavata*, e mexilhões *Mya arenaria* e *Mytilus edulis*, obtiveram resultados que sugerem a presença de pelo menos três toxinas, sendo uma delas a saxitoxina. Estes dados seriam consistentes com aqueles registrados por Shimizu *et al.* (1975), Buckley *et al.* (1976) e Oshima *et al.* (1977), os quais encontraram além da saxitoxina mais seis outras toxinas química e farmacologicamente relacionadas com a mesma.

Schantz (1980) refere-se a três toxinas paralisantes em *Gonyaulax catenella* — saxitoxina, e duas outras em *Gonyaulax tamarensis*, a goniatoxina e II-dihidroxisaxitoxina sulfato. A diferença entre as três ocorre no radical R (figura 12), onde na saxitoxina é H, na goniatoxina é OH, e na última é SO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

TABELA II

Propriedades químicas e físicas da saxitoxina, extraída de *Gonyaulax catenella*, e de mexilhões.

Propriedades	Toxina de <i>Saxidomus giganteus</i>	Saxitoxina	Toxina de <i>Mytilus californianus</i>
Bioensaio (MU/mg) — letalidade	5200	5100	5300
Rotação ótica específica	+ 128°	+ 128°	+ 130°
pka	8,3; 11,5	8,2; 11,5	8,3; 11,5
Coefficiente de difusão	4,9 x 10 <sup>-6</sup>	4,8 x 10 <sup>-6</sup>	4,9 x 10 <sup>-6</sup>
Absorção no ultra violeta e visível	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Conteúdo de nitrogênio (Kjeldahl)	26,8	26,3	26,1
Teste de Sakaguchi	Negativo	Negativo	Negativo
Teste de Benedict-Behre	Positivo	Positivo	Positivo
Teste de Jaffe	Positivo	Positivo	Positivo
Redução com H <sub>2</sub>	Dihidro-derivados não tóxicos	Dihidro-derivados não tóxicos	Dihidroderivados não tóxicos
Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub> · 2HCl	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub> · 2HCl	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub> · 2HCl
Peso molecular	372	372	372
Estruturas aromáticas	Presentes	Presentes	Presentes
Grupo carbonil	Ausente	Ausente	Ausente

Fonte: Schantz *et al.* (1966), The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture; and Russel (1975), Poisonous and venomous marine animals and their toxins.

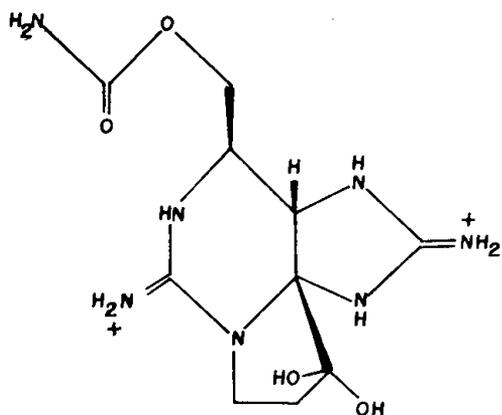


Figura 11 — Estrutura da saxitoxina (Schantz *et al.*, 1975).

Sullivan & Iwaoka (1983) e Sullivan *et al.* (1983), tentando separar as várias toxinas e derivados presentes nas culturas de *Gonyaulax* por cromatografia líquida sob alta pressão, encontraram além da saxitoxina mais cinco toxinas paralisantes: goniauxtoxina I, II, III e IV, neosaxitoxina e mais quatro derivados N — sulfocarbamoil. A estrutura destas toxinas é apresentada na figura 13 e nenhuma das goniauxtoxinas corresponde estruturalmente àquela citada por Schantz (1980).

É possível que o número de toxinas em *Gonyaulax* esteja sendo superestimado, computando-se a esse exagero falhas técnicas durante o isolamento e purificação.

A toxina de *Gymnodinium breve* é bastante diferente daquelas do tipo paralisante. A toxina deste dinoflagelado tem sido razoavelmente estudada quanto ao aspecto químico e toxicológico (Paster & Abbott, 1969; Spiegelstein *et al.*, 1973; Alam *et al.*, 1975).

Durante um intenso crescimento populacional de dinoflagelados, na Flórida, o qual provocou maré vermelha, *Gymnodinium breve* foi identificado como o principal agente do fenômeno. Martin & Chatterjee (1969), trabalhando com estes dinoflagelados isolados e cultivados em laboratório identificaram

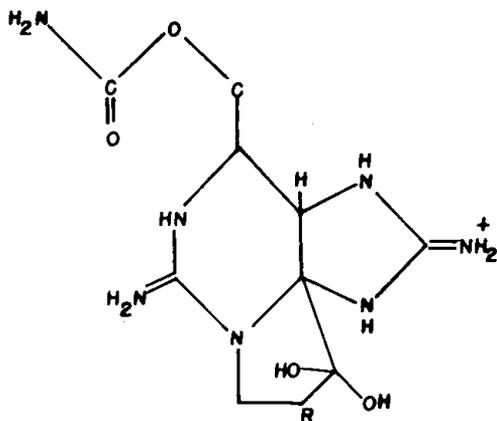
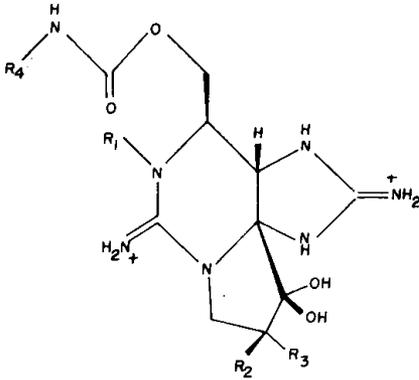


Figura 12 — Estrutura da saxitoxina e toxinas relacionadas. Saxitoxina (de *Gonyaulax catenella*), onde R é H; goniauxtoxina (de *Gonyaulax tamarensis*), onde R é OH; 11 — hidroxisaxitoxina sulfato (de *Gonyaulax tamarensis*), onde R é  $\text{OSO}_3$  (Schantz, 1980).

duas toxinas, uma das quais apresentou atividade neurotóxica, sendo sua fórmula empírica sugerida como  $\text{C}_{90}\text{H}_{162}\text{O}_{17}\text{P}$ , com peso molecular 650. A neurotoxina conhecida pela sigla GBTX tem sido responsabilizada por uma grande mortalidade em peixes. Estudos farmacológicos indicam que a toxina apresenta ação anticolinesterásica (Sasner *et al.*, 1972), provoca contração em músculos estriado, liso e cardíaco, e morte convulsiva em animais inferiores (Borison *et al.*, 1980). Em seres humanos seus efeitos são restritos a irritação nos olhos, dormência da boca e extremidades, e desconforto respiratório (Music *et al.*, citados por Gallagher & Shinnick — Gallagher, 1980).

Alam *et al.* (1975) e Halstead (1981) citam a presença de três toxinas em *Gymnodinium breve*, denominadas GB — I, II e III, todas com atividade neurotóxica. A toxina I ( $T_1$ ) também apresentou atividade hemolítica, a  $T_2$ , a principal delas, tem um peso molecular de 725 e não apresentou atividade anticolinesterásica.

Shinnick-Gallagher (1980) estudou a ação da toxina de *Gymnodinium breve* sobre a junção neuromuscular de mamíferos e observou que a toxina despolariza a membrana em repouso, aumenta sua



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
H	H	H	H	STX
H	H	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	B <sub>1</sub>
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX - II
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C <sub>1</sub>
H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	GTX - III
H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C <sub>2</sub>
OH	H	H	H	NEO
OH	H	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	B <sub>2</sub>
OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX - I
OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	GTX - IV

Figura 13 - Toxinas associadas com *paralytic shellfish poisoning*: STX = saxitoxina, GTX = goniautoxina, NEO = neosaxitoxina, e B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> - N - sulfocarbomil derivados (Sullivan *et al.*, 1983).

Segundo Halstead (1981), parece que não há um acordo, entre os vários pesquisadores que têm estudado as toxinas do dinoflagelado *Gymnodinium breve*, quanto às suas propriedades químicas, físicas e farmacológicas.

O estudo farmacológico das toxinas paralisantes tem-se concentrado na saxitoxina oriunda de *Gonyaulax catanella*.

Kellaway (1935 *a/b*) descreveu um efeito do tipo curare, quando a toxina era aplicada em músculo isolado do sapo. Entretanto, Hutner & McLaughlin (1958) afirmaram que os efeitos das toxinas paralisantes diferem daqueles do curare: enquanto este produz um bloqueio competitivo não despolarizante, as toxinas impedem a região sináptica de produzir acetilcolina. A ausência de atividade inibidora de acetilcolinesterase levou Bolton *et al.*, citados por Halstead (1965) a considerar as toxinas paralisantes como não anticolinérgicas.

Kao (1966), Halstead (1967) e Russel (1967), numa revisão sobre a ação

farmacológica das toxinas paralisantes, registraram que basicamente estas substâncias agem a nível de axônio motor e membranas musculares, impedindo que as membranas celulares tornem-se permeáveis ao sódio. Em consequência, as toxinas bloqueiam a excitabilidade das fibras musculares esqueléticas, produzindo uma paralisia muscular. Estudos de Hille (1968), citado por Kao (1974), demonstraram que estas substâncias reduzem a condutância máxima por reduzir o número de membranas dos canais através dos quais o sódio move-se para dentro.

Sinteticamente, as toxinas paralisantes têm uma ação principal sobre o sistema nervoso central, compreendendo uma atividade sobre os centros respiratório e vasomotor, e uma ação sobre o sistema nervoso periférico, isto é, sobre a junção neuromuscular (Kao & Fuhrman, 1967; Evans, 1970; e Schantz, 1980).

## AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

O bioensaio é o método oficial para a avaliação quantitativa de toxinas paralisantes, especificamente a saxitoxina, havendo uma aceitação geral no seu uso.

O ensaio biológico para detectar o teor de saxitoxina está baseado no método de Sommer & Meyer (1937), no qual um extrato suspeito é preparado e injetado em camundongos sob condições padronizadas. O tempo entre a injeção intraperitoneal e a morte é uma função exponencial da quantidade de toxina injetada. O método consiste basicamente na aplicação de 1,0 ml do extrato, intraperitonealmente, em cada grupo de três ou mais camundongos de laboratório. A toxidez é expressa em dose letal média ou "unidade de camundongo", conhecida internacionalmente pela sigla inglesa M. U., e é definida como a quantidade de "mexilhão intoxicado" capaz de matar um camundongo de 20 gramas em 10 a 20 minutos. Meyer (1953) estabeleceu que se um camundongo de 20 gramas morre em

15 minutos após receber intraperitonealmente 1,0 ml do sobrenadante da preparação, a concentração da toxina é expressa como 10 "unidades de camundongo" por 50 gramas do mexilhão. Na figura 14, o gráfico mostra a relação do tempo de morte do camundongo com a dose do "mexilhão paralisante envenenado".

O método de análise para a saxitoxina adotado pela *Association of Official Agricultural Chemists* é o do bioensaio e foi revisto e publicado por McFarren *et al.* (1961), considerando o procedimento de extração e o ensaio propriamente dito. Algumas precauções devem ser observadas durante o desenvolvimento do método, como: a) a toxina injetada deve ser diluída em água e não em soluções salinas; b) o pH da solução injetada deve estar entre 2,0 e 4,0; c) a concentração da toxina deve ser ajustada àquela que causou a morte dentre 5 a 7 minutos após a injeção; e d) o peso do camundongo a ser usado deverá estar entre 19 e 21 gramas e nunca acima de 23 gramas (Schantz *et al.*, 1958; Schantz, 1960).

Wood (1976) descreveu uma simplificação do método original de Sommer & Meyer, facilitando o trabalho dos laboratórios que controlam sistematicamente os níveis das toxinas paralisantes. Basicamente, o método compreende a homogeneização da amostra em um liquidificador, preparação do extrato mediante a agitação de 100 gramas de material com 100 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,1N e ajustamento do pH entre 3,0 e 4,0.

McFarren *et al.* (1958), considerando que as toxinas paralisantes purificadas, extraídas do *Saxidomus giganteus* e de *Mytilus californianus* dão compostos coloridos como o ácido pícrico, desenvolveram um método colorimétrico para a sua determinação quantitativa, utilizando como reagente o ácido pícrico, sendo comumente conhecido como teste de Jaffe. A reação torna-se negativa quando ocorre alguma modificação na

molécula da toxina, o que provoca uma perda de toxidez. Posteriormente, McFarren *et al.* (1959) modificaram o teste de Jaffe através da extração do ácido pícrico excedente do produto da reação, após o desenvolvimento da cor a 38°C por 20 minutos, com uma mistura de 25% de piridina em etil acetato.

Bates & Rapoport (1975) apresentaram um ensaio químico para a saxitoxina baseado na oxidação da toxina a uma purina fluorescente (figura 15), mediante tratamento com hidróxido de sódio 1M e água oxigenada a 10%. Segundo os autores este ensaio é superior ao método biológico (bioensaio) e sua utilização está sendo adotada em muitos laboratórios que controlam os surtos de moluscos paralisantes.

Shoptaugh *et al.* (1981), revisando os métodos químicos para determinação de saxitoxina e toxinas relacionadas, estabelecidos por Bates & Rapoport (1975), Bates *et al.* (1978) e Buckley *et al.* (1976, 1978) propôs o uso da fluoremetria para a determinação das citadas toxinas. Os extratos de ácido clorídrico a 0,1M aquecidos, usados para o ensaio biológico em camundongo, são tratados com peróxido de hidrogênio alcalino e a fluorescência resultante é lida em espectrofotômetro com a excitação a 330 nm com uma fenda de 5 nm e emissão a 380 nm e uma fenda de 10 nm. Os resultados mostraram-se mais sensíveis do que aqueles obtidos, para os mesmos extratos, pelo método biológico.

## ASPECTOS CLÍNICOS E DE SAÚDE PÚBLICA

A literatura cita três manifestações clínicas provocadas por ingestão de molusco e que podem ocorrer simultaneamente ou individualmente no mesmo paciente (Sommer & Meyer, 1937; Halstead, 1965, 1981). O primeiro tipo é caracterizado por náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais, com um período de incubação de, aproximada-

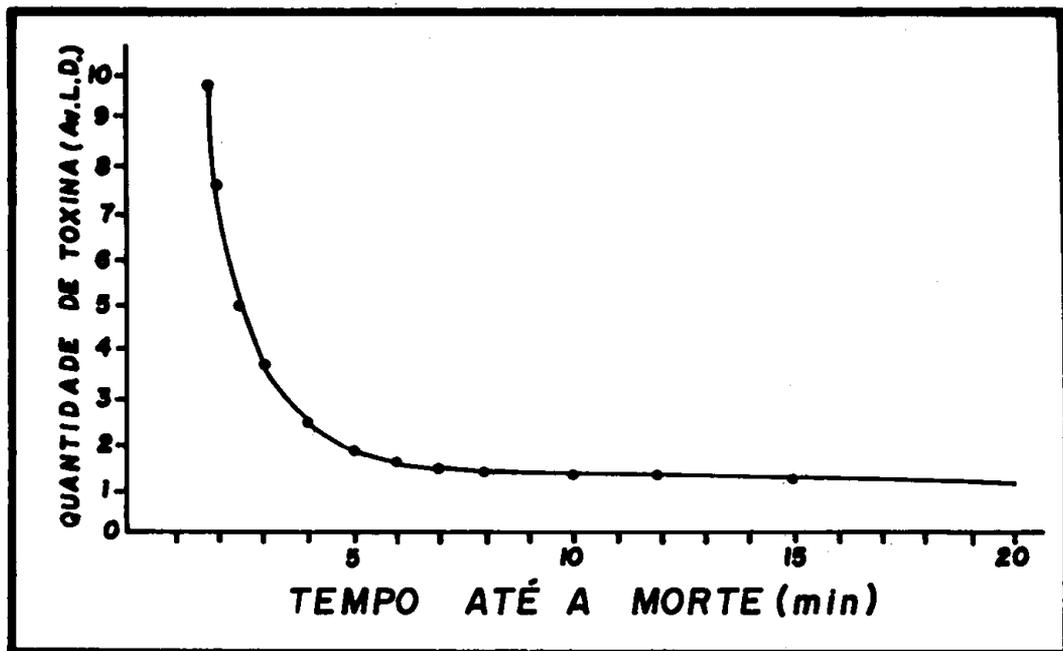


Figura 14 — Gráfico mostrando a relação entre o tempo de morte de rato e a dose de molusco paralisante intoxicado (Sommer & Meyer, 1937).

mente, 10 a 12 horas. Uma grande variedade de bactérias patogênicas causa esse tipo não específico de intoxicação por alimento. Essa manifestação não é provocada somente por molusco, mas por todos os alimentos contaminados por estes tipos de bactérias.

A segunda manifestação clínica é relacionada com sintomas alérgicos como eritema difuso, inchaço e urticária que, particularmente, afetam a face e pescoço, podendo atingir todo o corpo. A erupção é geralmente acompanhada por prurido. Ao lado dessas manifestações podem também estar presentes outros sintomas, como dor de cabeça, sensação de calor, inchaço da língua e dispnéia. A preservação inadequada do molusco é apontada como a causa desse tipo de intoxicação, sendo, por outro lado, contestada uma vez que moluscos em estado fresco têm sido incriminados. A natureza exata da doença ainda é obscura, embora existam fortes indícios que a enquadram naquelas de origem alérgica. A recuperação do paciente usualmente ocorre em poucos dias, mas a morte pode ocorrer eventualmente.

A intoxicação causada por mexilhões paralisantes é o terceiro tipo de moléstia causada especificamente por dinoflagelados presentes em moluscos. Os sintomas causados pela ingestão de moluscos contendo dinoflagelados produtores de toxinas paralisantes são manifestados, em geral, em 30 minutos. Inicialmente, aparece um ardor ou sensação de dormência nos lábios, gengiva, língua e faces, atingindo, em seguida, o pescoço, braços, pernas e pés. Em casos graves, a ataxia e descoordenação motora são acompanhadas por uma sensação de leveza como se o paciente estivesse flutuando no ar. Sintomas gastrointestinais como vômitos, diarreia e dores abdominais são raros. Sintomas mentais variam, mas geralmente as vítimas são calmas e conscientes de sua doença. Contração muscular e convulsões são manifestações muito raras. No estágio final da doença, acentuam-se progressivamente a debilidade motora e a paralisia muscular, ocorrendo a morte por parada respiratória, geralmente dentro um período de 12 horas após a ingestão do "mexilhão paralisante". Dificilmente

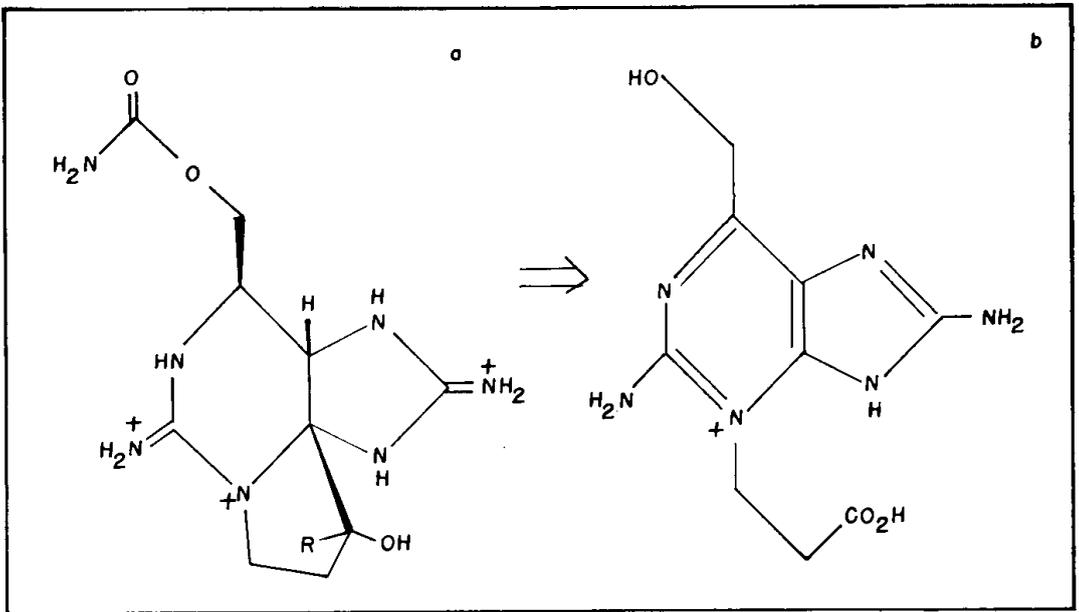


Figura 15 — Saxitoxina (a), a toxina do molusco paralisante, pode ser oxidada a purina (b) cuja concentração pode ser determinada por absorbância no ultravioleta ou fluorescência (Bates *et al.*, 1978).

o paciente morre se sobreviver as primeiras 12 horas e não há casos de óbito por "mexilhão paralisante" após 24 horas de sua ingestão.

Não havendo antídoto para a intoxicação de mexilhão paralisante, a terapia é sintomática. Desde que a toxina é prontamente adsorvida em carvão vegetal, o reagente de Lloyd e adsorventes similares são usados como uma tentativa de minimizar a sua absorção. Soluções alcalinas também são de algum valor, desde que ministradas logo após a ingestão de mexilhão intoxicado, uma vez que a toxina paralisante é instável em meio alcalino e, por conseguinte, perde sua ação deletéria.

A prática da respiração artificial é uma ajuda importante e deve ser utilizada à menor evidência de dificuldade respiratória. Murtha (1960) assinala que esta técnica tem sido usada com bons resultados.

Não há, na prática, um método capaz de diferenciar um mexilhão comestível

de um contaminado com dinoflagelados causadores de intoxicação paralisante, sendo o teste de toxidez realizado em laboratório o único confiável. Métodos como cozimento, fritura, tratamento com água em fervura têm pouco valor na destruição da toxina uma vez que a mesma é termoestável. Medcof *et al.* (1947) endenciaram que o cozimento por 30 minutos pode reduzir a potência da toxina em até 70% e Chin (1970) encontrou que o tratamento do mexilhão com hipoclorito de sódio inativa a toxina.

Entretanto, a prevenção mais racional é aquela que põe em quarentena uma área em que há indícios de organismos causadores de intoxicação paralisante. O aparecimento de modificações na coloração da água, principalmente quando a cor é avermelhada, e morte abundante de peixes, são sinais que devem provocar uma interdição da pesca na área em questão.

## CONCLUSÃO

Ao final desta monografia, poder-se-ão alinhar as principais informações, tidas como relevantes, sobre as toxinas de dinoflagelados, especialmente aquelas transmitidas ao homem pelos moluscos.

As toxinas tidas como paralisantes são produzidas principalmente pelos dinoflagelados *Gonyaulax catenella*, *Gonyaulax acatenella* e *Gonyaulax tamarensis*.

Os principais moluscos envolvidos na transmissão de toxinas paralisantes ao homem são *Saxidomus giganteus*, *Mytilus californianus* e *Mytilus edulis*.

O número de toxinas isoladas desses organismos tem variado de conformidade com o pesquisador e os métodos químicos usados. Considerando todas as toxinas até o momento isoladas, temos a saxitoxina, goniautoxina I, II, III e IV, neosaxitoxina e mais quatro derivados N — sulfocarbamoil.

A saxitoxina, que tem sido mais estudada química e farmacologicamente, em sua forma de cloridrato apresenta uma fórmula molecular de  $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2HCl$ , com peso molecular de 372. Em estado purificado é um sólido branco, solúvel em água, levemente solúvel em metanol e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, apresentando dois grupos tituláveis em pKa 8,2 e 11,5. Reage com o reagente de Benedict-Behre e com o reagente de Jaffe, resultando numa coloração azul e laranja, respectivamente. Não apresenta absorção no ultravioleta acima de 220 nm.

As toxinas paralisantes, em especial a saxitoxina, têm sua ação principal sobre o sistema nervoso central com atividade sobre os centros respiratórios e vasomotor, e uma ação sobre o sistema nervoso periférico. A toxina bloqueia a entrada do sódio na célula, evitando a excitabilidade das fibras musculares e, em consequência, há uma paralisia muscular.

Os sintomas clínicos provocados por essas toxinas são manifestados 30

minutos após a ingestão de moluscos paralisantes e constam principalmente de dormência nos lábios, língua e faces. Em casos graves, descoordenação motora, pulso rápido e paralisia muscular, ocorrendo a morte por parada respiratória.

Do *Gymnodinium breve* Martin & Chatterjee (1969) isolaram duas toxinas, uma das quais apresentou atividade neurotóxica, com uma fórmula empírica  $C_9O_4H_{162}O_{17}P$  e peso molecular de 650, com ação anticolinesterásica.

Entretanto, segundo Alam *et al.* (1975) e Halstead (1981), conclui-se que já foram isoladas três toxinas denominadas GB I, II e III, todas com atividade neurotóxica. A toxina I também apresentou atividade hemolítica e a II, a principal delas, tem um peso molecular de 725 não possuindo atividade anticolinesterásica.

As toxinas deste dinoflagelado, embora de alta toxicidade para os peixes são, entretanto, causadoras de fracas intoxicações no homem, não se constituindo como um risco iminente para a vida humana.

*Agradecimento* — Agradeço aos Engenheiros de Pesca Alexandre Holanda Sampaio e Silvana Sakker Sampaio, pela colaboração prestada no levantamento bibliográfico para este trabalho.

## SUMMARY

*English title:* Toxins in marine dinoflagellates.

This work intends to give a short account of the facts and agents of toxins, mainly those transmitted to man by paralytic shellfish. The principal toxins held as paralytic are produced by dinoflagellates, with special reference to *Gonyaulax catenella*, *Gonyaulax acatenella* and *Gonyaulax tamerensis*. The main mollusks involved in the transmission of paralytic toxins to man are *Saxidomus giganteus*, *Mytilus californianus* and *Mytilus edulis*. Their

physical, chemical and pharmacological properties are dealt with, the primary producers identified and some medical aspects related to clinical symptoms, treatment, prevention and importance to public health are discussed.

In Brazil, this subject has received but little attention both from researchers and health authorities, and this is the main relevance of this work as dinoflagellates, throughout the years, have been responsible for the mortality of many marine organisms, especially fish.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M.; N. M. Trieff; S. M. Ray & J. E. Hudson — 1975 — Isolation and partial characterization of toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium breve* Davis. *J. Pharm. Sci.*, 64 (5) : 865-867.
- Amabis, J. M.; G. R. Martho & Y. Mizuguchi — 1974 — *Biologia*. Vol. 1. Editora Moderna, 478 pp., São Paulo.
- Arcos, T. V. — 1982 — Mareias rojas en aguas equatorianas. *Rev. Cien. Mar Limn., Guayaquil*, 1 (2).
- Baslow, M. H. — 1969 — *Marine pharmacology. A study of toxins and other biologically active substances of marine origin*. The Williams & Wilkins Co., 452 pp., Baltimore.
- Bates, H. A.; R. Kostriken & H. Rapoport — 1978 — A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications. *J. Agric. Food Chem.*, 26 (1) : 252-254.
- Bates, H. A. & H. Rapoport — 1975 — A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J. Agric. Food Chem.*, 23 (2) : 237-239.
- Bordner, J.; W. E. Thiessen; H. A. Bates & H. Rapoport — 1975 — The structure of a crystalline derivative of saxitoxin. The structure of saxitoxin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 97 (21) : 6008-6012.
- Borison, H. L.; S. Ellis & L. E. McCharthy — 1980 — Central respiratory and circulatory effects of *Gymnodinium breve* toxin in anaesthetized cats. *Br. J. Pharm.*, 70 (2) : 249-256.
- Boyer, G. L.; E. J. Schantz & H. K. Schnoes — 1978 — Characterization of 11 — hydroxysaxitoxin sulphate, a major toxin in scallops exposed to blooms of the poisonous dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *J. C. S. Chem. Comm.*, 474 : 889-890.
- Buchwald, H. D.; L. Durham; H. G. Fisher; R. Harada; H. S. Mosher; C. Y. Kao & F. A. Fuhrman — 1964 — Identity of tarichatoxin and tetrodotoxin. *Science*, Washington, 143: 474-475.
- Buckley, L. J.; M. Ikawa & J. J. Sasner Jr. — 1976 — Isolation of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shell clam (*Mya arenaria*) and thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection. *J. Agric. Food Chem.*, 24 (1) : 107-111.
- Buckley, L. J.; Y. Oshima & Y. Shimizu — 1978 — Construction of a paralytic shellfish toxin analyzer and its application. *Anal. Biochem.*, 85 : 157-164.
- Chin, C. D. — 1970 — Neutralization of shellfish poison by chemical disinfectants. *Toxic. Appl. Pharm.*, 16 : 430-433.
- Evans, M. H. — 1970 — Two toxins from a poisonous sample of mussels *Mytilus edulis*. *Br. J. Pharm.*, 40 : 847-866.
- Gallagher, J. P. & P. Shinmick-Gallagher — 1980 — Effect of *Gymnodinium breve* toxin in the rat phrenic nerve diaphragm preparation. *Br. J. Pharm.*, 69 : 367-372.
- Ghazarossian, V. E.; E. J. Schantz; H. K. Schnoes & F. M. Strong — 1974 — Identification of a poison in toxic scallops from a *Gonyaulax tamarensis* red tide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59 (4) : 1219-1225.
- Goto, T.; Y. Kishi; S. Takahashi & Y. Hirata — 1965 — Tetrodotoxin XI. *Tetraedron*, 21 : 2059-2088.
- Halstead, B. W. — 1965 — *Poisonous and venomous marine animals of the world. Vol. 1: Invertebrates*. Government Printing Office, 994 pp., Washington.
- Halstead, B. W. — 1981 — Current status of marine biotoxicology — an overview. *Clin. Toxic.*, 18 (1) : 1-24.
- Hutner, S. H. & J. J. McLaughlin — 1958 — Poisonous tides. *Sci. Amer.*, 199 (2) : 92-98.
- Kao, C. Y. — 1966 — Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharm. Rev.*, 18 (2) : 997-1049.
- Kao, C. Y. — 1974 — Differences between the actions of tetrodotoxin and saxitoxin, pp. 115-121, in Humm, H. J. & C. E. Lane (eds.) *Bioactive compounds from the sea*. Marcel Dekker, Inc., 229 pp., New York.
- Kao, C. Y. & F. A. Fuhrman — 1967 — Differentiation of the actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Toxicon*, 5 : 25-34.
- Kellaway, C. H. — 1935a — Mussel poisoning — *Med. J. Aust.*, 1 : 399-401.

- Kellaway, C. H. — 1935b — The action of mussel poison on the nervous system. *Aust. J. Exp. Biol. Med.*, 13 : 79-94.
- Kwan-Ming, L. — 1965 — Ciguatera fish poison: a cholinesterase inhibitor. *Science*, Washington, 147 : 1580-1581.
- Martin, D. F. & A. B. Chatterjee — 1969 — Isolation and characterization of a toxin from the Florida red tide organism. *Nature*, London, 221 (4) : 59.
- Martin, D. F. & G. M. Padilla — 1974 — Some physiological properties of dinoflagellate toxins, pp. 151-173, in Humm, H. J. & C. E. Lane (eds.), *Bioactive compounds from the sea*. Marcel Dekker, Inc., 229 pp., New York.
- McFarren, E. F.; E. J. Schantz; J. E. Campbell & K. H. Lewis — 1958 — Chemical determination of paralytic shellfish poison in clams. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 41 (1) : 168-177.
- McFarren, E. F.; E. J. Schantz; J. E. Campbell & K. H. Lewis — 1959 — A modified Jaffe test for determination of paralytic shellfish poison. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 42 (2) : 399-404.
- McFarren, E. F.; M. S. Schaeffer; J. E. Campbell; K. H. Lewis; E. T. Jensen & E. S. Schantz — 1961 — Public health significance of paralytic shellfish poison. *Adv. Food Res.*, 10 : 135-179.
- Medcof, J. C.; A. H. Lein; A. B. Needler; A. W. H. Needler; J. Gibbard & J. Naubert — 1947 — Paralytic shellfish poisoning on the Canadian Atlantic coast. *Bull. Fish. Res. Board Can.*, Ottawa, (75) : 1-32.
- Meyer, K. F. — 1953 — Food poisoning. *New Engl. J. Med.*, 249 : 843-852.
- Meyer, K. F.; H. Sommer & P. Schoenholz — 1928 — Mussel poisoning. *J. Prev. Med.*, 2 (5) : 365-394.
- Mold, J. D.; J. P. Bowden; D. W. Stanger; J. E. Maurer; J. M. Lynch; R. S. Wyler; E. J. Schantz & B. Riegel — 1957 — Paralytic shellfish poison. VII. Evidence for the purity of the poison isolated from toxic clams and mussels. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79 : 5235-5238.
- Mosher, H. S.; F. A. Fuhrman; H. D. Buchwald & H. G. Fischer — 1964 — Tarichatoxin — Tetrodotxin, a potent neurotoxin. *Science*, Washington, 144 : 1100-1110.
- Müller, H. — 1935 — The chemistry and toxicity of mussel poison. *J. Pharm.*, 53 : 67-89.
- Murtha, E. F. — 1960 — Pharmacological study of poisons from shellfish and puffer fish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 90 : 820-836.
- Ohizumi, Y.; S. Shibata & K. Tachibana — 1981 — Mode of the excitatory and inhibitory actions of ciguatoxin in the guinea-pig vas deferens. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 217 (2) : 475-480.
- Ohizumi, Y.; Y. Ishida & S. Shibata — 1982 — Mode of the ciguatoxin-induced supersensitivity in the Guinea-pig vas deferens. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 221 (3) : 748-752.
- Oshima, Y.; L. J. Buckley; M. Alam & Y. Shimizu — 1977 — Heterogeneity of paralytic shellfish poisons. Three new toxins from cultured *Gonyaulax tamarensis* cells, *Mya arenaria* and *Saxidomus giganteus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57c : 31-34.
- Paster, Z. & B. C. Abbott — 1969 — Hemolysis of rabbit erythrocytes by *Gymnodinium breve* toxin. *Toxicon.*, 7 : 245.
- Rayner, M. D.; T. I. Kosaki & E. L. Fellmeth — 1968 — Ciguatoxin: more than an anticholinesterase. *Science*, Washington, 160 : 70-71.
- Russel, F. E. — 1975 — Poisonous and venomous animals and their toxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 245 : 57-64.
- Sasner Jr., J. J.; M. Ikawa; F. Thurberg & M. Alam — 1972 — Physiological and chemical studies on *Gymnodinium breve* Davis toxin. *Toxicon.*, 10 : 163-172.
- Schantz, E. J. — 1960 — Biochemical studies on paralytic shellfish poisons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 90 : 843-855.
- Schantz, E. J. — 1980 — Phycotoxin from dinoflagellates. *Pure Appl. Chem.*, 52 (1) : 183-188.
- Schantz, E. J.; V. E. Ghazarrosian; H. K. Schonoes; F. M. Strong; J. P. Springer; J. O. Pezzanit & J. Clardy — 1975 — The structure of saxitoxin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 97 (5) : 1238-1239.
- Schantz, E. J.; J. M. Lynch; G. Vayrada; K. Matsumoto & H. Rapoport — 1966 — The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture. *Biochemistry*, 5 (4) : 1191-1195.
- Schantz, E. J.; E. F. McFarren; M. L. Schaeffer & K. H. Lewis — 1958 — Purified shellfish poison for bioassay standardization. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 41 : 160-168.
- Schantz, E. J.; J. D. Mold; W. L. Howard; J. P. Bowden; D. W. Stanger; J. M. Lynch; O. P. Wintersteiner; J. P. Dutcher; D. R. Walter & B. Riegel — 1961 — Paralytic shellfish poison. VIII. Some chemical and physical properties of purified clam and mussel poisons. *Can. J. Chem.*, 39 : 2117-2123.

- Schantz, E. J.; J. D. Mold; D. W. Stanger; J. Shavel; F. J. Riel; J. P. Bowden; J. M. Lynch; R. S. Wyler; B. Riegel & H. Sommer — 1957 — Paralytic shellfish poisoning. VI. A procedure for isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissue. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79: 5230-5235.
- Sheuer, P. J. — 1967 — Ciguatoxin: isolation and chemical nature. *Science*, Washington, 155: 1267-1268.
- Shimizu, Y.; M. Alam; Y. Oshima & W. E. Fallon — 1975 — Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured *Gonyaulax tamarensis* cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66 (2) : 731-737.
- Shinnick-Gallagher, P. — 1980 — Possible mechanisms of action of *Gymnodinium breve* toxin at the mammalian neuromuscular junction. *Br. J. Pharm.*, 69 : 373-378.
- Shoptaugh, N. H.; P. W. Carter; T. L. Foxall; J. J. Sasner Jr. & M. Ikawa — 1981 — Use of fluorimetry for the determination of *Gonyaulax tamarensis* var. *excavata* toxins in New England Shellfish. *J. Agric. Food Chem.*, 29 (1) : 198-200.
- Sommer, H. & K. F. Meyer — 1937 — Paralytic shellfish poisoning. *Arch. Pathol.*, 24: 560-598.
- Sommer, H.; W. F. Whedon; C. A. Kofoid & R. Stohler — 1937 — Relation of paralytic shellfish poison to certain plankton organisms of the genus *Gonyaulax*. *Arch. Pathol.*, 24: 537-559.
- Spiegelstein, M. Y.; Z. Paster & B. C. Abbott — 1973 — Purification and biological activity of *Gymnodinium breve* toxins. *Toxicon*, 11 : 85-93.
- Storer, T. I. & R. L. Usinger — 1978 — *Zoologia geral*. Companhia Editora Nacional, XIV + 713 pp., São Paulo.
- Sullivan, J. J. & W. T. Iwaoka — 1983 — High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66 (2) : 297-303.
- Sullivan, J. J.; M. G. Simon & W. T. Iwaoka — 1983 — Comparison of HPLC and mouse bioassay methods for determining PSP toxins in shellfish. *J. Food Sci.*, 48: 1312-1314.
- White, A. W. — 1977 — Dinoflagellates toxins as probable cause of an Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) kill, and pteropodes as apparent vector. *J. Fish. Res. Board Can.*, Ottawa, 34 (12) : 2421-2424.
- White, A. W. & L. Maranda — 1978 — Paralytic toxins in the dinoflagellate *Gonyaulax excavata* and shellfish. *J. Fish. Res. Board Can.*, Ottawa, 35 (4): 397-402.
- Wong, J. L.; M. S. Brown; K. Matsumoto; R. Oesterlin & H. Rapoport — 1971 — Degradation of saxitoxin to a pyrimido [2, 1-6] purine. *J. Amer. Chem. Soc.*, 93 (18): 4633-4634.
- Wood, P. C. — 1976 — *Guide to shellfish hygiene*. World Health Organization, 80 pp., Geneva.
- Woodward, R. B. — 1964 — Structure of tetrodotoxin. *Pure Appl. Chem.*, 9: 49-74.
- Youngken Jr., H. W. & Y. Shimizu — 1975 — *Marine drugs: chemical and pharmacological aspects*, in Filey, J. & Shinow (eds.), *Chemical Oceanography*, 2nd edition, vol. 4, 269-317.