



ISABELLA FONTANA

**Propostas para o sistema de vigilância de moluscos bivalves
de Santa Catarina**

São Paulo

2016

ISABELLA FONTANA

Propostas para o sistema de vigilância de moluscos bivalves de Santa Catarina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - Brasil e Faculdade de Agricultura e Medicina Veterinária da Universidade de Padova - Itália para obtenção da Dupla Titulação de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadores:

Prof. Dr. Fernando Ferreira

Profa. Dra. Daniela Bertotto

De acordo: _____

Orientador USP

Isabella Fontana

Isabella Fontana

São Paulo

2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

**CERTIFIED**

We certify that the Research "Structuring a Surveillance System of Bivalve Molluscs in Santa Catarina, Brazil", protocol number CEUAX 9428060314, under the responsibility Fernando Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo, and was approved in the meeting of day May 07, 2014.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Proposta de Estruturação do Sistema de Vigilância de Moluscos Bivalves de Santa Catarina", protocolado sob o CEUAX nº 9428060314, sob a responsabilidade de Fernando Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 07 de maio de 2014.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3350
FMVZ

Fontana, Isabella
Propostas para o sistema de vigilância de moluscos bivalves de Santa Catarina /
Isabella Fontana. -- 2016.
139 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, Brasil e Faculdade de Agricultura e Medicina Veterinária da Universidade de Padova, Itália, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira.
Profa. Dra. Daniela Bertotto.

1. Sistema de vigilância. 2. Amostragem de moluscos bivalves. 3. Malacocultura de Santa Catarina. 4. Biotoxinas. 5. Algas nocivas. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FONTANA, Isabella

Título: **Propostas para o sistema de vigilância de moluscos bivalves de Santa Catarina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - Brasil e Faculdade de Agricultura e Medicina Veterinária da Universidade de Padova - Itália para obtenção da Dupla Titulação de Doutor em Ciências

Data: 29 / 07 / 2016

Banca examinadora

Prof. Dr.: José Soares Ferreira Neto

Instituição: FMVZ – USP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Vitor Salvador Picão Gonçalves

Instituição: UnB

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Mauro Riegert Borba

Instituição: UFRGS

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Daniela Bertotto

Instituição: UNIPD, Itália

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Henrique César Pereira Figueiredo

Instituição: UFMG

Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

Agraço às Universidades de São Paulo (USP) e à Università degli Studi di Padova (UNIPD), pela oportunidade de realização do programa de doutorado duplo, e aos professores Fernando Ferreira e Daniela Bertotto pela orientação.

Aos professores, funcionários, alunos e amigos dos departamentos de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da USP, do Departamento de Biomedicina Comparata e Alimentazione, da UNIPD, e do Laboratório de Epidemiologia e Planejamento em Saúde Animal, da Universidade de Brasília, pelo apoio durante toda a realização da minha pesquisa. Em especial, agradeço aos professores José Soares Ferreira Neto, Vítor Salvador Picão Gonçalves, Marco Martini e Ricardo Augusto Dias, ao funcionário Danival Lopes, aos queridos amigos e companheiros de trabalho, Ana Rita Pinheiro Marques, Ana Lourdes Arrais Alencar Mota, Marina Delphino, Aline Gil Guilloux, Anaiá da Paixão Sevá, Raul Ossada, Jason Onell Ardila Galvis, Gina Polo, Oswaldo Santos, Mariana Ramos Queiroz e Sebastián Alejandro Muñoz Leal.

Agradeço também aos servidores Eduardo de Azevedo Pedrosa Cunha, Daniel Machado e Pedro Henrique de Oliveira, da Coordenação-Geral de Animais Aquáticos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e ao servidor Pedro Mansur Sesterhenn, da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) pelo fornecimento de informações e dados essenciais à pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudo concedida no Brasil e pelo financiamento da participação de cursos e eventos por meio do processo CAPES/PROEX 3006/2011. Finalmente, agradeço ao Programa Ciências Sem Fronteiras pela bolsa de estudos concedida no exterior para a realização do programa de dupla-titulação (BEX-8728/14-3) no período de janeiro a setembro de 2015.

DEDICATÓRIA

À família Fontana, Riccardo, Dulce, Eloisa e Renato, minhas maiores fontes de apoio.

“... If we had not been wounded, if we had not been injured, then we will not produce the pearl.”

- Stephan A. Hoeller

RESUMO

FONTANA, I. **Propostas para o sistema de vigilância de moluscos bivalves de Santa Catarina.** [Proposals for the bivalve molluscs surveillance system of the Santa Catarina coast, Brazil]. 2016. 139 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Moluscos bivalves são organismos filtradores capazes de concentrar substâncias produzidas por microalgas tóxicas. No estado de Santa Catarina, líder na produção nacional, os cultivos têm sido oficialmente monitorados para a detecção de ficotoxinas causadoras dos Envenenamentos Diarreico (DSP), Amnésico (ASP) e Paralisante (PSP) por Consumo de Moluscos nas partes comestíveis. Amostras de água também são coletadas para a quantificação de algas nocivas. O objetivo deste trabalho foi sugerir o uso de áreas amostrais para coletas semanais, bem como calcular o tamanho das amostras agrupadas e analisar os dados de ocorrência. Diferentes cenários foram desenvolvidos para simular a variação dos tamanhos amostrais, utilizando-se o EpiTools®. Considerando-se uma alta prevalência e altas sensibilidades dos testes, é possível sugerir dois pools amostrais para a detecção de Toxinas Lipofílicas (2x30), duas para detectar PSP (2x15) e uma para detectar ASP (1x20) em cada uma das 24 áreas amostrais sugeridas. Se o teste de Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) for validado para todas as biotoxinas, apenas um pool amostral seria suficiente (1x15). Informações espaço-temporais de ocorrência também foram analisadas e apenas ficotoxinas causadoras de DSP foram encontradas. Utilizando-se os softwares SaTScan® e QGIS 2.12.2-Lyon®, foram desenvolvidos mapas de calor com os dois clusters espaciais encontrados para as detecções de DSP em moluscos e os quatro para *Dinophysis acuminata* (≥ 100 cels/L) em amostras de água. Os resultados com maiores riscos relativos corresponderam ao cluster temporal do segundo semestre de 2014, os clusters espaciais das áreas 7 a 11 para DSP e áreas de 7 a 9 para *D. acuminata*. Esses resultados poderão contribuir para o planejamento de estratégias a serem incorporadas num futuro sistema de vigilância de moluscos bivalves do estado.

Palavras-chave: Sistema de vigilância. Amostragem de moluscos bivalves. Malacocultura de Santa Catarina. Biotoxinas. Algas nocivas.

ABSTRACT

FONTANA, I. **Proposals for the bivalve molluscs surveillance system of the Santa Catarina coast, Brazil.** [Propostas para o sistema de vigilância de moluscos bivalves de Santa Catarina]. 2016. 139 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bivalve molluscs are filtering organisms capable to concentrate substances produced by toxic microalgae. In Santa Catarina state, main Brazilian producer, the crops have been officially monitored for the detection of phycotoxins that cause Diarrhetic (DSP), Amnesic (ASP), and Paralyzing (PSP) Shellfish Poisonings in edible parts. Water samples are also collected for harmful algae quantification. The goal of this study was to suggest the use of areas to be weekly sampled, as well as to calculate pooled sample sizes and to analyze the occurrence data. Different scenarios were developed to simulate the variation of sample sizes in EpiTools®. Considering a high prevalence and high tests sensitivities, we can suggest two pools to detect Lipophilic Toxins (2x30), two to detect PSP (2x15), and one to detect ASP (1x20) in each of the 24 suggested sampling areas. If the test of Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (LC-MS/MS) becomes validated for all biotoxins, only one pool would be enough (1x15). Space-time occurrence information was also analyzed and only phycotoxins causing DSP were found. Using SaTScan® and QGIS 2.12.2-Lyon® softwares, we developed heatmaps with two clusters found for DSP detection in shellfish and the four found for *Dinophysis acuminata* (≥ 100 cells/L) in water samples. The results with higher relative risk values corresponded to the time cluster of the second semester of 2014, spatial cluster of the areas 7 to 11 for DSP, and areas 7 to 9 for *D. acuminata*. These results can contribute for the strategic plans to be incorporated in a future bivalve molluscs surveillance system of the state.

Keywords: Surveillance system. Bivalve molluscs sampling. Shellfish production in Santa Catarina. Biotoxins. Harmful algae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 -	Produção de organismos aquáticos (ton./ano) nos principais municípios de Santa Catarina	30
Gráfico 2 -	Número de cultivos registrados por espécie no estado de SC.....	31
Gráfico 3 -	Número de maricultores nos principais municípios do estado de Santa Catarina	34
Gráfico 4 -	Tamanhos das áreas aquícolas destinadas à maricultura nos principais municípios do estado de SC	35
Gráfico 5 -	Quantidade de localidades onde foram detectadas toxinas ASP ao longo do tempo	108
Figura 1 -	A) Mexilhão (<i>Perna perna</i>). B) Ostras-do-pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>). C) Vieira (<i>Nodipecten nodosus</i>). D) Ostra-do-mangue (<i>C. rhizophorae</i>). E) Ostras-do-mague (<i>C. brasiliiana</i>). F) Berbigões (<i>Anomalocardia brasiliiana</i>) extraídos da Reserva do Pirajubaé, em Santa Catarina	31
Figura 2 -	A) Sururu (<i>Mytella charruana</i>); B) Turú (<i>Teredo navalis</i>) seco.....	33
Figura 3 -	A) Asa-de-anjo (<i>Cyrtopleura costata</i>); B) Ptéria, ostra perlífera (<i>Pteria hirundo</i>)	33
Figura 4 -	Cultivos marinhos em sistemas de long-line (A), suspenso fixo (B) e em mesas (C) utilizados na costa de Santa Catarina.....	37
Figura 5 -	Células intestinais marrons de berbigão japonês (<i>Venerupis philippinarum</i>) indicando exposição a poluentes, como o benzopireno	59
Figura 6 -	A) Mapa temático das concentrações de <i>E. coli</i> e pontos de maior risco de contaminação em berbigões da região das Marcas, Itália; B) Exemplo de cenário de maior risco de contaminação na mesma região	62

Figura 7 -	A) Mangueira e garrafas de amostragem de água; B) Rede para amostragem de fitoplâncton; C) Disco de Secchi para aferição da turbidez da água	64
Figura 8 -	Coleta de mexilhões (<i>Perna perna</i>) para o monitoramento de moluscos bivalves em Santa Catarina.....	66
Figura 9 -	Desconchamento de mexilhões para detecção de toxinas DSP	67
Figura 10 -	Níveis de alerta de acordo com os resultados das análises de moluscos do programa de monitoramento da Escócia	80
Figura 11 -	Caixas de depuração de moluscos bivalves de acordo com o recomendado pela UE.....	87
Figura 12 -	Procedimento de embalagem de moluscos bivalves vivos de acordo com o recomendado pela UE	88
Figura 13 -	Exemplos de rótulos de embalagens de moluscos bivalves vivos de acordo com o recomendado pela UE	88
Mapa 1 -	Localização das 24 áreas amostrais determinadas para a detecção de biotoxinas em moluscos bivalves da costa de Santa Catarina.....	97
Mapa 2 -	Detalhamento espacial das áreas amostrais de 1 a 5.....	98
Mapa 3 -	Detalhamento espacial das áreas amostrais 6 e 7	99
Mapa 4 -	Detalhamento espacial das áreas amostrais de 8 a 11	100
Mapa 5 -	Detalhamento espacial das áreas amostrais de 12 a 16	101
Mapa 6 -	Detalhamento espacial das áreas amostrais de 17 a 23	102
Mapa 7 -	Detalhamento espacial da área amostral 24	103
Mapa 8 -	Mapa de densidade de ocorrências de DSP em moluscos, áreas amostrais sugeridas e os clusters espaço-temporais de 6 meses e 7 dias de agrupamento	118
Mapa 9 -	Densidade de ocorrências detectadas de <i>D. acuminata</i> (>100 cel./L) e os clusters espaço-temporais encontrados	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Níveis máximos permitidos de concentração de biotoxinas por kg de parte comestível de moluscos bivalves (inteiros ou qualquer parte destinada ao consumo), métodos de detecção e as concentrações mínimas detectáveis.....	48
Quadro 2 -	Parâmetros de classificação de zonas de produção utilizados pela Comunidade Européia.....	82
Quadro 3 -	Número de mexilhões necessários em cada pool amostral para detecção de biotoxinas	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis de alerta de fitoplâncton em amostras de água.....	65
Tabela 2 -	Número mínimo de amostras a serem coletadas de acordo com o peso do lote de alimento produzido (Diretiva 2001/22/CE)	74
Tabela 3 -	Número de grupos a serem coletados em cada lote (Diretiva 2001/22/CE)	74
Tabela 4 -	Critérios para a definição de retirada de moluscos bivalves de acordo com as contagens de <i>E. coli</i>	85
Tabela 5 -	Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões necessários para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 1.....	105
Tabela 6 -	Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 2	105
Tabela 7 -	Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 3	105
Tabela 8 -	Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 4	106
Tabela 9 -	Sensibilidades estimadas, número de pools e tamanhos das amostras para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP em mexilhões no cenário 5	106
Tabela 10 -	Sensibilidades estimadas, número de pools e tamanhos das amostras para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP em mexilhões no cenário 6	106
Tabela 11 -	Número de pools positivos em relação aos analisados anualmente para cada grupo de biotoxina marinha.....	108
Tabela 12 -	Proporção de detecção anual de moluscos contaminados por toxinas causadoras de DSP e os respectivos intervalos de confiança de 95%.....	109

Tabela 13 -	Proporção de detecção de DSP em amostras de moluscos por localidade entre os anos de 2008 e 2011	109
Tabela 14 -	Proporção de detecção de DSP em amostras de moluscos por localidade nos anos de 2012 a 2015.....	111
Tabela 15 -	Proporção de detecção de DSP em amostras de moluscos por área amostral sugerida	112
Tabela 16 -	Quartis das concentrações (cel./L) de diferentes espécies do gênero <i>Dinophysis</i> identificadas durante o monitoramento em SC	114
Tabela 17 -	Quartis das concentrações de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. do monitoramento de fitoplâncton	115
Tabela 18 -	Clusters de ocorrência de DSP obtidos de diferentes agrupamentos temporais e seus respectivos riscos relativos e proporções de pools positivos.....	116
Tabela 19 -	Clusters temporais de ocorrência de DSP obtidos de diferentes agrupamentos e seus respectivos riscos relativos	120

LISTA DE SIGLAS

AO	Ácido ocadáico
AOAC	Associação de Analistas Químicos Oficiais
ASP	Síndrome de intoxicação amnésica por consumo de moluscos
AZA	Azaspirácidos
BTX	Brevetoxinas
CCFFP	Comitê do Codex sobre Peixes e Produtos Pesqueiros
CCMAS	Comitê do Codex sobre Métodos de Análise e Amostragem
CE	Comunidade Européia
CEFAS	Centro para Ciências do Meio Ambiente, da Pesca e da Aquicultura
CGSAP	Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira/MAPA
CI	Iminas cíclicas
CIDASC	Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrário de Santa Catarina
CTX	Ciguatoxinas
DA	Ácido domóico
DSP	Síndrome de intoxicação diarreica por consumo de moluscos
DTX	Dinofisistoxinas
EFSA	Autoridade Européia para a Segurança Alimentar
Epagri	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FATMA	Fundação do Meio Ambiente
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	HPLC com detecção com fotodiodo
HPLC-MS/MS	HPLC com espectrometria de massa
HPLC-UV	HPLC com método de detecção por ultravioleta
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IN	Instrução Normativa
IOC	Comissão Oceanográfica Intergovernamental
LCMM	Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMP	Número mais provável
NSP	Síndrome neurotóxica por consumo de moluscos
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
P1TX	Palitoxinas

PCT	Proteínas do choque térmico
PNCMB	Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves
PSP	Síndrome de intoxicação paralisante por consumo de moluscos
PTX	Pectenotoxinas
PVC	Policloreto de polivinila
SC	Santa Catarina
STX	Saxitoxinas
UE	União Européia
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WHO	Organização Mundial de Saúde
YTX	Yessotoxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	A PRODUÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES NO BRASIL	29
2.2	QUESTÕES AMBIENTAIS.....	38
2.3	SITUAÇÃO SANITÁRIA ATUAL.....	40
2.4	PERIGOS A SEREM INVESTIGADOS	42
2.4.1	Microrganismos patogênicos e indicadores de qualidade ambiental	42
2.4.2	Biotoxinas	45
2.4.2.1	Toxinas amnésicas (ASP).....	49
2.4.2.2	Toxinas paralisantes (PSP).....	50
2.4.2.3	Toxinas lipofílicas (DSP, YTX e PTX)	51
2.4.3	Contaminantes químicos	55
2.5	O USO DOS MOLUSCOS BIVALVES COMO BIOINDICADORES	57
2.6	PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA.....	59
2.7	COLETA DE ÁGUA E MOLUSCOS.....	63
2.8	FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAGENS.....	68
2.9	TAMANHO AMOSTRAL.....	71
2.9.1	Amostras de moluscos	71
2.9.2	Amostras de água	75
2.10	MONITORAMENTO E AÇÕES ESTRATÉGICAS	76
2.11	CLASSIFICAÇÃO DE ZONAS DE PRODUÇÃO	81
2.12	DEPURAÇÃO	85
3	MATERIAIS E MÉTODOS	89
3.1	ÁREAS AMOSTRAIS	89
3.2	TAMANHOS AMOSTRAIS.....	89
3.2.1	Definição dos cenários	91
3.3	ANÁLISES DAS OCORRÊNCIAS DE DSP E DE FITOPLÂNCTON TÓXICO	93
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
4.1	ÁREAS AMOSTRAIS	96

4.2.	TAMANHOS AMOSTRAL E ANÁLISE DOS CENÁRIOS.....	103
4.3	ANÁLISE DAS DETECÇÕES	107
4.3.1	Detecção de biotoxinas em moluscos	107
4.3.2	Ocorrência de fitoplâncton tóxico	113
4.4	ANÁLISES DE CLUSTERS ESPAÇO-TEMPORAIS.....	115
4.4.1	Moluscos	115
4.4.2	Fitoplâncton tóxico	117
4.5	RECOMENDAÇÕES PARA O SISTEMA DE VIGILÂNCIA.....	121
4.5.1	Otimização do banco de dados	121
4.5.2	Considerações sobre o plano de amostragem	121
4.5.3	Outras fontes de dados importantes	122
4.5.4	Outras considerações	123
5	CONCLUSÃO	125
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICE	139

1 INTRODUÇÃO

Fitoplâncton é o nome do grupo microscópico de organismos aquáticos que realizam fotossíntese. De acordo com condições oceanográficas, limnológicas¹ e meteorológicas, esses organismos podem formar densas e extensas aglomerações chamadas florações. Este tipo de evento pode fazer com que a superfície da água torne-se vermelha, verde ou marrom e, por isso, frequentemente é chamado de “maré vermelha”. Devido às suas altas taxas de atividade biológica, o fitoplâncton é muito importante para a manutenção da vida nos ambientes aquáticos e é capaz de influenciar o clima em escala global.

As microalgas são os principais organismos que compõem o fitoplâncton e existem aproximadamente 300 espécies capazes de formar florações. Destas, um quarto é considerado nocivo devido à produção de substâncias tóxicas, chamadas biotoxinas ou mais especificamente ficotoxinas, que provocam algum tipo de dano ao ser humano ou ao ambiente.

Os organismos aquáticos acumulam essas substâncias em seus tecidos, que ao serem ingeridos podem causar intoxicações tanto em humanos, quanto em animais. No caso dos moluscos bivalves (Mollusca: Bivalvia), por serem organismos filtradores, elevadas concentrações podem ocorrer causando sintomas severos, tais como diarreia, vômitos, dores abdominais, amnésia, distúrbios cardíacos, nervosos e respiratórios, convulsão, coma e morte. Um fator complicador para a segurança dos alimentos é o fato das ficotoxinas serem resistentes ao calor, não sendo eliminadas com o cozimento.

Em locais onde a ocorrência de microalgas tóxicas é frequente, programas de monitoramento em conjunto com setores governamentais são necessários para se evitar que produtos impróprios cheguem aos consumidores. Os esforços na coleta de amostras são grandes e onerosos devido às longas distâncias e quantidades a serem coletadas. Os maricultores são reembolsados pelos moluscos extraídos de seus cultivos.

Além das biotoxinas, outros contaminantes e resíduos, tais como metais pesados, pesticidas, organofosforados e substâncias petroquímicas devem ser

¹ A limnologia é o estudo das condições e aspectos biológicos, químicos e físicos de lagos, lagoas, rios, reservatórios, pântanos e regiões costeiras (POMPEO; MOSCHINI-CARLOS, 2016).

incorporados ao sistema. É importante lembrar que muitas vezes os moluscos bivalves são consumidos vivos, crus ou após cozimento insuficiente. Portanto, contaminantes, como coliformes termotolerantes e *Vibrio* spp. também devem ser sistematicamente monitorados não apenas por serem importantes indicativos de qualidade da água, mas também por causarem impactos na saúde pública. Alguns resíduos químicos, como os metais pesados, podem permanecer nos tecidos dos moluscos bivalves mesmo após 72 horas de depuração, representando riscos de graves casos de intoxicação alimentar.

Para que os resultados deste monitoramento tenham significância estatística e possam ser incorporados a um futuro sistema de vigilância é primordial que se estabeleça um bom delineamento amostral. Este trabalho tem como objetivo propor áreas de amostragem, o tamanho das amostras e estratégias para a detecção de biotoxinas marinhas nos moluscos bivalves cultivados e extraídos na costa de Santa Catarina. Dados de ocorrência de biotoxinas, de fitoplâncton tóxico e informações espaço-temporais serão analisados para identificação de clusters e elaboração de mapas para visualização da situação e auxílio na estruturação das propostas.

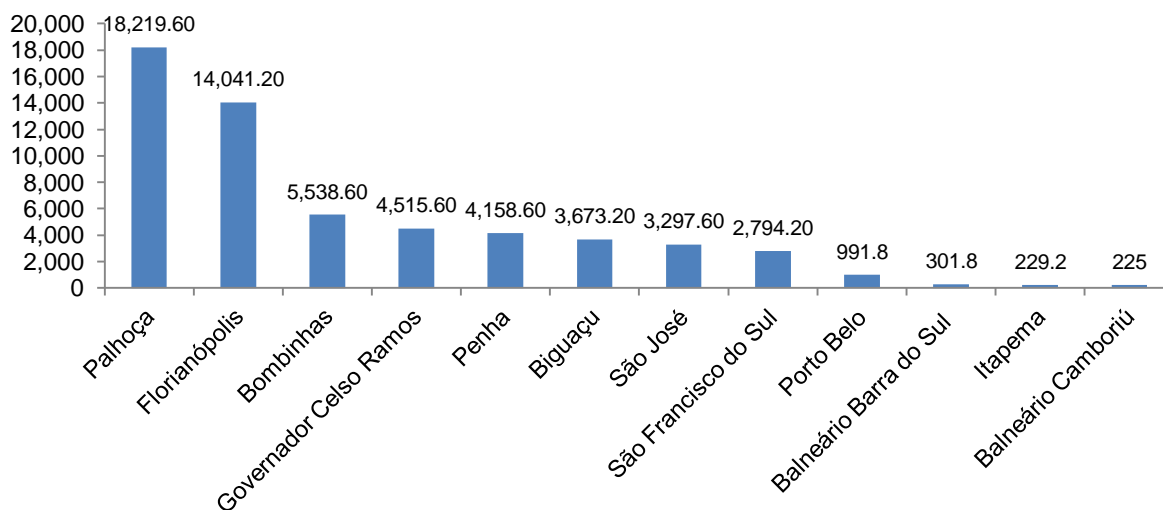
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PRODUÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES NO BRASIL

O Brasil é o segundo maior produtor de pescado da América do Sul sendo superado apenas pelo Chile (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008). Em 2003, a produção total de pescado foi de 712.144 toneladas, e em 2012, de 842.987, o que representa um aumento de mais de 15% em nove anos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2014). Na região Sul, a maricultura se iniciou no final da década de 80 (TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009) e representa 19% da produção nacional de organismos marinhos.

O estado de Santa Catarina (SC) se destaca como o líder nacional na produção de moluscos bivalves (Mollusca: Bivalvia), sendo responsável por, aproximadamente, 90% da produção brasileira, em 2009 (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008; DE SOUZA et al., 2011). Em 2014, a produção de foi de 21.553,6 toneladas (um aumento de 12,95% em relação a 2013), com destaque para o município de Palhoça, na grande Florianópolis. Esta produção representa 98% dos moluscos coletados e consumidos em todo o Brasil (ROSA, 2014; DOS SANTOS; DA COSTA, 2015). O Gráfico 1 mostra as quantidades de organismos aquáticos produzidas (ton./ano), em 2014, nos principais municípios do estado de SC.

Gráfico 1 - Produção de organismos aquáticos (ton./ano) nos principais municípios de Santa Catarina

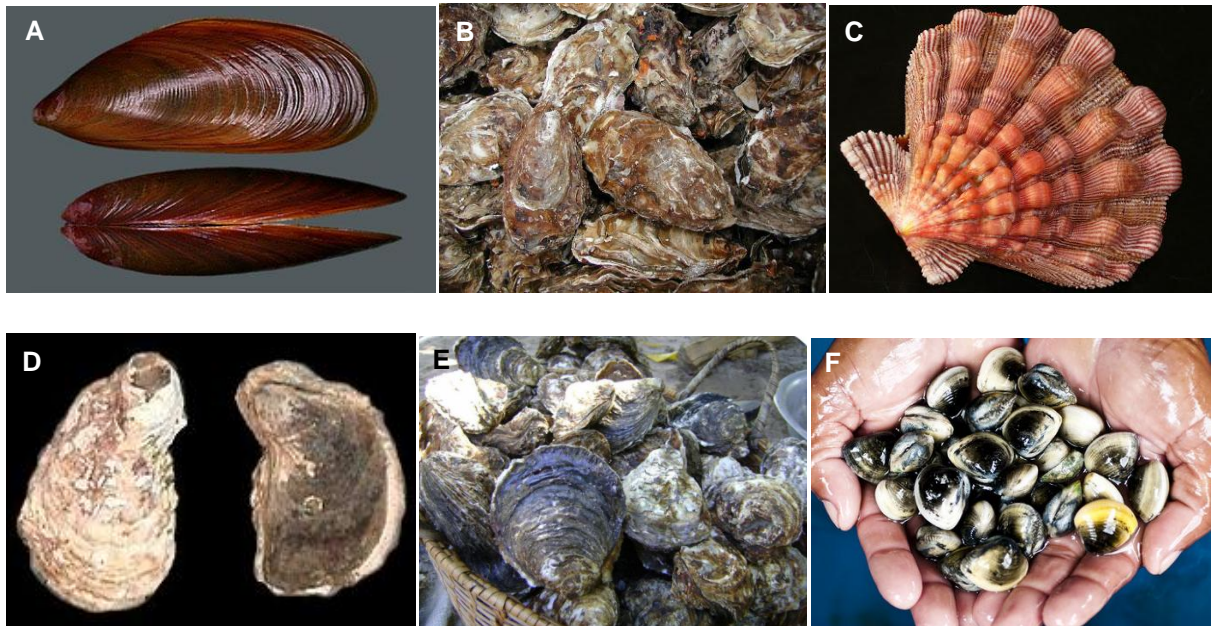


Fonte: (CGSAP, 2014).

Os principais animais produzidos são os mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mytilidae) que representam mais de 80% da produção, seguidos pelas ostras-do-Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Ostreidae), pela vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Pectinidae) e pelas ostras nativas, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Ostreidae) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) (Ostreidae) (Figura 1) (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

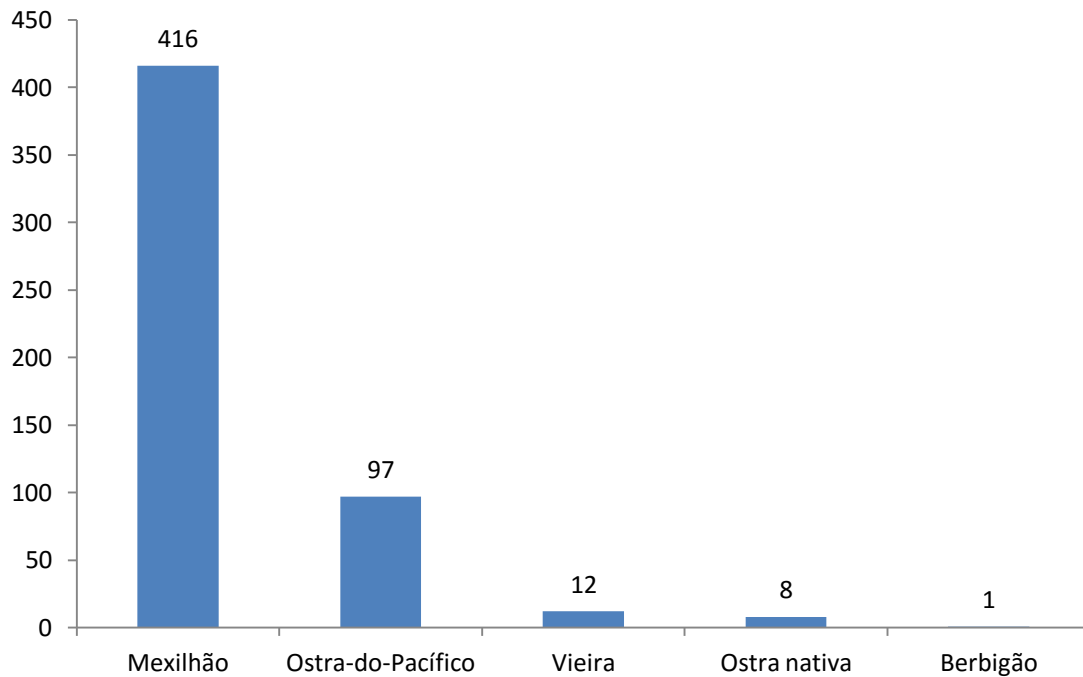
De acordo com as informações disponibilizadas pela Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira (CGSAP, 2014), do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), que atualmente denomina-se Coordenação de Animais Aquáticos (CAA) e pertence ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram registrados 534 cultivos de moluscos bivalves em SC. Existem 241 produtores cadastrados de moluscos bivalves produzindo em aproximadamente 372 unidades de produção, que podem conter um ou mais cultivos (CIDASC, 2014). O Gráfico 2 mostra as quantidades de cultivos para cada espécie cultivada.

Figura 1 - A) Mexilhão (*Perna perna*). B) Ostras-do-pacífico (*Crassostrea gigas*). C) Vieira (*Nodipecten nodosus*). D) Ostra-do-mangue (*C. rhizophorae*). E) Ostras-do-mangue (*C. brasiliana*). F) Berbigões (*Anomalocardia brasiliana*) extraídos da Reserva do Pirajubaé, em Santa Catarina



Fonte: A) (CENEMAR, 2008); B) (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2013); C) (GISELA-SHELLS, 2008); D) (GOFAS, 2015); E) (HOSHINO, 2009); F) (BARTABURU, 2013).

Gráfico 2 - Número de cultivos registrados por espécie no estado de SC



Fonte: (CGSAP, 2014).

O berbigão (*Anomalocardia brasiliiana*) (Gmelin, 1791) (Veneridae), (Figura 1F) é um exemplo de molusco bivalve, de origem extrativista, que também é consumido e comercializado no Brasil. Tornou-se conhecido devido ao importante mercado consumidor que se desenvolveu em São Paulo e graças à criação, em 1992, da primeira reserva extrativista marinha do Brasil, a Reserva do Pirajubaé, em SC. Aproximadamente 1.700 hectares ao sul de Florianópolis foram destinados à coleta deste molusco (BARTABURU, 2013).

O sururu, *Mytella charruana* (d'Orbigny, 1842) (Mytilidae), é extraído de regiões lagunares da região Nordeste (NAVARRO, 2013) e o turú (*Teredo* spp.), conhecido também como gusano, busano ou cupim-do-mar, é encontrado em manguezais e consumido principalmente na região Norte (Figura 2) (HOUAISS, 2001; CHADA, 2008).

O surgimento da ostreicultura em SC está diretamente ligado ao início das atividades do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Este laboratório é responsável por produzir e fornecer sementes ² de ostra-do-Pacífico, ostras-do-mangue, pré-sementes e sementes de vieiras, larvas de mexilhão, larvas de asa-de-anjo, *Cyrtopleura costata* (Linnaeus, 1758) (Pholadidae), e das espécies de ostras perlíferas ptéria, *Pteria hirundo* (Linnaeus, 1758) (Pteriidae) (Figura 3) e *Pteria colymbus* (Röding, 1798) (Pteriidae), atendendo à demanda, inclusive de outros estados (UFSC, 2006, 2016; VICENTE, 2010; BACHI, 2015).

² Semente é o termo zootécnico que se dá ao molusco bivalve jovem que já passou pela fase larval, apresenta concha e é capaz de se fixar para dar continuidade ao desenvolvimento (PEREIRA et al., 1998).

Figura 2 - A) Sururu (*Mytella charruana*); B) Turú (*Teredo navalis*) seco



Fonte: A) (ALAGOAS, 2014). B) Fonte: (UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY, 2005).

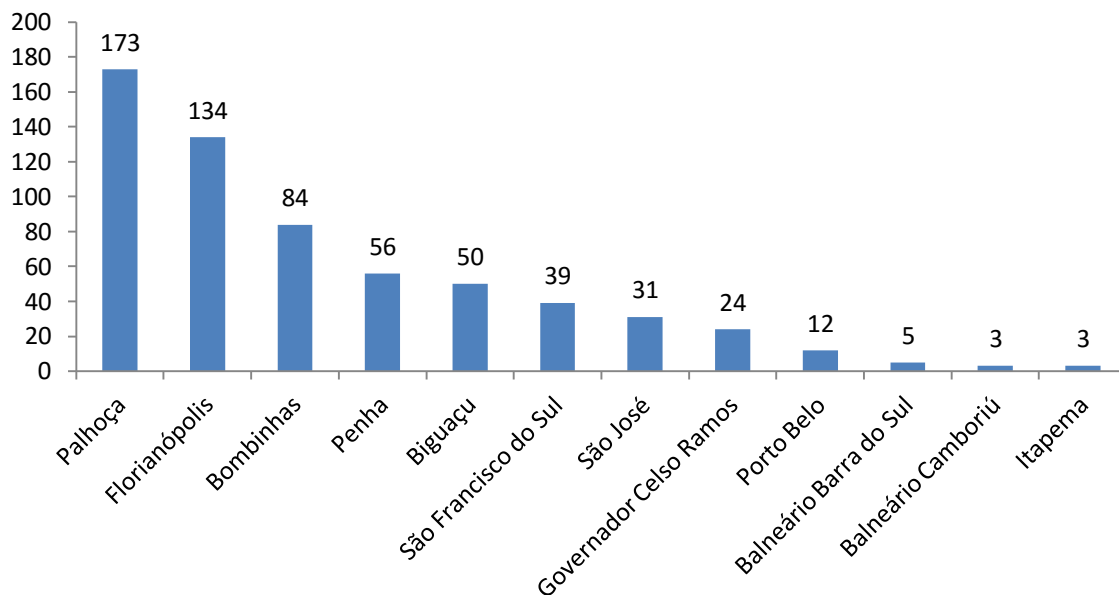
Figura 3 - A) Asa-de-anjo (*Cyrtopleura costata*); B) Ptéria, ostra perlífera (*Pteria hirundo*)



Fonte: A) (CASTRO, 2013). B) Fonte: (HENCKES, 2016).

A malacocultura em SC inclui um contingente de aproximadamente 700 maricultores, que chegaram a comercializar 12.462 toneladas de moluscos no ano de 2009 e de 18.253 toneladas em 2011 (DE SOUZA et al., 2011; ROCHA et al., 2011). O Gráfico 3 mostra a quantidade aproximada nos principais municípios de SC.

Gráfico 3 - Número de maricultores nos principais municípios do estado de Santa Catarina

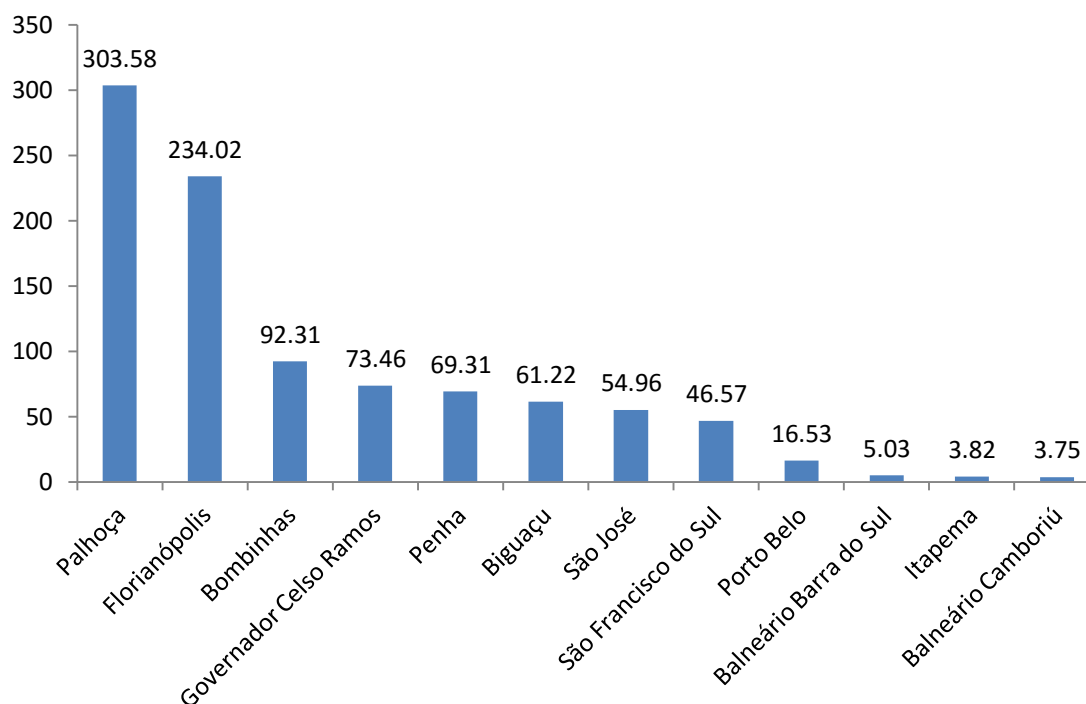


Fonte: (CGSAP, 2014).

A atividade esteve em plena expansão nos anos 90, mas a partir de 2001 entrou num período de oscilação, indicando a existência de dificuldades no desenvolvimento do setor. Alguns autores sugeriram que um importante fator relacionado a tal limitação foi o início da regulamentação de utilização do espaço marinho para os cultivos, iniciado em 2000 (VICENTE, 2010; DE SOUZA et al., 2011). Apenas em 2011, houve a legalização de áreas para a produção de moluscos bivalves, o que definitivamente foi um marco na história da maricultura catarinense (VICENTE, 2010; DE SOUZA et al., 2011). A maioria dos parques aquícolas foram licenciados pela Fundação do Meio Ambiente (FATMA), que é o órgão ambiental licitador da esfera estadual do governo de SC, e outras por órgãos municipais (NOVAES et al., 2010; SILVEIRA, 2012; FATMA, 2016).

O Gráfico 4 mostra os tamanhos das áreas legalizadas para maricultura nos principais municípios de SC. Dos 965 hectares de produção, registrados em 2014, aproximadamente 403 foram destinados à produção de moluscos bivalves (CGSAP, 2014).

Gráfico 4 - Tamanhos das áreas aquícolas destinadas à maricultura nos principais municípios do estado de SC



Fonte: (CGSAP, 2014).

As técnicas de cultivo geralmente empregadas são artesanais, utilizando-se mão de obra familiar e basicamente embarcações impulsionadas por remo ou vela (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2014). Os maiores problema enfrentados pelo setor são, além da informalidade de grande parte dos produtores, a falta de incentivos fiscais, a falta de estruturas apropriadas de produção e processamento imediato, a dependência da extração de sementes de mexilhão de bancos naturais (aglomerações de formas jovens de moluscos bivalves) e o déficit na produção de sementes produzidas em laboratório (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

A atividade de extração de sementes de bancos naturais só pode ser feita após autorização do órgão ambiental. O fato de alguns produtores não possuírem tal licença, somado à baixa eficiência dos coletores artificiais³ são fatores que limitam a produção. Em entrevistas realizadas em 2010, maricultores, extencionistas e pesquisadores apontaram a licitação de áreas de cultivo e a comercialização como os principais problemas do setor. Extencionistas sugeriram que a falta de

³ Coletores artificiais são estruturas simples (bóias, cordas e cabos de madeira), instaladas no ambiente costeiro, em épocas e locais adequados, onde as larvas dos moluscos bivalves se fixam para serem cultivadas posteriormente (CASTILHO-WESTPHALL, 2014).

associativismo e/ou cooperativismo, manejo inadequado das sementes e uso incorreto dos coletores possam ser importantes fontes de problemas (VICENTE, 2010).

Os principais problemas relacionados à comercialização para os maricultores foram o baixo preço do produto, em relação aos gastos de produção, em grande parte devido à ação de atravessadores (comerciantes ilegais), falta de certificação e mercado restrito de consumidores. Na visão de extensionistas e pesquisadores, a falta de inspeção, beneficiamento e industrialização dos produtos também foram importantes fatores (VICENTE, 2010).

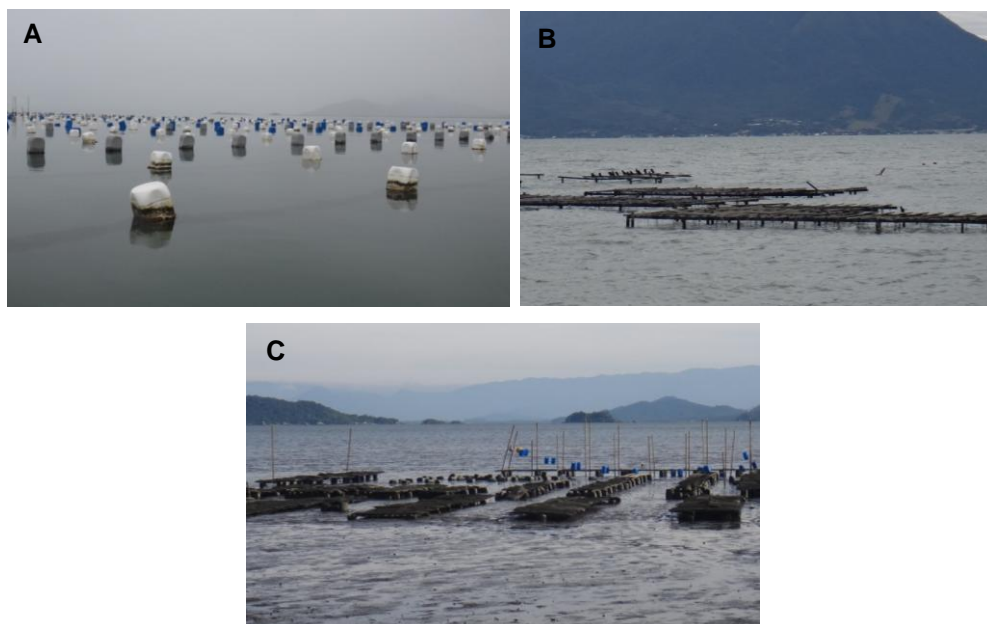
Em relação às causas de mortalidade ou perdas, maricultores e extensionistas apontam a ação de predadores, aumentos de temperatura no verão, furtos de produtos e dessalinização da água devido ao excesso de chuvas como as principais causas. Entretanto, os pesquisadores da mesma região sugerem que os fatores mais importantes sejam causas naturais e o manejo inadequado (VICENTE, 2010).

Segundo Ostrensky et al. (2008), o aumento da produção de mexilhões está fundamentado nos baixos custos de produção e representa uma importante alternativa para pescadores e ex-pescadores, que vêm sendo afetados pela falta de perspectivas para a pesca tradicional e que migraram para a maricultura como principal atividade de geração de renda. O Brasil ainda não possui um sistema de assistência técnica e extensão rural eficiente e isso impede o desenvolvimento de uma aquicultura mais produtiva e rentável. Entretanto, as dificuldades de produção de moluscos associadas às causas de mortalidade e baixo preço de comercialização levaram muitos maricultores a desistirem dessa atividade (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

Os maricultores de SC estão representados por 21 associações municipais e uma estadual, uma cooperativa e duas federações, distribuídos por 12 municípios (DOS SANTOS; DA COSTA, 2016). O sistema de produção predominante é o suspenso flutuante, com estruturas do tipo espinhel ou long-line (Figura 4A) de aproximadamente 100 m de comprimento, com 10 m de distância entre si e profundidade superior a 3 – 4 m. Onde a profundidade é menor, o sistema mais utilizado é o do tipo suspenso fixo (Figura 4B) ou com estruturas do tipo mesa

(Figura 4C), geralmente confeccionadas com policloreto de polivinila (PVC) ou madeira (OLIVEIRA NETO, 2005; VICENTE, 2010).

Figura 4 - Cultivos marinhos em sistemas de long-line (A), suspenso fixo (B) e em mesas (C) utilizados na costa de Santa Catarina



Fonte: (FONTANA, I., 2013).

O beneficiamento e a transformação da maior parte da produção de moluscos bivalves em SC são feitos pelos próprios maricultores e geralmente em condições precárias com pouco ou nenhum controle higiênico-sanitário (GALLON et al., 2011). As agroindústrias de beneficiamento seriam uma importante alternativa para os produtores que não possuem condições de beneficiar seus produtos. Eles poderiam vender diretamente à indústria podendo dedicar-se exclusivamente à produção, entretanto muitos maricultores se vêem frustrados devido a grande diferença de preço entre o produto pescado e o beneficiado, fazendo com que muitas vezes optem por não participar desta cadeia produtiva e continuem a adotar práticas inadequadas (VICENTE, 2010).

Em 2004, a produção de ostras, incluindo a de ostras do mangue, no Brasil foi de 2.682 toneladas com US\$ 5,4 milhões de receita gerada (1% da produção total da aquicultura nacional). O cultivo deste molusco no Brasil vem demonstrando um crescimento bastante acentuado, sendo que no ano de 2004, verificou-se um incremento de 22% da produção nacional (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008). Em relação aos mexilhões, novas técnicas, tais como o assentamento remoto

de larvas olhadas diretamente no mar, têm apresentado resultados promissores na produção observados em projetos de pesquisa com parceria da iniciativa privada, o que também tem contribuído bastante para o aumento da produção (DE SOUZA et al., 2011).

Apesar de avanços consideráveis, ainda existe a demanda por máquinas, como de seleção, de limpeza de moluscos e debulhadora de mexilhões, embarcações mecanizadas e outros maquinários e implementos, como guinchos e equipamentos para confecção de cordas. O atendimento a essas demandas irá melhorar o trabalho dos maricultores e impulsionar o sistema produtivo (VICENTE, 2010).

2.2 QUESTÕES AMBIENTAIS

O cultivo de moluscos bivalves não é caracterizado como uma prática ambientalmente impactante, já que estes animais obtêm alimento por conta própria do ambiente. A atividade de pesca de ostras e mexilhões, por exemplo, não causa danos ambientais. Além disso, é uma produção conveniente, pois a atividade de filtração dos moluscos pode auxiliar na retirada de resíduos e contaminantes presentes no ambiente, neste caso, não podendo ser encaminhados ao consumo. Entretanto, instituições internacionais indicam que a coleta de moluscos bivalves fossoriais pode ser extremamente danosa caso não sejam respeitados os limites e as normas ambientais de extração de cada país (SLOW FOOD ITALIA, 2014).

O conhecimento das técnicas e do histórico de outros países é importante para que se compreenda os riscos ambientais envolvidos. A Itália, por exemplo, é o maior produtor europeu de berbigão japonês, *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) (Veneridae) (ROBERT et al., 2013), conhecido também como amêijoa japonesa. Neste país, o sistema de coleta nas lagoas da Região do Vêneto, é feito de forma manual ou mecânica, sendo a coleta manual feita utilizando-se uma rede de arrasto (rasca) ou um rastelo, ambos manuais. E a coleta mecânica, utilizando-se uma rede de arrasto tracionada mecanicamente (rusca) ou por meio de um vibrante com caixa hidráulica de comprimento máximo de 80 cm (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

Os métodos manuais são realizados em áreas com até 1,5 m de profundidade e as ferramentas utilizadas penetram de 10 a 12 cm o leito das lagoas do Vêneto. Este método de coleta possui baixo impacto ambiental nos ecossistemas lagunares, principalmente se comparado aos sistemas que utilizam instrumentos, como: rusca, draga hidráulica ou bomba hidráulica e rastelo vibrante, métodos considerados mais impactantes. Em 2004, na Itália, foi aprovada a utilização de um novo tipo de draga, que produz jatos de água à baixa pressão e é utilizada manualmente (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

No Brasil, os principais moluscos bivalves fossoriais coletados são o berbigão e o sururu, retirados artesanalmente de reservas extrativistas pelas comunidades tradicionais. Tal atividade é considerada pouco lesiva ao ambiente. Entretanto, a emissão de esgotos e o assoreamento são grandes ameaças, não apenas para este tipo de extração, mas também para o equilíbrio ambiental das reservas (IABSTV, 2014; ICMBIO, 2016).

No caso dos mexilhões, o principal problema ambiental associado à malacocultura, no Brasil, é a obtenção de sementes. Segundo Melo et al. (2006), utilizar apenas sementes de mexilhão provenientes de bancos naturais é insustentável ambiental e economicamente. Em entrevistas realizadas com 61 maricultores de SC, em 2010, 25% afirmaram que retiravam sementes de bancos naturais (VICENTE, 2010). Tal atividade requer a autorização do órgão ambiental local (FATMA), sendo proibida entre os dias 01 de setembro e 31 de dezembro, de acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 105/2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), para que seja respeitado o período de defeso desses animais. A referida IN também regulamenta os critérios para a retirada, os limites de quantidade e a forma de extração (LABORATÓRIO DE MOLUSCOS MARINHOS, 2006; DE SOUZA et al., 2011).

A autorização apenas pode ser fornecida aos maricultores que possuem concessão de áreas marinhas para cultivo, o que foi um dos fatores limitantes do crescimento da malacocultura, principalmente durante o período de 2001 a 2011 (DE SOUZA et al., 2011). A demanda para aumento de produção e a fiscalização deficiente fazem com que muitos maricultores atuem de forma ilegal, realizando a raspagem de costões de maneira inadequada. Esse método prejudica o meio ambiente, pois os estoques naturais possuem baixa capacidade de recuperação.

Além disso, estudos comprovaram que as sementes provenientes da raspagem dos costões apresentam baixo desempenho em cultivo (LABORATÓRIO DE MOLUSCOS MARINHOS, 2006).

2.3 SITUAÇÃO SANITÁRIA ATUAL

O estresse crônico gerado pela intensificação da aquicultura predispõe os organismos aquáticos a doenças, uma vez que esse é um dos fatores imunossupressores mais importantes. A ausência de vacinas e testes diagnósticos suficientemente sensíveis/específicos torna o sistema ainda mais complexo. Por isso, a biossegurança e outras formas de prevenção têm se tornado cada vez mais interessantes na produção aquícola (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

Por albergarem organismos macro e microscópicos importantes em ciclos infecciosos, os moluscos devem ser incluídos em rotinas de monitoramento (HELM; BOURNE, 2004; LAWRENCE et al., 2011). Alguns testes diagnósticos disponíveis para animais aquáticos, como os testes de biologia molecular, apenas demonstram a presença de um patógeno específico e, por isso, devem ser utilizados juntamente à testes que demonstrem a atuação dos patógenos, como os bioensaios (sintomas), histologia (lesões) e cultura (proliferação *in vitro*) (HELM; BOURNE, 2004).

Devido à diversidade de espécies presentes em ambientes abertos, à falta de conhecimento científico na susceptibilidade da maioria das espécies não cultivadas e à dificuldade de se estabelecer precisamente a situação sanitária de populações selvagens, populações não testadas deveriam ser consideradas suspeitas de carrear agentes infecciosos relevantes ao menos que se prove o contrário (HELM; BOURNE, 2004).

Segundo Helm e Bourne (2004), em algumas instâncias, as investigações podem não resultar em diagnósticos conclusivos, podendo estar limitadas a descrever a ocorrência de uma doença (morbidade, mortalidade, duração do problema, sinais clínicos, presença de lesões). Isso é particularmente comum nos caso das doenças de animais aquáticos, muitas das quais (principalmente as bacterianas) são consideradas novas para a ciência.

A qualidade da água varia consideravelmente com o aquecimento das águas na primavera e início do verão. Bactérias do gênero *Vibrio* sp. podem se proliferar e dominar a microbiota. Por isso, a limpeza e a inspeção de filtros, tanques e equipamentos devem ser feitas com frequência (HELM; BOURNE, 2004).

Segundo Helm e Bourne (2008), não existe no Brasil nenhum programa de controle da qualidade sanitária das formas jovens produzidas e comercializadas. Além disso, problemas relativos a transporte, que podem ocasionar sementes com qualidade duvidosa, prazos de entrega não cumpridos, que podem atrasar toda a produção, e quantidade disponível são alguns dos problemas enfrentados pelos produtores que dependem desses juvenis.

Doenças que afetam a fase larval dos moluscos bivalves geralmente são altamente impactantes. As larvas raramente apresentam sinais clínicos, podem aparentar perfeitamente normais em termos de coloração e comportamento e no dia seguinte amanhecerem no fundo do tanque, mortas ou moribundas, com as conchas desprovidas de tecido e repletas de protozoários ciliados atuando como saprófitas oportunistas. Quando infectadas por algum tipo de patógeno, geralmente as larvas morrem antes da metamorfose. Nesses casos, o incubatório deve ser despovoado, desinfetado por meio de fumigação e inutilizado por pelo menos duas semanas. O uso de antibióticos é desaconselhado devido ao baixo sucesso e risco de indução de resistência dos patógenos. Nas zonas temperadas, a criação de larvas é concentrada no período do inverno até o início da primavera devido a menor chance de ocorrência de surtos infecciosos e logo antes do aumento populacional do fitoplâncton (HELM; BOURNE, 2004).

Sem boas fontes de água dificilmente desenvolve-se atividades de incubação de maneira eficiente e proveitosa. Tanto as larvas de moluscos bivalves, como as formas jovens e adultas possuem diferentes requerimentos de temperatura, salinidade e oxigenação. Altas concentrações de algumas algas marinhas e bactérias, por exemplo, podem liberar substâncias tóxicas que causam redução na sobrevivência e no crescimento dos moluscos bivalves (HELM; BOURNE, 2004).

2.4 PERIGOS A SEREM INVESTIGADOS

Segundo Austrália (2009) e Lawrence et al. (2011), os perigos a serem avaliados em pontos de coleta de amostras de um programa de monitoramento de moluscos bivalves incluem:

- Patógenos bacterianos entéricos (ex. *Salmonella* spp.);
- Patógenos virais entéricos (ex. norovírus, vírus causadores de hepatite);
- Patógenos bacterianos de ocorrência natural (ex. *Vibrio* spp.);
- Biotoxinas (ex. ácido ocadáico [DSP], saxitoxinas [PSP], brevetoxinas [NSP], ácido domóico [ASP], azaspirácidos [AZP]);
- Contaminantes químicos (ex. metais pesados, pesticidas, organofosforados, substâncias petroquímicas).

2.4.1 Microrganismos patogênicos e indicadores de qualidade ambiental

Os microorganismos de origem humana ou animal podem se concentrar até 100 vezes mais no interior de moluscos bivalves (CROSSAN et al., 2012). Segundo Austrália (2009), o monitoramento de organismos patogênicos deve ser capaz de determinar a extensão de contaminações fecais, de prover dados quantitativos para a classificação e de delimitar o fechamento das áreas de cultivo. Os critérios para tais classificações ou procedimentos serão discutidos na seção 2.11, que se refere à classificação das zonas de produção.

A detecção de coliformes fecais (ou ditos termotolerantes) pode ser utilizada como indicativo da presença de patógenos entéricos tanto bacterianos, quanto virais em áreas de cultivo de moluscos bivalves (AUSTRÁLIA, 2009). Entretanto, tanto o Regulamento (CE) No. 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia (EUROPA, 2004a), quanto a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estabeleceram parâmetros referentes especificamente à contagem de *E. coli* e de *Salmonella* spp. para segurança microbiológica (LAWRENCE et al., 2011). O Reg. (CE) n. 2073/2005 também

recomenda que seja utilizada a contagem de *E. coli* ao invés da de coliformes fecais para indicar contaminação fecal em áreas de cultivos de moluscos bivalves (EUROPA, 2005).

Para os moluscos que serão consumidos crus e que, portanto, devem estar vivos imediatamente antes do consumo, a recomendação da FAO descritas no Codex Alimentarius é a de que se analise cinco amostras de 100 g de parte comestível, onde nenhuma pode conter mais do que 700 *E. coli* e no máximo uma pode conter entre 230 e 700 *E. coli*. Para *Salmonella* sp., recomenda-se que a análise consista também em cinco amostras, porém de 25 g cada de parte comestível. Nenhuma amostra pode indicar a presença deste agente (LAWRENCE et al., 2011; FAO/WHO, 2013).

Apesar de ainda não existir um regulamento específico, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) recomenda que, para os moluscos bivalves não destinados ou que não se tenha a intenção de consumir crus, uma instrução para se consumir o produto apenas após cozimento seja inserida no rótulo da embalagem. Isso porque ainda não foram estabelecidos limites de segurança para os níveis de vírus transmitidos por alimentos, como o Norovírus e os vírus das Hepatites A e E (EFSA, 2011).

Os regulamentos que determinam as contagens de *E. coli* como um indicativo de contaminação provavelmente reduzem o número de infecções, principalmente as bacterianas. Porém, podem não ser adequados para controlar os riscos de contaminações virais (CROSSAN et al., 2012).

Segundo a EFSA (2010), o Norovírus e o vírus da Hepatite A em moluscos bivalves, produtos cárneos e alimentos prontos para o consumo são as causas mais frequentes de doenças virais transmitidas por alimentos. Um tratamento térmico a temperaturas internas de 85-90°C por 90 segundos seria o necessário para se destruir os vírus presentes em moluscos, mas cuidados no tratamento devem ser seguidos para não endurecer o produto e comprometer a qualidade (EFSA, 2010). Vírus viáveis podem representar risco à saúde pública em moluscos que foram apenas levemente cozidos a vapor, defumados ou preservados em ambiente ácido (CROSSAN et al., 2012).

Em regiões tropicais e temperadas, espécies de *Vibrio* podem ocorrer naturalmente em ambientes marinhos, costeiros e estuarinos, sendo mais

abundantes no último. O gênero contém pelo menos 12 espécies patogênicas para humanos, das quais dez podem causar doenças transmitidas por alimentos. Destacam-se as espécies *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*.

Os moluscos bivalves são veículos bem conhecidos de *Vibrio* spp., especialmente o *V. parahaemolyticus* e o *V. vulnificus*. Em muitos países, eles são mantidos vivos à temperatura ambiente, o que favorece o crescimento de ambas species. As infecções em humanos estão frequentemente associadas à ingestão de alimentos com pH baixo. O cozimento é capaz de inativar estes micro-organismos mesmo em produtos altamente contaminados (FAO, 2010).

A multiplicação de *V. vulnificus* no tecido das ostras ocorre em temperaturas superiores a 13°C. Em áreas endêmicas com temperatura superior a 20°C, a concentração pode ser alta. A salinidade ótima varia consideravelmente de acordo com a região, mas as maiores contagens são geralmente encontradas em salinidades de 5 a 25g/L. Transferindo-se as ostras para salinidades mais altas (>32 g/L) consegue-se reduzir a contagem de *V. vulnificus* (<10 por g) em duas semanas (FAO, 2010).

Temperaturas abaixo de 15°C para *V. parahaemolyticus* e abaixo de 20°C para *V. vulnificus* não têm sido, em geral, associadas à ocorrência de enfermidades nos humanos. Da mesma maneira, em níveis de salinidade acima de 35 e 30g/L, respectivamente, poucos casos de doenças têm sido associados à ingestão de moluscos bivalves. É por isso que a temperatura e a salinidade dos locais de coleta dos moluscos bivalves são fatores a serem considerado na determinação de necessidade de controle de agente patogênicos (FAO, 2010).

As diretrizes de higiene alimentar para controle de *Vibrio* em organismos aquáticos disponíveis no Codex Alimentarius, documento CAC/GL 73-2010, recomendam que seja feito o monitoramento de moluscos bivalves durante as coletas para identificação dos níveis de *V. vulnificus* totais e *V. parahaemolyticus* patogênicos e totais para determinação de variações regionais e sazonais. As prevalências de cepas patogênicas e outros dados epidemiológicos, incluindo susceptibilidade da população, devem ser considerados. Essas informações serão úteis para serem incluídas em modelos, para avaliação de resultados e para aplicação em medidas de controle (FAO, 2010).

2.4.2 Biotoxinas

Sob condições ambientais favoráveis, relacionadas ao clima e à hidrografia, a proliferação do fitoplâncton, com a ocasional dominância de determinada espécie, pode resultar em altas densidades de algas e na formação de florações. Quando as espécies envolvidas nas florações são produtoras de toxinas, podemos dizer que se trata de uma floração de algas tóxicas (HALLEGRAEFF; ANDERSON; CEMBELLA, 1995; VAN DER FELS-KLERX et al., 2012).

O risco de intoxicação por biotoxinas algais está altamente relacionado ao consumo de moluscos bivalves (principalmente mexilhões) devido ao acúmulo de tais substâncias nos organismos filtradores. Os berbigões, geralmente, não representam um grande risco aos consumidores, já que são moluscos fossoriais e por isso dificilmente filtrarão algas tóxicas (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008). As ficotoxinas tendem a se concentrar nas colunas mais superficiais d'água por serem produzidas por organismos fotossintéticos, ou seja, aqueles que precisam da luz solar para realizarem seus processos metabólicos (AUSTRÁLIA, 2009).

A questão das biotoxinas em moluscos bivalves tem assumido uma dimensão preocupante no setor da mitilicultura devido ao aumento do número de algas tóxicas. Isto se deve tanto à eutrofização das áreas marinhas costeiras, quanto à progressiva difusão de fitoplâncton em novas áreas geográficas. A água de lastro dos navios é um bom exemplo de forma de difusão de microorganismo e outros contaminantes e mantém-se em contínua expansão (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008; AUSTRÁLIA, 2009).

Entre março e maio de 2016, ocorreu a maior floração de algas tóxicas da história do Chile, afetando drasticamente a indústria pesqueira do país. Pesquisadores apontaram o fenômeno climático “El Niño”, deste ano, como um fator-chave para a ocorrência. Entretanto, a presença de fertilizantes inorgânicos, outros resíduos advindos da agricultura industrial e a produção em larga escala de salmão, devido à grande deposição de matéria orgânica, também têm sido apontados como importantes fatores agravantes (CHOW, 2016; THE GUARDIAN, 2016).

As características das biotoxinas também tornam a prevenção e o controle das intoxicações difíceis, pois são de natureza não protéica e extremamente estáveis (GILL; THOMPSON; GOULD, 1985), não alterando as características organolépticas do pescado e não sendo destruídas pelos processos de cozimento, defumação, secagem ou salga (HUSS, 1997).

Por causa dos riscos associados ao consumo, programas de monitoramento de biotoxinas em moluscos bivalves foram desenvolvidos em vários países, seguindo-se as recomendações dos Regulamentos nº. 853/2004, 854/2004 e 786/2013 da Comunidade Européia (CE) (CEFAS, 2011). O Reg. nº. 853/2004 estabeleceu regras específicas de higiene aplicáveis aos produtos de origem animal, incluindo especificações detalhadas a respeito dos moluscos bivalves e estabeleceu os limites máximos permitidos de cada grupo de biotoxinas por quilo de partes comestíveis de moluscos (EUROPA, 2004b). O Reg. nº. 786/2013 foi publicado posteriormente para aumentar o limite de yessotoxina (YTX) após a emissão de um parecer de especialistas da EFSA garantindo a segurança na alteração do limite de 1 mg de equivalente de YTX/kg para 3,75 mg/kg de carne de moluscos bivalves (EUROPA, 2013). E o Reg. nº. 854/2004 estabeleceu regras específicas de organização dos controles oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano, incluindo os critérios de classificação de zonas de produção (Classes A, B e C), afinação e diretrizes básicas para os planos de amostragem de moluscos bivalves para monitoramento de biotoxinas e outros contaminantes (EUROPA, 2004a).

Tanto os programas sanitários, quanto os de qualidade de água têm como objetivo aumentar a qualidade dos produtos para os comércios local e internacional. Para isso, é necessário ter-se conhecimento do risco da presença de microalgas nocivas nas regiões costeiras (TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

Segundo Austrália (2009), todas as áreas de cultivo, incluindo as localizadas em mar aberto, devem ser monitoradas para a presença de biotoxinas e fitoplâncton potencialmente tóxicos. É importante levar em consideração que o risco de florações tóxicas pode apresentar sazonalidade e que é possível que algas tóxicas desconhecidas afetem a região.

A junta de especialistas da FAO/IOC/WHO determinou, em 2004, que as biotoxinas podem ser classificadas em oito grupos de acordo com a estrutura

química: azaspirácidos (AZA), brevetoxinas (BTX), iminas cíclicas (CI), ácido domóico (DA), ácido ocadáico (AO) e seus análogos (incluindo as dinofisistoxinas – DTX), pectenotoxinas (PTX), saxitoxinas (STX) e yessotoxinas (YTX). Dois novos grupos devem ser considerados, o das palitoxinas (P1TX) e o das ciguatoxinas (CTX) (EFSA, 2010).

Algumas destas toxinas são capazes de causar, no total, quatro síndromes de intoxicação em humanos associadas ao consumo de moluscos bivalves. A STX e seus derivados são responsáveis por causar a Síndrome de intoxicação paralisante por consumo de moluscos (“Paralytic Shellfish Poisoning” ou PSP), o DA causa a Síndrome de intoxicação amnésica (“Amnesic Shellfish Poisoning” ou ASP), as toxinas do grupo do AO, DTX e AZA causam a Síndrome diarreica (“Diarrhetic Shellfish Poisoning” ou DSP) e as BTX, a Síndrome neurotóxica (“Neurotoxic Shellfish Poisoning” ou NSP) (EFSA, 2010; CEFAS, 2014a).

As CI, PTX, YTX apresentam alta toxicidade em camundongos inoculados, entretanto relatos de intoxicações em humanos ainda não foram descritos (TOYOFUKU, 2006; EFSA, 2009; CEFAS, 2011; OTERO et al., 2011). As P1TX causam sintomas neurológicos e gastrintestinais, como gosto metálico na boca, náusea, vômito, diarreia, letargia, espasmos musculares, mialgia e dispnéia, podendo causar morte por lesão do miocárdio (LOUZAO; ARES; CAGIDE, 2008; RAMOS; VASCONCELOS, 2010). As CTX são as mais frequentes causadoras de intoxicação por biotoxinas, causam sintomas semelhantes ao das P1TX, porém raramente são letais (ISBISTER; KIERNAN, 2005).

No Brasil, não existem relatos de detecção de toxinas causadoras da NSP, entretanto as outras síndromes de intoxicação devem ser monitoradas devido à ocorrência já registrada da síndrome ou do fitoplâncton tóxico correspondente. O Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) segue as recomendações da União Européia (UE) estabelecendo as concentrações máximas permitidas de biotoxinas causadoras destas três síndromes nas amostras de partes comestíveis de moluscos. Em SC, as análises laboratoriais são realizadas pelo Laboratório Oficial de Análise de Resíduos e Contaminantes em Recursos Pesqueiros – LAQUA-Itajaí/SC (BRASIL, 2012, 2013; CEFAS, 2014a).

Os níveis máximos de concentração de biotoxinas permitidos pela legislação europeia, os métodos de detecção e as concentrações mínimas detectáveis estão dispostos no Quadro 1.

Segundo Alexander et al. (2009), as doses críticas de referência para intoxicações por cada biotoxina podem variar de acordo com o consumo de moluscos bivalves. Sendo assim, os limites definidos pela UE para AO, STX e DA podem não ser suficientes para os que consomem grandes quantidades. Especialistas acreditam que porções de 250 g representariam 97,5% dos consumidores da maioria dos países em que os dados estão disponíveis. Os limites de referência são baseados num consumo de 100 g, valor frequentemente utilizado em avaliações de risco.

Quadro 1 - Níveis máximos permitidos de concentração de biotoxinas por kg de parte comestível de moluscos bivalves (inteiros ou qualquer parte destinada ao consumo), métodos de detecção e as concentrações mínimas detectáveis

Nome do grupo de biotoxinas		Concentração máxima permitida/kg de carne de molusco*	Método de detecção atual do LAQUA-Itajaí/SC**	Concentração mínima detectável pelo método laboratorial	
Toxinas hidrossolúveis	ASP	DA	≤ 20 mg	HPLC-DAD 100-150 g (10-21 mexilhões)	0,02-0,03 mg/kg*
	PSP	STX	≤ 0,8 mg de equivalente	Bioensaio 150 g (15-21 mexilhões)	0,004 mg/kg*
Toxinas lipofílicas	DSP	AO e DTX	≤ 0,16 mg de equivalente de AO	Bioensaio 25 g de hepatopâncreas (28-39 mexilhões) ou 150 g de tecido integral (15-21 mexilhões)	Considerar ≅ 0,10 a 0,14 mg/kg para amostras de hepatopâncreas****
		AZA	≤ 0,16 mg		
	YTX	≤ 1 mg de equivalente ou 3,75 mg***			

Fonte: BRASIL (2013). * (HALLEGRAEFF; ANDERSON; CEMBELLA, 1995); ** Protocolos laboratoriais do LAQUA-Itajaí (comunicação pessoal). E-mail: Marina Delphino <marina.delphino@mpa.gov.br>; *** Reg. (CE) no. 786/2013 (EUROPA, 2013); **** Definido para AZA (HESS et al., 2009). Legenda: HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjos de diodo.

2.4.2.1 Toxinas amnésicas (ASP)

A ficotoxina responsável pela ASP é o DA, que é produzido por diatomáceas do gênero *Pseudonitzschia*. Os sintomas incluem vômito, diarreia, cólica abdominal e perda da memória de curto prazo, o que pode tornar-se permanente. Em alguns poucos casos, a intoxicação por ASP pode ser fatal. Níveis acima do permitido são encontrados no período de abril a novembro nas águas da Escócia (CEFAS, 2011).

A ocorrência de *Pseudo-nitzschia* foi descrita entre os períodos de 2000 a 2002, por Tavares et al., (2009), em aproximadamente 72% das amostras da região da Baía da Enseada do Itapocoroy, em SC. As mais altas concentrações ocorreram em 2002, chegando à 1.000.000 cel./L, a temperaturas superiores a 24°C e salinidade de 27-35 ppm.

Os limites de detecção de DA por meio da cromatografia líquida dependem do método de extração e limpeza. Se extratos de moluscos crus forem utilizados sem limpeza, o limite de quantificação é de 1 mg/kg. Interferências com outras substâncias, como o triptofano, são comumente encontradas, o que pode gerar resultados falso-positivos nos extratos crus. Utilizando-se a combinação de extração com metanol aquoso, limpeza com SAX-SPE (forte permutador aniônico para extração da fase sólida) e análise com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com método de detecção por ultravioleta (HPLC-UV), os limites de detecção caem para 0,02-0,03 mg/kg e os cromatogramas ficam livres de interferências, ou seja, aumenta-se a sensibilidade e a especificidade do teste. A detecção com fotodiodo (HPLC-DAD) pode ser usada para confirmação, aumentando-se a especificidade do teste (HALLEGRAEFF; ANDERSON; CEMBELLA, 1995). As toxinas causadoras de ASP também podem ser detectadas por meio de HPLC com espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) (AUSTRÁLIA, 2009).

Considerando que as concentrações máximas de DA permitidas pela UE são bem superiores às concentrações mínimas detectáveis pela técnica de HPLC em amostras frescas ou refrigeradas por até 6 dias, que o uso do metanol aquoso diminui as interferências no diagnóstico e que a detecção com fotodiodo é utilizada como método confirmatório, é possível dizer que o diagnóstico pelo referido teste possui altas sensibilidade e especificidade para a classificação dos resultados como

positivo e negativo (HALLEGRAEFF; ANDERSON; CEMBELLA, 1995; SCHRAMM, 2008).

Na Escócia, onde o mesmo método de diagnóstico é empregado, toxinas desse grupo foram detectadas em 94 amostras de 1891 amostras testadas entre abril de 2011 e março de 2012, sendo que nenhuma excedeu o limite máximo permitido de 20 µg/g (CEFAS, 2011).

2.4.2.2 Toxinas paralisantes (PSP)

A PSP está associada às algas dos gêneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*. Os componentes ativos da intoxicação são a saxitoxina (STX) e seus derivados, que bloqueiam os canais de sódio dos nervos, impedindo a condução do impulso nervoso. Os sintomas surgem logo após o consumo de mariscos contaminados e incluem: dormência/formigamento dos lábios, incoordenação muscular, dificuldade e parada respiratórias. Casos de PSP ocorreram nas Ilhas Shetlands e Orkney, na Escócia, e a presença dessas toxinas são eventos anuais nestes locais, apesar de geralmente apresentarem-se em concentrações abaixo do nível máximo permitido (EUROPA, 2004b; CEFAS, 2011).

Na Baía Armação do Itapocoroy, no sul do Brasil, a espécie *Gymnodinium catenatum* foi observada em cadeias de até 14 células durante um período de duas semanas e chegou a uma concentração de 16.000 cel./L no mês de março de 2000. Semanas antes, haviam sido identificadas mudanças ambientais indicativas de advecção de águas mais frias e salgadas, características dos fenômenos de ressurgência nas águas subtropicais. Estas águas são ricas em nitrato e tais mudanças nas águas podem ter favorecido a floração. As células encontradas podem ter sido trazidas pela corrente advectiva ou podem ter germinado a partir dos cistos bentônicos que se suspenderam, já que o *G. catenatum* é capaz de produzir cistos latentes que permanecem viáveis por muitos anos (DALE, 2001; TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009). Se estimulados por mudanças ambientais, estes cistos podem germinar em períodos curtos, como duas semanas (BLACKBURN; HALLEGRAEF; BOLCH, 1989).

Segundo Tavares et al. (2009), existe uma proeminente variação anual na abundância e nos padrões sazonais de ocorrência de fitoplâncton do complexo *D. acuminata* na Baía da Armação do Itapocoroy. No mesmo local, foram detectados também fitoplâncton do gênero *Alexandrium* em baixas concentrações. Entretanto, a principal espécie encontrada foi a *A. fraterculus*, que não é tóxica (OMACHI; TAMANAHA; PROENÇA, 2007; TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

Nas pesquisas de Schramm (2008), a técnica de HPLC baseada no método de Oshima (1995), com pequenas alterações, identificou variações no limite de detecção de apenas 0,001 a 0,020 eq-STX mg/kg, sendo o limite mínimo para a classificação de risco de 0,8 mg/kg. O método atualmente utilizado pelo LAQUA-Itajaí/SC é o de bioensaio em camundongos, que ainda é a base de muitos programas de monitoramento de toxicidade em moluscos bivalves. O método é antigo e foi padronizado pela Associação de Analistas Químicos Oficiais (AOAC) para o desenvolvimento de medições rápidas e precisas. O limite de detecção deste método é de aproximadamente 40 µg STX/100g (0,004 mg/kg) de carne de moluscos e com uma precisão de 15 a 20%. A sensibilidade do teste pode ser variável, já que altas concentrações de sal podem suprimir os efeitos das toxinas e altos níveis de zinco podem ser letais para os camundongos enquanto não apresentariam risco para a saúde humana (FAO, 2004a). As toxinas causadoras de PSP podem ser detectadas por meio de bioensaio ou HPLC (AUSTRÁLIA, 2009).

De 2435 amostras testadas pelo método de bioensaio, de abril de 2011 a março de 2012 na Escócia, nenhuma apresentou resultados acima do limite máximo permitido de 80 µg/100g, embora níveis detectáveis tenham sido encontrados em 10 amostras de mexilhões (CEFAS, 2011).

2.4.2.3 Toxinas lipofílicas (DSP, YTX e PTX)

As toxinas lipofílicas incluem AO, DTX, AZA, YTX e PTX, sendo as três primeiras responsáveis pela DSP em humanos. As toxinas da DSP são produzidas pelas microalgas do gênero *Dinophysis* e *Prorocentrum*. Os principais sintomas são diarreia, náusea, vômitos e dor abdominal (EFSA, 2010; CEFAS, 2011). O AO e a

DTX-1 mostraram-se também como promotores de câncer em experimentos em camundongos (VAN EGMOND et al., 1993; CEFAS, 2011). Aproximadamente 5% das amostras anuais enviadas para análises pelos controles oficiais, no norte da Inglaterra e na Escócia, são positivas para DSP (CEFAS, 2011).

As YTX e as PTX faziam parte do grupo das DSP. Entretanto, seus principais efeitos afetam o coração e o fígado de camundongos inoculados, respectivamente, ao invés de afetarem o sistema gastro-intestinal. As YTX são produzidas pelos dinoflagelados *Proceratium reticulatum* e *Lingulodinium polyedrum*. Enquanto as PTX são produzidas pelo gênero *Dinophysis*. Apesar de frequentemente ocorrerem juntamente com o AO e as DTX, não existem relatos de intoxicação humana causada pelo consumo de moluscos bivalves contaminados com YTX e PTX e por isso, estas não devem ser incluídas no grupo das DSP. Entretanto, são incluídas nos monitoramentos devido aos seus potenciais riscos a saúde humana devido à significativa toxicidade observada em animais (ALEXANDER et al., 2008a,b; EFSA, 2010; VAN DER FELS-KLERX et al., 2012).

No sul do Brasil, entre o pleno inverno e o verão dos anos 2000 a 2002, foram detectadas altas concentrações de células do complexo *D. acuminata* (>1000 cel./L). Uma floração foi identificada no final de julho de 2000, uma semana após a entrada de uma massa de água fria (12°C) na Bahia da Armação do Itapocoroy, e teve duração de aproximadamente 50 dias. A floração se formou com valores de temperatura e salinidade da água do mar relativamente baixos (15-17°C e 31-32 ppm) e a maior concentração registrada foi de 9.800 cel./L, três semanas após o início. Quatro amostras de moluscos foram positivas para DSP nos bioensaios dos dias 13/08/00, 20/08/00, 27/08/00 e 08/09/00 (SCHMITT; PROENÇA, 2000; TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

Entre o período de março do ano 2000 e março do ano 2001, no mesmo local, o gênero *Prorocentrum* spp. foi detectado em 91% das amostras, chegando a atingir a concentrações de 1.000-10.000 cel./L. As principais espécies identificadas foram *P. minimum* e *P. balticum*, sendo a última não considerada tóxica (TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

O primeiro caso bem registrado de DSP no Brasil ocorreu em 2007, numa área de 200 km da costa sul. Pelo menos 150 pessoas foram intoxicadas e a coleta de mexilhões para consumo foi suspensa temporariamente (PROENÇA et al., 2007).

O evento ocorreu no verão e a concentração de *D. acuminata* na água chegou a 52.000 cel./L (TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

Em relação às toxinas diarreicas, a análise pela técnica de HPLC exige um alto nível de limpeza prévia das amostras devido à falta de bons cromóforos na estrutura destas toxinas. Além disso, o uso de reagentes pouco estáveis e a presença de várias substâncias reagentes no tecido dos moluscos faz com que a confiabilidade dos resultados seja afetada. Estas características indicam principalmente uma baixa especificidade do teste (HALLEGRAEFF; ANDERSON; CEMBELLA, 1995).

A espectrometria de massa é um dos sistemas de detecção utilizados pela HPLC e é uma ferramenta poderosa para a análise de biotoxinas marinhas. Possui alta sensibilidade e especificidade e é capaz de fornecer informações estruturais úteis para a confirmação da identificação inclusive de novas toxinas. A combinação da HPLC com a espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) parece ser um dos métodos mais sensíveis, específicos e rápidos de análise das toxinas causadoras de DSP. O limite de detecção é de 1 ng/g, ou seja 10^{-9} mg/kg de parte comestível de moluscos, sendo que o limite máximo permitido pela legislação europeia e neozelandesa é de 0,16 mg/kg equivalente de AO ou AZA (baseando-se num consumo de 100g por adulto) (HALLEGRAEFF; ANDERSON; CEMBELLA, 1995; SCHRAMM, 2008; AUSTRÁLIA, 2009).

O programa de monitoramento australiano permite o limite máximo de 0,2 mg/kg, mas explica que em determinadas situações pode-se utilizar o valor indicado pela UE, principalmente se o objetivo é exportar mariscos para esta localidade (AUSTRÁLIA, 2009). Se os limites máximos fossem alterados para 0,08 ou 0,05 equivalentes de AO/kg, conforme sugerido por Toyofuku (2006), de acordo com os consumos de 250 g e 380 g por adulto respectivamente, ainda assim o método de detecção poderia ser considerado altamente sensível. Comumente utilizam-se apenas as glândulas digestivas (hepatopâncreas) dos moluscos para as análises de DSP, o que contribui para uma sensibilidade ainda maior do diagnóstico (ALVES; DIAS; PINTO, 2013).

O uso da HPLC-MS/MS para a detecção de grupos múltiplos de toxinas é uma ferramenta robusta e provou ser superior ao uso do bioensaio para a detecção

de toxinas DSP na determinação da distribuição espacial e determinação de características das toxinas lipofílicas em moluscos bivalves (STOBO et al., 2008).

Segundo a FAO (2004b) e Lawrence et al. (2011), as principais desvantagens do bioensaio são a sua baixa especificidade (não há diferenciação entre as várias toxinas detectadas), a subjetividade relativa aos sintomas e tempo de morte dos animais, a necessidade de manutenção de um biotério e questões éticas que envolvem o bem-estar animal. De um modo geral, o método não é eficiente na diferenciação entre os vários componentes das toxinas causadoras da DSP.

Resultados de detecção falso-positivos podem ocorrer devido à presença de ácidos graxos livres nos moluscos, o que resulta em alta toxicidade aos camundongos (SUZUKI et al., 1996). Outra desvantagem do bioensaio é que este fornece resultados apenas qualitativamente, o que não é o mais adequado para um sistema de monitoramento, enquanto a HPLC-MS/MS informa resultados quantitativos (STOBO et al., 2008; HESS et al., 2009; LAWRENCE et al., 2011). Além disso, a detecção de toxinas lipofílicas pelo bioensaio ainda não foi validada por provas interlaboratoriais e as características do seu desempenho não estão bem estabelecidas (LAWRENCE et al., 2011).

A UE ainda considera o bioensaio como um dos métodos oficiais de detecção, mas sugere que métodos alternativos sejam utilizados para a detecção de DSP, já que estes são capazes de sozinhos ou em combinação detectar todos os análogos de DSP (EURLMB, 2013). Da mesma maneira, o Codex Alimentarius reconhece as limitações do bioensaio e recomenda que novas técnicas químicas e instrumentais sejam desenvolvidas para futura validação inter-laboratorial (AUSTRÁLIA, 2009; FAO/WHO, 2012). Seguindo estas recomendações, pesquisadores escoceses já desenvolveram e validaram um método de HPLC-MS/MS para detecção de toxinas DSP e outras toxinas lipofílicas (STOBO et al., 2008).

Para os casos em que se utiliza apenas o hepatopâncreas dos mexilhões para análise laboratorial, é importante lembrar que o conteúdo do hepatopâncreas varia sazonalmente de acordo com a disponibilidade de alimento e fase do ciclo reprodutivo. É preferível que se tenha acesso a um conjunto grande de dados para se verificar a real extensão dessa variabilidade (HESS et al., 2009). Nas pesquisas de Alves et al. (2013), foi possível determinar um valor médio de peso de

hepatopâncreas de mexilhões da costa de Santa Catarina, o que possibilita ajustes relacionados à amostragem.

Utilizando-se a HPLC-MS/MS como padrão-ouro para avaliar o desempenho do bioensaio na detecção de azaspirácidos (AZP-DSP) foi possível notar que este último possui capacidade de detecção de 0,10 a 0,14 mg/kg. Apesar das conhecidas limitações do bioensaio, esta variação de valores possui um limiar muito próximo ao valor de 0,16 mg/kg, atualmente permitido pelas normas internacionais. Portanto, com base no limite máximo de AZP, é possível dizer que o bioensaio possui equivalência diagnóstica à HPLC-MS/MS. Caso o limite tenha que ser reduzido para 0,08 mg/kg, conforme sugerido para os casos de consumo elevado de moluscos, a probabilidade de detecção do bioensaio cairia para 5%, o que não seria confiável para o programa de monitoramento (HESS et al., 2009).

Em relação às YTX, o limite máximo permitido que havia sido estabelecido pelo Regulamento (CE) 853/2004 era de 1mg/kg de equivalente de YTX. Entretanto, em 2013, entrou em vigor o Regulamento (CE) 786/2013, aumentando o limite para 3,75 mg/kg (EUROPA, 2013).

As toxinas causadoras de DSP podem ser detectadas por meio de bioensaio ou HPLC-MS/MS (AUSTRÁLIA, 2009). Atualmente, o LAQUA-Itajaí/SC utiliza o método de bioensaio, entretanto existem perspectivas para que se inicie as análises por meio da HPLC-MS/MS, assim que forem definidos os novos protocolos laboratoriais (LAQUA-ITAJAÍ/SC, 2014).

De 2493 amostras, coletadas em 38 pontos diferentes da costa da Escócia, de abril de 2011 a março de 2012, 132 resultaram positivas aos testes de bioensaio. Destas, 111 amostras eram de mexilhões, 20 de ostras-do-Pacífico e 1 de leque, *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) (Pectinidae) (CEFAS, 2011).

2.4.3 Contaminantes químicos

Em um monitoramento de regiões costeiras, é importante identificar e avaliar todos os fatores que influenciam a qualidade das águas nos cultivos de moluscos. Informações devem ser usadas para ajudar na seleção dos contaminantes químicos

importantes a serem incluídos no monitoramento de moluscos bivalves (AUSTRÁLIA, 2009).

As principais fontes de contaminantes químicos podem incluir: resíduos de estações de tratamento, mineração, navais, agropecuários e de refinarias de petróleo, esgoto, fossas sépticas, rejeitos industriais, contaminantes geofísicos (AUSTRÁLIA, 2009). É por isso que recomenda-se que o órgão competente do país interessado em implantar um sistema de vigilância de moluscos bivalves elabore um inventário das potenciais fontes de poluição que possam afetar as áreas de cultivo (EUROPA, 2004a).

Para um sistema de monitoramento, é importante identificar os produtos químicos utilizados mais intensamente e suas tendências de bioacumulação. Os produtos que não forem identificados ou que estiverem em níveis muito baixos para se bioacumularem não precisam ser incluídos no monitoramento. Assim que os resíduos químicos a serem testados forem identificados, é necessário verificar se existem testes laboratoriais disponíveis e se existe capacidade laboratorial para realizar as análises (AUSTRÁLIA, 2009).

As concentrações aceitáveis de cada substância tóxica, estabelecidas pelas organizações competentes e pela WHO, devem ser utilizadas como referência nas análises da carne dos moluscos (AUSTRÁLIA, 2009).

Não existem métodos laboratoriais padronizados para muitos dos resíduos químicos que deveriam ser investigados e onde métodos reconhecidos existem (recomendados pela WHO), a capacidade dos laboratórios não é suficiente para que se estabeleça uma rotina intensa de análises. Além da disponibilidade de métodos e da capacidade laboratorial, o custo das análises é um fator importante para estabelecimento de um monitoramento (AUSTRÁLIA, 2009).

De acordo com o Programa Australiano de Garantia de Qualidade de Mariscos, o monitoramento de contaminantes químicos deve ser feito anualmente ou duas vezes ao ano durante um período de três anos. Em seguida, a frequência poderia ser reduzida para uma vez a cada dois ou três anos. Em áreas com maiores fontes municipais ou industriais, amostragens trimestrais podem ser apropriadas até que se conclua que a bioacumulação não esteja ocorrendo (AUSTRÁLIA, 2009).

Pontos com concentrações de resíduos químicos acima dos níveis aceitáveis devem ser imediatamente reamostrados de maneira intensiva para que se

determine a extensão da contaminação e os valores encontrados devem ser armazenados em bancos de dados para comparações em futuros eventos de contaminação. Um banco de dados bem elaborado irá auxiliar na determinação das frequências das amostragens (AUSTRÁLIA, 2009).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são contaminantes importantes a serem investigados, pois ao atingirem o ambiente marinho tornam-se biodisponíveis aos animais aquáticos por meio da cadeia alimentar e podem causar efeitos deletérios graves, como alterações gênicas, disfunções imunes e endócrinas, malformações, fibrose e câncer (BOSCOLO PAPO et al., 2014a).

Dentre os HAPs que aparecem em altas concentrações nas costas mais urbanizadas, geralmente resultantes de atividades industriais, o benzopireno é um dos mais importantes indicadores. Por meio de análises de HPLC, é possível observar que moluscos expostos ao benzopireno permanecem contaminados mesmo após 24 horas de depuração. A identificação destes poluentes ou de indicativos semelhantes em moluscos bivalves não é apenas um indicativo de risco aos consumidores, mas funciona também como uma importante ferramenta para se fazer inferências relativas às atividades industriais que afetam o ambiente (BOSCOLO PAPO et al., 2014a,b).

2.5 O USO DOS MOLUSCOS BIVALVES COMO BIOINDICADORES

Um dos modos mais eficazes de se verificar o estado de saúde de um ecossistema aquático é observando-se seus componentes biológicos. A poluição e as alterações físicas do ambiente influenciam o bioma, seja direta ou indiretamente. Portanto, é possível avaliar os distúrbios por meio da resposta dos organismos (LE FOCHE; NOTARGIACOMO; MANCINI, 2005).

É neste contexto que se inserem os conceitos ecotoxicológicos de “organismo sentinela” ou “bioindicador”. Ambos termos são definidos como organismos capazes de responder de maneira quantificável à contaminação ambiental antes que esta cause alterações biológicas no homem. Tais organismos nos fornecem uma medida da biodisponibilidade dos contaminantes e podem ser utilizados em programas de monitoramento como sinalizadores precoces de perigo, mesmo na ausência de

respostas químico-físicas claras (STAHL, 1997; MORGADO; BEBIANO, 2005; VICO; CARELLA, 2012).

Define-se como biomarcador qualquer alteração quantificável de uma determinada resposta biológica (molecular, celular, bioquímica, fisiológica ou comportamental) que possa ser correlacionada à exposição e/ou ao efeito tóxico do composto contaminante (PEAKALL, 1994). Existe uma tendência a se associar o conceito de biomarcador àquele de dano celular (reversível ou irreversível), que é capaz de identificar alterações físico-químicas do ambiente (temperatura, pH, salinidade, oxigênio e gás carbônico dissolvidos) e as interações com organismos patogênicos (VICO; CARELLA, 2012).

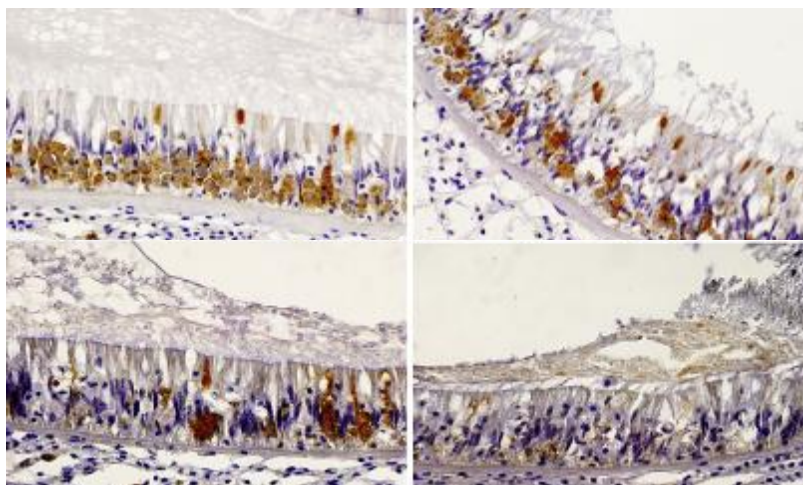
Existem várias características que levam ao uso dos moluscos como modelos para programas de monitoramento ambiental: (1) Possuem relevância ecológica e reconhecida importância em termos sócio-econômicos e sanitários; (2) Particularmente, os moluscos gastrópodes e bivalves possuem ampla e abundante distribuição nos vários ecossistemas aquáticos, sendo algumas espécies (por exemplo, o gênero *Mytilus*) cosmopolitas, o que permite estudos em larga escala geográfica; (3) São espécies chave para o funcionamento de muitos ecossistemas aquáticos e terrestres, já que o estresse ambiental sofrido por eles pode determinar efeitos negativos para todo o ambiente; (4) A maioria das espécies é extremamente sedentária e longeva, podendo sobreviver de 14 a 100 anos, o que favorece uma boa representação da situação ecológica a curto, médio e longo prazo da área pesquisada; (5) Possuem estratégias reprodutivas variadas e seus aparatos reprodutivos podem responder de maneira bastante peculiar aos diversos tipos de estresse ambiental; (6) Muitas espécies estudadas são grandes, o que possibilita o manuseio com facilidade; (7) O contato com a água, sedimentos e contaminantes é direto; (8) A capacidade de metabolizar e de desintoxicar contaminantes é relativamente baixa, se comparada à outras espécies, por isso, tendem a acumular moléculas tóxicas e a responderem em termos biológicos à baixas concentrações de poluentes, sendo portanto, capazes de representar o estado de contaminação do seu habitat (VIARENGO et al., 1999; OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003; NARBONNE et al., 2008; ROLA et al., 2012; VICO; CARELLA, 2012).

Os benzopirenos, anteriormente citados, assim como outros poluentes, são capazes de induzir a deposição de lipofuscina nos tecidos dos moluscos filtradores

causando alterações histológicas. Além disso, eventos estressantes, como a exposição a choques térmicos, pesticidas, vírus, metais e outros componentes tóxicos, podem desencadear a expressão de proteínas conhecidas como proteínas do choque térmico (PCT). A identificação das alterações histológicas e a detecção destas proteínas podem ser utilizadas como biomarcadores úteis para estudos de biomonitoramento (BOSCOLO PAPO et al., 2014a).

O berbigão japonês *V. philippinarum* é um importante recurso econômico da Lagoa de Venezia, na Itália, onde é pescado e cultivado. É também utilizado como sentinela em programas de monitoramento para investigar a qualidade da água e a presença de sedimentos de poluição no ecossistema costeiro da lagoa. Por meio de análises histológicas e imunohistoquímicas, é possível localizar PCT nas células intestinais marrons dos moluscos (Figura 5) (BOSCOLO PAPO et al., 2014a).

Figura 5 - Células intestinais marrons de berbigão japonês (*Venerupis philippinarum*) indicando exposição a poluentes, como o benzopireno



Fonte: (BOSCOLO PAPO et al., 2014).

2.6 PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA

Planos de amostragem devem ser instituídos tanto para o monitoramento das áreas de cultivo, quanto para a classificação das zonas de produção, utilizando-se parâmetros pré-estabelecidos e baseados em análises de dados históricos. O número de pontos de amostragem, a distribuição geográfica e a frequência de

amostragem devem ser os mais representativos possíveis para garantir as análises adequadas posteriormente (EUROPA, 2004a).

Os pontos de coleta de amostras de água devem ser definidos para se atingir em longo prazo os seguintes objetivos: (a) compor um banco de dados ao longo do tempo com os resultados do monitoramento para avaliações de risco, análises de tendências e previsões de florações tóxicas; (b) estabelecer mecanismos de alerta a partir da detecção de mudanças na abundância de espécies de fitoplâncton potencialmente tóxicos; (c) determinar a dinâmica populacional das espécies de fitoplâncton produtoras de toxinas durante os eventos de contaminação, incluindo a variação entre as áreas de cultivo e a influência das marés e ciclos diurnos na abundância dessas espécies; (d) aumentar o conhecimento e ter uma maior compreensão das espécies produtoras de biotoxinas (AUSTRÁLIA, 2009).

A determinação da localização dos pontos de coleta deve levar em consideração o histórico da ocorrência de fitoplâncton e biotoxinas marinhas, a área de cobertura da maioria dos cultivos de moluscos bivalves, a necessidade de realizar amostragens imediatamente antes e durante os períodos de extração, o acesso aos pontos de coleta, as condições climáticas durante as coletas, a localização de bancos naturais de mariscos, as áreas onde florações e mortalidade de peixes têm sido regularmente observados, as áreas onde os rios exercem maiores impactos, o impacto de escoamentos e pontos de concentração de água infiltrada do solo, a necessidade de pontos secundários de coleta, a advecção das florações tóxicas para dentro das áreas de cultivo, os pontos de emissão ou escoamento de poluentes e outros critérios oceanográficos que possam influenciar a distribuição das microalgas (AUSTRÁLIA, 2009; LAWRENCE et al., 2011). De uma forma mais simplificada, sugere-se que o ponto exato de coleta de amostras seja o de maior probabilidade de ocorrência de microalgas tóxicas e biotoxinas marinhas numa área de cultivo baseando-se nas experiências históricas (VAN DER FELSKLERX et al., 2012).

Os fatores ambientais que podem influenciar diretamente a amostragem, como hidrografia, pontos de ressurgência, marés, correntes, zonas de retenção e padrões circulares também devem ser levados em consideração (AUSTRÁLIA, 2009). Por isso, modelos hidrográficos são de grande importância na predeterminação de pontos de coleta apropriados e o julgamento de especialistas

deve sempre ser levado em consideração (LAWRENCE et al., 2011). O monitoramento de regiões costeiras fornece informações essenciais para a determinação das quantidades, localização e frequência de coleta dos pontos de amostragem de água e moluscos (AUSTRÁLIA, 2009).

É importante lembrar que estas localizações podem ser alteradas de acordo com os resultados obtidos nas análises ou caso as necessidades do programa de monitoramento sejam modificadas. Pontos adicionais podem ser utilizados para se determinar a extensão e a dinâmica das florações. Estes pontos secundários não precisam ser monitorados regularmente, mas apenas quando uma floração tóxica ocorrer em áreas de cultivo (AUSTRÁLIA, 2009).

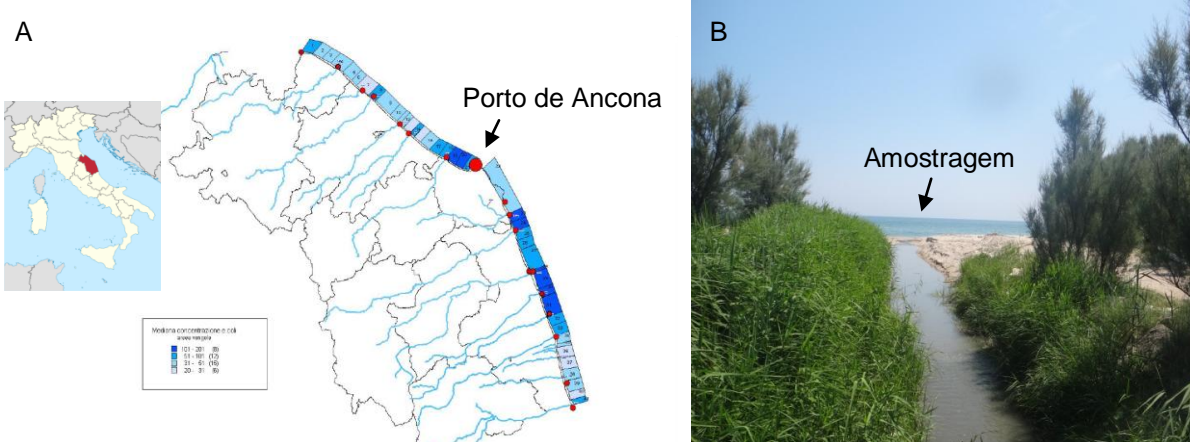
Critérios mais específicos para a seleção dos pontos de coleta são: devem ser escolhidos para que amostras de água coletada sejam realmente representativas da água que está sendo filtrada pelos moluscos bivalves, devem ser localizados onde as biotoxinas marinhas possuem maior probabilidade de ocorrer de acordo com experiências passadas, deve-se levar em consideração a maré para assegurar que a amostra represente a água que ainda será filtrada pelos moluscos e não a que já foi filtrada, a batimetria⁴ do local de cultivo deve ser representada nas amostras, amostragens não devem ser feitas em locais de arrebentações de ondas devido à alta fragilidade das células e presença de lodo, o que dificulta ou impossibilita a identificação, as amostras de moluscos devem ser representativas da fase de desenvolvimento correspondente à de extração para consumo e devem ser obtidas das principais bordas dos cultivos, pois nesses locais a água muito provavelmente ainda não foi filtrada por outros organismos filtradores (AUSTRÁLIA, 2009).

A Figura 6A ilustra um exemplo de mapa temático utilizado no auxílio da determinação dos pontos de monitoramento de berbigões na região das Marcas, na Itália. Os pontos vermelhos indicam as áreas de maior probabilidade de contaminação, determinados de acordo com as concentrações de *E. coli* de cada zona de extração, localização de portos e também de acordo com a localização de grandes e pequenos estuários (Figura 6B), que são importantes carreadores de contaminação (DURANTI, 2015; LATINI, 2015). Zonas petrolíferas também são consideradas de alto risco (AUSTRÁLIA, 2009).

⁴ A batimetria é a medição da profundidade dos oceanos, lagos e rios (DNIT, 2015).

Para que a amostragem tenha significância estatística e não atinja custos excessivos, a quantidade de pontos de coleta de amostras deve ter uma cobertura apropriada da extensão de um evento de floração tóxica e contaminação microbiológica ou ser capaz de demonstrar o pior cenário possível e de acordo com as viabilidades do órgão executor (LAWRENCE et al., 2011).

Figura 6 -A) Mapa temático das concentrações de *E. coli* e pontos de maior risco de contaminação em berbigões da região das Marcas, Itália; B) Exemplo de cenário de maior risco de contaminação na mesma região



Fonte: 6A) (DURANTI, 2015); 6B) (FONTANA, I., 2015).

Na Escócia, as áreas de cultivo são agrupadas para fins de amostragem de acordo com semelhanças hidrográficas e ambientais. Em cada grupo, são estabelecidos pontos de monitoramento, que seriam os locais mais prováveis de serem representativos ou indicativos de qualquer toxicidade presente. Em cada grupo são designadas também áreas de coleta associadas. Além das áreas de cultivo, amostram-se também pectinídeos selvagens de processadores comerciais autorizados (CEFAS, 2011).

De abril de 2010 a março de 2011, 13 autoridades locais contribuíram para a amostragem de 87 áreas de amostragem da costa escocesa. Foram coletadas no total 2747 amostras de diferentes espécies em 118 pontos de amostragem e de acordo com os protocolos do Centro para Ciências do Meio Ambiente, da Pesca e da Aquicultura (CEFAS). Além disso, foram coletadas também 49 amostras de pectinídeos selvagens de 16 diferentes locais (CEFAS, 2011).

Segundo oceanógrafos especialistas no monitoramento de fitoplâncton da região costeira de Santa Catarina, os pontos de coleta de amostras do

monitoramento de moluscos bivalves da região possuem boa representatividade em termos de distribuição espacial e variações oceanográficas (informação verbal)⁵. Além disso, esse número de pontos é economicamente e logisticamente viável pelo menos numa fase inicial de transição de um serviço de monitoramento para um sistema de vigilância a ser executado pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrário de Santa Catarina (CIDASC) (informação verbal)⁶.

2.7 COLETA DE ÁGUA E MOLUSCOS

Tanto amostras de partes de água, utilizando-se mangueiras ou garrafas dispostas verticalmente, quanto as coletadas por meio de redes cônicas, com coletor adaptado à extremidade, devem ser obtidas. As partes de água são preferidas, pois algumas células podem estar frágeis e terão viabilidade reduzida nas redes, entretanto, estas últimas podem ser úteis quando a contagem celular está baixa. O ideal é coletar as amostras de água entre 10h e 14h, quando existe maior probabilidade das microalgas estarem próximo à superfície para realização da fotossíntese (AUSTRÁLIA, 2009).

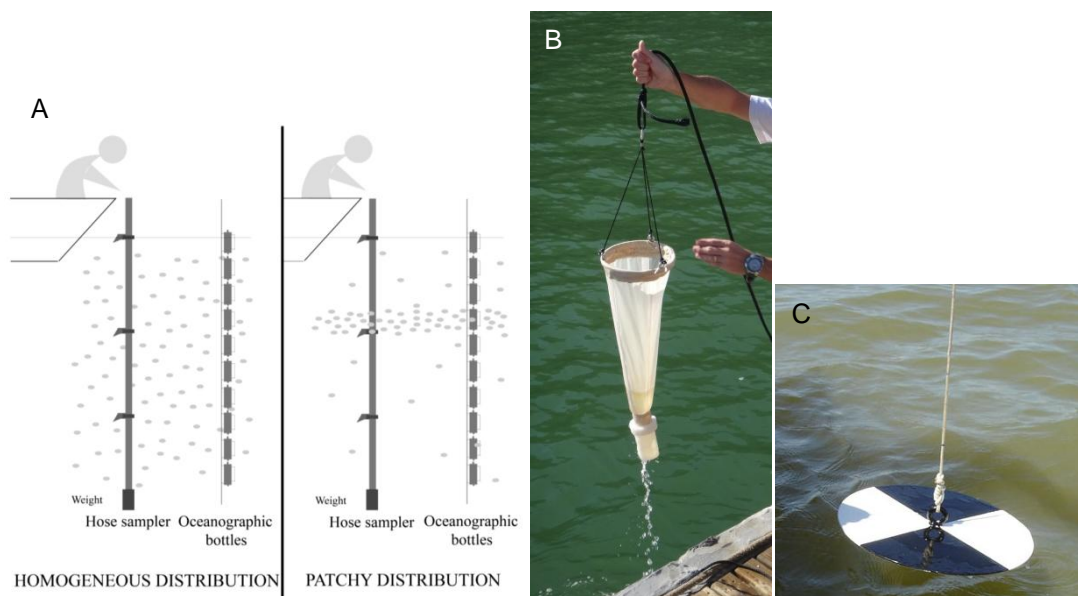
As amostras integradas constituem-se de uma determinada coluna d'água, sendo, portanto, coletadas com o auxílio de uma mangueira contínua. Estas são preferidas às amostras coletadas com garrafas, em diferentes profundidades, quando águas mais profundas devem ser amostradas. Isso porque a estratificação da coluna d'água permite que as microalgas migrem entre os estratos, fazendo com que a amostragem com uso de garrafas possa não coletar o estrato de maior acúmulo de microalgas em um determinado momento. Geralmente, coleta-se de 500 mL a 1L de água, mas o volume pode variar de acordo com o método de análise utilizado. As amostras devem ser colocadas em recipientes deixando-se uma pequena quantidade de ar e não devem ser submetidas a grandes variações de temperatura (AUSTRÁLIA, 2009).

⁵ Mencionado pelos Doutores Luis Antonio de Oliveira Proença e Mathias Alberto Schramm durante o curso de Monitoramento de Algas Nocivas e Ficotoxinas, Itajaí-SC, 2013.

⁶ Mencionado pelo Médico Veterinário Pedro Mansur Sesterhenn durante visita técnica, Florianópolis-SC, 2013.

No Brasil, a coleta de amostras de água é geralmente feita utilizando-se uma mangueira de plástico com 2,4 cm de diâmetro e que possui uma válvula para fechamento na parte superior (Figura 7A). A mangueira pode chegar a 5 m de comprimento dependendo da profundidade da coluna d'água no ponto de coleta. O conteúdo da coluna d'água é colocado num recipiente para ser homegeinizado e dali se retiram alíquotas de 200 mL a serem mantidas em garrafas de cor âmbar com 2% de solução de lugol. Estas alíquotas são utilizadas para as análises quantitativas de fitoplâncton. Para as análises qualitativas, as amostras são coletadas utilizando-se uma rede cônica com malha de 20 μm (Figura 7B) e são mantidas em garrafas plásticas com formaldeído a 4%. As células são identificadas de acordo com as características morfológicas e contadas utilizando-se câmeras de sedimentação (10 ou 50 mL) e microscópio de luz invertida (TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009), de acordo com o método Utermöhl (HASLE, 1978). São mensurados também os parâmetros de temperatura, salinidade (refratômetro) e transparência (disco Secchi - Figura 7C) da água do mesmo local (TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

Figura 7 - A) Mangueira e garrafas de amostragem de água; B) Rede para amostragem de fitoplâncton; C) Disco de Secchi para aferição da turbidez da água



Fonte: A) (PIZARRO et al., 2013); B) (FONTANA, I., 2013); C) (CONSULPESC, 2016).

Antes de 2005, no Reino Unido, os dados de parâmetros físicos, químicos e biológicos eram coletados por cientistas que iam ao mar com embarcações de

pesquisa ou por equipamentos de gravação contínua instalados em estações fixas. A partir do referido ano, tais parâmetros passaram a ser detectados por satélites ou por sensores automáticos posicionados sobre a superfície do mar. Foi desenvolvido um sistema de monitoramento autônomo que fornece uma alta frequência de dados espaço-temporais. Isso inclui a determinação da biomassa e a coleta de amostras de água para posterior identificação automatizada das espécies de fitoplâncton, em laboratório, relativas a pontos selecionados ao longo da costa da Inglaterra e do País de Gales (CEFAS, 2014b; SAMS, 2016).

Na Inglaterra e no país de Gales, foram definidas concentrações que indicam a necessidade de medidas de precaução nos cultivos (Tabela 1) (FSA, 2014). Na Escócia, a concentração de alerta para *Pseudo-nitzschia* (ASP) é de 50.000 células por litro (CEFAS, 2011).

Tabela 1 - Níveis de alerta de fitoplâncton em amostras de água na Inglaterra e País de Gales

Grupo de biotoxinas	Fitoplâncton/toxina	Níveis de alerta (cel./L)
PSP	Alexandrium /Saxitoxina	> 0
DSP	Dinophysis /Ácido ocadáico	≥ 100 e dados históricos
ASP	Pseudo-nitzschia /Ácido domóico	≥ 150.000 e dados históricos

Fonte: (FSA, 2014).

As amostras de moluscos bivalves devem ser de tamanho suficiente para que se teste todos os grupos de biotoxinas necessários e para que se represente bem o ponto de coleta. Devem ser mantidas sob refrigeração (10°C ou menos) e enviadas ao laboratório o mais rápido possível (AUSTRÁLIA, 2009).

Para o monitoramento de moluscos bivalves das regiões italianas do Veneto e do Lazio, costuma-se coletar uma quantidade aproximada de 4 kg de moluscos com conchas, da qual 2 kg são destinados à investigação de biotoxinas, 1,5 kg para contaminantes químicos e 500 g para parâmetros microbiológicos. Parte das amostras é congelada, caso necessite-se de confirmação (MODALITÀ, 2011).

Recomenda-se também que durante um evento de floração tóxica, o foco seja frequentemente amostrado em diferentes profundidades. Um exemplo de esquema de coleta consiste na utilização de cordas marcadas em intervalos regulares para definição de transectos e os moluscos seriam coletados de acordo com cada marca

na corda. Com o auxílio de um aparelho de GPS, é possível que a equipe de coleta localize o ponto selecionado previamente. Os moluscos mais próximos ao ponto seriam coletados. Para o caso de moluscos bivalves criados verticalmente, como nas lanternas de ostras e vieiras, uma estratégia sistemática poderia ser adotada para levar em consideração as diferentes profundidades de criação. Numa primeira amostra agrupada, indivíduos seriam coletados da superfície; na segunda, seriam amostrados de uma profundidade mediana e na terceira, os indivíduos mais profundamente distantes que possam ser apanhados da embarcação (CORSIN et al., 2009).

Recomenda-se a coleta de indivíduos de tamanho considerado comercializável para que o número de indivíduos coletados não tenha grandes variações (Figura 8). A porção dos moluscos bivalves a serem analisadas laboratorialmente deve corresponder à parte comestível (Figura 9), que geralmente se refere a todo o tecido mole. No caso das análises de partes mais contaminadas, como o hepatopâncreas, os resultados devem ser corrigidos por meio de um fator de conversão para uma base de análise de parte comestível (LAWRENCE et al., 2011).

Figura 8 - Coleta de mexilhões (*Perna perna*) para o monitoramento de moluscos bivalves em Santa Catarina



Fonte: (FONTANA, I., 2013).

Quando a amostragem estiver sendo feita em resposta aos resultados de uma alta contagem de fitoplâncton, todas as espécies de moluscos cultivados e extraídos da região devem ser amostradas. Caso isso não seja possível ou quando se estiver realizando apenas amostragens de rotina, deve-se amostrar as espécies que tenha

a maior probabilidade de revelar precocemente a presença de biotoxinas marinhas e as que mostrem os níveis mais altos de toxinas (AUSTRÁLIA, 2009). O uso de uma espécie de molusco bivalve como indicadora implica que a ausência de toxicidade nesta espécie indica a provável ausência na outras espécies produzidas e extraídas da mesma região (LAWRENCE et al., 2011).

Mesmo sabendo-se que as vieiras parecem ser mais sensíveis ao ácido domóico, os mexilhões são usados como espécies sentinelas internacionalmente. Em termos gerais, eles indicam a presença de biotoxinas antes que outras espécies (AUSTRÁLIA, 2009; INTECMAR, 2014).

Figura 9 - Desconchamento de mexilhões para detecção de toxinas DSP



Fonte: (FONTANA, I., 2015).

Segundo Alves et al. (2013), devido às características alimentares e fisiológicas do mexilhão marrom, *P. perna*, este organismo adquiriu o status de biomonitor ambiental marinho sendo amplamente utilizado em impactos ambientais, no monitoramento de condições sanitárias e da qualidade da água. Em Santa

Catarina, geralmente utiliza-se o mexilhão como sentinela nas amostragens devido à sua alta densidade populacional, sistema de filtração mais rudimentar que o das ostras e pelo menor custo ao produtor.

Caso existam dados suficientes que demonstrem que alguma espécie ou produto de moluscos bivalves não acumulam biotoxinas, eles podem ser excluídos do plano de manejo durante os fechamentos. Por exemplo, existem muitas evidências de que as vieiras quando vendidas sem as ovas não representam risco de presença de biotoxina (AUSTRÁLIA, 2009).

Além das amostras, é importante também coletar dados ambientais, como: salinidade, temperatura da água, visibilidade, escoamento dos rios, pluviosidade, velocidade e direção do vento, irradiância, teor de compostos nitrogenados inorgânicos e teor de fósforo, que irão compor os bancos de dados a serem periodicamente analisados (AUSTRÁLIA, 2009).

O Brasil participa de um projeto denominado ANTARES, criado em 2003, que tem como objetivo avaliar as mudanças de longo prazo dos ecossistemas costeiros da América do Sul. Este projeto utiliza uma base de dados obtidos por meio de estações oceanográficas e satélites que captam a concentração de clorofila *a* e a temperatura da superfície do mar. Estas informações podem ser úteis para se estimar as densidades de microalgas e poderiam ser incorporadas a um futuro sistema de vigilância. Entretanto, desde o início de 2010, as informações não têm sido mais disponibilizadas no site. Os organizadores apontam a necessidade de mais recursos humanos para a continuidade do projeto (INPE, 2014).

2.8 FREQUÊNCIA DAS AMOSTRAGENS

A frequência das amostragens deve ser suficiente para acessar mudanças espaço-temporais nas microalgas, na presença de toxinas nos moluscos bivalves e cobrindo os possíveis riscos de rápido aumento na toxicidade dos mesmos (LAWRENCE et al., 2011).

A detecção de biotoxinas marinhas na carne de molusco bivalves, além de ser feita periodicamente por meio dos monitoramentos, deve ser feita sempre que forem detectados níveis de fitoplâncton nocivos acima do esperado. Com o aumento dos

níveis tóxicos na água ou em moluscos, a frequência das amostragens deve aumentar para assegurar o fechamento das áreas em tempo apropriado (AUSTRÁLIA, 2009).

Inicialmente, as amostragens deveriam ser feitas regularmente ao longo do ano, já que espécies potencialmente nocivas podem ocorrer em qualquer período. A amostragem semanal de fitoplâncton é uma norma estabelecida internacionalmente para áreas onde há ocorrência de toxinas ou em pontos de coleta pré-definidos (EUROPA, 2004a; STOBO et al., 2008; VALE et al., 2008; AUSTRÁLIA, 2009; MURRAY, 2010; CEFAS, 2011; NSW FOOD AUTHORITY, 2011; INTECMAR, 2014), mas em alguns casos pode ser feita em frequências menores ou de acordo com os resultados das análises espaço-temporais (EUROPA, 2004a; LAWRENCE et al., 2011). Alguns exemplos seriam os locais de extração sazonal ou áreas às quais já existe uma base de dados significativa capaz de indicar baixo risco de ocorrência de florações tóxicas ou que possuem baixo risco em determinadas épocas do ano (AUSTRÁLIA, 2009).

A frequência das amostragens poderia ser inicialmente menor e ir aumentando de acordo com os resultados do monitoramento. Quanto maior for a frequência, mais efetivo será o programa de monitoramento, pois favorece um sistema de alerta precoce do risco de florações nocivas (AUSTRÁLIA, 2009).

Em Portugal, a amostragem pode ser feita quinzenalmente ou mensalmente quando toxinas do grupo da PSP não são encontradas no outono/inverno anterior, caso contrário, é seguido o Regulamento EC 854/2004 referente às amostragens semanais (VALE et al., 2008). Na Austrália, a amostragem de moluscos é feita mensalmente nos locais de cultivo e semanalmente onde existem estoques temporários como em áreas de mar aberto (NSW FOOD AUTHORITY, 2011).

Na Escócia, a frequência das amostragens segue o seguinte esquema, baseado em avaliação de risco sazonal (CEFAS, 2011):

- PSP: semanalmente de abril a outubro e a cada duas semanas de novembro a março;
- DSP: semanalmente de abril a dezembro e mensalmente de janeiro a março;
- ASP: semanalmente de junho a outubro, a cada duas semanas em maio e mensalmente de novembro a abril. Com exceção dos

pectenídeos selvagens, que são coletados semanalmente durante todo o ano.

Considera-se necessário realizar amostragens regulares de moluscos principalmente quando os cultivos visam a exportação, quando a amostragem de microalgas é difícil ou ineficaz, como em áreas de mar aberto, zonas de muita quebra de ondas e zonas com a finalidade de produção de pérolas, ou quando a área de cultivo é nova e possui poucas informações sobre riscos de ocorrência de biotoxinas (AUSTRÁLIA, 2009).

A frequência de coleta ideal deve ser baseada em avaliações de risco que incluam os fatores ambientais citados anteriormente (LAWRENCE et al., 2011). Na Itália, a frequência das amostragens é determinada com base nos dados históricos, nas atividades do centro de depuração, em fatores climáticos que possam influenciar as características microbiológicas, químicas e físicas e em outras variáveis que possam ser levadas em consideração. Geralmente, são previstas de duas a três amostragens por semana relativas aos riscos biológicos (*E. coli* e *Salmonella*). Para os demais riscos, a frequência deve ser estabelecida de acordo com as avaliações do risco pelo serviço veterinário oficial (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

O monitoramento de fitoplâncton nas amostras de água é uma valiosa ferramenta complementar ao monitoramento dos moluscos. Deve ser feito com o objetivo de se obter resultados quantitativos que suportem a tomada de decisões (AUSTRÁLIA, 2009; LAWRENCE et al., 2011), como as tendências de abundância de fitoplâncton. Esta informação pode gerar alertas para que se impessa o acúmulo de biotoxinas nos mariscos e serve como guia para a determinação da frequência da amostragem de moluscos (LAWRENCE et al., 2011). Portanto, a coleta de moluscos deveria ocorrer juntamente com a coleta de amostras de água ou em resposta aos resultados do monitoramento do fitoplâncton (AUSTRÁLIA, 2009).

2.9 TAMANHO AMOSTRAL

2.9.1 Amostras de moluscos

Segundo o guia de amostragem disponibilizado no relatório da junta FAO/IOC/WHO, especialistas em biotoxinas de moluscos bivalves recomendam que os protocolos de amostragem sejam definidos de acordo com a localização e o número de pontos de coleta de amostras de microalgas e de moluscos bivalves (LAWRENCE et al., 2011).

Em relação ao tamanho amostral, não existe nenhum consenso internacional para as diferentes espécies de moluscos bivalves. A quantidade de indivíduos coletados deve ser suficiente para suprir a variabilidade entre as espécies. É por isso que o número de indivíduos de tamanho comercializável, ao invés da massa de parte comestível, deveria ser o fator determinante do tamanho amostral (EFSA, 2008; LEE; LOVATELLI; ABABOUC, 2008; LAWRENCE et al., 2011).

Além das possíveis diferenças entre espécies, sabe-se que a maioria dos métodos disponíveis não se encontra totalmente de acordo com os critérios do Codex de calibração e padronização. Por isso, a EFSA sugere que o Comitê do Codex sobre Peixes e Produtos Pesqueiros (CCFFP) deveria considerar vários métodos de análise de biotoxinas. Se possível, os métodos de referência não deveriam se basear em bioensaios, mas em métodos químicos, bioquímicos e imunológicos validados pelo CCFFP para que depois possam ser recomendados ao Comitê do Codex sobre Métodos de Análise e Amostragem (CCMAS) para revisão e determinação como regulamento (EFSA, 2010).

Estimativas realistas de sensibilidade e especificidade de cada um dos métodos utilizados devem ser usadas para o delineamento amostral. Estas estimativas podem ser feitas incorporando-se a opinião de especialistas às premissas necessárias. Deve-se também levar em consideração o uso de amostras agrupadas ao se determinar o valor da sensibilidade do teste, já que isso tende a reduzi-la (CORSIN et al., 2009; PEELER; TAYLOR, 2011).

Segundo Williams e Moffitt (2001), interpretações baseadas nos resultados positivos de amostras agrupadas podem estar equivocadas. A proporção de pools

positivos em relação a cada pool negativo é maior que a estimativa de máxima verossimilhança da prevalência aparente. É possível obter um intervalo de confiança menor quando um número maior de grupos é utilizado na análise com poucos indivíduos por pool. Nas populações com alta prevalência, o uso de amostras agrupadas reduz significativamente a confiança nas estimativas de prevalência. Porém, torna-se uma importante ferramenta quando pretende-se realizar estudos de detecção de agentes.

Deve-se evitar que o plano de amostragem com amostras agrupadas encontre positividade em todos os pools, ou seja, que tenham baixa especificidade. Quando a prevalência é alta, o ideal seria não utilizar amostras agrupadas, mas usar um número maior de pools ou usar uma combinação de estratégias. Neste caso, a variação da prevalência estimada pode ser alta. Existem métodos de se estimar a prevalência com amostras agrupadas com qualquer combinação de tamanhos amostrais para se obter informações populacionais de maneira eficiente nos programas de amostragem (WILLIAMS; MOFFITT, 2001).

A escolha do tamanho amostral dependerá não apenas de considerações estatísticas, mas também da precisão desejada, da frequência esperada de cada toxina e de considerações não estatísticas, como recursos disponíveis (CORSIN et al., 2009).

Os fatores que devem ser levados em consideração são (CORSIN et al., 2009):

- Sensibilidade e especificidade dos testes utilizados;
- Incerteza em relação à sensibilidade e à especificidade;
- Prevalência mínima detectável desejada;
- A sensibilidade do sistema;
- Precisão desejada;
- Tamanho populacional (muitas vezes assume-se que é infinitamente grande);
- O poder desejado do inquérito.

Em áreas de cultivo onde as emissões de poluentes ainda não estão claramente compreendidas e este tipo de contaminação pode estar ocorrendo de maneira aleatória e imprevisível, uma estratégia de amostragem sistemática pode ser utilizada. Esta estratégia assume que uma secção transversal estatisticamente

representativa de todos os fatores meteorológicos, hidrodinâmicos e outros será incluída na análise de dados e então a classificação das áreas de cultivo será baseada nos dados que representam as condições mais prováveis de contaminação (AUSTRÁLIA, 2009).

A amostragem aleatória e contínua presume que se mudanças desfavoráveis e intermitentes ocorrem na qualidade da água, elas serão detectadas nos resultados laboratoriais. No caso de contaminações associadas a alguma condição sazonal ou meteorológica, como contaminações de cultivos próximos a áreas urbanas durante a estação chuvosa devido ao escoamento de contaminantes, uma estratégia de amostragem com uma frequência adequada às condições adversas seria ideal para acessar a qualidade dos moluscos (AUSTRÁLIA, 2009).

Na Austrália, cada amostra consiste de 15 a 18 indivíduos de tamanho comercial, que são submetidas ao teste Jellet de triagem e, se positivas, aos testes de confirmação, como bioensaio e LC-MS. O número mínimo de animais a serem coletados é 12 e aproximadamente 100 g da parte comestível deve ser designada para cada toxina testada ou conforme especificado pelo laboratório (LEE; LOVATELLI; ABABOUC, 2008; AUSTRÁLIA, 2009).

No Canadá, são coletadas no mínimo 15 amostras de cada área amostral. Nas áreas de cultivo mais remotas, essa exigência pode ser alterada se as condições sanitárias forem garantidas. Em certas circunstâncias, uma estratégia de amostragem sistemática pode ser seguida, estabelecendo-se a primeira localização de coleta de forma aleatória e prosseguindo-se com um esquema preestabelecido para a determinação das próximas coletas, de acordo com os cultivos, distâncias ou pontos de amostragem (CCME, 2011).

A CE recomenda que os planos de amostragem para controlar a presença de contaminantes químicos devem ser capazes de detectar níveis superiores ao estabelecido no Regulamento (CE) n. 466/2001. Este determina o valor máximo permitido de 1 mg/kg de metais pesados em moluscos bivalves frescos. Os critérios de desempenho para a colheita de amostras e para os métodos de análise seguem a Diretiva 2001/22/CE, relativa aos teores de chumbo, cádmio, mercúrio e 3-MCPD (3-monocloropropano-1,2-diol) e que determina o número mínimo de amostras de acordo com o peso (em kg) de cada lote de alimento produzido (Tabela 2).

Tabela 2 - Número mínimo de amostras a serem coletadas de acordo com o peso do lote de alimento produzido (Diretiva 2001/22/CE)

Peso do lote (kg)	Número mínimo de amostras
< 50	3
50 – 500	5
> 500	10

Fonte: (EUROPA, 2001).

Se o lote consiste de grupos de indivíduos, como 1kg de berbigões embalados em redes plásticas, o número de grupos a ser coletado para formar as amostras agrupadas deve seguir o esquema da Tabela 3.

Tabela 3 - Número de grupos a serem coletados em cada lote (Diretiva 2001/22/CE)

Número de grupos em cada lote	Número de grupos
1 – 25	3
26 – 100	5
> 100	10

Fonte: (EUROPA, 2001).

Amostras dos mercados locais e de diferentes etapas de processamento poderiam ser incluídas, como parte de um sistema de vigilância ativa (CORSIN et al., 2009), já que a contaminação com biotoxinas não provoca sinais clínicos ou anormalidades visíveis nos moluscos bivalves, conseqüentemente não afetando a disponibilidade destes nos mercados para a venda (HUSS, 1997). Além disso, informações como número, tamanho e distribuição das unidades de produção são necessárias para estruturação e refinamento do sistema (CORSIN et al., 2009).

Amostragens rotineiras de moluscos bivalves geralmente são compostas de vários indivíduos numa mesma amostra. Assim, uma amostra pode conter efetivamente entre 10 e 20 animais e da mesma maneira, cinco amostras podem conter até 100 animais. A composição da unidade amostral afeta consideravelmente a sensibilidade do teste diagnóstico dependendo da proporção de indivíduos e do nível de contaminação de cada amostra. Dependendo do planejamento amostral, os resultados podem ser ambíguos ou pouco conclusivos (FAO/WHO, 2012).

Para o caso de áreas onde pontos de amostragem não foram pré-estabelecidos, é indicada uma amostragem espacial para se obter aleatoriedade. Neste tipo de amostragem, pontos georreferenciados são selecionados aleatoriamente e então os moluscos próximos aos pontos seriam coletados. Para isso, as áreas com produção significativa devem ser indicadas no mapeamento dos estuários e das baías (CORSIN et al., 2009).

2.9.2 Amostras de água

O objetivo chave de um estudo piloto de programa de monitoramento ambiental é determinar o poder estatístico e o tamanho amostral para implementações de estratégias futuras. Para se avaliar corretamente o impacto e as mudanças nas condições ambientais em pontos de monitoramento da qualidade de água, é preciso conhecer essas variáveis para que se possam realizar interpretações sensatas (SHAO; WANG, 2009).

Shao e Wang (2009) sugerem que os resultados dos pontos de monitoramento sejam comparados a pontos de referência para ocorrência de determinados tipos de fitoplâncton. Assim, ao invés de se fazer as comparações entre as médias, os autores sugerem que se façam comparações entre as médias do monitoramento e o 80° percentil dos resultados de pontos de referência previamente definidos. Caso a média do ponto de monitoramento seja inferior a este limite, considera-se que a diferença está dentro do esperado. Entretanto, se o inverso ocorrer, novas investigações devem ser feitas. Da mesma maneira, caso os resultados do monitoramento ultrapassem valores de referência fixados por regulamento específico, recomenda-se que mais análises sejam feitas.

Tradicionalmente, utiliza-se um poder estatístico de 80% ou 90% para determinações práticas de tamanhos amostrais, sendo que o primeiro é o valor recomendado pelo Conselho de Conservação e Meio Ambiente da Austrália e Nova Zelândia para seus programas de monitoramento oceânico (SHAO; WANG, 2009; WATER CORPORATION, 2012).

Esse método de comparação com valores de referência se aplica, principalmente, para os casos em que se tem uma grande quantidade de resultados com valores abaixo da capacidade mínima de detecção dos equipamentos atualmente disponíveis, como é o caso de alguns contaminantes químicos. Isso afeta bastante o cálculo das médias, pois os valores são lidos como zero, mas não o cálculo dos quantis, especialmente se forem quantis mais altos (SHAO; WANG, 2009).

2.10 MONITORAMENTO E AÇÕES ESTRATÉGICAS

Para a adequação de áreas produtoras de moluscos bivalves aos requerimentos da saúde pública, as agências oficiais deveriam considerar as seguintes ações (LAWRENCE et al., 2011):

- Classificação/reclassificação das áreas produtoras de acordo com o risco de contaminação por *E. coli*/coliformes termotolerantes ou coliformes totais por meio de levantamentos e monitoramentos de frequência apropriada;
- Classificação/reclassificação das áreas produtoras de acordo com a probabilidade de contaminação por organismos patogênicos da carne de moluscos bivalves por meio de monitoramentos de frequência apropriada;
- Fechamento/reabertura de áreas produtoras de acordo com a probabilidade de contaminação por biotoxinas por meio do monitoramento de moluscos bivalves em combinação com o monitoramento de fitoplâncton na água do mar (Tabela 1);
- Controle de contaminantes químicos.

A reabertura de áreas de cultivo após uma contaminação deve ocorrer após a demonstração de que os níveis de toxinas nos moluscos reduziram até níveis aceitáveis para o consumo humano. Geralmente, a reabertura é feita após três amostras satisfatórias colhidas ao longo de 14 dias (AUSTRÁLIA, 2009).

A Austrália possui uma lista de espécies de fitoplâncton potencialmente tóxicos mais prováveis de ocorrerem em suas águas costeiras e diferentes níveis de alerta para se iniciar as ações de manejo. Recomenda-se que cada país ou região produtora desenvolva sua própria lista de espécies potencialmente tóxicas e a utilize

como guia para tomada de decisões. Deve-se levar em consideração a capacidade laboratorial para a identificação dos gêneros e das espécies. As estratégias de ação podem incluir a reamostragem de água, os testes de detecção de biotoxinas e o fechamento da área de cultivo ou extração. Sugere-se que a lista contenha, por espécie de microalga, a síndrome a qual está relacionada (ASP, PSP ou DSP) e as quantidades máximas permitidas (células/L) para as exigências de reamostragens e de fechamento temporário das áreas (AUSTRÁLIA, 2009). Na Escócia, as notificações de fechamento valem por 28 dias a não ser que sejam revogadas antes desse período. A reabertura é feita após dois resultados aceitáveis consecutivos, de acordo com a classificação da área, feitos com um intervalo de 15 dias (MURRAY, 2010).

O plano de manejo deve detalhar as ações a serem feitas em cada um dos seguintes cenários: (1) presença de espécies de fitoplâncton acima dos níveis estabelecidos, (2) presença de espécies de fitoplâncton conhecida internacionalmente por ser tóxica, mas não previamente observada ou testada na região em questão, (3) aumento dos níveis de biotoxinas marinhas mesmo que ainda não tenha excedido os limites estabelecidos e (4) presença de espécies de fitoplâncton tóxicos em áreas de cultivo adjacentes. As ações podem incluir o aumento na frequência de amostragem, aumento do número de pontos de coleta e fechamentos por precaução (AUSTRÁLIA, 2009).

Recomenda-se que sejam feitas revisões anuais e trienais da localização e da frequência das amostragens. Qualquer resultado que represente algum risco para a segurança sanitária da área analisada deverá receber maior atenção e poderá levar a uma alteração de estratégia de manejo (AUSTRÁLIA, 2009). Além dos dados dos pontos de amostragem e do histórico completo das áreas de cultivo, é necessário ter também informações sobre os maricultores, seus padrões de produção e sobre os órgãos locais para se avaliar adequadamente a delimitação e a classificação das áreas (MURRAY, 2010).

No Canadá, essas revisões são feitas anualmente. São coletadas no mínimo cinco amostras de moluscos de cada área amostral e são analisadas as 15 últimas amostras de água para se determinar ou manter a classificação da área (CCME, 2011).

Segundo o guia para vigilância da saúde de animais aquáticos da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), populações grandes ou com estrutura complexa, em que áreas amostrais não estão definidas, mas existe uma probabilidade de agrupamento em relação ao problema sanitário, a amostragem em dois estágios é indicada. Primeiramente, grupos de fazendas, áreas aquícolas ou pontos de coleta seriam selecionados. Em seguida, indivíduos seriam selecionados de cada grupo para a coleta (CORSIN et al., 2009).

De acordo com o regulamento no. 854/2004 da Comissão da Comunidade Européia, os planos de amostragem para o controle da presença de fitoplâncton produtor de ficotoxinas devem ser capazes de detectar alterações na composição do fitoplâncton tóxico e na sua distribuição geográfica. Se os resultados sugerirem acúmulo de biotoxinas na carne dos moluscos, deve-se proceder com uma amostragem intensiva. Nas zonas mais susceptíveis à contaminação, deve-se realizar testes periódicos de toxicidade nos moluscos (EUROPA, 2004a).

A frequência de amostragem semanal, durante os períodos em que é permitida a colheita de moluscos, pode ser reduzida em zonas específicas, ou em relação a determinados tipos de moluscos, se uma avaliação de riscos sobre a ocorrência de toxinas ou fitoplâncton sugerir um risco muito baixo de episódios tóxicos. Esta frequência deverá ser aumentada se essa avaliação sugerir que a amostragem semanal não é suficiente. A avaliação de riscos deve ser revista periodicamente (EUROPA, 2004a).

Sempre que se conheçam as taxas de acúmulo de toxinas para um determinado grupo de espécies em crescimento na mesma zona, a espécie com a taxa mais elevada deve ser utilizada como espécie sentinela. Sempre que os teores de toxinas na espécie sentinela estiverem acima dos valores-limite regulamentares, a colheita das demais espécies só será permitida se outras análises revelarem teores de toxinas abaixo dos valores-limite (EUROPA, 2004a).

Em relação à análise de fitoplâncton, as amostras devem ser representativas da coluna de água e fornecer informações sobre a presença de espécies tóxicas e tendências populacionais. Se forem detectadas quaisquer alterações que possam resultar em um acúmulo de biotoxinas, a frequência de amostragem dos moluscos deverá ser aumentada ou deverão ser estabelecidas medidas cautelares de

encerramento das zonas suspeitas, até estarem disponíveis os resultados das análises para detecção de toxinas (EUROPA, 2004a).

O entendimento das tendências populacionais do fitoplâncton é essencial para se determinar os riscos de formação das florações. Alguns autores seguem o conceito de que uma espécie de fitoplâncton não necessita atingir altas densidades populacionais para ser considerada em estado de floração. A associação das altas densidades durante o verão com florações, é algo que se aplica a algumas (diatomáceas, por exemplo), mas não todas as espécies formadoras de florações. Portanto, esta premissa pode ser enviesada e reducionista aos olhos de muitos oceanógrafos (SMAYDA, 1997; TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

As diatomáceas possuem estratégias antipredatórias que reduzem a população de copépodes, inibindo seus sucessos reprodutivos (POULET et al. 1994). Essa característica pode ser uma das responsáveis pela ampla identificação de florações formadas por este grupo, o que conseqüentemente leva muitos a acreditarem que as florações se comportam basicamente como as das diatomáceas (SMAYDA, 1997).

Define-se uma floração com base na sua análise qualitativa e não pura e simplesmente quantitativa. Portanto, utilizar um critério específico de biomassa, como a detecção de níveis de clorofila, para a definição de floração, de forma geral, pode ser um problema (SMAYDA, 1997).

Na Escócia, o monitoramento é feito utilizando-se amostras de moluscos das áreas de cultivo, de pectinídeos selvagens de processamentos comerciais e de amostras de água para o monitoramento de fitoplâncton de pontos fixos de amostragem. Os níveis de alerta neste país seguem o esquema da Figura 10 (CEFAS, 2011).

No Brasil, alguns autores, após realizarem estudos de 2000 a 2002 na Baía da Armação do Itapocoroy, consideraram importante a influência da advecção das águas na ocorrência de florações nesse local. Por isso, as tentativas de predição de ocorrência de DSP, PSP ou ASP requerem o monitoramento das correntes oceânicas e de dados meteorológicos (TAVARES; PROENÇA; COEBRECHT, 2009).

Figura 10 - Níveis de alerta de acordo com os resultados das análises de moluscos do programa de monitoramento da Escócia

	Nenhuma amostra recebida/Sem resultados
	Teste não solicitado
	ASP: Não detectado LTs: Negativo PSP: Não detectado
	ASP: Detectado <20µg/g LTs: Negativo com sinais clínicos PSP: Níveis quantificáveis <80µg/100g
	ASP: Detectado ≥20µg/g LTs: Positivo PSP: Níveis quantificáveis ≥80µg/100g

Fonte: (CEFAS, 2011).

É difícil estabelecer fatores preditivos para a ocorrência de florações tóxicas, pois a periodicidade de tais eventos pode variar de local para local e de acordo com diferentes parâmetros. Entretanto, com a análise de bancos de dados é possível desenvolver modelos simples que possam explicar o acúmulo de toxinas em determinados moluscos. Na Ria de Aveiro (formação lagunar no estuário do rio Vouga), em Portugal, por exemplo, observou-se que tanto o escoamento dos rios em maio, quanto as chuvas acumuladas de janeiro a maio, podem predizer a intensidade de acúmulo de AO associado à *D. acuminata* em moluscos em junho/julho. Além disso, a contaminação por AO e DTX2, simultaneamente, aumentou exponencialmente em setembro/outubro de acordo com o número de dias acumulados de ventos em direção oeste no mês de agosto precedente. Neste caso, a direção do vento contribui para o acúmulo mecânico de *Dinophysis* spp. na costa, o que pode não ocorrer para outras espécies de microalgas (VALE, 2012).

De acordo com Álvarez-Salgado et al. (2011), em termos gerais, uma primavera chuvosa leva a extensos fechamentos de cultivos no verão e um verão ventoso leva a extensos fechamentos no outono.

Segundo Van Der Fels-KlerX et al. (2012), se for encontrada uma relação substancial e quantificável entre o pico populacional de fitoplâncton produtor de toxinas DSP e a concentração de toxinas DSP, ela poderá ser utilizada no programa

de monitoramento para ajudar a prever áreas de risco de toxinas DSP em moluscos bivalves.

Na Holanda, foi encontrada uma pequena correlação entre as concentrações de fitoplâncton produtor de toxinas causadoras de DSP e os níveis de toxinas DSP em moluscos, em 2007. Os níveis aumentados destas toxinas foram detectados até cinco semanas após o pico populacional do fitoplâncton correspondente. Entretanto, para outras biotoxinas, uma correlação não foi observada devido aos baixos casos de ocorrência (VAN DER FELLS-KLERX et al., 2012). Associações entre a ocorrência de DSP em amostras de moluscos e a abundância de *D. acuminata* e *D. acuta* foram observadas em vários países da Europa (NAUSTVOLL; GUSTAD; DAHL, 2012; VAN DER FELLS-KLERX et al., 2012).

Apesar de a temperatura ser considerada um fator importante para a abundância e concentração de *Dinophysis*, nem sempre é possível encontrar uma correlação significativa. Além disso, a correlação pode ser negativa para outras espécies. Entretanto, na Noruega, análises demonstraram tendência relacionadas a direção dos ventos. Um aumento na abundância de *Dinophysis* sp. foi observado em períodos de ventos em direção à costa e uma diminuição, em períodos com ventos em direção ao mar (NAUSTVOLL; GUSTAD; DAHL, 2012).

2.11 CLASSIFICAÇÃO DE ZONAS DE PRODUÇÃO

O monitoramento de moluscos bivalves é um indicador para a classificação das condições dos cultivos, particularmente onde as condições ambientais e geográficas não asseguram a qualidade da água e da carne dos moluscos. As análises microbiológicas das partes comestíveis podem também ser usadas como medida efetiva para verificar a adequação de uma zona de segurança fechada ou para confirmar que cultivos em áreas de mar aberto estão sendo manejadas de maneira higiênica antes e durante o desembarque (AUSTRÁLIA, 2009).

Baixas concentrações de coliformes fecais em moluscos coletados ao redor do perímetro de uma zona de segurança fechada podem ser utilizadas como parâmetro de confirmação de tamanho adequado desta área. Além disso, a concentração de contaminantes na carne de moluscos pode ser usada para a

classificação das áreas de produção como sendo de extração liberada ou sob restrição. Maiores detalhamentos serão apresentados no Quadro 2 e na Tabela 4 desta seção (AUSTRÁLIA, 2009).

Na Austrália, com base nos resultados de amostragens prévias, as áreas de extração podem ser classificadas em: aprovadas, aprovadas condicionalmente, restritas, restritas condicionalmente, proibidas, remotamente aprovadas e de áreas abertas. Uma área é classificada como proibida quando os moluscos estão tão alta e frequentemente contaminados que os procedimentos de controle não podem ser manejados adequadamente para garantir a proteção da saúde pública. Áreas ocasionalmente afetadas por biotoxinas são classificadas como aprovadas condicionalmente. Uma zona fechada de segurança é definida quando existe emissão de tratamento de esgoto ou alguma outra fonte de descarga de importância sanitária próxima à área de cultivo. Considera-se que o cultivo seja em mar aberto quando este se localiza a três milhas náuticas da costa, não sendo impactado pelas fontes costeiras de contaminação (AUSTRÁLIA, 2009).

Na Europa, o Reg. (CE) n. 853/2004 estabeleceu regras específicas de higiene dos alimentos de origem animal, incluindo também os limites máximos permitidos de biotoxinas em moluscos bivalves (Quadro 2). Além disso, determinou que os maricultores podem recolher e submeter ao mercado apenas moluscos provenientes de zonas classificadas (EUROPA, 2004b). Segundo o Reg. (CE) n. 854/2004, esta classificação deve ser estabelecida pela autoridade competente com base nos níveis descritos no Quadro 2, como pertencendo às classes A, B ou C (EUROPA, 2004a).

Quadro 2 - Parâmetros de classificação de zonas de produção utilizados pela Comunidade Europeia

Classificação	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	Destino ao consumo humano
Classe A	≤ 230 NMP/100g	Ausente em 25g	Direto
Classe B	> 230 e ≤ 4.600 NMP/100g em pelo menos 90%* das amostras	Ausente em 25g	Apenas após tratamento em um centro de depuração ou de transformação
Classe C	> 4.600 ≤ 46.000 NMP/100g	Ausente em 25g	Apenas após afinação por período igual ou superior a 2 meses ou tratamento em um centro de transformação

Fonte: (EUROPA, 2004a) e *EFSA (2011). Legenda: NMP – Número mais provável.

Os parâmetros definidos aplicam-se às amostras da parte comestível de moluscos e para a quantificação de *E. coli* inclui-se também o líquido intervalvar. Para a investigação da presença de *Salmonella* spp., utiliza-se apenas a parte comestível (EUROPA, 2004a; SARDEGNA, 2009).

As zonas de estabulação referem-se aos locais destinados exclusivamente à depuração natural dos moluscos e devem possuir as mesmas características da zona A (EUROPA, 2004b; SARDEGNA, 2009).

Além da quantificação microbiológica, os moluscos oriundos de zonas de produção da classe A devem cumprir os requisitos referentes aos limites de biotoxinas para serem disponibilizados para o consumo humano. Podem ser armazenados em áreas de produção, centros de depuração ou centros de expedição em tanques ou quaisquer outras instalações que contêm água do mar limpa ou em áreas naturais, visando-se remover areia, lama ou lodo, preservar ou melhorar as características organolépticas e garantir as boas condições de vitalidade antes do acondicionamento ou da embalagem. A este processo, dá-se o nome de acabamento (EUROPA, 2004a).

Os moluscos de zonas classe B, devem ser submetidos a algum tipo de tratamento em centro de depuração ou devem ter passado pelo processo de afinação, que consiste na transferência para zonas marinhas, lagunares ou estuarinas durante o tempo necessário para a eliminação dos contaminantes. Os resultados microbiológicos de 5 amostras da zona não devem exceder os limites de 4.600 NMP *E. coli* por 100 g de carne e líquido intravalvar. E os de classe C, só podem ser liberados para o consumo após um longo período de afinação e 5 amostras não devem exceder o limite de 46.000 NMP de *E. coli* por 100 gramas de carne e líquido intravalvar (EUROPA, 2004a).

Após depuração ou afinação, os moluscos bivalves vivos das zonas de produção da classe B ou C também deverão cumprir os requisitos dos limites máximos de biotoxinas. Caso estes últimos não tenham sido sujeitos à depuração ou afinação, poderão ser enviados para um centro de transformação onde deverão ser submetidos à esterilização ou tratamento térmico a fim de se eliminar os microrganismos patogênicos, após remoção de areia, lama ou lodo, se for o caso, no mesmo ou em outro estabelecimento (EUROPA, 2004a).

Se a autoridade competente decidir classificar as zonas de produção, deve elaborar um inventário das fontes de poluição de origem humana ou animal que possam constituir fonte de contaminação às zonas de produção, examinar as quantidades de poluentes orgânicos lançadas nessa zona durante os diferentes períodos do ano, em função das variações sazonais das populações humana e animal na bacia hidrográfica, das precipitações, do tratamento das águas residuais, etc., determinar as características da circulação de poluentes com base no regime de correntes, na batimetria e no ciclo das marés na zona de produção e estabelecer um programa de amostragem de moluscos bivalves vivos na zona de produção com base no exame dos dados obtidos e com um número de amostras, uma distribuição geográfica dos pontos de colheita de amostras e uma frequência de amostragem que assegurem que os resultados da análise sejam tão representativos quanto possível para a zona em questão (EUROPA, 2004a).

Segundo o Regulamento (CE) n. 854/2004, as zonas de produção e de afinação devem ser periodicamente amostradas para verificação da qualidade microbiológica de cada zona, da presença de fitoplâncton produtor de ficotoxinas, bem como da presença de biotoxinas nos moluscos bivalves e da presença de contaminantes químicos (EUROPA, 2004a). Na Escócia, por exemplo, revisões anuais são feitas para a classificação das áreas de cultivo baseadas nos últimos três anos de monitoramento de *E. coli*. No mínimo nove amostras são necessárias ao longo do ano para se manter a classificação de cada área produtiva (MURRAY, 2010).

No Brasil, não existe a classificação em zonas de classe A, B ou C, entretanto foram estabelecidos limites de quantificação de *E. coli* para se decidir, de acordo com o número de amostras positivas de cada área de extração, se a retirada de moluscos será liberada, liberada sob condição ou suspensa. Tais normas estão descritas no manual do PNCMB esquematizadas na Tabela 4 (BRASIL, 2013).

Tabela 4 - Critérios para a definição de retirada de moluscos bivalves de acordo com as contagens de *E. coli*

Número de amostras classificadas de acordo com as contagens de <i>E. coli</i>			Retirada de moluscos
< 230	230 – 46.000	> 46.000	
= 5	= 0	= 0	Liberada
= 4	= 1	= 0	Liberada
= 4	= 0	= 1	Suspensa
≤ 3	≥ 2	= 0	Liberada sob condição
≤ 3	≥ 1	≥ 1	Suspensa

Fonte: (BRASIL, 2013).

2.12 DEPURAÇÃO

A depuração é capaz de reduzir os níveis de *E. coli* e de outros patógenos bacterianos consideravelmente. Alguns autores reportaram reduções de até 95% de *E. coli* em ostras após um período de 48 horas de depuração. Resultados aceitáveis de purificação também foram encontrados para *Salmonella*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. Entretanto, o mesmo sucesso não foi verificado para agentes virais. O Norovirus, por exemplo, teve sua detecção reduzida em apenas 7% nos mesmos trabalhos realizados e foi detectado até mesmo após 10 dias de depuração (SON; FLEET, 1980; SCHWAB et al., 1998; EFSA, 2011). Por isso, a depuração não é um método considerado confiável pela UE para garantir a segurança alimentar em relação às contaminações virais (EFSA, 2011).

Em alguns países, os moluscos oriundos de zonas de cultivo classificadas como B ou C devem passar por centro de depuração antes de serem comercializados. Os circuitos destes centros podem ser abertos ou fechados. Nos circuitos abertos, é utilizada água do mar limpa, filtrada e tratada com substâncias desinfetantes, como o bióxido de cloro em concentrações residuais (0,2 ppm). Concentrações maiores deste desinfetante, como 0,5 ppm, podem causar irritação nos órgãos respiratórios dos moluscos, o que pode interromper a atividade de filtração (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

A troca de água é contínua, proporcional à quantidade de moluscos presente e o excesso de água é eliminado no mar. Para a depuração de berbigões das lagoas do Veneto, utiliza-se os valores ótimos de pH entre 8 e 8,4, o que deve ser monitorado, já que durante a atividade de depuração, ocorre uma leve acidificação.

A salinidade ótima é de 25 a 35 g por litro e a quantidade máxima recomendada de berbigões é de 45 kg por m². Este sistema possui grandes vantagens, pois os moluscos se mantêm nas mesmas condições que as naturais e a atividade de filtração não é alterada (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

Nos circuitos fechados de depuração, utilizam-se caixas plásticas sobrepostas (no máximo três, Figura 11), por onde a água circula a 5 m³ por hora e com temperaturas entre 11 e 20°C (preferencialmente de 11 a 16°C), que é a faixa de temperatura que favorece a taxa máxima de filtração pelos berbigões. A água é filtrada por filtros de areia, de carvão ativado e filtros biológicos para neutralizar os resíduos amoniacais e reduzir a carga de nitritos. A ação bactericida é ampliada pelo uso do ozônio e de lâmpadas ultravioletas. A quantidade máxima de berbigões por caixa é de 250-300 kg. Caso a temperatura da água esteja em torno de 25°C, a densidade deve ser alterada para 130 kg por caixa, já que o aumento da temperatura implica na redução da quantidade de oxigênio dissolvido disponível (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

As estruturas para depuração em circuito fechado requerem constante manutenção e mão-de-obra altamente especializada para que seja garantido o correto funcionamento. Tanto nos circuitos abertos, quanto nos fechados, devem ser frequentemente verificados os seguintes parâmetros químico-físicos: temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, e nos circuitos fechados, também os nitritos, nitratos e amoníacos (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

Na Itália, de modo geral, o tempo de depuração é estabelecido de acordo com a espécie, o nível de contaminação da área de coleta, eventuais fatores meteorológicos, climáticos, ambientais que possam ter alterado a situação sanitária e características operacionais do centro de depuração. A análise dos dados históricos da localização de origem é também altamente relevante nessa etapa. Levando em consideração que na Itália comercializam-se aproximadamente 62 espécies de moluscos bivalves para consumo, a questão do período de depuração, incluindo os outros fatores citados, pode ser bastante variável (BOFFO; ARCANGELI; ROSSETTI, 2008).

Figura 11 - Caixas de depuração de moluscos bivalves de acordo com o recomendado pela UE



Fonte: (FONTANA, I., 2015).

Os períodos de depuração variam de acordo com os regulamentos de cada país. Podem durar de algumas horas até alguns dias. Num sistema bem estruturado, um período de 24 horas de depuração deveria assegurar a remoção da maioria dos patógenos bacterianos oriundos de esgoto e reduzir aproximadamente dois terços dos patógenos virais, como o Norovirus. Entretanto, existe uma tendência geral de se utilizar o período de 48 horas. Alguns países, como a Itália, frequentemente utilizam períodos de 18-24 horas e às vezes menores (LEE; LOVATELLI; ABABOUC, 2008).

Extender o período para, por exemplo, 5 dias deveria melhorar a remoção de patógenos virais, considerando que a temperatura e outras condições sejam satisfatórias. Para *C. gigas*, por exemplo, a temperatura de 18°C é considerada satisfatória para depuração no norte da Europa (LEE; LOVATELLI; ABABOUC, 2008).

Um período mínimo de depuração de 42 horas é regulamentado no Reino Unido e de 44 horas, nos Estados Unidos. Na Nova Zelândia, estipulou-se o mínimo de 48 horas, mas caso as autoridades reconheçam que todas as exigências tenham sido cumpridas, é possível reduzir este período para até 36 horas, dependendo da espécie. Nos países onde não há uma especificação de temperatura mínima pelas autoridades competentes e onde a indústria foca o período de depuração de acordo com a remoção de bactérias indicadoras de contaminação fecal, o período mínimo de depuração utilizado é inferior a 48 horas (LEE; LOVATELLI; ABABOUC, 2008).

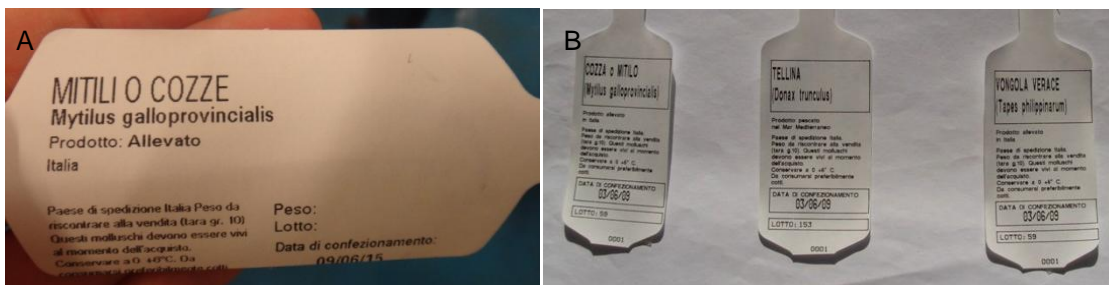
Nos tanques de depuração de moluscos bivalves não podem ser mantidos crustáceos, peixes ou qualquer outra espécie marinha. Após a depuração e confirmação da ausência de detecção de contaminantes, a UE recomenda que os moluscos sejam embalados e rotulados com material resistente e impermeável, conforme descrito no Reg. 853/2004 (Figura 12). As ostras devem ser embaladas com a concha côncava para baixo e os rótulos de todos os moluscos devem conter o nome comum, o científico, a data da manipulação e em geral descreve-se também o local de proveniência para garantia de rastreabilidade. O prazo mínimo de validade pode ser substituído pela expressão “estes animais devem encontrar-se vivos no momento da compra” (EUROPA, 2004b). Indicações da temperatura de conservação, de consumo preferivelmente cozido, o peso e o número do lote também são comumente inseridos nos rótulos, como mostra a Figura 13.

Figura 12 - Procedimento de embalagem de moluscos bivalves vivos de acordo com o recomendado pela UE



Fonte: (FONTANA, I., 2015).

Figura 13 - Exemplos de rótulos de embalagens de moluscos bivalves vivos de acordo com o recomendado pela UE



Fonte: A) (FONTANA, I., 2015); B) (PUCA, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREAS AMOSTRAIS

A localização dos parques e áreas aquícolas da costa de Santa Catarina foi fornecida pela Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira (CGSAP) do MPA e a das unidades hidrográficas foi obtida no site da mapoteca da Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) (EPAGRI/SDS, 2005). Com esses dados, foi possível desenvolver mapas para auxílio na definição de áreas amostrais. Foram definidas 24 unidades de acordo com a proximidade entre os cultivos, quantidade de áreas aquícolas licitadas e suas disposições em relação às respectivas unidades hidrográficas. Nas unidades hidrográficas mais extensas e com grande quantidade de cultivos, foram feitas subdivisões para garantir uma maior sensibilidade de detecção do sistema.

A localização dos pontos oficiais de coleta foi fornecida pela CIDASC e incluída nos mapas para ilustração das atividades atuais de monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas. Tais pontos foram definidos por oceanógrafos da região com base em dados de correntes oceânicas e dados meteorológicos.

3.2 TAMANHOS AMOSTRAIS

Quando as premissas de prevalência, sensibilidade e especificidade não são precisas e dependem da opinião, muitas vezes subjetivas, de especialistas, é possível estimar valores aproximados utilizando-se estatística Bayesiana por meio de programas, como o Bayesfreecalc (CORSIN et al., 2009).

Entretanto, para a realização deste trabalho, optou-se por estimar os valores de sensibilidade com base na comparação entre a concentração mínima de toxina detectável por cada teste, de acordo com o encontrado na literatura, e a concentração máxima permitida pela legislação (ponto de corte). Quando o limite mínimo de detecção era muito inferior ao ponto de corte, considerou-se a

sensibilidade quase perfeita (99%). Quando esta diferença era igual ou inferior a duas casas decimais, considerou-se valores de sensibilidade menores e quando ocorrências de falhas/interferências de detecção foram citadas na literatura para determinado teste diagnóstico, considerou-se que os valores de sensibilidade eram inferiores ou em torno de 90%. Para as toxinas diarréias, utilizou-se como referência os valores de AO e AZA, visto que seus limites máximos permitidos são mais críticos em relação aos limites mínimos detectáveis. Além disso, foram desenvolvidos cenários com simulações de diferentes prevalências (proporções de 2, 10 e $\geq 20\%$ de moluscos contaminados) e de sensibilidades diferentes para se observar a variação dos tamanhos amostrais.

Os cálculos de tamanho amostral foram feitos considerando o uso de amostras agrupadas (pools) e com o objetivo de se detectar a presença de biotoxinas em cada uma das áreas amostrais citadas anteriormente. Foi utilizado o programa Epitools, disponível online (SERGEANT, 2014), que considera a especificidade dos testes perfeita (100%) e um valor conhecido (ou estimado) de sensibilidade utilizando uma adaptação dos cálculos de Cowling, Gardner e Johnson (1999). Além da sensibilidade, são utilizados como input os valores do tamanho do pool amostral (moluscos por pool ou unidade amostral), sensibilidade de grupo desejada e prevalência estimada/simulada.

Utilizando-se estes valores de tamanho dos pools amostrais e uma sensibilidade de grupo desejada de 95%, foi possível obter a quantidade de pools necessários e seus respectivos tamanhos aproximados.

Além dos cálculos de tamanho amostral para diferentes cenários, realizou-se uma análise dos resultados de ocorrências do monitoramento realizado pela EPAGRI, nos anos de 2008 a 2011, e pela CIDASC, nos anos de 2012 a 2015, no qual foram coletadas amostras de água e de moluscos.

A planilha de dados do monitoramento completo foi obtida por meio da tabulação das informações presentes nos laudos oficiais disponibilizados nos sites da EPAGRI e da CIDASC e incluindo-se informações fornecidas pela CGSAP. Na análise da planilha inicialmente compilada, identificou-se 69 nomes de localidades amostradas pela EPAGRI e 74 pela CIDASC. Após o agrupamento de localidades por padronização dos nomes, obteve-se 52 nomes de localidades amostradas pela EPAGRI e 32 pela CIDASC, totalizando 56 nomes. Excluindo-se as localidades com

baixo número de repetições, obtiveram-se 35 nomes de localidades amostradas pela EPAGRI, 18 pela CIDASC e 39 no total. Exatamente 39 são os pontos oficiais de monitoramento de biotoxinas (coleta apenas de moluscos) de acordo com as informações fornecidas oficialmente, entretanto pela diferença dos nomes dos pontos não foi possível garantir que se tratavam dos mesmos pontos e não foi possível atribuir todos às coordenadas geográficas disponibilizadas. Além destes 39 pontos, existem também oito de monitoramento exclusivamente microbiológico, totalizando, portanto, 47 pontos oficiais, segundo as informações fornecidas pela CIDASC (informação pessoal)⁷. A definição de tais pontos foi iniciada em 2008 por oceanógrafos e não foram encontrados na literatura os critérios utilizados.

3.2.1 Definição dos cenários

Para a determinação de um tamanho amostral representativo das áreas de cultivo e para a detecção de ficotoxinas, calculou-se o número de pools amostrais a serem analisados laboratorialmente. Devido à incerteza em relação aos valores das sensibilidades de cada teste e de prevalência de cada biotoxina em moluscos, foram criados seis diferentes cenários com valores simulados para os casos de ocorrência de florações tóxicas.

Cenário 1 – Simulação com prevalência estimada de 2% e altas sensibilidades dos testes diagnósticos.

Neste cenário, considerou-se uma pequena proporção de moluscos contaminados para o caso de ocorrência de alguma floração tóxica. Esta situação se aplicaria, por exemplo, à localização do ponto de amostragem numa zona de corrente oceânica que não favorece a contaminação de grandes quantidades de moluscos ou à uma posição no cultivo no qual a chance dos moluscos estarem contaminados é menor devido ao recebimento de água já filtrada pelos outros

⁷ Sesterhenn, P. M. Amostragem de moluscos bivalves. Mensagem recebida por pedromansurs@gmail.com em 28 mai. 2014.

moluscos. Foram considerados também altos níveis de sensibilidade dos métodos de diagnóstico disponíveis e utilizados no LAQUA/Itajaí.

Os valores de sensibilidade utilizados para ASP, PSP, DSP (utilizando-se hepatopâncreas), DSP (tecido integral) e para o caso da utilização do método de detecção por HPLC-MS/MS foram: 98%, 90%, 95%, 93% e 99%, respectivamente.

Cenário 2 – Simulação com prevalência estimada de 2% e baixas sensibilidades dos testes diagnósticos.

Com a mesma prevalência estimada anteriormente, realizou-se os cálculos com valores de sensibilidade menores, o que representaria um pior cenário em relação ao desempenho dos métodos de diagnóstico. Os valores de sensibilidade utilizados para ASP, PSP, DSP (utilizando-se hepatopâncreas), DSP (tecido integral) e para o caso da utilização do método de detecção por HPLC-MS/MS foram: 90%, 80%, 85%, 83% e 90%, respectivamente.

Cenário 3 – Simulação com prevalência estimada de 10% e altos valores de sensibilidade dos testes diagnósticos.

Neste cenário, considerou-se uma proporção maior de moluscos contaminados, no caso de ocorrência de alguma floração tóxica. Esta situação representaria a localização dos pontos de amostragem em zonas que favoreceriam a contaminação de uma quantidade considerável de moluscos, incluindo a posição no cultivo que não estaria sujeita ao recebimento de água já filtrada por outros organismos filtradores. Os valores de sensibilidade utilizados para ASP, PSP, DSP (utilizando-se hepatopâncreas), DSP (tecido integral) e para o caso da utilização do método de detecção por HPLC-MS/MS foram: 98%, 90%, 95%, 93% e 99%, respectivamente.

Cenário 4 – Simulação com prevalência estimada de 10% e baixos valores de sensibilidade dos testes diagnósticos.

Com a mesma prevalência estimada anteriormente, realizou-se os cálculos com valores de sensibilidade menores, o que representaria um pior cenário em relação ao desempenho dos métodos de diagnóstico. Os valores de sensibilidade utilizados para ASP, PSP, DSP (utilizando-se hepatopâncreas), DSP (tecido integral)

e para o caso da utilização do método de detecção por HPLC-MS/MS foram: 90%, 80%, 85%, 83% e 90%, respectivamente.

Cenário 5 – Simulação com prevalência estimada maior ou igual a 20% e altos valores de sensibilidade dos testes diagnósticos.

Neste cenário, considerou-se uma grande proporção de moluscos contaminados, no caso de ocorrência de alguma floração tóxica. Os valores de sensibilidade utilizados para ASP, PSP, DSP (utilizando-se hepatopâncreas), DSP (tecido integral) e para o caso da utilização do método de detecção por HPLC-MS/MS foram: 98%, 90%, 95%, 93% e 99%, respectivamente.

Cenário 6 – Simulação com prevalência estimada maior ou igual a 20% e baixos valores de sensibilidade dos testes diagnósticos.

Com a mesma prevalência estimada anteriormente, realizou-se os cálculos com valores de sensibilidade menores. Os valores de sensibilidade utilizados para ASP, PSP, DSP (utilizando-se hepatopâncreas), DSP (tecido integral) e para o caso da utilização do método de detecção por HPLC-MS/MS foram: 90%, 80%, 85%, 83% e 90%, respectivamente.

3.3 ANÁLISES DAS OCORRÊNCIAS DE DSP E DE FITOPLÂNCTON TÓXICO

Inicialmente, realizou-se uma análise descritiva das ocorrências para cada grupo de biotoxina, agrupando-se todos os resultados semanais de monitoramento de cada ano. Calculou-se a proporção de pools positivos agrupados para cada ano, evidenciando-se o número total de coletas anuais realizadas para fins comparativos. Utilizando-se a distribuição binomial exata, por meio da função “binom.test” do pacote “stats” do Programa R, foi possível obter os intervalos de confiança de 95% para os resultados anuais de DSP. Em seguida, foram feitas as mesmas análises, porém por localidade e por área amostral. A distribuição beta foi utilizada para se verificar o intervalo com 95% de confiança da proporção de detecção.

Além da análise utilizando-se as localidades como variáveis qualitativas, foi possível realizar análises de clusters espaço-temporais, utilizando-se o software

SaTScan, dos dados de ocorrências de DSP. Os resultados das análises por localidade foram dispostos em tabelas, evidenciando-se o número de amostras positivas e analisadas para que fosse possível observar a variação entre eles. As análises de clusters foram feitas utilizando-se casos e controles de 31 localidades com coordenadas oficialmente fornecidas, 13 coordenadas atribuídas de acordo com o nome do local e utilizando-se o modelo probabilístico de Bernoulli para agrupamentos de tempo de 7 dias, 14 dias, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 1 ano. O modelo de Bernoulli foi utilizado pois a probabilidade de casos e controles ocorrerem era desconhecida. O menor agrupamentos de tempo (7 dias) foi definido de acordo com o intervalo semanal entre as amostragens definido pelo PNCMB. Os outros agrupamentos foram feitos de acordo com possíveis durações de florações tóxicas, considerando-se que estas podem durar meses, dependendo das condições ambientais (FLORIDA DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL PROTECTION, 2012).

Foram excluídas 12 localidades desta análise devido ao baixo número de repetições ou a não atribuição de coordenadas geográficas por incompatibilidades nas identificações das localidades. Para visualização da situação de ocorrências e dos clusters espaciais, foram elaborados mapas com as densidades de ocorrência detectadas utilizando-se a estimativa de densidade de Kernel com 5 km de raio por meio do software QGIS 2.12.2-Lyon. O uso do raio de 5 km permitiu uma boa visualização do gradiente de densidade sem que houvesse uma grande sobreposição de áreas. Além disso, é uma distância ainda considerada como próxima à costa (LANDRY; HICKEY, 1989) e de variação máxima de temperatura de superfície marinha, de acordo com um estudo realizado em Mumbai, Índia. Sendo os ambientes costeiros altamente influenciados pela temperatura, considerou-se esta distância para a análise visual dos mapas de calor (AZMI et al., 2015). Os resultados de clusters temporais foram apresentados em tabelas.

Sendo os resultados do monitoramento de fitoplâncton representados pela quantificação de células por litro de cada espécie de microalga tóxica, foram feitas análises dos quartis desses valores. Da mesma maneira que para os resultados de DSP, foram feitas análises de clusters espaço-temporais para a principal espécie de microalga produtora de toxinas diarreicas, a *D. acuminata*, utilizando-se o ponto de corte de 100 cél./L (FSA, 2014).

É importante lembrar que com o tamanho e critério amostral utilizado durante o monitoramento, não é possível determinar quão representativas foram estas amostras em relação às areias de cultivo. Portanto, neste trabalho, a determinação do parâmetro populacional de prevalência mais provável não foi realizada, optando-se por utilizar estimativas de proporção de pools positivos em simulações para a finalidade de cálculo de tamanho amostral. A análise dos dados do serviço oficial de monitoramento forneceu importantes informações sobre a situação da contaminação por biotoxinas na costa de SC e poderão dar diretrizes a um futuro sistema de vigilância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÁREAS AMOSTRAIS

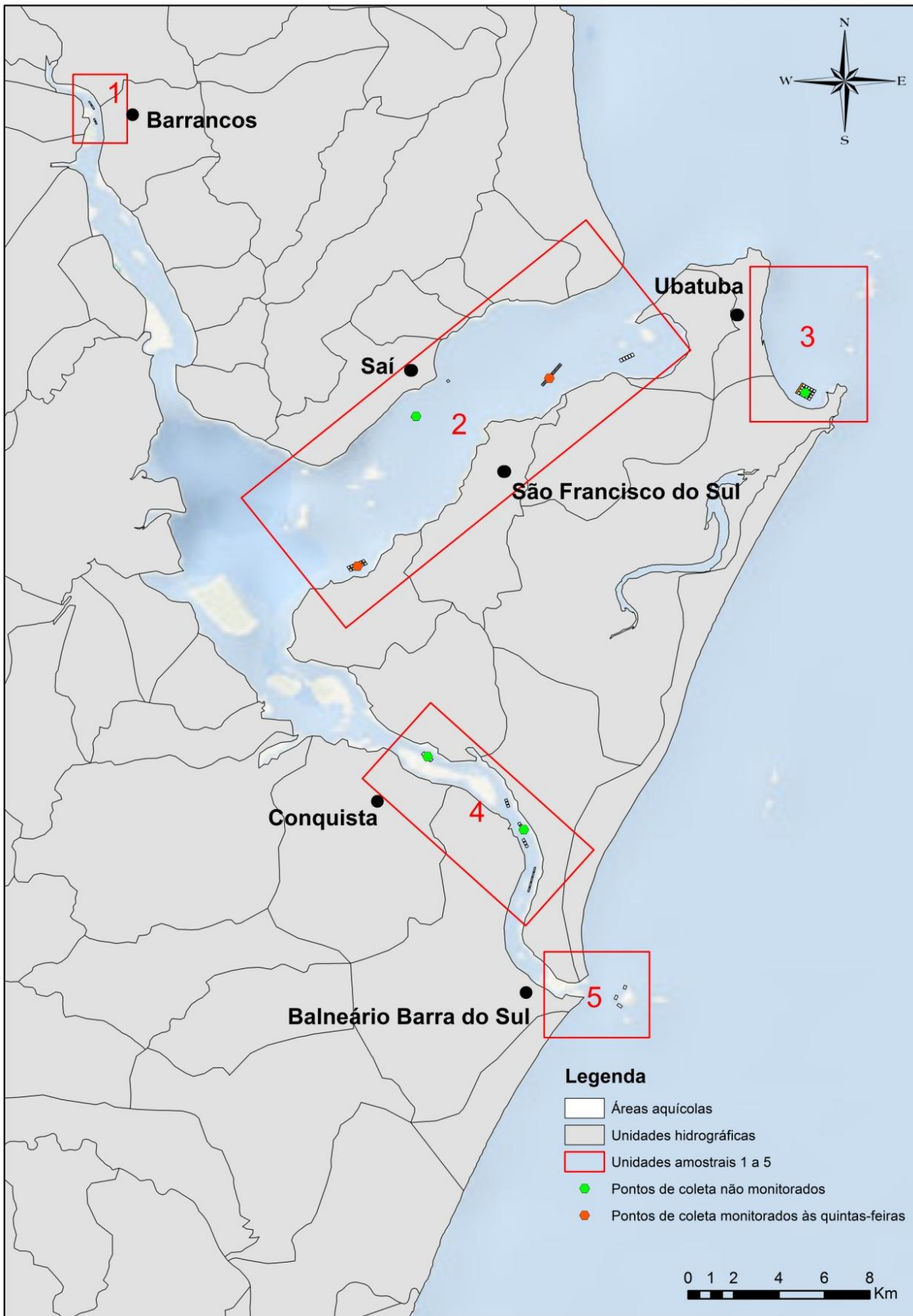
As 24 áreas amostrais propostas para o monitoramento estão ilustradas no Mapa 1. Os Mapas 2 a 7 ilustram as áreas amostrais com maior detalhamento espacial e incluem os 47 pontos oficiais de coleta do monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas. Destes, apenas 16 estão sendo realmente monitorados atualmente. Os outros pontos foram amostrados no período em que a Epagri era responsável pelo monitoramento ou no início das atividades de coleta coordenadas pela CIDASC. Observa-se que em 11 das áreas amostrais definidas neste trabalho, o monitoramento não está sendo feito no presente momento por questões operacionais, que incluem grandes distâncias, ou por ausência de cultivos de moluscos em áreas já licitadas.

Mapa 1 - Localização das 24 áreas amostrais determinadas para a detecção de biotoxinas em moluscos bivalves da costa de Santa Catarina



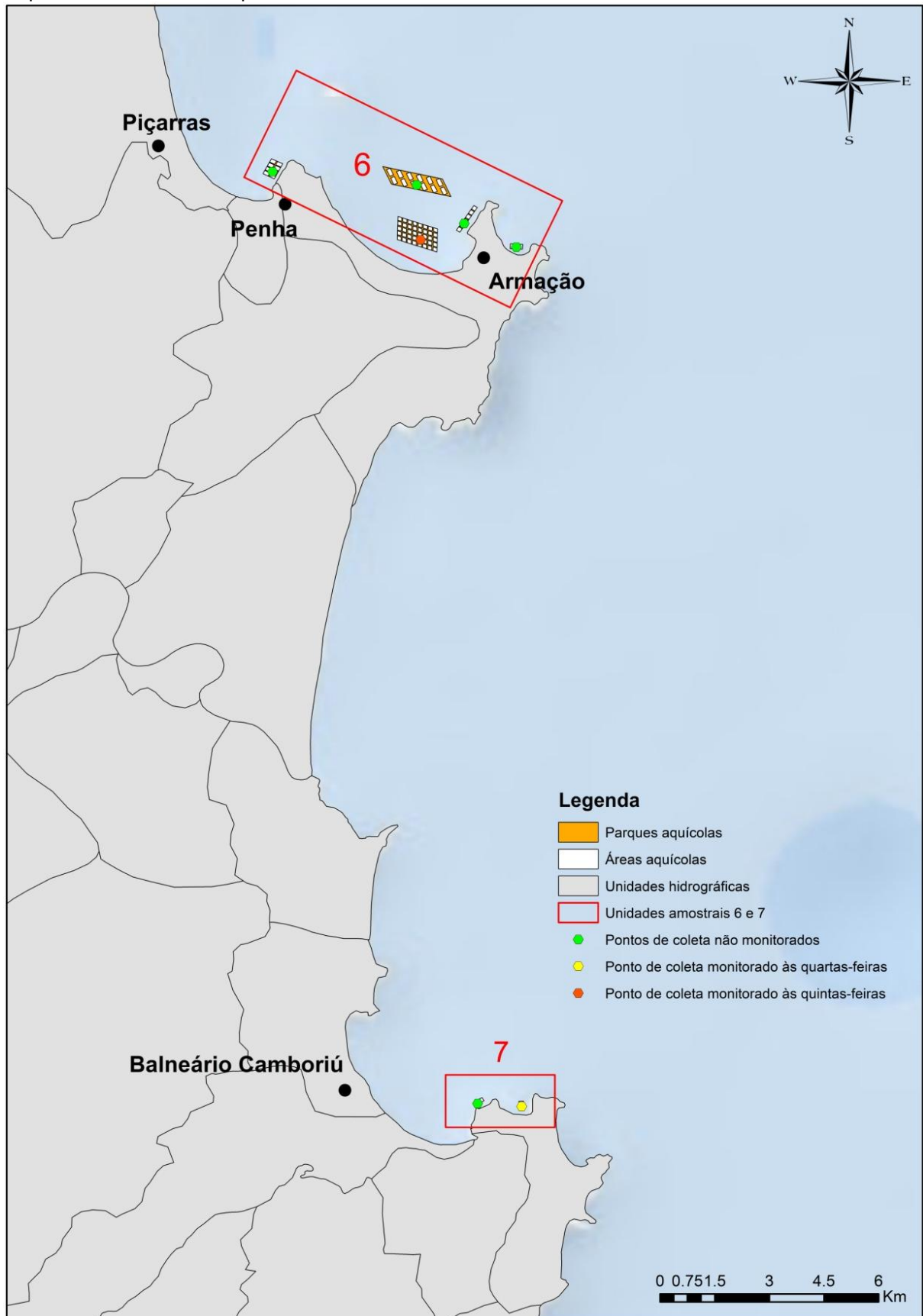
Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Mapa 2 - Detalhamento espacial das áreas amostrais de 1 a 5



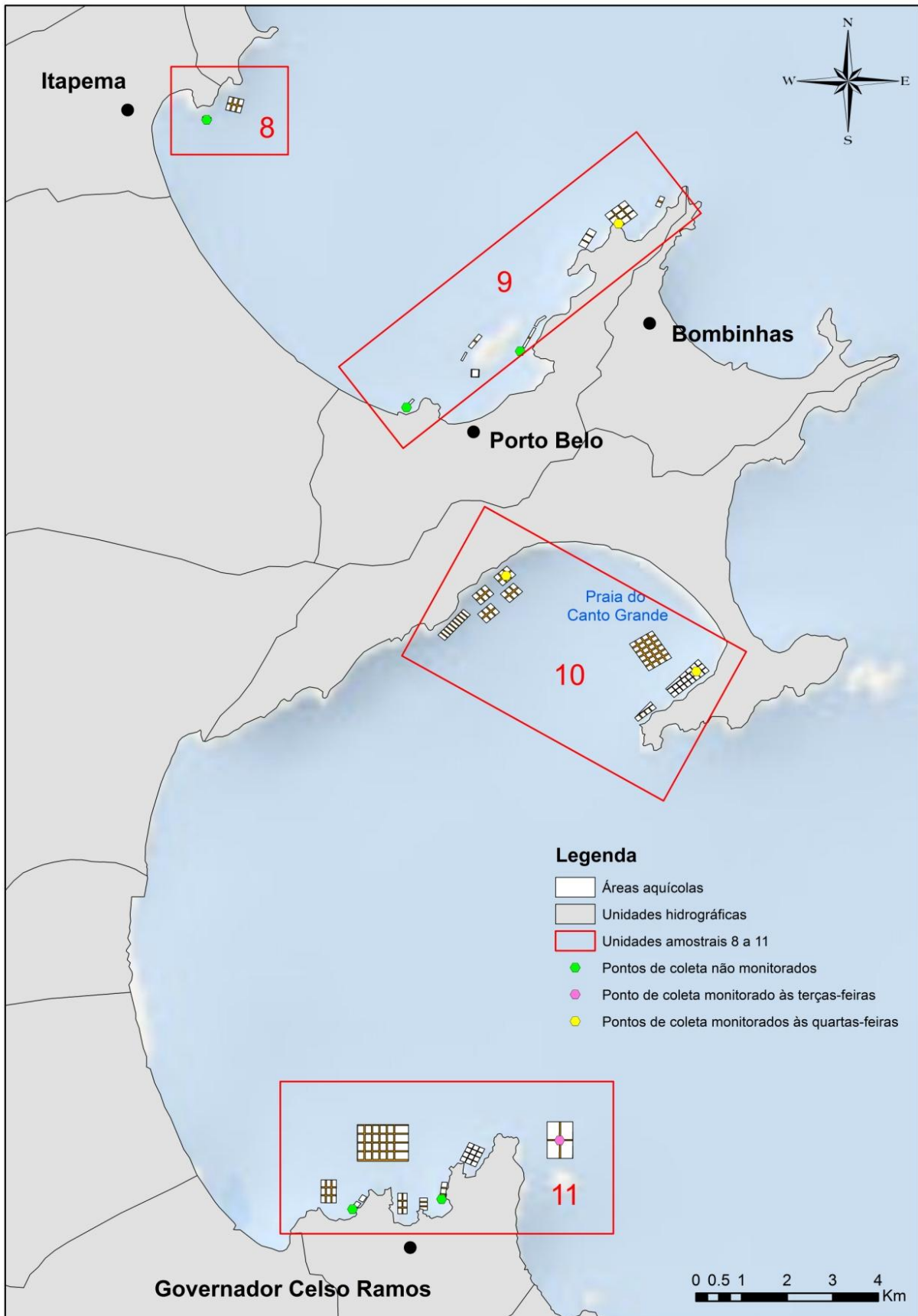
Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Mapa 3 - Detalhamento espacial das áreas amostrais 6 e 7



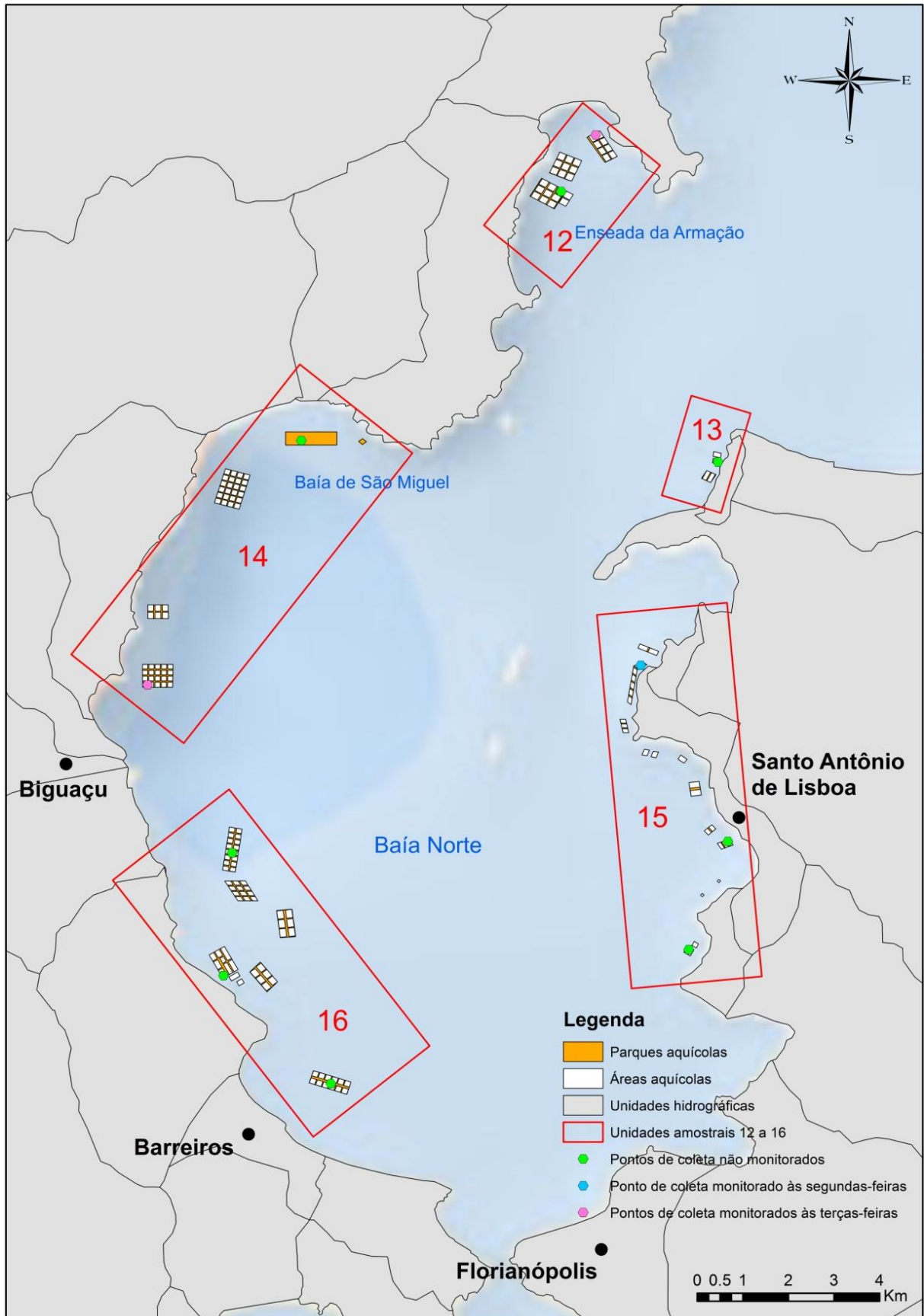
Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Mapa 4 - Detalhamento espacial das áreas amostrais de 8 a 11



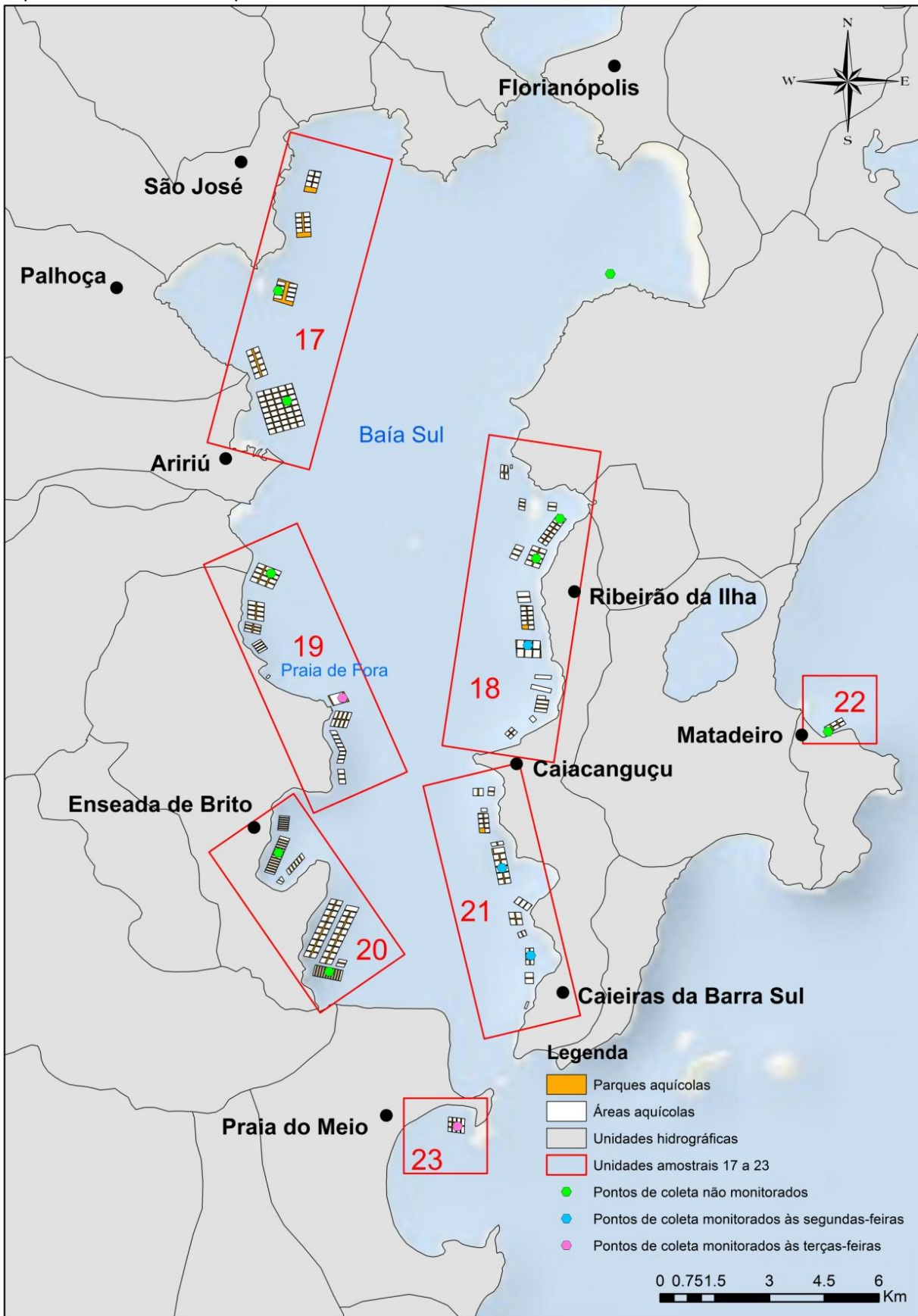
Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Mapa 5 - Detalhamento espacial das áreas amostrais de 12 a 16



Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Mapa 6 - Detalhamento espacial das áreas amostrais de 17 a 23



Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Mapa 7 - Detalhamento espacial da área amostral 24



Fonte: (FONTANA, I., 2016).

4.2. TAMANHO AMOSTRAL E ANÁLISE DOS CENÁRIOS

Considerando que 100 g de carne de molusco correspondam a entre 10 e 14 indivíduos (BRASIL, 2013), então as 150 g necessárias para realização do macerado para detecção de PSP correspondem a uma unidade amostral de aproximadamente 15 a 20 indivíduos. Segundo Schramm (2008), utiliza-se realmente uma quantidade mínima de 15 indivíduos para obtenção do referido macerado. Para a detecção de ASP, o macerado deve conter de 100 a 150 g de carne de molusco, o que seria correspondente a uma unidade amostral de aproximadamente 10 a 20 indivíduos.

Para a detecção de DSP, a recomendação laboratorial é a de que se use 25 g de um macerado contendo apenas o tecido do hepatopâncreas dos mexilhões, o que aumenta a sensibilidade da detecção (FAO, 2004b). Segundo Alves et al. (2013), o peso do hepatopâncreas, de mexilhões amostrados durante os

monitoramentos de 2011 em Santa Catarina, correspondeu, em média a 9% do peso total dos animais. Com base nesta porcentagem, é possível deduzir que 25 g de hepatopâncreas correspondem a uma unidade amostral de aproximadamente 30 a 40 mexilhões.

Utilizando-se como referência os dados dos tamanhos dos pools para a análise de cada grupo de biotoxinas de acordo com os diferentes métodos de detecção atualmente utilizados pelo Laboratório Oficial, LAQUA-Itajaí/SC (Quadro 3), é possível determinar os tamanhos amostrais para cada método. Os cálculos amostrais foram feitos considerando-se o uso de bioensaios e métodos de HPLC.

Quadro 3 - Número de mexilhões necessários em cada pool amostral para detecção de biotoxinas

Grupo de biotoxinas	Método de detecção	Tamanho dos pools amostrais
ASP	HPLC-DAD	10-20 (15)
PSP	Bioensaio	15-20 (18)
DSP	Bioensaio (hepatopâncreas)	30-40 (35)
DSP	Bioensaio (tecido integral)	15-20 (18)
ASP/PSP/DSP	LC-MS	10-20 (15)

Fonte: (LAQUA-ITAJAÍ/SC, 2014).

Com base nos valores médios de mexilhões, seria necessário coletar uma unidade amostral de aproximadamente 70 mexilhões para se realizar uma investigação de um pool amostral para cada síndrome de intoxicação, desconsiderando-se a utilização do método HPLC-MS/MS. Esta quantidade é compatível com o disposto no manual de coleta do PNCMB. Neste manual, definiu-se que são necessários 500 g de carne de moluscos para se fazer os diagnósticos laboratoriais para cada ponto de coleta e que este peso corresponderia a entre 50 e 70 mexilhões (BRASIL, 2013).

Entretanto, é importante realizar os cálculos de tamanho amostral para que se possa estabelecer a unidade amostral mais adequada para a detecção das biotoxinas. Os cenários com os tamanhos amostrais obtidos estão descritos nas tabelas 5 a 10.

Tabela 5 - Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões necessários para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 1

Grupo de biotoxinas	Sensibilidade estimada	No. de pools necessários	Tamanho amostral
ASP	98%	11x15 ou 2x100	165 – 200
PSP	90%	10x18 ou 2x100	180 – 200
DSP (hepatopâncreas)	95%	5x35 ou 2x100	175 – 200
DSP (tecido integral)	93%	9x18 ou 2x100	≅160 – 200
ASP/PSP/DSP (HPLC-MS/MS)	99%	11x15 ou 2x100	165 – 200

Tabela 6 - Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 2

Grupo de biotoxinas	Sensibilidade estimada	No. de pools necessários	Tamanho amostral
ASP	90%	12x15 ou 2x100	180 – 200
PSP	80%	11x18 ou 3x100	≅200 – 300
DSP (hepatopâncreas)	85%	6x35 ou 3x100	210 – 300
DSP (tecido integral)	83%	11x18 ou 3x100	198 – 300
ASP/PSP/DSP (HPLC-MS/MS)	90%	12x15 ou 2x100	180 – 200

Tabela 7 - Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 3

Grupo de biotoxinas	Sensibilidade estimada	No. de pools necessários	Tamanho amostral
ASP	98%	2x15 ou 1x40	30 – 40
PSP	90%	3x15 ou 2x20	40 – 45
DSP (hepatopâncreas)	95%	2x30	60
DSP (tecido integral)	93%	2x18	36
ASP/PSP/DSP (HPLC-MS/MS)	99%	2x15 ou 1x40	30 – 40

Tabela 8 - Sensibilidades estimadas, número de pools e número total de mexilhões para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP no cenário 4

Grupo de biotoxinas	Sensibilidade estimada	No. de pools necessários	Tamanho amostral
ASP	90%	3x15 ou 2x20	40 – 45
PSP	80%	3x15 ou 2x40	45 – 80
DSP (hepatopâncreas)	85%	3x15 ou 2x25	45 – 50
DSP (tecido integral)	83%	3x15 ou 2x30	45 – 60
ASP/PSP/DSP (HPLC-MS/MS)	90%	3x15 ou 2x20	40 – 45

Tabela 9 - Sensibilidades estimadas, número de pools e tamanhos das amostras para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP em mexilhões no cenário 5

Grupo de biotoxinas	Sensibilidade estimada	No. de pools necessários	Tamanho amostral
ASP	98%	2x10 ou 1x20	20
PSP	90%	2x15	30
DSP (hepatopâncreas)	95%	2x30	60
DSP (tecido integral)	93%	2x15	30
ASP/PSP/DSP (HPLC-MS/MS)	99%	1x15	15

Tabela 10 - Sensibilidades estimadas, número de pools e tamanhos das amostras para detecção de biotoxinas causadoras de ASP, PSP e DSP em mexilhões no cenário 6

Grupo de biotoxinas	Sensibilidade estimada	No. de pools necessários	Tamanho amostral
ASP	90%	2x10	20
PSP	80%	2x18	36
DSP (hepatopâncreas)	85%	2x30	60
DSP (tecido integral)	83%	2x15	30
ASP/PSP/DSP (HPLC-MS/MS)	90%	2x10	20

Comparando-se os diferentes cenários, é possível observar o quanto a prevalência estimada utilizada em cada simulação, com erro amostral pré-fixado, é capaz de influenciar o tamanho amostral necessário para se detectar as biotoxinas

em amostras de mexilhão. Tanto o cenário 1 quanto o 2 (Tabelas 5 e 6) representam as dificuldades de detecção quando se tem uma baixa prevalência da situação investigada, o que leva a necessidade de se obter um tamanho amostral maior. Com as premissas estabelecidas no cenário 3 (Tabela 7), seria possível detectar as biotoxinas em um número menor de pools amostrais de mexilhões.

Em relação aos cenários 4 e 6 (Tabelas 8 e 10), observa-se que mesmo utilizando-se baixos valores estimados de sensibilidade dos testes, o número de pools necessários para a detecção das biotoxinas seria igual a dois para cada teste diagnóstico.

A situação do cenário 5 (Tabela 9) não está muito distante da realidade se for considerado que os pontos de amostragem estão localizados onde existe a melhor chance de detecção. Um plano de amostragem de dois pools amostrais semanais para o monitoramento de DSP e PSP por meio de bioensaio seria adequado, para cada área amostral. Para o monitoramento de ASP ou quaisquer biotoxina utilizando-se os métodos de HPLC-DAD e HPLC-MS/MS, respectivamente, um pool amostral semanal seria suficiente.

O plano atual do PNCMB estabelece um esquema de análises semanais de um pool amostral para a detecção de cada grupo de biotoxinas em moluscos. Entretanto, com as informações disponíveis e testes diagnósticos oficialmente utilizados, no momento, é possível que este tamanho amostral não seja o mais adequado para a detecção de biotoxinas.

4.3 ANÁLISE DAS DETECÇÕES

4.3.1 Detecção de biotoxinas em moluscos

Os resultados de positividade dos pools amostrais em relação ao número de análises realizadas para DSP, PSP e ASP por ano estão descritos na Tabela 11. Observa-se que tanto para PSP, quanto para ASP não foram encontrados resultados positivos até o final do ano de 2015. A proporção total de detecção para DSP foi de 2,57%. É possível observar a ausência de um padrão de quantidade total

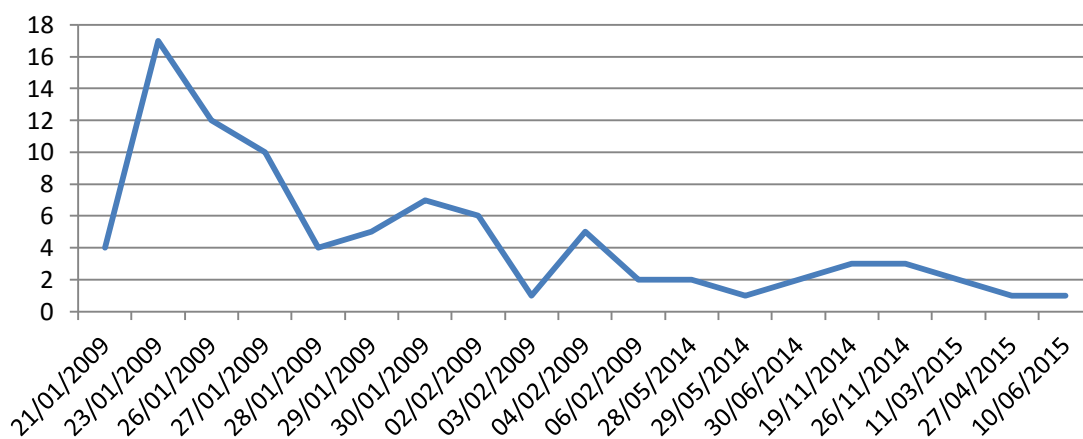
amostrada, o que pode representar um viés de seleção. Um número maior de amostras pode ter sido coletado onde haviam maiores suspeitas dos problemas. Isso limita a interpretação dos resultados finais.

Tabela 11 - Número de pools positivos em relação aos analisados anualmente para cada grupo de biotoxina marinha

Toxinas	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
DSP	0/15	11/63	15/85	3/18	5/30	1/31	34/51	18/56	87/3387
PSP	0/12	0/667	0/775	0/16	0/28	0/28	0/476	0/561	0/3229
ASP	0/6	0/772	0/570	0/6	0/17	0/14	0/478	0/561	0/2711

Dos 2711 pools amostrais analisados para ASP, em 89 (3,28%) foram detectadas ficotoxinas. Entretanto, nenhuma apresentou quantidades acima do limite de 20 mg/kg, estabelecido pela legislação brasileira e internacional. Por isso, os resultados foram considerados negativos. Os valores variaram de 0,01 a 4386 µg de equivalente de AD/kg, estando portanto, bem abaixo do limite máximo permitido. Destas amostras, 58/2413 foram de mexilhão, 27/286 de ostras, 1/5 de berbigão e 1/1 de craca (*Thoracica sp.*), sendo os dois últimos coletados com a finalidade experimental e não de monitoramento. Os registros de presença de toxinas ASP se concentraram no início de 2009, em maio, junho e novembro de 2014 e em março, abril e junho de 2015, como mostra o Gráfico 5.

Gráfico 5 - Quantidade de localidades onde foram detectadas toxinas ASP ao longo do tempo



As proporções de detecção para DSP por cada ano de monitoramento estão descritas na Tabela 12. Pode-se inferir que no ano de 2014, a proporção foi superior

às proporções de 2008, 2010, 2012, 2013 e do período total. Entretanto, houve sobreposição de intervalos de confiança em relação a 2009, 2011 e 2015.

Tabela 12 - Proporção de detecção anual de moluscos contaminados por toxinas causadoras de DSP e os respectivos intervalos de confiança de 95%

Ano	DSP (%)	IC 95%
2008	0,00	0,00 – 0,22
2009	2,56	0,06 – 13,47
2010	1,76	0,99 – 2,88
2011	1,60	0,33 – 4,59
2012	1,64	0,53 – 3,79
2013	0,32	0,00 – 1,74
2014	6,59	4,06 – 9,06
2015	3,21	1,91 – 5,02
Total	2,76	2,18 – 3,43

As 52 localidades monitoradas pela EPAGRI (2008 e 2011), as 32 localidades monitoradas pela CIDASC (2012 a 2015) e os respectivos resultados de positividade para DSP nas amostras de molusco em relação ao número de análises estão descritas nas Tabela 13 e Tabela 14, respectivamente.

Tabela 13 - Proporção de detecção de DSP em amostras de moluscos por localidade entre os anos de 2008 e 2011

Localidades	Positivos	Analisados	Prop. Det. (%)	(continua)	
				IC 95%	
Araçá	0	33	0,00	0 – 10,57	
Armação de Fora	0	8	0,00	0 – 36,94	
Armação do Itapocorói	0	64	0,00	0 – 05,60	
Atlântico Sul	0	15	0,00	0 – 21,80	
Barra do Aririú	1	43	2,33	0,05 – 12,29	
Barra do Sul	0	15	0,00	0 – 21,80	
Barreiros	0	34	0,00	0 – 10,28	
Barro Vermelho	0	43	0,00	0 – 8,22	
Cabras	-	-	-	-	
Cacupé	0	35	0,00	0 – 10,00	
Caieira da Barra do Sul	0	69	0,00	0 – 5,20	
Calheiros	0	35	0,00	0 – 10,00	
Canal do Linguado	1	16	6,25	0,16 – 30,23	
Canto da Praia	0	34	0,00	0 – 10,28	
Canto dos Ganchos	1	35	2,86	0,07 – 14,92	
Canto Grande	0	67	0,00	0 – 5,35	
Capri	0	22	0,00	0 – 15,43	
Cavalo Marinho	0	1	0,00	0 – 97,5	
Coroa de Santa Maria	-	-	-	-	

Localidades	Positivos	Analisados	Prop. Det. (%)	(conclusão)
				IC 95%
Costeira do Ribeirão	0	63	0,00	0 – 5,68
Enseada	0	19	0,00	0 – 17,64
Enseada do Brito	1	55	1,82	0,04 – 9,72
Estaleiro	7	50	14,00	5,82 – 26,74
Farol de Santa Marta	0	2	0,00	0 – 84,19
Fazenda da Armação	1	60	1,67	0,04 – 8,94
Fazenda Santana	0	1	0,00	0 – 97,5
Freguesia do Ribeirão	0	65	0,00	0 – 5,51
Ganchos de Fora	1	63	1,59	0,04 – 8,53
Ilha João da Cunha	0	32	0,00	0 – 10,88
Itapema	-	-	-	-
Lagoa Camacho	-	-	-	-
Laranjeiras	0	60	0,00	0 – 5,96
Laranjeiras Balneário	0	5	0,00	0 – 5,22
Passagem do Maciambú	0	34	0,00	0 – 10,28
Paulas	6	60	10,00	3,76 – 20,50
Perequê	0	33	0,00	0 – 10,57
Ponta de Baixo	0	38	0,00	0 – 9,25
Ponta do Papagaio	0	67	0,00	0 – 5,35
Porto Belo	0	1	0,00	0 – 97,5
Praia Alegre	3	41	7,32	1,53 – 19,92
Praia das Canasvieiras	-	-	-	-
Praia de Baixo	0	1	0,00	0 – 97,5
Praia de São Miguel	0	29	0,00	0 – 11,94
Praia do Cedro	1	56	1,79	0,04 – 9,55
Praia do Forte	0	43	0,00	0 – 8,22
Praia do Pontal	4	45	8,89	2,47 – 21,22
Praia dos Ingleses	-	-	-	-
Sambaqui	0	41	0,00	0 – 8,60
Santo Antônio	0	47	0,00	0 – 7,55
Serraria	0	42	0,00	0 – 8,40
Tijuquinhas	0	23	0,00	0 – 14,82
Zimbros	2	44	4,55	0,55 – 15,47
Total	29	1689	1,72	1,15 – 2,45

Observa-se que praticamente todos os intervalos de confiança da Tabela 13 se sobrepõem, portanto, não é possível indicar as localidades onde a probabilidade de detecção poderia ter sido superior com base nesta análise. É possível dizer que durante o período monitorado pela EPAGRI, a proporção de moluscos contaminados com DSP foi maior em Estaleiro quando comparado à Armação do Itapocorói, Caieira da Barra do Sul, Canto Grande, Costeira do Ribeirão, Freguesia do Ribeirão,

Laranjeiras Balneário, Ponta do Papagaio e também em relação à proporção total, que foi de 1,72%, com intervalo de confiança chegando a 2,45%.

Tabela 14 - Proporção de detecção de DSP em amostras de moluscos por localidade nos anos de 2012 a 2015

Localidades	Positivos	Analisados	Prop. Det. (%)	IC 95%
Armação de Fora	1	30	3,33	0,08 – 17,21
Armação do Itapocorói	2	99	2,02	0,24 – 7,10
Barra do Aririú	0	26	0,00	0 – 13,22
Barro Vermelho	0	27	0,00	0 – 12,77
Caieira da Barra do Sul	3	110	2,73	0,56 – 7,76
Calheiros	1	7	14,29	0,36 – 57,87
Canal do Linguado	2	10	20,00	2,52 – 55,61
Canto Grande	3	92	3,26	0,67 – 9,23
Costeira do Pirajubaé	0	2	0,00	0 – 84,18
Costeira do Ribeirão	0	105	0,00	0 – 3,45
Enseada do Brito	0	25	0,00	0 – 13,72
Enseada SFS	0	3	0,00	0 – 70,76
Fazenda da Armação	0	73	0,00	0 – 4,92
Freguesia do Ribeirão	1	109	0,92	0,02 – 5,00
Ganchos de Fora	7	94	7,45	3,04 – 14,74
Ganchos do Meio	3	21	14,29	3,04 – 36,34
Lagoa Camacho	0	1	0,00	0 – 97,5
Laranjeiras	0	79	0,00	0 – 4,56
Laranjeiras Balneário	5	52	9,62	3,20 – 21,03
Paulas	2	98	2,04	0,25 – 7,18
Ponta do Papagaio	6	109	5,50	2,04 – 11,60
Porto Belo	7	71	9,86	4,05 – 19,26
Praia Alegre	2	23	8,70	1,07 – 28,03
Praia de São Miguel	1	82	1,22	0,03 – 6,61
Praia do Cedro	1	105	0,95	0,02 – 5,20
Praia do Forte	0	28	0,00	0 – 12,34
Praia do Pontal	0	5	0,00	0 – 52,18
Sambaqui	1	67	1,49	0,03 – 8,03
Santo Antônio	2	32	6,25	0,76 – 20,8
Serraria	0	21	0,00	0 – 16,10
Tapera	0	1	0,00	0 – 97,5
Zimbros	8	91	8,79	3,87 – 16,60
Total	58	1698	3,42	2,60 – 4,40

Analisando-se a Tabela 14, é possível observar que as localidades de Porto Belo e Zimbros apresentaram proporções de detecção de DSP em moluscos maiores que a de Costeira do Ribeirão, durante a investigação feita entre 2012 e 2015.

Observado-se os números de amostras analisadas das Tabelas 13 e 14, é possível verificar a ausência de uma padronização no esquema de amostragem das diferentes localidades. Este representa um dos grandes gargalos do monitoramento, pois compromete a análise de dados e, conseqüentemente, a estruturação de estratégias para a vigilância.

Agrupando-se as localidades de acordo com as áreas amostrais anteriormente sugeridas, temos os resultados de proporção de detecção descritos na Tabela 15. Esta informação pode ser importante para que estratégias no plano de amostragem possam ser melhoradas, já que as condições ambientais e, conseqüentemente, as situações epidemiológicas entre tais áreas provavelmente são diferentes. A área 25 foi incluída devido à presença de resultados nos bancos de dados de 2008-2011 relativos à esta localidade (Farol de Santa Marta). Entretanto, de acordo com os dados fornecidos pelo CGSAP, não existem áreas aquícolas licitadas nesta localização e por isso a área não foi incluída nos mapas anteriores relativos à proposta de criação de áreas de amostragem.

Tabela 15 - Proporção de detecção de DSP em amostras de moluscos por área amostral sugerida

Área	Positivos	Analisados	Prop. Det. (%)	(continua)
				IC 95%
Área 01	0	0	0,00	-
Área 02	8	319	2,51	1,09 – 4,90
Área 03	0	3	0,00	0 – 70,76
Área 04	3	26	11,54	0 – 13,22
Área 05	0	0	0,00	-
Área 06	8	265	3,02	1,31 – 5,86
Área 07	5	87	5,75	1,90 – 12,90
Área 08	0	34	0,00	0 – 10,28
Área 09	14	220	6,36	3,52 – 10,44
Área 10	14	294	4,76	2,62 – 7,86
Área 11	12	255	4,71	2,45 – 8,07
Área 12	1	133	0,75	0,02 – 4,12
Área 13	0	71	0,00	0 – 5,06
Área 14	1	135	0,74	0,02 – 4,06
Área 15	3	222	1,35	0,28 – 3,90
Área 16	0	97	0,00	0 – 3,73
Área 17	1	107	0,93	0,02 – 5,09
Área 18	1	244	0,41	0,01 – 2,26
Área 19	6	211	2,84	1,05 – 6,08
Área 20	1	115	0,87	0,02 – 4,75
Área 21	3	348	0,86	0,18 – 2,50
Área 22	0	0	0,00	-

Área	Positivos	Analisados	Prop. Det. (%)	(conclusão)
				IC 95%
Área 23	6	176	3,41	1,26 – 7,27
Área 24	0	1	0,00	0 – 97,5
Área 25	0	2	0,00	0 – 84,2
Total	87	3365	2,59	2,07 – 3,18

A quantidade total de pools analisados para DSP da Tabela 11 (3387) difere do total da Tabela 15 (3365) porque 22 coletas não possuíam informações de georreferenciamento e não puderam ser categorizadas de acordo com as áreas amostrais.

Utilizando-se a distribuição beta com os dados de positividade de todos os anos de monitoramento, foi possível verificar que existe 95% de probabilidade de a contaminação por DSP estar entre 2,08% e 3,16% dos pools amostrados, sendo o valor mais provável o de 2,57%. Os resultados diferem-se ligeiramente dos da Tabela 12, pois estes foram calculados utilizando-se a distribuição binomial exata.

Para PSP e ASP, as proporções foram iguais à zero. Entretanto, utilizando-se a mesma distribuição, é possível dizer que caso tais toxinas estivessem presentes nos moluscos, elas estariam presentes em menos de 0,11% e 0,13% dos pools coletados, respectivamente, numa probabilidade de 95%.

4.3.2 Ocorrência de fitoplâncton tóxico

Analisando-se os dados de microalgas do gênero *Dinophysis*, é possível identificar a variação da concentração de células por litro de amostra de água (Tabela 16).

Tabela 16 - Quartis das concentrações (cel./L) de diferentes espécies do gênero *Dinophysis* identificadas durante o monitoramento em SC

Dinophysis	Min	25%	50%	75%	Max
<i>D. acuminata</i>	0	0	0	100	52300
<i>D. caudata</i>	0	0	0	0	1650
<i>D. tripos</i>	0	0	0	0	150
<i>D. scrobiculata</i>	0	0	0	0	250
<i>D. rotundata</i>	0	0	0	0	100
<i>D. bibulbus</i>	0	0	0	0	666
<i>D. fortii</i>	0	0	0	0	200
<i>D. exigua</i>	0	0	0	0	50
<i>D. mitra</i>	0	0	0	0	0,01
<i>D. operculoides</i>	0	0	0	0	200
Total	0	0	0	100	52300

Observa-se que o terceiro quartil (50-75%) corresponde ao valor de 100 cel./L tanto para *D. acuminata*, quanto para *Dinophysis* sp. Este valor é compatível com o recomendado pelo programa de monitoramento de fitoplâncton tóxico do Reino Unido como sendo uma concentração de alerta em relação ao gênero citado. Utilizando-se este valor como ponto de corte para classificar os resultados de contagem de microalgas em positivos e negativos, obtém-se uma proporção de 27% de positividade (984/3634) com intervalo de confiança de 95% de 25,64 a 28,55%. A discrepância entre os resultados de proporção de positivos em amostras de moluscos e em amostras de água mostra que o ponto de corte de 100 cel./L torna a sensibilidade do monitoramento extremamente alta e é por esse motivo que deve ser interpretado como um nível de alerta para auxílio nas tomadas de decisões e não como resultado oficial de contaminação.

Em relação às microalgas do gênero *Pseudo-nitzschia*, foram analisadas as concentrações de cél./L de amostra de água e os resultados dos quartis dispostos na Tabela 17. Segundo as referências do monitoramento de fitoplâncton realizado no Reino Unido, o ponto de corte para determinação de alerta para ocorrência de microalgas deste gênero é de 150.000 cél./L (FSA, 2014). Observa-se que no monitoramento realizado em SC, o valor máximo encontrado ficou bem abaixo deste valor estabelecido.

Tabela 17 - Quartis das concentrações de *Pseudo-nitzschia* spp. do monitoramento de fitoplâncton

Quartis	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
Valor mínimo	1,60
1º quartil	645,25
2º quartil	2.573,01
3º quartil	17.162,37
Valor máximo	22.534,28

Concentrações maiores do que 0 cél./L de *Gymnodinium catenatum* são suficiente para que se acione um nível de alerta (FSA, 2014). Das 3650 amostras de água analisadas durante todo o monitoramento de fitoplâncton, 15 (0,41%) apresentaram concentrações superiores a 0, variando de 0,01 a 1300, com uma média de 386 cél./L. Estes resultados foram identificados em várias localizações diferentes sem uma tendência aparente.

Tanto as baixas concentrações de *Pseudo-nitzschia*, quanto a baixa ocorrência de *G. catenatum* são compatíveis com a negatividade dos resultados para presença de ASP e PSP nas amostras de moluscos.

4.4 ANÁLISES DE CLUSTERS ESPAÇO-TEMPORAIS

4.4.1 Moluscos

A análise espaço-temporal relativa aos resultados laboratoriais de DSP identificou um cluster com significância estatística ($p < 0,01$) para vários agrupamentos temporais diferentes. O cluster encontrado para agrupamentos tanto de um ano, quanto de seis meses incluiu 13 localidades, sendo elas: Perequê, Ilha João da Cunha, Porto Belo, Praia do Araçá, Zimbros, Estaleiro, Canto da Praia, Canto Grande, Ganchos de Fora, Ganchos do Meio, Canto dos Ganchos, Calheiros e Praia das Laranjeiras (Balneário Camboriú).

Para os agrupamentos temporais de três meses, um mês, 14 dias e 7 dias, o cluster espacial ($p < 0,01$) obtido compreendeu uma área com 21 localidades, sendo elas: Armação de Fora, Armação do Itapocorói, Praia Alegre, Atlântico Sul, Barra do

Sul, Praia das Laranjeiras, Canto da Praia, Estaleiro, Praia do Araçá, Ilha João da Cunha, Porto Belo, Perequê, Canal do Linguado, Zimbros, Canto Grande, Laranjeiras, Ganchos de Fora, Canto dos Ganchos, Ganchos do Meio, Calheiros e Paulas.

Os períodos dos clusters temporais, os riscos relativos e as proporções de pools positivos de cada um dos agrupamentos estão descritos na Tabela 18. Observa-se que o segundo semestre de 2014 está presente em todos os clusters temporais e corresponde ao maior risco relativo, identificado também para um período de 7 dias. Portanto, este foi o período de maior chance de detecção de ficotoxinas DSP em amostras de moluscos de todo o monitoramento.

Tabela 18 - Clusters de ocorrência de DSP obtidos de diferentes agrupamentos temporais e seus respectivos riscos relativos e proporções de pools positivos

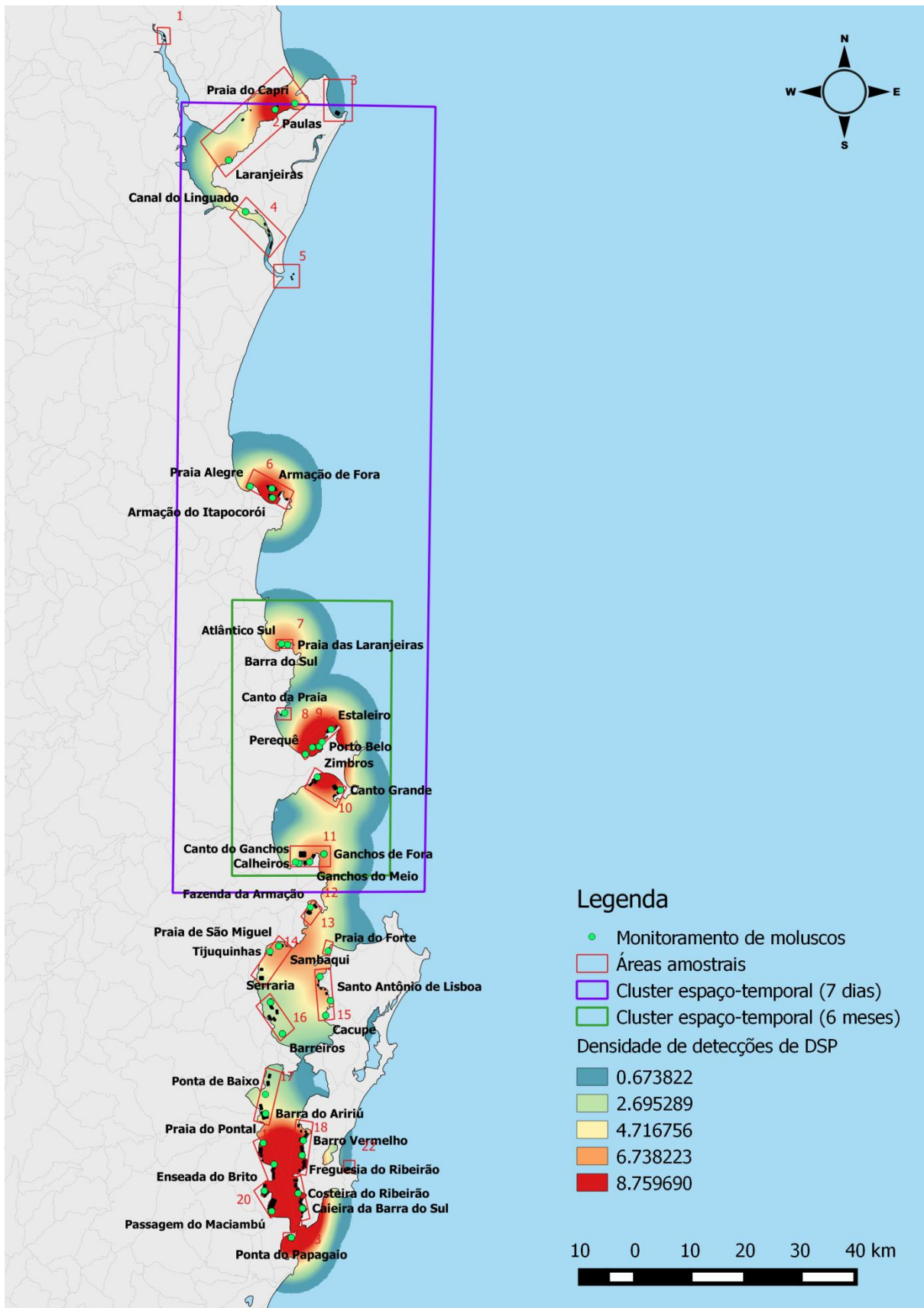
Agrupamento temporal	Cluster temporal	Risco relativo	Proporção de pools positivos
1 ano	01/01/2014 – 31/12/2015	6,97	12% (34/283)
6 meses	01/07/2014 – 30/06/2015	11,40	19% (34/179)
3 meses	01/07/2014 – 31/03/2015	10,96	16,5% (40/242)
1 mês	01/08/2014 – 31/01/2015	14,61	22% (39/177)
14 dias	01/08/2014 – 20/01/2015	14,61	22% (39/177)
7 dias	08/08/2014 – 22/01/2015	15,53	23,3% (39/167)

O Mapa 8 ilustra as densidades de ocorrências detectadas de DSP em toda a zona monitorada da costa de SC, as áreas amostrais sugeridas e os dois clusters espaço-temporais encontrados para diferentes agrupamentos temporais. A região da Lagoa Camacho, correspondente à Área 24 da proposta de áreas de amostragem não foi incluída neste mapa por estar sendo monitorada apenas para ocorrência de fitoplâncton tóxico (amostras de água). O cluster espaço-temporal de sete dias (igual ao de três meses) inclui as áreas amostrais 2, 4 e de 6 a 11 e o cluster de seis meses (igual ao de um ano), as áreas 7 a 11.

4.4.2 Fitoplâncton tóxico

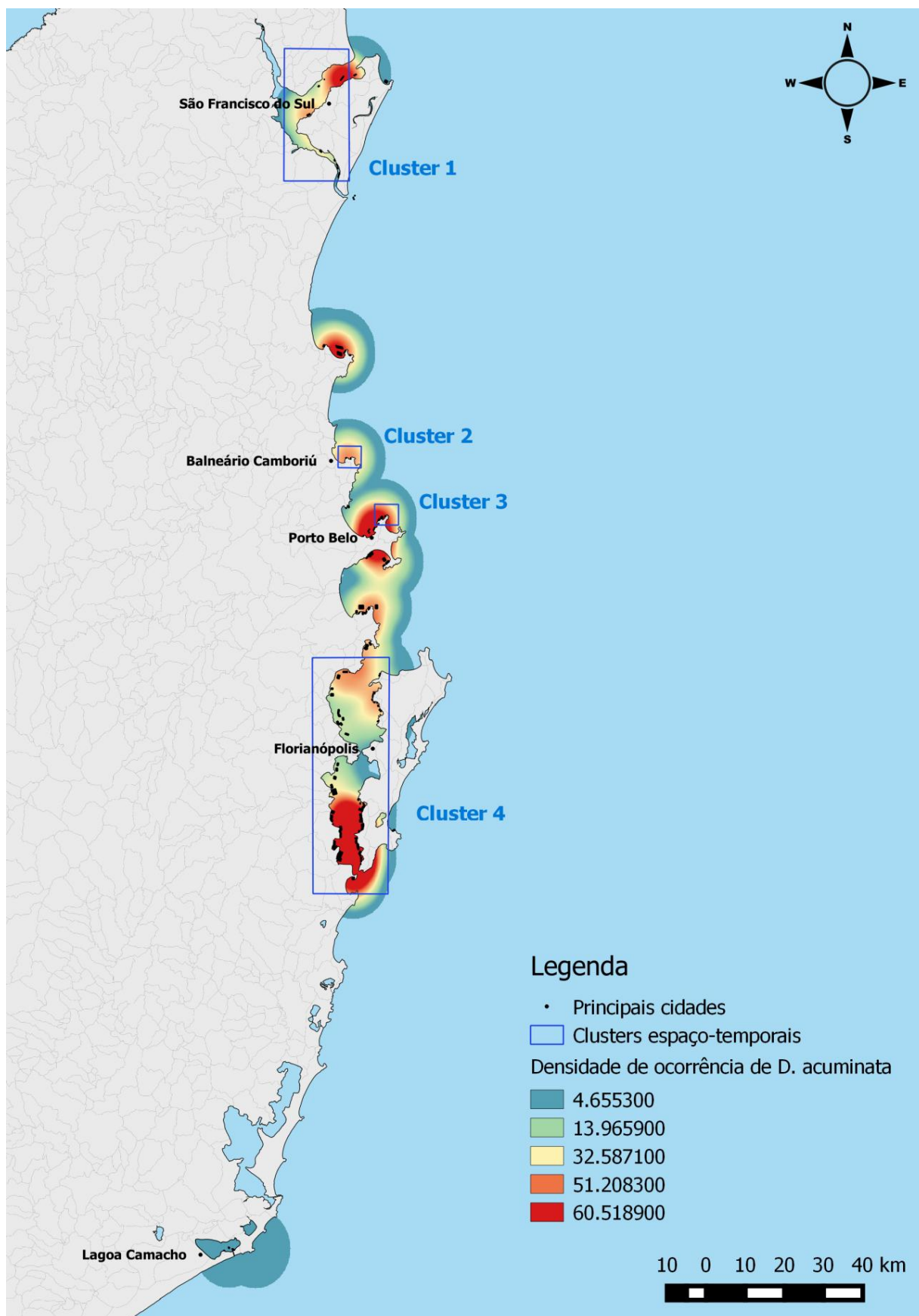
Utilizando-se o mesmo método de análise espaço-temporal, foi possível identificar clusters para diferentes agrupamentos temporais para as espécies mais importantes de microalgas tóxicas. Para o agrupamento temporal de um ano de ocorrências de *D. acuminata* com concentração igual ou superior a 100 cel./L, obteve-se quatro clusters estatisticamente significativos ($p < 0,01$), sendo eles: cluster 1 – Canal do Linguado, Laranjeiras e Paulas; cluster 2 – Atlântico Sul; cluster 3 – Estaleiro; cluster 4 – Barra do Aririú, Ponta de Baixo, Praia do Pontal, Barro Vermelho, Praia do Cedro, Freguesia do Ribeirão, Enseada do Brito, Barreiros, Costeira do Ribeirão, Passagem do Maciambú, Caieira da Barra do Sul, Serraria, Cacupé, Ponta do Papagaio, Santo Antônio, Sambaqui, Tijuquinhas e Praia de São Miguel. O Mapa 9 ilustra a densidade de ocorrências detectadas e os clusters espaciais encontrados.

Mapa 8 - Mapa de densidade de ocorrências de DSP em moluscos, áreas amostrais sugeridas e os clusters espaço-temporais de 6 meses e 7 dias de agrupamento



Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Mapa 9 - Densidade de ocorrências detectadas de *D. acuminata* (>100 cel./L) e os clusters espaço-temporais encontrados



Fonte: (FONTANA, I., 2016).

Os períodos dos clusters temporais e os riscos relativos de cada um dos agrupamentos estão descritos na Tabela 19. Observa-se que tanto para o agrupamento de 1 ano, quanto para o de 6 meses, foram obtidos quatro clusters espaço-temporais. Aqueles com maiores riscos relativos foram os clusters 2 e 3, correspondentes aos pontos do Atlântico Sul e Estaleiro, respectivamente. Estes últimos coincidem com os clusters espaciais encontrados no monitoramento de moluscos e, por isso, poderiam receber atenção especial. Para os agrupamentos de 3 meses, 1 mês, 14 dias e 7 dias, apenas dois clusters foram encontrados e com as localidades compatíveis aos clusters 1 e 4 do Mapa 9. Observa-se que os resultados temporais do cluster 1 tendem a incluir o período de abril e maio de 2010 ao início de 2013, o cluster 2, de julho de 2008 à junho de 2009, o cluster 3 apresenta um pequeno período de interseção, que corresponde ao final de 2009 e o cluster 4 apresenta uma tendência a concentrar-se entre o início e o fim de 2009 com um período de interseção que vai de maio a agosto.

Tabela 19 - Clusters temporais de ocorrência de DSP obtidos de diferentes agrupamentos e seus respectivos riscos relativos

Clusters	1 ano	6 meses	3 meses	1 mês	14 dias	7 dias
Cluster 1	2009 – 2012	07/2009 – 06/2013	04/2010 – 12/2013	05/2010 – 04/2013	30/04/2010 – 25/04/2013	01/05/2009 – 17/09/2009
RR 1	1,98	2,12	2,33	2,44	2,44	2,58
Cluster 2	2008 – 2009	07/2008 – 06/2009	-	-	-	-
RR 2	2,71	2,71	-	-	-	-
Cluster 3	2009	07/2009 – 12/2010	-	-	-	-
RR 3	2,48	2,63	-	-	-	-
Cluster 4	2009	2009	04/2009 – 09/2009	05/2009 – 08/2009	01/05/2009 – 17/09/2009	09/04/2010 – 18/04/2013
RR 4	1,61	1,61	2,34	2,62	2,58	2,42

4.5 RECOMENDAÇÕES PARA O SISTEMA DE VIGILÂNCIA

4.5.1 Otimização do banco de dados

As dificuldades na etapa de elaboração dos bancos de dados consistiram inicialmente na identificação dos pontos de monitoramento efetivo, pois tanto os laudos emitidos pelos laboratórios quanto outras informações fornecidas utilizaram a identificação dos pontos de coleta na forma de nomes das localidades, suas variações e diferentes siglas ou códigos sem padronização. Isso resulta num número maior de localidades no banco de dados do que de fato oficialmente monitoradas. Muitos dos nomes de localidades descritos nos laudos não coincidem com os nomes fornecidos oficialmente. Além disso, os laudos não dispunham de coordenadas geográficas para que se pudesse conferir espacialmente as localizações. Alguns dos pontos classificados como oficiais não constavam nos laudos emitidos e vice-versa.

Além da padronização, é importante que várias outras informações sejam incluídas nos formulários de preenchimento para enriquecer análises e interpretações futuras. Um modelo de planilha encontra-se disponível no Apêndice A.

4.5.2 Considerações sobre o plano de amostragem

Recomenda-se que seja feita uma amostragem de frequência semanal em cada uma das 24 áreas ilustradas no Mapa 1, caso estejam em fase produtiva, utilizando-se os 39 pontos de coleta de moluscos de forma rotativa para que se componha o banco de dados com um número de repetições suficiente e equilibrado entre as áreas para as análises.

Este trabalho possui limitações devido às características dos bancos de dados. Algumas localidades foram mais intensamente amostradas do que outras, o que pode condicionar a classificação de algumas áreas como de risco mais alto.

Entretanto, a análise espaço-temporal realizada leva em consideração estas diferenças entre tamanhos amostrais e permite que clusters estatisticamente significativos e seus respectivos valores de risco relativo sejam identificados. Com base nisso, podemos indicar áreas de maior risco para ocorrência de DSP.

As áreas 2, 4 e de 6 a 11 ou, pelo menos, as de 7 a 11 deveriam receber atenção especial, instituindo-se dois ou mais pontos de coleta de moluscos e de monitoramento de fitoplâncton e instituindo-se a utilização imediata de pontos secundários de investigação em caso de alerta. A informação de dados oriundos de pontos secundários deve ser indicada no banco de dados.

Considerando que os pontos de amostragem tenham uma boa capacidade de detecção de ocorrência de uma floração tóxica, é possível utilizar os resultados do Cenário 5 (

Tabela 9) na definição do tamanho amostral. Neste caso, seriam necessários dois pools amostrais para detecção de PSP (2 pools de 15 mexilhões), dois para DSP (2 pools de hepatopâncreas de 30 mexilhões) e um para ASP (1 pool de 20 mexilhões), totalizando em uma unidade amostral de 110 mexilhões, enquanto o uso do bioensaio ainda estiver sendo feito. Segundo Ferreira et al. (2016), 30 mexilhões de 7 a 8 cm correspondem à aproximadamente 1 kg. Portanto, por questões práticas, uma unidade amostral de 3,6 kg de mexilhões de cada ponto amostral seria suficiente para a realização do monitoramento de biotoxinas.

A partir do momento em que as análises por meio de HPLC-MS/MS estiverem padronizadas, um pool amostral de 15 mexilhões seria suficiente para as detecções, também considerando-se o Cenário 5.

As quantidades adicionais devem ser consideradas para a investigação microbiológica e de contaminantes químicos, podendo a última ser realizada em intervalos maiores de tempo.

4.5.3 Outras fontes de dados importantes

Baseando-se nas informações obtidas na literatura, recomenda-se que seja elaborado um inventário das fontes de contaminação que possam afetar as zonas de

cultivo, incluindo as localizações de estuários, saídas de esgoto, resíduos de estações de tratamento, fossas sépticas, resíduos navais, rejeitos industriais, resíduos de mineração, contaminantes geofísicos, resíduos de regiões de produção agropecuária, resíduos de refinarias e outros. Essas informações associadas à dinâmica das correntes oceânicas e dados meteorológicos dão grande confiabilidade a cerca da determinação dos pontos de monitoramento, aumentando-se, assim, a sensibilidade do sistema.

A partir da ativação de um sistema informatizado, contendo todos os dados obtidos semanalmente, diferentes níveis de alerta poderão ser automaticamente acionados e análises espaço-temporais poderão ser refeitas frequentemente para adaptações estratégicas.

Monitoramentos de fitoplâncton via satélite ou por meio de equipamentos autônomos podem ser instituídos, como é feito na Inglaterra e no País de Gales, desde que se pudesse garantir continua e adequada manutenção desses equipamentos. Alguns programas de monitoramento de outros países também permitem que as coletas de moluscos sejam feitas em frequências menores que as coletas de água, caso comprove-se que em determinados locais a população de microalgas nocivas mantenha-se suficientemente baixa pelo menos em períodos definidos.

Recomenda-se que os serviços de saúde pública locais reforcem a identificação de suspeitas de intoxicação por biotoxinas e procedam com a notificação para captação de informações por vigilância passiva.

4.5.4 Outras considerações

É importante que seja criado um regulamento que preveja o envio dos moluscos vivos a centros de depuração, caso sejam oriundos de zonas onde o baixo risco sanitário não possa ser assegurado.

A vigilância passiva associada aos órgãos de saúde pública teria informações valiosas para o sistema. Entretanto, devido às dificuldades relacionadas à prevenção, como ausência de alterações das características organolépticas do

pescado comercializado e impossibilidade de destruição das biotoxinas pelos métodos de transformação de alimentos disponíveis, além da subnotificação dos casos de suspeita de envenenamento por consumo de bivalves, poucas informações efetivamente seriam integradas. Os sintomas são muitas vezes associados à viroses e, por isso, poucos profissionais de saúde procedem com as notificações. É importante que se faça a fiscalização relativa à procedência dos produtos em mercados, feiras, entrepostos, distribuidores e restaurantes para a garantia de segurança alimentar.

Recomenda-se também a utilização de métodos químicos de detecção, abandonando-se o uso do bioensaio, que além de ter valores de sensibilidade e especificidade questionáveis, exige altos custos operacionais na manutenção de biotérios e gera conflitos relativos às questões de bioética e bem-estar animal.

Estimular os pequenos maricultores a se associarem em cooperativas para que tenham acesso a créditos, instruções adequadas e a assistência de extensionistas é uma maneira de reduzir as práticas irregulares de produção, beneficiamento e comercialização, o que melhoraria também as questões de rastreabilidade e segurança alimentar. A fiscalização, tanto por questões sanitárias, quanto ambientais, e campanhas de conscientização da população são imprescindíveis para uma melhor eficiência do sistema.

5 CONCLUSÃO

A determinação das áreas amostrais visa a obtenção de amostras de uma área ampla, porém numa quantidade viável para atuação do serviço local. Com esta proposta seriam coletadas pelo menos 24 amostras semanalmente ao invés das 39 coletas previstas oficialmente.

Apesar do baixo percentual de detecção de ASP (< 0,11%, se presente) e PSP (< 0,13%, se presente), as informações do monitoramento de fitoplâncton evidenciam a presença do fitoplâncton tóxico e devido à alta gravidade dos sintomas em humanos, justifica-se o monitoramento semanal em amostras de moluscos para garantia de segurança alimentar.

Para DSP, observou-se uma baixa proporção total de detecção (2,57%), porém com ampla distribuição tanto de fitoplâncton tóxico quanto de biotoxinas em amostras de moluscos. Por meio das análises de clusters e da densidade de ocorrências, é possível inferir que, principalmente, as áreas amostrais de 7 a 11 requerem atenção especial, incluindo-se a utilização de pontos secundários de amostragem.

A recomendação da análise de dois pools para detecção de DSP e PSP, por bioensaio, e de um pool para ASP, por HPLC-DAD, poderá ser considerada satisfatória após a elaboração de um inventário das fontes de contaminação para se certifique sobre quão sensíveis são os atuais pontos de coleta do monitoramento oficial.

Com base na integração dos dados das análises de moluscos, de água, de fontes de contaminação, de correntes oceânicas, dados meteorológicos e de dados para a rastreabilidade será possível estabelecer um sistema de vigilância com planos estratégicos que garantam uma alta sensibilidade na detecção de riscos para que diferentes planos de ação sejam utilizados.

O monitoramento de fitoplâncton via satélite ou por meio de equipamentos autônomos pouparia muito tempo, mão-de-obra e recursos após implantação inicial, já que permitiria uma necessidade de amostragem de água muito menos intensa.

Para determinação de tamanhos das amostras de água, a metodologia que compara as médias dos resultados de pontos de referência com os quantis dos pontos de monitoramento, poderia ser utilizada. Para isso, seria necessário que

pontos de referência fossem determinados para a coleta dos parâmetros a serem incluídos nos cálculos.

Para o monitoramento de micro-organismos patogênicos, recomenda-se que a amostragem seja também feita semanalmente e para o monitoramento de contaminantes químicos, como metais pesados, que seja feito inicialmente uma ou duas vezes por ano durante três anos para classificação das áreas.

REFERÊNCIAS

- ALAGOAS. Ministério Público de Contas de Alagoas. **Sururu**, 2014. Disponível em: <<http://mpc.al.gov.br/congressompc/alagoas-cultural/gastronomia/>>. Acesso em: 21 mar. 2016.
- ALEXANDER, J.; BENFORD, D.; COCKBURN, A.; CRAVEDI, J.; DOGLIOTTI, E.; DOMENICO, A. Di; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; FINK-GREMMELS, J.; FÜRST, P.; GALLI, C.; GRANDJEAN, P.; GZYL, J.; HEINEMEYER, G.; JOHANSSON, N.; MUTTI, A.; SCHLATTER, J.; LEEUWEN, R. Van; PETEGHEM, C. Van. Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group. **The EFSA Journal**, v. 907, p. 1–62, 2008a.
- ALEXANDER, J.; BENFORD, D.; COCKBURN, A.; CRAVEDI, J.; DOGLIOTTI, E.; DOMENICO, A. Di; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; FINK-GREMMELS, J.; FÜRST, P.; GALLI, C.; GRANDJEAN, P.; GZYL, J.; HEINEMEYER, G.; JOHANSSON, N.; MUTTI, A.; SCHLATTER, J.; LEEUWEN, R. Van; PETEGHEM, C. Van. Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065D) Adopted on 2 December 2008. **The EFSA Journal**, v. 1109, p. 1–47, 2008b.
- ÁLVAREZ-SALGADO, X. A.; FIGUEIRAS, F. G.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; LABARTA, U.; PETEIRO, L.; PIEDRACOBIA, S. Control of lipophilic shellfish poisoning outbreaks by seasonal upwelling and continental runoff. **Harmful Algae**, v. 10, n. 2, p. 121–129, jan. 2011. Disponível em: <<http://digital.csic.es/handle/10261/35578>>. Acesso em: 22 set. 2015.
- ALVES, T. P.; DIAS, G. F.; PINTO, T. de O. Relação entre o peso total e do hepatopâncreas de moluscos bivalves cultivados no litoral de Santa Catarina. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO DO IFSC, 1., **Anais...** 2013. Disponível em: <<http://eventoscientificos.ifsc.edu.br/index.php/sepei/sepei2013/paper/viewFile/126/279>>. Acesso em: 15 mar. 2014.
- AUSTRÁLIA. Australian shellfish quality assurance program. **Operations Manual**, p. 147, 2009.
- AZMI, S.; AGARWADKAR, Y.; BHATTACHARYA, M.; APTE, M.; INAMDAR, A. B. Monitoring and trend mapping of sea surface temperature (SST) from MODIS data: a case study of Mumbai coast. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 4, p. 165. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10661-015-4386-9>>. Acesso em: 27 ago. 2016.
- BACHI, G. C. **Avaliação de diferentes adesivos para produção de meia-pérola na ostra perlífera *Pteria hirundo***. 2015. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
- BARTABURU, X. Berbigão: vulgo vôngole. **National Geographic Brasil**, 2013. Disponível em: <<http://viajeaqui.abril.com.br/materias/berbigao-vulgo-vongole>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- BLACKBURN, S. I.; HALLEGRAEF, G. M.; BOLCH, C. J. Vegetative reproduction

and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmanis, Australia. **Journal of Phycology**, v. 25, n. 3, p. 577–590, set. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00264.x>>. Acesso em: 6 ago. 2015.

BOFFO, L.; ARCANGELI, G.; ROSSETTI, E. **Manuale di corretta prassi igienica della produzione della vongola verace nel Veneto**. Legnaro: GRAL, 2008. 110 p.

BOSCOLO PAPO, M.; BERTOTTO, D.; PASCOLI, F.; LOCATELLO, L.; VASCELLARI, M.; POLTRONIERI, C.; QUAGLIO, F.; RADAELLI, G. Induction of brown cells in *Venerupis philippinarum* exposed to benzo(a)pyrene. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 233–238, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.006>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

BOSCOLO PAPO, M.; BERTOTTO, D.; QUAGLIO, F.; VASCELLARI, M.; PASCOLI, F.; NEGRATO, E.; BINATO, G.; RADAELLI, G. Histopathology and stress biomarkers in the clam *Venerupis philippinarum* from the Venice Lagoon (Italy). **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 1, p. 42–50, 2014b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464814001326>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Manual do MPA para o programa nacional de controle higiênico-sanitário de moluscos bivalves**. Brasília: MPA, 2013. p. 27.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Programas sanitários**. 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/monitoramento-e-controlempa/sanidade-pesqueira/programas-sanitarios/pncmb/sobre-pncmb>>. Acesso em: 4 jun. 2015.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT (CCME). Protocol for bivalve and mollusc sampling. In: _____. **Protocols Manual for Water Quality Sampling in Canada**. Winnipeg: CCME, 2011. p. 139.

CASTILHO-WESTPHALL, G. G. **O uso de coletores artificiais de sementes: uma importante alternativa para a viabilização da ostreicultura no Paraná**. 2014. Disponível em: <<http://www.gia.org.br/m%C3%ADdia-e-pr%C3%AAmios/videos/problemas-na-ostreicultura/19-not%C3%ADcias/243-o-uso-de-coletores-artificiais-de-sementes-uma-importante-alternativa-para-a-viabilizac%C3%A3o-da-ostreicultura-no-parana>>. Acesso em: 22 set. 2015.

CASTRO, M. **Cyrtopleura costata (Linnaeus, 1758)**. 2013. Disponível em: <<http://marcelomarks50.blogspot.com.br/2013/03/cyrtopleura-costata-chlamys-benedicti-e.html>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

CENTRE FOR ENVIRONMENT, FISHERIES AND AQUACULTURE SCIENCE (CEFAS). **Algal toxins surveillance**. 2014. Disponível em: <<http://www.cefas.defra.gov.uk/our-science/animal-health-and-food-safety/food-safety/algalsurveillance.aspx>>. Acesso em: 10 jan. 2016a.

CENTRE FOR ENVIRONMENT, FISHERIES AND AQUACULTURE SCIENCE (CEFAS). **Biotoxin monitoring programme for Scotland**: April 10 to March 11.

Contract reference PAU225 - S02007, Ref C3161. Suffolk: Cefas, 2011. p.135.

CENTRE FOR ENVIRONMENT, FISHERIES AND AQUACULTURE SCIENCE (CEFAS). **Phytoplankton ecology**. 2014. Disponível em: <<http://www.cefas.defra.gov.uk/our-science/ecosystems-and-biodiversity/phytoplankton-ecology.aspx>>. Acesso em: 23 jan. 2016b.

CENTRO DE ESTUDOS MARINHOS DO ATLÂNTICO SUL (CENEMAR). **Mexilhão *Perna perna***. 2008. Disponível em: <http://www.cenemar.org.br/foto_do_dia/foto_11.htm>. Acesso em: 19 mar. 2016.

CHADA, N. **Animais e plantas conhecidas e utilizadas pelas populações tradicionais da Amazônia**. Belém, PA: PUBLIT, 2008. 264 p.

CHOW, L. Chile's worst ever red tide kills 20 million fish, prompts investigation of salmon farms. **EcoWatch**. 2016. Disponível em: <<http://ecowatch.com/2016/05/18/chile-red-tide/>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

COMÉRCIO DE INSTRUMENTOS CIENTÍFICOS, EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIO E PESQUISA, PESCA E NÁUTICA (CONSULPESC). **Análise da água: disco de secchi**. 2016. Disponível em: <http://www.consulpesq.com.br/analise_agua.html>. Acesso em: 20 abr. 2016.

CORSIN, F.; GEORGIADIS, M.; HAMMELL, K. L.; HILL, B. **Guide for aquatic animal**. Paris: OIE, 2009. 114 p.

COWLING, D. W.; GARDNER, I. A.; JOHNSON, W. O. Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 39, n. 3, p. 211–25, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10327439>>. Acesso em: 9 abr. 2013.

CROSSAN, C.; BAKER, P. J.; CRAFT, J.; TAKEUCHI, Y.; DALTON, H. R.; SCOBIE, L. Virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 12, p. 2085–2087, 2012.

DALE, B. The sedimentary record of dinoflagellate cysts: looking back into the future of phytoplankton blooms. **Scientia Marina**, v. 65, p. 257–272, 2001. Supplement, 2.

DE SOUZA, R. V.; VICENTE, A. L.; DOS SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; OSTRENSKY, A. Malacocultura em Santa Catarina: Maricultores, extensionistas e pesquisadores apontam problemas e demandas. **Panorama da Aquicultura**, jan./fev., p. 36–41, 2011.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE INFRAESTRUTURA DE TRANSPORTES (DNIT). **Batimetria**. 2015. Disponível em: <<http://www.dnit.gov.br/hidrovias/hidrovias-interiores/manutencao-hidroviaria/barimetria>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

DURANTI, A. **Epidemiologia applicata ai molluschi**. Tolentino: IZS dell'Umbria e delle Marche, 2015. Corso professionalizzante sul controllo dei molluschi bivalvi vivi. 29 Apr. 2015.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA

CATARINA (EPAGRI/SDS). **Mapa de unidades hidrográficas de Santa Catarina**. 2005. Disponível em: <<http://ciram.epagri.sc.gov.br/mapoteca/>>. Acesso em: 6 maio. 2016.

EUROPA. Diretiva 2001/22/CE da Comissão de 8 de março de 2001 que estabelece os métodos de colheita de amostras e de análise para o controle oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio e 3-MCPD presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, n. L 077, p. 14–21, 2001.

EUROPA. Regulamento (CE) no. 2073/2005 de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, n L 338, p. 11–22, 2005.

EUROPA. Regulamento (CE) no. 786/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de agosto de 2013 que altera o anexo III do Reg. (CE) no. 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito aos limites permitidos de yessotoxinas em moluscos bivalves. **Jornal Oficial da União Europeia**, n L 220, p. 14, 2013.

EUROPA. Regulamento (CE) no. 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos gêneros alimentícios de origem animal. **Jornal Oficial da União Europeia**, n. L 139, p. 55–206, 2004.

EUROPA. Regulamento (CE) no. 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. **Jornal Oficial da União Europeia**, n L 139, p. 28–101, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. **EFSA Journal**, v. 9, n. 7, p. 2190, 2011. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/2190>>. Acesso em: 24 set. 2015.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish: Emerging toxins. **EFSA Journal**, v. 8, n. 7, p. 1677, 2010.

EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS (EURLMB). **European Union harmonised standard operating procedure for detection of lipophilic toxins by mouse bioassay**. Vigo: MSSSI, 2013, v. 6, 14 p.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M.; MARENZZI, A. C.; TUREK, C.; DA SILVA, R. T. Coletores de sementes de mexilhão: A opção do miticultor catarinense para retomar o crescimento da produção. **Panorama da Aquicultura**, jul./ago, p. 43-48, 2016. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/Paginas/Revistas/96/ColetoresdeSementes96.asp>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

FLORIDA DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL PROTECTION (FDEP), 2012. **How long do the blooms last?** Disponível em: <<http://www.dep.state.fl.us/water/bgalgae/faq.htm#4>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Diarrhoeic Shellfish Poisoning (DSP). In: _____. **Marine Biotoxins**. Roma: FAO, 2004b. p. 53–95. (FAO Food and Nutrition Paper 80).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). In: _____. **Marine Biotoxins**. Roma: FAO, 2004a. p. 5–52. (FAO Food and Nutrition Paper 80).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Fishery and aquaculture statistics 2012**. Roma: FAO, 2014. p. 1–79.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of pathogenic *Vibrio* species in seafood**. Roma: FAO, 2010. p. 14. CAC/GL 73-2010. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11565/CXG_73e.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). World Health Organization (WHO). Codex Alimentarius Commission. **Standard for live and raw bivalve molluscs**. Roma: FAO, 2013. p. 1–6. CODEX/STAN 292-2008. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11109/CXS_292e.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). World Health Organization (WHO). **Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on fish and fishery products**. 2012. Seção 32, p. 1–6, out. CX/FFP 12/32/2-ADD.1. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccffp/ccffp32/fp32_02_add1e.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2013.

FOOD STANDARDS AGENCY (FSA). **Official control biotoxin monitoring (live bivalve molluscs) programme (England and Wales)**. 2014. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/enforcement/monitoring/shellfish/ewbiotoxin/#.U4DvKyjgK8A>>. Acesso em: 3 dez. 2015a.

FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE DO GOVERNO DE SANTA CATARINA (FATMA). 2016. Disponível em: <<http://www.fatma.sc.gov.br/conteudo/o-que-e>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

GALLON, A. V.; NASCIMENTO, C. do; PFITSCHER, E. D.; NASCIMENTO, C. do; PFITSCHER, E. D. The bivalve production chain in Santa Catarina, Brazil, and its management. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 208–226, 2011. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053938004&partnerID=40&md5=f28ffc623b410bd624e0c83ea7a5ff40>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

GILL, T. A.; THOMPSON, J. W.; GOULD, S. Thermal resistance of paralytic shellfish poison in soft-shell clams. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 8, p. 659–667, 1985. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1985/00000048/00000008/art00003?crawler=true>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

GISELA-SHELLS. ***Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758)**. 2008. Disponível em: <<http://gisela9344.blogspot.com.br/2008/05/nodipecten-nodosus-linnaeus-1758.html>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

GOFAS, S. ***Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)**. 2015. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=420777>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. France: UNESCO, 1995. p. 551. (IOC Manuals and Guides No. 33).

HASLE, G. R. Using the inverted microscope. In: SOURNIA, A. (Ed.). **Phytoplankton manual**. 6. ed. Paris: UNESCO Press, 1978. p. 191–196.

HELM, M. M.; BOURNE, N. **Hatchery culture of bivalves: a practical manual**. Rome: FAO, 2004. p. 21.

HENCKES, C. **Conquiliologistas do Brasil**. 2016. Disponível em: <<http://www.conchasbrasil.org.br/conquiliologia/descricao.asp?id=1017>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

HESS, P.; BUTTER, T.; PETERSEN, A.; SILKE, J.; MCMAHON, T. Performance of the EU-harmonised mouse bioassay for lipophilic toxins for the detection of azaspiracids in naturally contaminated mussel (*Mytilus edulis*) hepatopancreas tissue homogenates characterised by liquid chromatography coupled to tandem mass spect. **Toxicon**: Official Journal of the International Society on Toxinology, v. 53, n. 7-8, p. 713–22, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254738>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

HOSHINO, P. **Avaliação e comparação de projetos comunitários de ostreicultura localizados no nordeste paraense**. 2009. 9 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

HOUAISS, A. **Dicionário Houaiss da língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. p. 533-1499.

HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. Roma: FAO, 1997. 176 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO E SUSTENTABILIDADE (IABSTV). **Projeto de diagnóstico da cadeia produtiva do sururu na Lagoa Mundaú, Maceió-AL**. 2014. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=_05n1oXB_aA>. Acesso em: 19 mar. 2016.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBIO). **Resex Pirajubaé**. 2016. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/unidades-de-conservacao/biomas-brasileiros/marinho/unidades-de-conservacao-marinho/2294-resex-pirajubae.html>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **ANTARES Brasil**. 2014. Disponível em: <<http://www.dsr.inpe.br/antares/index.html>>. Acesso em: 23 mar. 2014.

INSTITUTO TECNOLÓGICO PARA O CONTROL DO MEDIO MARIÑO DE GALICIA (INTECMAR). **Biotoxinas**. 2014. Disponível em: <<http://www.intecmar.org/Intecmar/Biotoxinas.aspx>>. Acesso em: 23 mar. 2014.

LABORATÓRIO DE PESQUISA E MONITORAMENTO DE ALGAS NOCIVAS E FICOTOXINAS (LAQUA-ITAJAÍ/SC). **Protocolos laboratoriais para a detecção de biotoxinas em amostras de moluscos bivalves**. Itajaí: LAQUA-ITAJAÍ/SC, 2014.

LABORATÓRIOS DE MOLUSCOS MARINHOS. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). **Assentamento remoto de larvas de mexilhão**. Santa Catarina: LMM, 2006. 25 p. (Manual do Produtor de Moluscos).

LANDRY, M. R.; HICKEY, B. M. **Coastal oceanography of Washington and Oregon**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1989. p. 240. (Elsevier Oceanography Series 47).

LATINI, M. **Valutazione delle fonti di inquinamento animali e umana**. Tolentino: IZS dell'Umbria e delle Marche, 2015. Corso professionalizzante sul controllo dei molluschi bivalvi vivi. 29 abr. 2015.

LAWRENCE, J.; LOREAL, H.; TOYOFUKU, H.; HESS, P.; KARUNASAGAR, I.; ABABOUC, L. **Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs**. Rome: FAO, 2011. p. 337. (FAO fisheries and aquaculture technical paper no. 551).

LE FOCHE, M.; NOTARGIACOMO, T.; MANCINI, L. Rassegna degli indici basati sui macroinvertebrati bentonici come indicatori di qualità degli ecosistemi lacustri. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 41, n. 3, p. 403–413, 2005.

LEE, R.; LOVATELLI, A.; ABABOUC, L. **Bivalve depuration: fundamental and practical aspects**. FAO Fisheries Technical Paper. No. 511. p. 139, 2008.

MODALITÀ di esecuzione e trasporto del campione al laboratorio designato. **Bollettino Ufficiale Regione Lazio**, Pt. 5, p. 87–92, 2011. Supplemento ordinario n. 141.

MORGADO, M. E.; BEBIANO, M. J. A mussel watch in the Ria Formosa lagoon. **Ciencias Marinas**, v. 31, n. 1B, p. 231–241, 2005.

MURRAY, L. Official control monitoring programmes for live bivalve molluscs - legislative and regulatory approaches: Scotland. In: REES, G.; POND, K.; HAY, J.; BARTRAM, J.; SANTO DOMINGO, J. (Ed.). **Safe management of shellfish and harvest waters**. London: IWA Publishing, 2010.

NARBONNE, J. F.; AARAB, N.; CLÉRANDEAU, C.; DAUBÈZE, M.; NARBONNE, J.; CHAMPEAU, O.; GARRIGUES, P. **Scale of classification based on biochemical markers in mussels**: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. 2008. Disponível em:

<<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13547500500071339>>. Acesso em: 5 fev. 2015.

NAUSTVOLL, L.-J.; GUSTAD, E.; DAHL, E. Monitoring of *Dinophysis* species and diarrhetic shellfish toxins in Flødevigen Bay, Norway: inter-annual variability over a 25-year time-series. **Food Additives & Contaminants: part A**, v. 29, n. 10, p. 1605–1615, 2012.

NAVARRO, F. **Dicionário do nordeste**. 2. ed. Recife: Companhia Editora de Pernambuco, 2013. p. 711.

NOVAES, A. L. T.; VIANNA, L. F. N.; SANTOS, A. A. dos; SILVA, F. M.; SOUZA, R. V. de. Planos locais de desenvolvimento da maricultura de Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, nov./dez., p. 52–58, 2010.

NSW FOOD AUTHORITY. **Marine biotoxin management plan**. Newington: NSW Food Authority, 2011.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Chapter 17 Molluscs as bioindicators. **Trace Metals and other Contaminants in the Environment**, v. 6, p. 577–635, 2003.

OLIVEIRA NETO, F. M. **Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina. Epagri**. Florianópolis: Epagri, 2005. (Documentos, 220).

OMACHI, C. Y.; TAMANAHA, M. S.; PROENÇA, L. A. O. Bloom of *Alexandrium fraterculus* in coastal waters of Itajaí, SC, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, n. 1, p. 57–61, mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-87592007000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 18 set. 2015.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: FAO, 2008. p. 276.

PANORAMA AQUICULTURA. Governos do Estado repassa verba para cooperativa de ostras de Florianópolis. 2013. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=2429>>. Acesso em: 19 mar. 2016.

PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 1, p. 55–60, 1994.

PEELER, E. J.; TAYLOR, N. G. H. The application of epidemiology in aquatic animal health: opportunities and challenges. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1–15, 2011.

PEREIRA, A.; TEIXEIRA, A. L.; POLI, C. R.; BROGNOLI, F. F.; SILVA, F. C. Da; RUPP, G. S.; SILVEIRA JR., J.; ARAÚJO, S. C. **Biologia e cultivo de ostras**. Florianópolis: UFSC, 1998. p. 70.

PIZARRO, G. B.; MOROÑO, Á.; PAZ, B.; FRANCO, J. M.; PAZOS, Y.; REGUERA, B. Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of

Dinophysis toxins in shellfish. **Marine drugs**, v. 11, n. 10, p. 3823–3845, 2013.

POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, V. **O que é limnologia**. 2016. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/limnologia/Oqueelimnologia/>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

POULET, S. A.; IANORA, A.; MIRALTO, A.; MEIJER, L. Do diatoms arrest embryonic development in copepods? **Marine Ecology Progress Series**, v. 111, n. 1-2, p. 79–86, 1994.

PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A.; TAMANAHA, M. S.; ALVES, T. P. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. **Harmful Algae News**, n. 33, p. 1–28, 2007.

PUCA, M. **L'etichettatura del pescato, fondamentale per un acquisto sicuro**. 2011. Disponível em: <http://www.ilnautilus.it/trasporti/2011-10-07/l%E2%80%99etichettatura-del-pescato-fondamentale-per-un-acquisto-sicuro_4555/>. Acesso em: 27 abr. 2016.

ROBERT, R.; SÁNCHEZ, J. L.; PÉREZ-PARALLÉ, L.; PONIS, E.; KAMERMANS, P.; O'MAHONEY, M. A glimpse on the mollusc industry in Europe René. **Aquaculture Europe**, v. 38, n. 1, p. 5–11, 2013.

ROCHA, I. P.; CAMPOS, F. K. J.; COSTA, S. W. da. **Aquaculture in Brazil: Domestic markets rise as industry looks to future**. St. Louis: Global aquaculture advocate, 2011. p. 48–50, 2011.

ROLA, R. C.; MONTEIRO, M. D. C.; REIS, S. R. D. S.; SANDRINI, J. Z. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 4, p. 766–771, 2012.

ROSA, E. **Santa Catarina mantém liderança nacional na produção de ostras, mariscos e vieiras, confirma IBGE**. 2014. Disponível em: <<http://ndonline.com.br/florianopolis/noticias/286697-santa-catarina-mantem-lideranca-nacional-na-producao-de-ostras-mariscos-e-vieiras-confirma-ibge.html>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

SANTOS, A. A. dos; COSTA, S. W. da. **Síntese informativa da maricultura 2014**. Florianópolis: Epagri, 2015. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=676>. Acesso em: 12 fev. 2016.

SANTOS, A. A. dos; COSTA, S. W. da. **Síntese informativa da maricultura 2015**. Florianópolis: Epagri, 2016. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese-Informativa-Maricultura-2015.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

SARDEGNA. **Allegato alla Deliberazione della Giunta regionale n. 26/9 del 3.6.2009**. Linee guida regionali: classificazione delle zone di produzione e di stabulazione dei molluschi bivalvi vivi e delle zone di produzione degli echinodermi, dei tunicati e dei gasteropodi marini vivi. [Sardegna: s.n.], 2009. 34 p.

SCHMITT, F.; PROENÇA, L. A. Ocorrência de dinoflagelados do gênero *Dinophysis* (Enrenberg, 1839) na Enseada de Cabeçudas (verão e outono de 1999). **Notas**

Técnica FACIMAR, n. 4, p. 49–59, 2000.

SCHRAMM, M. A. **Ocorrência de toxinas amnésicas, paralisantes e diarréicas na carne de moluscos cultivados em Santa Catarina**: segurança alimentar e saúde pública. 2008. 112 p. Tese (doutorado em Ciências dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SCHWAB, K. J.; NEILL, F. H.; ESTES, M. K.; METCALF, T. G.; ATMAR, R. L. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1674–80, dez. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9874348>>. Acesso em: 25 set. 2015.

SCOTTISH MARINE INSTITUTE (SAMS). **Monitoring programme for the presence of toxin producing plankton in shellfish production areas in Scotland**. 2016. Disponível em: <<http://www.sams.ac.uk/keith-davidson/toxic-plankton-monitoring>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

SERGEANT, E. S. G. **Epitools epidemiological calculators**. 2014. Disponível em: <<http://epitools.ausvet.com.au>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

SHAO, Q.; WANG, Y.-G. Statistical power calculation and sample size determination for environmental studies with data below detection limits. **Water Resources Research**, v. 45, n. 9, p. 1–8, 16 set. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1029/2008WR007563>>. Acesso em: 27 maio. 2014.

SILVEIRA, M. **Processo de cessão de uso de áreas da união para maricultura em Santa Catarina**. 2012. p. 44. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SLOW FOOD ITALIA. **Scuola di cucina Slow Food**: frutti di mare e crostacei. Milão: Giunti, 2014. p. 42

SMAYDA, T. J. What is a bloom? A commentary. **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 5, part. 2, p. 1132–1136, 1997.

SON, N. T.; FLEET, G. H. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, re-laying, and storage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 994–1002, 1980.

STAHL, R. G. Can mammalian and non mammalian “sentinel species” data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants? **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 3, p. 329–335, 1997. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10807039709383689>>. Acesso em: 27 maio. 2014.

STOBO, L. A.; LACAZE, J.-P. C. L.; SCOTT, A. C.; PETRIE, J.; TURRELL, E. A. Surveillance of algal toxins in shellfish from Scottish waters. **Toxicon official journal of the International Society on Toxinology**, v. 51, n. 4, p. 635–648, 2008.

SUZUKI, T.; YOSHIZAWA, R.; KAWAMURA, T.; YAMASAKI, M. Interference of free

fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins. **Lipids**, v. 31, n. 6, p. 641–5, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784745>>. Acesso em: 5 jun. 2013.

TAVARES, J. F.; PROENÇA, L. A. O.; COEBRECHT, C. Assessing the harmful microalgae occurrence and temporal variation in a coastal aquaculture area, southern Brazil. **Atlântica**, v. 31, n. 2, p. 129–144, 2009.

THE GUARDIAN. **A silent catastrophe**: Chilean fishermen protest failure to mitigate toxic “red tide”. 2016. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/world/2016/may/03/chile-fishermen-red-tide-algal-bloom-protests>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

TOYOFUKU, H. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1735–1745, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X06002797>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY (USGS). **Um turú (*Teredo navalis*) seco retirado de um objeto de madeira**. 2005. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Turu#/media/File:Shipworm.jpg>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC). **Laboratório de Moluscos Marinhos**. 2016. Disponível em: <<http://imm.ufsc.br/>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC). **Reunião anual da SBPC: novas espécies de ostras e vieiras poderão ajudar Santa Catarina a intensificar a maricultura**. 2006. Disponível em: <<http://noticias.ufsc.br/2006/07/reuniao-anual-da-sbpc-novas-especies-de-ostras-e-vieiras-poderao-ajudar-santa-catarina-a-intensificar-a-maricultura/>>. Acesso em: 2 jul. 2016.

VALE, P. Two simple models for accounting mussel contamination with diarrhoetic shellfish poisoning toxins at Aveiro lagoon: control by rainfall and atmospheric forcing. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 98, p. 94–100, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2011.12.007>>. Acesso em: 7 jul. 2015.

VALE, P.; BOTELHO, M. J.; RODRIGUES, S. M.; GOMES, S. S.; SAMPAYO, M. A. de M. Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986–2006): A review of exposure assessment. **Harmful Algae**, v. 7, n. 1, p. 11–25, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156898830700087X>>. Acesso em: 23 jul. 2015.

VAN DER FELS-KLERX, H. J.; ADAMSE, P.; GOEDHART, P. W.; POELMAN, M.; POL-HOFSTAD, I. E.; VAN EGMOND, H.; GERSSEN, A. Monitoring phytoplankton and marine biotoxins in production waters of the Netherlands: results after one decade. **Food Additives & Contaminants**: part A, v. 29, n. 10, p. 1616–1629, 2012.

VAN EGMOND, H. P.; AUNE, T.; LASSUS, P.; SPEIJERS, G. J. A.; WALDOCK, M. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. **Journal of Natural Toxins**, v. 2, p. 41–82, 1993.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; DONDERO, F.; MARRO, A.; FABBRI, R. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. **Biomarkers**, v. 4, n. 6, p. 455–466, 1999. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032761072&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 14 set. 2015.

VICENTE, A. L. **Diagnóstico de problemas e demandas da malacocultura em Santa Catarina**: uma visão de maricultores, extensionistas e pesquisadores. 2010. 48 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Bacharel em Zootecnia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2010.

VICO, G. de; CARELLA, F. **Argomenti di patologia comparata dei molluschi**. Napoli: Loffredo, 2012. p. 15-21.

WATER CORPORATION. **Perth long term ocean outlet monitoring program (PLOOM)**: 2012 summer water quality survey. Disponível em: <<http://www.watercorporation.com.au/about-us/environment-and-sustainability/ocean-outfall/perth-monitoring-program>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

WILLIAMS, C. J.; MOFFITT, C. M. A critique of methods of sampling and reporting pathogens in populations of fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, n. 4, p. 300–309, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8667%282001%29013%3C0300%3AACOMOS%3E2.0.CO%3B2>>. Acesso em: 28 maio. 2014.

APÊNDICE A - Modelo de planilha de dados para o sistema de vigilância de moluscos bivalves

Data.coleta	IDPontodeColeta	N.Area	Latitude	Longitude	Especie	DSP*	PSP*	ASP	ASP_Pos*	<i>D.acuminata</i>	<i>D.acum_Pos*</i>
12/05/2016	Ponta_do_Papagaio	23	-2.785.260.833	-4.858.452.778	<i>P.perna</i>	0	0	15.20	0	80	0
13/05/2016	Freguesia_do_Ribeirao	18	-2.773.393.056	-4.856.717.222	<i>C.gigas</i>	1	0	0	0	1110	1
15/05/2016	Laranjeiras	2	-26.288.175	-4.868.692.222	<i>P.perna</i>	0	0	0.01	0	50	0

Legenda: ID – identificação; N.Area – número da área amostral; *D.acuminata* – contagem de células por litro de *Dinophysis acuminata* em amostras de água;

* Dados qualitativos, onde “0” corresponde a negativo e “1” a positivo.

<i>D.caudata</i>	<i>D.tripos</i>	<i>D. scrobiculata</i>	<i>D.rotundata</i>	<i>D. bibulbus</i>	<i>D. fortii</i>	<i>D. exigua</i>	<i>D. mitra</i>	<i>D.operculooides</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i>	<i>G.catenatum</i>	<i>K.brevis</i>
0	0	250	0	0	50	0	0.01	0	21.4	150	0
40	20	0	0	0	0	0	0	200	2900	0	0
120	0	0	40	100	0	0	0	0	3	0	50

Legenda: *G. catenatum* – contagem de células por litro de *Gymnodinium catenatum* (PSP) em amostras de água; *K.brevis* – *Karenia brevis*.

TempAg	SalinidadeAg	TurbidezAg	DirecaoVento	VelocVentoMedia	Insolacao	Precipitacao	PressaoMedia	TempArMedia	UmidadeRelAr	CodigoAmostra
20	16	0.3	NE	3.6	151.5	614.9	1018.63	19.5	77.52	123456789
27	26	2	E	2.9	89.9	304.5	1012.2	23.14	84.21	123456790
25	32	4.8	S	1.4	103.8	216.7	1016.13	26.33	74.14	123456791

Legenda: TempAg – temperatura da água; CodigoAmostra – código de barra ou qualquer outro código numérico/eletrônico que identifique a amostra desde a sua coleta até a emissão do laudo final.