



UNIVERSIUNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



**TÍTULO: ANÁLISE DE BIOTOXINAS MARINHAS EM
ÁREAS DE CULTIVO DE OSTRAS DO NORDESTE DO PARÁ
(AMAZÔNIA -BRASIL).**

FRANCISCO ARIMATÉIA DOS SANTOS ALVES

BELÉM – PA

2022

FRANCISCO ARIMATÉIA DOS SANTOS ALVES

**TÍTULO: ANÁLISE DE BIOTOXINAS MARINHAS EM
ÁREAS DE CULTIVO DE OSTRAS DO NORDESTE DO PARÁ
(AMAZÔNIA -BRASIL).**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dra. Maria Paula Cruz Schneider.

Coorientador (a): Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Lima.

Coorientador (a): Prof. Dra. Eliane Brabo de Sousa.

Belém – Pará

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474a Alves, Francisco Arimatéia dos Santos Alves.

ANÁLISE DE BIOTOXINAS MARINHAS EM ÁREAS DE CULTIVO DE OSTRAS DO NORDESTE DO PARÁ (AMAZÔNIA -BRASIL). / Francisco Arimatéia dos Santos Alves Alves. — 2022.

49 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Paula Cruz Schneider

Coorientação: Prof^a. Dra. Eliane Brabo de Sousa

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Belém, 2022.

1. dinoflagelados. 2. veneno de marisco paralítico. 3. goniautoxina. 4. saxitoxina .. I. Título.

CDD 571.951

FRANCISCO ARIMATÉIA DOS SANTOS ALVES

**TÍTULO: ANÁLISE DE BIOTOXINAS MARINHAS EM
ÁREAS DE CULTIVO DE OSTRAS DO NORDESTE DO PARÁ
(AMAZÔNIA -BRASIL).**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 23 / 09 / 2022

Banca examinadora

Prof. Dra. Maria Paula Cruz Schneider

Prof. Dr. Júlio Pieczarka

Documento assinado digitalmente
 MARIA IRACILDA DA CUNHA SAMPAIO
Data: 04/12/2022 09:07:26-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Dra. Maria Iracilda da Cunha
Sampaio

Documento assinado digitalmente
 RAFAEL AZEVEDO BARAÚNA
Data: 05/12/2022 09:02:53-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Dr. Rafael Baraúna

Documento assinado digitalmente
 SILVIA MARIA MATHES FAUSTINO
Data: 05/12/2022 09:28:07-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino

Dedico este trabalho ao meu pai Otávio Viana Rodrigues que faleceu vítima da Covid, por sempre me apoiar nos bons momentos e nos momentos difíceis da minha vida. Também a minha mãe por sempre está ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Maria Paula Cruz Schneider pela confiança e paciência a minha pessoa.

A meus amigos de Laboratório do Instituto Evandro Chagas: Dra. Eliane Brabo, Dra. Samara Cristina, Dr. Kelson Faial, Ms. Celly Cunha, Ms. Vanessa Costa, Ms. Aline Lemos.

Agradecimento especial ao meu amigo Dr. Marcelo Lima pelo apoio em toda minha estadia no Instituto Evandro Chagas.

Agradeço a Dra. Elisabeth Santos que nunca mediu esforços para ajudar no meu desenvolvimento profissional na Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas.

Agradeço a minha mãe Antonia dos Santos Alves por todo apoio ao longo de minha vida e ao meu pai Otávio Viana Rodrigues (*in memória*) que também sempre me apoiou em tudo que eu quis fazer em toda minha vida.

A minha esposa Renata Valéria pela paciência nos últimos anos e aos meus filhos Anthony Alves e Emanuella Alves.

Ao Instituto Evandro Chagas (Seção de Meio Ambiente) pelo apoio material para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a UFPA e Bionorte pela vaga de doutorado

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”. Albert Einstein.

ALVES, Francisco Arimatéia dos Santos. **Análise de biotoxinas marinhas em áreas de cultivo de ostras do nordeste do Pará (Amazônia -Brasil)**. 2022. 55 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Pará, Pará, 2022.

RESUMO

As ficotoxinas marinhas são compostos orgânicos sintetizados por algumas espécies de microalgas, que se acumulam nos tecidos de organismos filtradores, como os moluscos bivalves. Essas toxinas podem causar episódios de intoxicação aguda em humanos, uma grave ameaça à aquicultura e à pesca. No Estado do Pará, Brasil, a ostreicultura tem bases comunitárias, artesanais e sustentáveis, utilizando manguezais como ambiente de cultivo e banco de sementes de ostras. Na produção em pequena escala, muitas vezes não existem métodos estabelecidos para proteger a saúde dos consumidores, elevando os riscos potenciais de surtos de intoxicação por mariscos. Nosso estudo avaliou a presença de ficotoxinas em ostras cultivadas em cinco municípios da região da Amazônia Atlântica (Pará, Brasil) avaliando a qualidade do produto final. Avaliamos ainda as microalgas, a qualidade da água e a variação espaço-temporal de fatores físico-químicos na mesma área. As diatomáceas dominaram a composição das microalgas, seguidas pelos dinoflagelados, alguns dos quais são relatados como potencialmente tóxicos e produtores de toxinas paralíticas de mariscos. Pela primeira vez, descrevemos a ocorrência do dinoflagelado potencialmente tóxico *Ostreopsis* sp. na região amazônica. Além disso, pela primeira vez, toxinas foram detectadas em ostreicultura no nordeste do Estado do Pará, a saber, GTX2,3, STX e dc-STX, porém, com valores atóxicos. As toxinas identificadas representam uma ameaça potencial para os consumidores de marisco.

Palavras-chave: Dinoflagelados; Veneno de marisco paralítico; Goniatóxina; saxitóxina

ALVES, Francisco Arimatéia dos Santos. **Analysis of marine biotoxins in oyster farming areas in northeastern Pará (Amazon - Brazil)**. 2021. 55 f. Thesis (Ph.D. in Biodiversity and Biotechnology) – Federal University of Pará, Pará, 2021.

ABSTRACT

Marine phycotoxins are organic compounds synthesized by some species of microalgae, which accumulate in the tissues of filter-feeder organisms such as bivalve mollusks. These toxins can cause acute intoxication episodes in humans, a severe threat to aquaculture and fisheries. In the State of Pará, Brazil, oyster farming has community, artisanal and sustainable bases, using mangroves as cultivation environment and seed banks oysters. In small-scale production, there are often no established methods of safeguarding the health of consumers elevating the potential risks of shellfish poisoning outbreaks. Our study evaluated the presence of phycotoxins in oysters cultivated in five municipalities in the region of the Atlantic Amazon (Pará, Brazil) assessing the quality of the final product. We further evaluated the microalgae, water quality, and the spatio-temporal variation of physicochemical factors in the same area. Diatoms dominated the microalgae composition, followed by dinoflagellates, some of which are reported to be potentially toxic and producers of paralytic shellfish toxins. For the first time, we describe the occurrence of the potentially toxic dinoflagellate *Ostreopsis* sp. in the Amazon region. Furthermore, for the first time, toxins were detected in oyster farming in the northeast of the State of Pará, namely GTX2,3, STX, and dc-STX nevertheless, with nontoxic values. The identified toxins represent a potential threat to shellfish consumers.

Keywords: Dinoflagellates; Paralytic shellfish poison; Gonyautoxin; Saxitoxin

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

- Figura 1** – Mapa geográfico dos pontos de amostragem. Imagem superior: Litoral Nordeste do Pará dividido por municípios com atividade de ostreicultura (Amazônia Oriental, Brasil). **18**
- Figura 2** – Locais de amostragem: 1A – Lauro Sodré (Curuçá); 1B – Pererú de Fátima (São Caetano de Odivelas); 1C – Nazaré do Seco (Maracanã); 1D – Nova Olinda (Agusto Corrêa); 1E – Santo Antonio de Urindeua (Salinópolis). **19**
- Quadro 1:** Volume de GTX 1,4, NEO e ácido Clorídrico (0,003M) usados no preparo da solução estoque 1 PSP **24**
- Quadro 2:** Volume de GTX 2,3, dcSTX, GTX2,3, GTX5 e ácido Clorídrico (0,003M) usados no preparo da solução estoque 2 PSP **25**
- Quadro 3:** Preparação de solução de calibração PSP da solução trabalho 1 PSP diluída. **26**
- Quadro 4:** Preparação de solução de calibração PSP da solução trabalho 2 PSP diluída. **26**
- Quadro 5:** Volumes de GTX1,4, NEO, GTX2,3, dcSTX, GTX5 e ácido clorídrico (0,003M) usados no preparo de solução spiking PSP. **27**
- Figura 3** - Variação espacial e temporal da média e desvio padrão da densidade de microalgas na região de ostreicultura do Estado do Pará (Brasil) por (A) Mês; (B) período sazonal; (C) localização e (D) profundidade da Zona Eufótica (EuZ). **31**
- Figura 4** - Análise de redundância (RDA) entre distribuição espaço-temporal de microalgas e fatores ambientais na região de ostreicultura do Estado do Pará (Brasil). **32**
- Tabela 6** - Concentrações equivalentes de ficotoxinas identificadas em regiões de ostreicultura do Estado do Pará (Amazônia, Brasil). Em STX equiv./Kg, Kg refere-se a carne de ostra **33**
- Figura 5** - Cromatograma HPLC-FLD de padrões de toxina PSP (dc-STX, GTX2,3 e STX) usando oxidação pré coluna com periodato. Identidade do pico: 1-dc-STX; 2-GTX2,3; 3-STX. **34**
- Figura 6** - Cromatograma HPLC-FLD de padrões de toxina PSP (GTX-1,4 e NEO) usando oxidação pré-coluna com periodato. Identidade do pico: 1-GTX1,4; 2--NEO. **35**

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	7
1.1 - OBJETIVO GERAL.....	10
1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 – MICROALGAS E FICOTOXINAS	11
2.1.1 - PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)	11
2.2 - CIANOBACTÉRIA.....	13
2.3 - DINOFLAGELADOS	14
2.4 - MICROALGAS E FICOTOXINAS EM AMBIENTES COSTEIROS AMAZÔNICOS.....	16
2.5 – MONITORAMENTO E LEGISLAÇÃO NO BRASIL	16
3 - MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 - ÁREA DE ESTUDO	18
3.2 - MICROALGA E CLOROFILA- a.....	19
3.3 - PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA.....	20
3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3.5 – PREPARAÇÃO DE REAGENTES PARA ANÁLISE DE PSP.....	21
3.5.1 - Solução de ácido acético 0,1M.....	21
3.5.2 - Formiato de amônio em água e acetronitrila 0,1M.....	21
3.5.3 - Solução de hidróxido de sódio (1M)	22
3.5.4 - Solução de ácido periódico 0,03M.....	22
3.5.5 - Solução de fosfato de sódio 0,3M	22
3.5.6 - Solução de formiato de amônio 0,3M	22
3.5.7 - Solução de hidróxido de sódio 0,2 M	23
3.5.8 - Solução de oxidação de periodato 0,01M	23
3.5.9 - Solução de peróxido de hidrogênio aquoso 10% v/v.....	23

3.5.10 - Solução de ácido hidrolórico 0,003M.....	23
3.6 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE CALIBRAÇÃO PSP E SOLUÇÃO SPIKING.....	24
3.6.1 - PSP estoque 1 e 2	24
3.6.2 - Soluções trabalho PSP 1 e 2 e soluções de calibração	25
3.6.3 - Preparação de solução spiking PSP	26
3.7 - ANÁLISE DE SAXITOXINAS	27
3.7.1 - Limpeza C18	27
3.7.2 - Oxidação com periodato	28
3.7.3 - Oxidação com peróxido	28
3.7.4 - Quantificação	28
4 - RESULTADOS	30
4.1 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA.....	30
4.2 - MICROALGAS	30
4.3 - ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA.....	31
4.4 - IDENTIFICAÇÃO DE PSPS EM OSTRAS POR HPLC-FLD.....	33
5 - DISCUSSÃO	36
6 - CONCLUSÃO.....	40
BIBLIOGRAFIA	41
ANEXOS.....	51

1 - INTRODUÇÃO

A pesca e aquicultura constituem importantes atividades produtoras de alimento, nutrição e renda econômica para centenas de milhões de pessoas ao redor do mundo [1].

Na região amazônica o aumento da demanda de pescados, ocasionada pelo crescimento populacional mundial, vem intensificando uma grande exploração sobre os principais estoques pesqueiros, afetando as comunidades litorâneas e ribeirinhas que usam a pesca como meio de subsistência [2]. Estas modificações levam à migração de pescadores artesanais para outros empregos e ocupações fora do universo da pesca. Nesse contexto, o cultivo de organismos em águas continentais, estuarinas e marinhas é uma atividade do ramo da agropecuária considerada como uma das alternativas para o encaminhamento das soluções para o setor pesqueiro, representando significativo valor socioeconômico para as comunidades litorâneas e ribeirinhas [3].

No Brasil, estima-se que a aquicultura já contribui com 5% da produção de proteína animal, apresentando ritmo de crescimento [4]. Entre as modalidades de aquicultura, tem-se a piscicultura (cultivo de peixes), carcinocultura (cultivo de camarão), quelonicultura (criação de quelônios), malacocultura (cultivo de moluscos), sendo este último vem crescendo no mundo, onde a produção mundial de moluscos passou de 13,5 milhões de toneladas em 2010 para 17,5 milhões de toneladas em 2018 (totalizando USD 19 milhões), sendo que o Brasil aparece com uma produção de 22,1 toneladas de moluscos, sendo que a produção de ostras em 2018 foi 5,8 milhões de toneladas no mundo [1].

Entre os principais moluscos cultivados no Brasil destacam-se as ostras: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), *C. brasiliana* (Lamarck, 1819) e o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). A ostreicultura aproxima-se de um modelo de aquicultura ecologicamente sustentável, uma vez que reduz a pressão sobre os estoques naturais [3].

O cultivo de ostras é realizado em todas as regiões do Brasil, sendo que no Norte e Nordeste acontecem de forma artesanal ou experimental e, nas regiões Sul e Sudeste do país é praticada de forma industrial, observando-se a maior produtividade.

O cultivo de ostra na região sul tem se destacado como uma alternativa de emprego e renda, à medida que o produto ganha espaço no mercado, a exemplo do que vem acontecendo nas regiões sul e sudeste do Brasil [5].

Na análise da produção pesqueira marinha por espécie, observou-se que o grupo dos peixes representou 87% da produção total, seguido pelos crustáceos com 10% e moluscos com 3%. Em 2011, a produção pesqueira marinha de peixes foi de 482.335,7 t, representando um aumento de 3,6% em relação a 2010, quando foram produzidas 465.454,7 t. Em 2011, a produção pesqueira marinha de crustáceos foi igual a 57.344,8 t e de moluscos 13.989,4 t,

caracterizando um pequeno incremento de 1% e 0,3%, respectivamente, em relação a 2010 [6].

Entre os moluscos, o mexilhão aparece como a espécie mais capturada em 2011, com 3.772,5 t, o que representou aproximadamente 27% do total desta categoria. A segunda espécie mais capturada foi o sururu, com 2.133,3 t, seguida do polvo com 2.089,6 t. A captura de lulas foi de 1.623,6 t e ostras foi de 1.233,7 t em 2011. Em 2011, a produção aquícola nacional foi de 628.704,3 t, representando um incremento de 31,1% em relação à produção de 2010. Atualmente a produção aquícola marinha brasileira pode ser dividida basicamente em dois tipos: a malacocultura, que se refere à produção de moluscos, e a carcinicultura, que se refere à produção de crustáceos. A malacocultura, que possui a maior parte da produção oriunda do Estado de Santa Catarina, é baseada no cultivo de três espécies: o mexilhão (mitilicultura), a ostra do pacífico e a vieira (pectinicultura). Em 2011 a malacultura registrou uma produção de 18.541,7 toneladas. Sendo que a mitilicultura produziu 15.989,9 t, a ostreicultura 2.538,4 t e a pectinicultura 13,4 t [6].

No estado do Pará (Norte do Brasil), os primeiros experimentos de cultivo foram realizados entre 2001 à 2003 através do projeto “Moluscos Bivalves” e do projeto “Cultivo Experimental de Ostra do Mangue”, que utilizaram como base de pesquisas as comunidades localizadas nos municípios de Augusto Corrêa, Magalhães Barata, Maracanã, Bragança e São João de Pirabas [7].

Atualmente, a ostreicultura paraense vem se tornando uma das principais alternativas de geração de renda para 80 famílias, distribuídas nos municípios de Augusto Correa, Maracanã, Curuçá, São Caetano de Odivelas e Salinópolis, localizados na mesorregião Nordeste e Microrregião do Salgado no Estado do Pará, onde produção total aumentou de 8,25 toneladas em 2013 para 41,8 toneladas em 2016 [8]. Em 2020 a produção de moluscos no estado do Pará é de aproximadamente 50 toneladas, se tornando o quinto maior produtor do Brasil, onde Santa Catarina continua sendo o primeiro no ranking nacional com aproximadamente 13.000 toneladas [9].

Estes locais ainda são bastante conservados pela população local, porém o crescimento antrópico pode ocasionar problemas futuros, como aumento de produtos lançados nos estuários onde estão concentrados os cultivos de ostras.

A atividade antrópica tem levado a uma crescente contaminação das lagoas costeiras e estuários brasileiros. Essa contaminação causa mudanças na qualidade das águas, incluindo redução do oxigênio dissolvido, morte extensiva de peixes e aumento das incidências de florações de fitoplâncton em geral, principalmente dinoflagelados e cianobactérias potenciais produtores de toxinas [10].

Sob certas condições ambientais, como disponibilidade de luz, nutrientes e reduzida

dispersão pela ação de ventos, determinadas espécies fitoplanctônicas podem apresentar um aumento nas suas taxas de crescimento e de densidades celulares, caracterizando uma floração de microalgas (bloom) [10].

Florações naturais correspondem a um importante aumento na cadeia de produção biológica, levando a um aumento significativo de biomassa na base da cadeia alimentar e consequentemente, maior disponibilidade de alimentos para os elos subsequentes da rede [11]. Entretanto, em condições específicas, uma gama de efeitos pode ocorrer com uma floração, os quais variam de acordo com a espécie ou espécies de microalgas envolvida, caracterizando as chamadas florações de algas nocivas (Harmful Algal Blooms – HABS).

Há basicamente dois tipos de HABS, o primeiro envolve microalgas produtoras de toxinas e o segundo, não tóxico, é formado, por exemplo, por espécies cuja estrutura celular pode provocar danos mecânicos em outros organismos, ou são produtoras de metabólitos que inibem o desenvolvimento de outras espécies, alterando a dinâmica da cadeia alimentar. Um bloom pode acarretar riscos pelo acúmulo de sua biomassa, degradando habitats de outros organismos ao impedir a passagem de luz para o fitoplâncton de outra zona fótica, ou afetando a co-ocorrência de outras espécies pela depleção de oxigênio, ao gerar condições de anoxia na água pela sua própria decomposição [12].

As florações podem acarretar doenças e até a morte, principalmente dos animais filtradores e dos animais que se alimentam destas florações. Na estrutura celular destes organismos que provocam as florações (espécies com cerdas ou valvas pontiagudas, por exemplo) podem provocar danos mecânicos nos aparelhos de filtração de muitos animais, propiciando infecções por bactérias oportunistas.

Diante dos expostos e de trabalhos publicados este trabalho foi pautado em três hipóteses:

Os fatores ambientais influenciam às variáveis físico-químicas das águas de ostreicultura da Amazônia atlântica (Pará, Brasil).

Os fatores ambientais e as variáveis físico-químicas influenciam a dinâmica espaço-temporal das microalgas das águas de ostreicultura da Amazônia atlântica (Pará, Brasil).

As ficotoxinas podem ser encontradas em ostras provenientes de ostreicultura artesanal de ambientes preservados da Amazônia atlântica (Pará, Brasil).

1.1 - OBJETIVO GERAL

Determinar a dinâmica espaço-temporal das microalgas associadas aos fatores físico-químicos da água e Identificar as Toxinas Paralíticas de Mariscos em ostras do gênero *Crassostrea* sp. de cultivo de aquicultores da região nordeste do estado do Pará.

1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a qualidade das águas e a variação espaço-temporal dos fatores físico-químicos e das microalgas da região de ostreicultura;

Identificar a influência dos fatores ambientais (físico-químicos, precipitação e ventos) sobre a dinâmica das microalgas na região de ostreicultura;

Identificar a presença das Toxinas Paralíticas de Mariscos em ostras cultivadas na região costeira.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – MICROALGAS E FICOTOXINAS

As microalgas constituem um grupo polifilético de organismos unicelulares fotossintéticos que vivem principalmente na água e participam das cadeias tróficas aquáticas, da produção do oxigênio atmosférico e dos ciclos biogeoquímicos. Exibem uma ampla diversidade de morfologia, tamanho, fisiologia, metabolismo e revestimento resultando em uma variedade de estratégias adaptativas que lhes permitem colonizar habitats muito diferentes, desde águas doces e oceanos até ambientes terrestres [13–16].

Algumas destas microalgas possuem importância sanitária, ambiental e de saúde humana, pois quando crescem aceleradamente promovem o fenômeno de florações ou blooms, o qual geralmente vem acompanhado da produção de toxinas que alteram a qualidade da água para o consumo humano e animais, influenciam nos estoques pesqueiros e comprometem a economia de uma região ou país [17,18].

As ficotoxinas marinhas, como são conhecidas as toxinas produzidas por microalgas marinhas, são compostos orgânicos produzidos por microalgas unicelulares (Chromista), principalmente por dinoflagelados e diatomáceas [19]. Entre os dinoflagelados, as espécies planctônicas *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Gymnodinium* e as espécies bentônicas *Prorocentrum* e *Ostreopsis* são os produtores de toxinas mais relatados [20,21]. O gênero *Pseudo-nitzschia* são as principais diatomáceas planctônicas envolvidas nesses eventos tóxicos [22]. As cianobactérias também são responsáveis pela produção de ficotoxinas em ambientes marinhos [23,24] representadas principalmente pelas espécies *Nodularia spumigena* Mertens ex Bornet & Flahault e *Trichodesmium*.

As microalgas marinhas produtoras de ficotoxinas constituem as chamadas Algas nocivas e estão relacionadas a várias síndromes humanas devido ao consumo direto de água contendo as toxinas ou pelo consumo de peixes e mariscos contaminados. Abaixo, têm-se informações sobre as ficotoxinas e as principais microalgas e/ou grupos microalgais associados, enfatizando as PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) ou Toxina Paralisante de Frutos do Mar ou PSP-saxitoxina, devido os objetos deste estudo serem a saxitoxina e alguns congêneres e sua presença em bivaves de região de ostreicultura.

2.1.1 - PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)

Os PSTs, também chamados de Saxitoxinas (STXs), são um grupo de neurotoxinas produzidas por dinoflagelados marinhos e por cianobactérias de água doce. Em termos ambientais há alterações nas características da água, notadamente, na cor e odor desagradáveis.

Até agora, mais de 50 análogos deste grupo de toxinas foram descritos com diferentes

toxicidades, com saxitoxina (STX) sendo o composto mais representativo devido à sua potente toxicidade e caracterização inicial [25].

O nome da toxina (saxitoxina) é derivado do molusco do qual foi purificado, *Saxidomus giganteus*. A estrutura química básica dessas toxinas é baseada em uma esqueleto de 3,4,6-trialquil tetra-hidropurina e, de acordo com suas cadeias laterais de substituintes, são classificados em cinco grupos principais: carbamato, N-sulfocarbamoil, decarbamoil, 13-desoxicarbamoil e toxinas hidroxibenzoato [26].

Quando microalgas produtoras de toxinas parálíticas de marisco (PSTs) se desenvolvem, as toxinas são principalmente acumuladas por organismos filtradores, na maioria dos casos sem efeitos adversos sobre eles. A forma mais comum de intoxicação por mariscos em humanos normalmente ocorre a partir da ingestão de alimentos crus ou cozidos mexilhões, ostras, berbigões, vieiras, amêijoas, búzios, winkles, algumas lagostas e caranguejos (caranguejos xantídeos) [26–28]. Após a ingestão de mariscos contaminados, essas toxinas são responsáveis pela síndrome de intoxicação parálítica por marisco (PSP) em humanos, caracterizada por sintomas como sensação de formigamento ao redor dos lábios, gengivas e língua; dormência das extremidades; e em casos extremos, fatalidades devido à paralisia dos músculos respiratórios [26].

O limite permitido de PSP toxicidade em moluscos bivalves vivos foi estabelecida na União Européia como $800 \mu\text{g STXdiHCl eq kg}^{-1}$ (medido no corpo inteiro ou em qualquer parte comestível separadamente) (EC/EU 2021).

Não há antídoto conhecido para PSP com o único tratamento adequado sendo respiração artificial, embora alguns defendam a administração de carvão ativado na esperança de quelar toxinas ainda a serem tomadas do intestino da vítima [26]. Devido a programas de monitoramento, casos em humanos são pouco frequentes e os relatos mais comuns são em animais, sobretudo mamíferos domésticos como cachorros [29].

Em toda a América Latina ocorreram 249 registros, de 1970 a 2019, de intoxicações com ficotoxinas, com um total de 1.432 intoxicações humanas, incluindo 37 fatalidades, sendo que a maioria destes eventos compreendeu PSPs com 49% dos casos [30].

No Brasil há uma escassez de informação sobre ficotoxinas relacionadas às PSPs e os estudos concentram-se nas regiões Sul e Suldeste do País. As PSPs encontradas até o momento na região costeira do Brasil incluem palitoxina, saxitoxinas e congêneres (NeoSTX, GTX1-4, C1, C2), provenientes de várias microalgas, como *Dynophysis acuminata*, *Ostreopsis ovata*, *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum* [31].

2.2 - CIANOBACTÉRIA

Em água doce, as florações mais comuns são promovidas por cianobactérias e são fortemente influenciadas pela eutrofização artificial, isto é, entrada excessiva de nutriente no ambiente aquático, principalmente nitrogênio e fósforo, por fontes difusas e pontuais [32].

As florações de cianobactérias alteram a viscosidade, odor e o sabor natural da água, diminuem a concentração e oxigênio, diminuem a transparência da água e introduzem toxinas denominadas cianotoxinas que compromete a segurança da água para o consumo [33–35].

Ecologicamente nas florações há uma alteração na estrutura da comunidade das microalgas, onde a dominância de algumas poucas espécies modifica a estrutura trófica do ambiente. Por exemplo, dominâncias de cianobactérias, representada por uma ou duas espécies, causam a diminuição da diversidade de microalgas, assim como a diminuição dos consumidores primários (zooplâncton) selecionando algumas espécies em detrimento de outras [36–39].

Florações de cianobactérias são relatadas em todo mundo [35,40–43] com crescente aumento associado ao aumento da eutrofização, mencionado anteriormente, e às mudanças climáticas [44]. As cianotoxinas estão associadas as florações e variam conforme a predominância da espécie, as toxinas mais comuns em florações de água doce é a Microcistina-MC, uma hepatotóxica, sendo a variante MC-LR a mais tóxica e/ou mais bem estudada (DÍEZ-QUIJADA *et al.* , 2019) produzida pelas espécies do gênero *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Limnothrix*, *Nostoc*, *Phormidium*, and *Planktothrix* [45,46].

As intoxicações ocorrem na grande maioria pela ingestão crônica e acidental de água contaminada por cianotoxina, mas existem casos associados a contatos recreativos, onde existe o contato prolongado com a água (banho, mergulho, esqui aquático) ou com aerossóis durante a prática de esportes aquáticos, consumo de contaminados hortaliças e frutas irrigadas com água contendo cianotoxinas; consumo de organismos aquáticos (peixes, mariscos, etc.) de águas contaminadas e ingestão oral de suplementos dietéticos de cianobactérias, sem controle de níveis de toxinas [17,47].

Sobre estas a ingestão e banho se pode citar os episódios de intoxicação ocorridos com vários adolescentes meninos previamente saudáveis que nadavam em uma lagoa coberta com cianobactérias coberta de espuma em Wisconsin (EUA). Todos ficaram doentes com sintomas leves a graves e proximadamente 48 h após a exposição, um dos meninos que ingeriu água sofreu uma convulsão e morreu de insuficiência cardíaca, sendo a cianotocina (anatoxina-a) a provável causa da morte (BEHM, 2003). Também mortes de animais domésticos e selvagens estão associados a intoxicação por cianobactérias [48,49].

Ressalta-se o caso mais conhecido no mundo sobre intoxicação com cianotoxina por rota intravenosa, trata-se de uma intoxicação em massa de pacientes de uma clínica de

hemodiálise, no estado de Pernambuco (Brasil) em 1996, abastecida por água contaminada por cianotoxina e que levou a morte de dezenas de pacientes e estabeleceu um marco nos estudos de intoxicação humana letal pelas hepatotoxinas [50,51].

Em ambientes marinhos e costeiros os registros de florações de cianobactérias são reportados por espécies *Nodularia* e *Trichodesmium* [52]. Florações de *Trichodesmium* estão associadas a entrada de esgoto nos ambientes marinhos como ocorre no sudeste do Mar Mediterrâneo [53]. Entretanto, em Oceano Aberto, como o Oceano Atlântico Sul, florações de *Trichodesmium* foram associadas a elevadas concentrações de saxitoxinas, uma cianotoxina neurotóxica, as quais são prejudiciais a larvas de camarões e a comunidade planctônica [54]. Este gênero também está associado a produção de palitoxina, uma potente neurotoxina marinha que intoxica o humano através da ingestão de água ou consumo de e caranguejos e peixes contaminados [55].

Já a cianobactéria *Nodularia spumigena* tem sido relatadas em episódios de florações em ambientes costeiros da Austrália com bioacumulação em tainhas [56]. Florações anuais de *Nodularia spumigena* ocorrem nas águas salobras do Mar Báltico produzindo uma toxina denominada nodularina, uma hepatotoxina, que afeta a biota sendo detectada no zooplâncton copépodo, em mexilhões azuis (com elevadas concentrações da toxina 70-230 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), peixes pelágicos e bentônicos como o arenque e linguado[57].

Estas florações constituem as Harmful algal blooms (HABs) ou Floração de algas nocivas (FANs) que ocorrem no Mar Báltico afetando toda a região costeira do Norte da Europa e contaminando e causando a morte de peixes e bivalves incluindo ostras [58].

Apesar das ficotoxinas produzidas por cianobactérias apresentarem menor ocorrência entre as HABs ou FANs, estudos sobre sua ocorrência de ficotoxinas de cianobactérias e sua relação com a biota aquática são importantes. Neste contexto, estudos recentes envolvendo principalmente os bivalves *Corbicula fluminea* e *Crassostrea virginica*, ostras de importância econômica em diferentes regiões do mundo, incluindo o Brasil, onde *Crassostrea virginica* é encontrada em zonas costeiras, descrevem que estes bivalves acumulam cianotoxinas (microcistinas) e constituem um vetor de hepatotoxicidade em estuários com florações de cianobactérias do gênero *Microcystis* [59].

Logo, ostras provenientes de regiões estuarinas com florações com *Microcystis*, produtoras de Microcistinas, devem ser estudadas para mitigar os riscos de intoxicação em humanos pelo consumo de bivalve.

2.3 - DINOFLAGELADOS

Os dinoflagelados constituem o grupo de microalgas mais citados como produtor de toxina no mundo em regiões costeiras e oceânicas, portanto, é componente principal das HABs

[60].

Os dinoflagelados são um grupo monofilético de organismos principalmente unicelulares unidos por um conjunto de características únicas, incluindo inserção flagelar, pigmentação, organelas e características do núcleo, que os distinguem de outros grupos. Está presentes em todas as latitudes, mais diversos e abundantes em águas marinhas tropicais e subtropicais. Aproximadamente metade das espécies pertence ao protozooplâncton, poucas são estritamente autotróficas, e muitas delas mixotróficas capazes de produção fotossintética e fagotrófica [61,62]. Em ambientes marinhos juntamente com as diatomáceas constituem com a metade da fixação do carbono global realizada pelos oceanos [63].

Eutrofização, ressurgências, alterações hidrológicas, ventos e alterações de temperatura por mudanças climáticas são as principais causas das florações de dinoflagelados em regiões costeiras [64–66].

As espécies mais citadas como formadoras de florações tóxicas são planctônicas do gênero *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Gymnodinium*. As Florações mais reportadas são com o dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* H.W.Graham. Na China, por exemplo, essa espécie tem causado problemas econômicos e ambientais afetando muitas áreas de cultivo de marisco [27,67], onde se encontra toxinas.

Em áreas costeiras do México como a baía de Manzanillo e baía Santiago, têm-se registradas florações de *Gymnodinium catenatum* da ordem de $1,02 \times 10^7$ células/L e identificada saxitoxinas em amostras de ostras locais (1525,8 µg STXeq/100g) [68].

Também na Costa Chinesa florações tóxicas são causadas por espécies de dinoflagelados no gênero *Alexandrium*. *Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum*, *Dinophysis acuminata* ou *Dinophysis fortii* têm sido referenciados como causadores de florações tóxicas nas ressurgência de Belgela estendendo-se de Cabo Frio, no norte da Namíbia, até Cabo das Agulhas no extremo sul da África [66].

Dinoflagelados bentônicos *Prorocentrum gracile*, e planctônico *Gymnodinium catenatum* e *Alexandrium tamarense* tem causado florações tóxicas na Venezuela [69]. Em toda a América Latina as espécies mais citadas são as espécies *Alexandrium catenella/tamarense*, *Gymnodinium catenatum* e *Dinophysis acuminata*, sendo *Alexandrium fragae* Branco e Menezes foi recentemente descrita para águas brasileiras, Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, a qual produz a PSP GTX_{2,3} e ST [30,70].

As espécies bentônicas *Ostreopsis* spp. é encontrada em regiões de águas rasas e das 11 espécies descritas, sete são toxigênicas e produzem vários compostos que representam uma grande ameaça à saúde humana e ambiental [71]. Nas últimas décadas tem crescendo a ocorrência de *Ostreopsis* com eventos de florações em águas temperadas e tropicais

produzindo ficotoxina neurotóxica palitoxina. Exemplos de florações ocorrem ao longo do Mar Mediterrâneo, como o exemplo de florações tóxicas em Portugalia, Atlântico NE, a ocorrência de *Ostreopsis cf. siamensis* e *Ostreopsis cf. ovata* foi relatado desde 2008 e 2017 [72].

Foram registradas florações de *Ostreopsis cf. ovata* em Currais de um arquipélago costeiro localizado na costa subtropical brasileira [73]. Esta floração ocorreu em temperatura e irradiância crescentes e velocidade do vento decrescente a densidades celulares atingiram até $8,0 \times 10^4$ células cm^{-2} e os perfis de toxinas eram compostos principalmente de ovatoxina-a (58%) e ovatoxina-b (32%), até 35,5 pg PLTX-eq. célula⁻¹ no total. Os mexilhões foram contaminados durante a floração com níveis inseguros de toxina (até 131 μg PLTX-eq. kg^{-1}).

Na Região Norte do Brasil, a produção de ostras é relativamente recente e tem bases comunitárias e estudo sobre a qualidade ambiental aquática tem caminhado à princípio para identificar as espécies presentes nas águas do cultivo, na avaliação das características físico-químicas da água e na determinação de toxinas presentes nas águas e em ostras. Assim, Faustino *et al.* (2021) avaliou o efeito da toxicidade dos dinoflagelados *Prorocentrum lima* e *Ostreopsis cf. ovata* sobre as ostras nativas *Crassostrea gasar* e os resultados indicaram que *C. gasar* suscetível a *O. cf. ovata*, a qual prejudicou a fisiologia e os mecanismos de defesa da ostra podendo levar a maior aumento da suscetibilidade das ostras *C. gasar* a infecções parasitárias.

2.4 - MICROALGAS E FICOTOXINAS EM AMBIENTES COSTEIROS AMAZÔNICOS

A Zona Costeira Amazônica Brasileira abrange os estados de Amapá, Pará e Maranhão, possui altas temperaturas e precipitação anual, baixa variação térmica anual, elevada amplitude de maré e uma extensa área de manguezais. É uma região, onde processos costeiros, como ventos, marés e deposição de sedimentos pelo rio Amazonas são bastantes variáveis [74].

O fitoplâncton nesta região é dominado por diatomáceas com mais de 80% da composição e tendo os dinoflagelados (Myzozoa) como segundo componente, sendo os gêneros mais frequentes *Dinophysis*, *Gonyaulax*, *Oxytoxum*, *Prorocentrum*, *Protoperdinium* e *Tripos* [75–78].

Estudos sobre ficotoxinas foram realizados apenas em ambientes de água doce [33,36,79], em ambientes salobros não há trabalhos publicados, sendo de grande necessidade os estudos devido ao crescimento de cultivo de ostras no estado do Pará. Sobre isso, o monitoramento de algas nocivas e de ficotoxinas é necessário para assegurar alimento seguro para a população.

2.5 – MONITORAMENTO E LEGISLAÇÃO NO BRASIL

A análise de algas nocivas e biotoxinas em moluscos de fazendas de cultivo iniciou-se

no Estado de Santa Catarina em 1997 e dando apoio a maricultura local. Onde se deu iniciou o programa piloto de monitoramento desenvolvido pelo Laboratório de Estudos sobre Algas Nocivas, da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), sendo o pioneiro no litoral brasileiro. Com a criação do Comitê Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (CNCMB), extinto em 2012, incluiu não só o monitoramento microbiológico, mas também o de ficotoxinas envolvendo os moluscos bivalves. A análise microbiológica e de toxinas marinhas é exigida pelo Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves – PNCMB, dentro da Instrução Normativa Interministerial (INI) n.º 7, de maio de 2012, assinada pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este documento foi criado para se rastrear toda a produção do setor levado ao consumo humano, como ostras, berbigões, vieiras e mexilhões. A Portaria MPA n.º 204, de junho de 2012 (alterada pela Portaria n.º 175 de 15 de maio de 2013), cria metodologias para amostragem e procedimento operacionais padrão (POP) para identificação de microorganismos potenciais produtores de ficotoxinas em bivalves.

A IN n.º 3, de abril de 2012 (MAPA), estabelece a RENAQUA – Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura, onde os laboratórios da rede são responsáveis por estabelecer e aplicar metodologias para identificação de bactérias, vírus, protozoários, microalgas e possíveis toxinas produzida por estes [80]. A RENAQUA estabelece os limites aceitáveis de biotoxinas produzidas por micro algas para a venda destes moluscos de fazendas de cultivo, estabelecendo valores aceitáveis estabelecidos em outros países. Os valores são os mesmos adotados pela União Européia que é 0,8 mg equivalentes de saxitoxina, onde se analisam a parte mole do molusco e água do local de cultivo, para análise qualitativa, quantitativa de microalgas e outros microorganismos. As espécies de moluscos coletadas para o monitoramento são os mexilhões; e, no caso de não haver mexilhões na área de cultivo, a coleta deve contemplar a espécies cultivadas no local, como ostras ou vieiras. A legislação recomenda que em áreas onde não haja o cultivo de mexilhões sejam colocadas cachopas de outros moluscos para coleta de amostras, devendo ser alternados os pontos para evitar a viciação da amostragem [80].

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ÁREA DE ESTUDO

Os municípios pertencem à Mesorregião do Nordeste Paraense e à Microrregião do Salgado (Figura 1), localizados em área estuarina do estado.

As coletas foram realizadas nos meses de março, junho, setembro e novembro de 2017 nas comunidades de ostreicultores localizadas nos Municípios de Curuçá (Comunidade da Vila Lauro Sodré), São Caetano de Odivelas (Comunidade Pereru de Fátima), Maracanã, Augusto Corrêa (Nova Olinda) e Salinópolis (Santo Antonio de Urindeua). Em cada comunidade situou-se um ponto de amostragem, onde foram coletadas amostras de água para análise das microalgas (com ênfase nas planctônicas), parâmetros físico-químicos da água e coleta de ostra (Figura 2)..

Os locais de estudo fazem limite ao norte com o oceano Atlântico. Estes locais têm uma cobertura de manguezais nas faixas litorâneas e semi - litorânea, as terras firmes são cobertas por florestas. Possuem uma grande rede hidrográfica cortando os manguezais que convergem para o oceano.

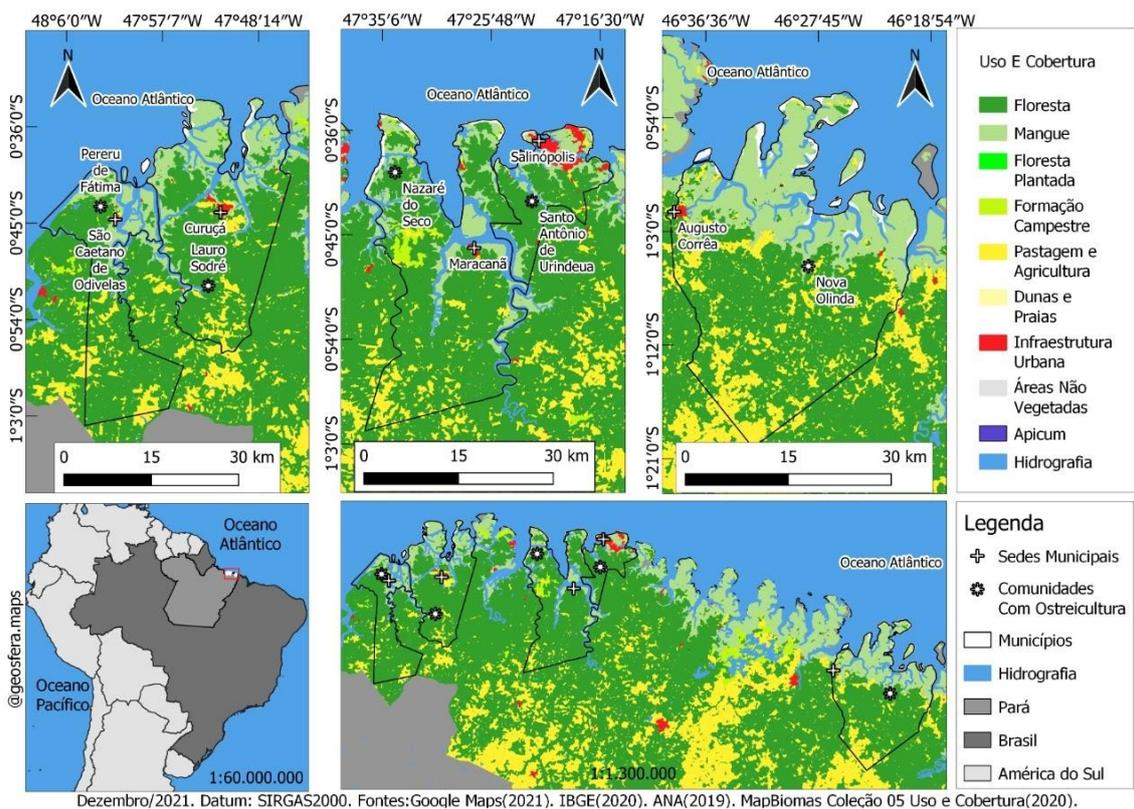


Figura 1 – Mapa geográfico dos pontos de amostragem. Imagem superior: Litoral Nordeste do Pará dividido por municípios com atividade de ostreicultura (Amazônia Oriental, Brasil). Os municípios estudados são indicados com um sinal de milho. Da esquerda para a direita: São Caetano de Odivelas (comunidade Pererú de Fátima), Curuçá (comunidade Lauro Sodré), Maracanã (comunidade Nazaré do Seco), Salinópolis (Santo Antônio de Urindeua) e Augusto Corrêa (Nova Olinda). Imagem inferior, à esquerda: Localização do estado do Pará, norte do Brasil, leste da Amazônia. Imagem inferior, à direita: pontos de amostragem



Figura 2 – Locais de amostragem: 1A – Lauro Sodré (Curuçá); 1B – Pererú de Fátima (São Caetano de Odivelas); 1C – Nazaré do Seco (Maracanã); 1D – Nova Olinda (Agusto Corrêa); 1E – Santo Antonio de Urindeua (Salinópolis).

3.2 - MICROALGA E CLOROFILA- a

Para análise qualitativa de microalgas, uma rede de plâncton de 20 μm foi usada para arrastar o subsolo da água horizontalmente por três minutos. O material coletado foi fixado com solução de formol a 4% [81] e analisado por microscópio triocular (Axio Lab. A1, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com oculares de medição (Axiocam MRc, Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Amostras quantitativas de microalgas foram obtidas da água coletada com a garrafa de Van Dorn fixada em lugol acético. A contagem de microalgas usando microscopia inversa (Observer D1 Zeiss, Alemanha) seguiu o método descrito na APHA 2012, seção 10200F [81]. Todas as células (cenóbias, frústulas, células lóricas, colônias ou filamentos) foram consideradas um organismo (org/L). A identificação, nomenclatura e classificação taxonômica estavam de acordo com a literatura especializada [82,83]. A identificação taxonômica do gênero *Ostreopsis* foi realizada com base em suas características morfológicas em microscopia de luz e, apesar de sua teca fina, contorno, forma de lágrima, dimensões, cloroplastos marrom-dourado foram as principais características observadas para este gênero[84].

As amostras de clorofila-a foram filtradas a vácuo através de filtros de celulose de tamanho de poro de 0,45 μm . Os pigmentos foram extraídos com 90% de acetona e clorofila-a foram medidos de acordo com métodos padrão 10.200 H com um espectrofotômetro Hach DR6000 [81].

3.3 - PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA.

A transparência da água foi medida usando disco de Secchi. A temperatura da água ($T^{\circ}\text{C}$), potencial hidrogeniônico (pH), salinidade, condutividade elétrica (CE), sólidos total dissolvido (STD) e oxigênio dissolvido (OD) foram medidos *in situ* usando sonda multiparamétrica HI 9828 (HANNA®, USA).

Outros parâmetros foram medidos a partir da amostragem de águas superficiais usando garrafa de Van Dorn. Alíquotas de 1 L foram armazenadas em frascos de polipropileno e as análises seguiram a recomendação 1060 do *Standard Methods for the Examination of Water and Waste water* [81].

A turbidez, cor verdadeira foram determinadas pelo método nefelométrico 2130 B [85] e os sólidos totais em suspensão (STS) pelo método fotométrico [86]. A demanda bioquímica do oxigênio (DBO) foi determinada pelo método 5210 B e a demanda química do oxigênio (DQO) pelo método colorimétrico em refluxo fechado (5220D), ambos determinados por espectrometria no UV-VIS (modelo DR 3900), de acordo com APHA [81]. Nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), nitrogênio amoniacal (N-NH_3), dureza e sulfato (SO_4^{2-}) foram determinados em cromatógrafo de íons ICS Dual 2000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) com supressão química da condutividade do eluente, método 4110 B da APHA [81].

3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variações dos fatores ambientais foram analisadas por meio de uma Análise de Variância Multivariada Não Paramétrica Bidirecional PERMANOVA, uma vez que os valores mesmo transformados não atingiram a normalidade multivariada através dos testes de Mardia e Doornik, e Hansen Omnibus. Uma Análise de Variância Univariada foi realizada usando os testes de Kruskal-Wallis e o teste post hoc de Dunn para valores de densidade. Para todos os testes, foi considerada significância estatística inferior a 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software livre Past 4.06 para Windows [87].

As espécies indicadoras do ambiente (IndVal—Valor indicativo da espécie) foram determinadas conforme descrito anteriormente [88]. A significância estatística do IndVal foi testada pela técnica de Monte Carlo por meio de 9.999 permutações [89] utilizando o software PCORD 5 [90]. A partir da matriz de espécies indicadoras significativas, o RDA, foi realizada análise de ordenação canônica utilizando uma matriz biológica com as espécies indicadoras significativas (IndVal) transformadas em Hellinger e a matriz ambiental contém os valores das variáveis físico-químicas, precipitação e ventos, transformadas em Rangin [89].

3.5 – PREPARAÇÃO DE REAGENTES PARA ANÁLISE DE PSP

Todos os reagentes foram preparados e etiquetados com datas de preparação, data de validade e nome do responsável técnico que preparou as soluções. O phmetro foi calibrado diariamente com solução de calibração ph 7.01 e ph 4.01 antes de ser usado para preparação dos reagentes.

3.5.1 - Solução de ácido acético 0,1M

Aproximadamente 50mL de água deionizada foi colocado em um frasco de 100mL e usando pipetas calibradas, 572 μ L de ácido acético glacial foi transferido para o frasco com água. O volume foi completado para 100mL com água deionizada. O frasco foi misturado várias vezes por inversão e em seguida o volume do frasco foi transferido para uma garrafa de Duran e refrigerado até o uso por um período de 7 dias.

3.5.2 - Formiato de amônio em água e acetronitrila 0,1M

Dependendo do número de amostras a ser analisada, a quantidade de fase móvel pode variar. A seguinte descrição refere-se a 2L de solução de formiato de amônio (0,1M). Formiato de amônio (12,62 \pm 0,05g) foi pesado em um béquer de 100mL usando uma balança analítica de pelo menos três casas decimais. O formiato de amônio foi dissolvido usando água deionizada (~40mL) e a solução transferida para um frasco de 2L. O béquer foi lavado duas vezes com ~20 mL de água deionizada e transferido para o frasco de 2L. Água deionizada foi adicionada (~3cm abaixo da marca graduada) e a solução transferida para o béquer de 2L e agitada com uma barra de agitação magnética. Usando o ph-metro calibrado, o pH da solução foi ajustado para pH6 por adição gota a gota de ácido acético (0,1M) usando uma pipeta Pauster. A solução foi transferida para uma garrafa de 2L usando um funil e completada com água deionizada. A garrafa foi fechada e a solução misturada várias vezes por inversão. A solução foi transferida para uma garrafa de Winchester e etiquetada como fase móvel A com data de produção e validade (duas semanas após a preparação). Uma fase móvel adicional contendo solvente orgânico foi preparada em um volume menor, comparado a fase móvel A, devido ao uso nominal durante a análise. Solução de formiato de amônio (500mL), previamente preparado como fase móvel A, foi colocada em um frasco de 500mL. Usando um dispenser com uma pipeta plástica graduada descartável, 25mL de formiato de amônio foi removido do frasco e substituído por 25mL de acetronitrila. A solução foi fechada e misturada várias vezes por inversão e transferida para uma garrafa de Duran de 500mL. Esta solução foi transferida para uma garrafa Winchester (2,5L) e etiquetada como fase móvel B, com data de preparo e validade, respectivamente (duas semanas após a preparação).

3.5.3 - Solução de hidróxido de sódio (1M)

Pellets de hidróxido de sódio ($4\pm 0,02\text{g}$) foram pesados dentro de bquer de 50mL usando uma balança de 3 casas ou superior. Água deionizada foi adicionada ao um bquer ($\sim 20\text{mL}$) e a solução gentilmente misturada até desaparecer totalmente os “pellets”. A solução foi transferida para um frasco de 100mL. O bquer foi lavado várias vezes com água deionizada e o lavado transferido a um frasco volumétrico. O frasco foi completado com água deionizada, fechado e misturado por inversão várias vezes. A solução de hidróxido de sódio (1M) foi transferida para uma garrafa de Duran de 100mL e estocada a temperatura ambiente por um período máximo de um mês.

3.5.4 - Solução de ácido periódico 0,03M

Ácido periódico ($0,34\pm 0,01\text{g}$) foi pesado em um bquer usando uma balança de 3 casas decimais. Água deionizada foi adicionad a um bquer ($\sim 20\text{mL}$) e a solução gentilmente misturada até desaparecimento total de alguns cristais de ácido periódico. A solução foi transferida para um frasco volumétrico. O bquer foi lavado várias vezes com água deionizada e o lavado colocado no frasco. O frasco foi completado com água deionizada, fechado e misturado por inversão várias vezes. A solução de ácido periódico (0,03M) foi então transferida para uma garrafa de Duran de 50mL, protegida da luz com papel alumínio e refrigerada de 4 a 8°C por um período máximo de um mês.

3.5.5 - Solução de fosfato de sódio 0,3M

Fosfato de sódio ($2,13 \pm 0,01\text{g}$) foi pesado em um bquer de 50mL usando uma balança de três casas decimais. Usando uma garrafa de lavagem, água deionizada foi adicionada ao bquer ($\sim 20\text{mL}$) e a solução foi gentilmente misturada até dissolução de cristais de fosfato de sódio. A solução salina foi transferida para um frasco de 50mL e o bquer foi lavado várias vezes com água deionizada e os lavados foram adicionados ao frasco. O frasco foi completado com água deionizada, fechado e a solução misturada várias vezes por inversão. A solução de fosfato de sódio (0,3M) foi transferida para uma garrafa de Duran de 50mL e estocada a temperatura ambiente por período máximo de um mês.

3.5.6 - Solução de formiato de amônio 0,3M

Formiato de amônio ($0,95\pm 0,01\text{g}$) foi pesado dentro de um bquer de 50mL usando uma balança de três casas decimais ou mais. Usando uma garrafa de lavagem, água deionizada foi acionada ao bquer ($\sim 20\text{mL}$) e a solução gentilmente misturada até o desaparecimento de total de dos cristais de formiato de amônio. A solução salina foi transferida para um frasco de 50mL

e o béquer foi lavado várias vezes com água deionizada e os lavados foram adicionados ao frasco. O frasco foi completado com água deionizada, fechado e misturado várias vezes por inversão. A solução de formiato de amônio (0,3M) foi transferida para uma garrafa de Duran de 50mL e estocada e refrigerada (4-8°C) por período máximo de um mês.

3.5.7 - Solução de hidróxido de sódio 0,2 M

Hidróxido de sódio ($0,40 \pm 0,01$ g) foi pesado dentro de um béquer de 50mL usando uma balança de três casas decimais ou mais. Usando uma garrafa de lavagem, água deionizada foi adicionada ao béquer (~25mL) e a solução gentilmente misturada até a dissolução total dos sais. A solução salina foi transferida para um frasco de 50mL e o béquer foi lavado várias vezes com água deionizada e os lavados foram adicionados ao frasco. O frasco foi completado com água deionizada, fechado e misturado várias vezes por inversão. A solução de hidróxido de sódio (0,2M) foi transferida para uma garrafa de Duran de 50mL e estocada a temperatura ambiente por período máximo de um mês.

3.5.8 - Solução de oxidação de periodato 0,01M

Usando uma pipeta calibrada, foi transferido para um béquer de 50mL, 8mL de solução de ácido periódico (0,03M), 8mL de solução de formiato de amônio (0,3M) e 8mL de solução de fosfato de sódio (0,3M). A solução de periodato foi misturada usando uma barra magnética a baixa velocidade para evitar respingo. Usando um pHmetro calibrado, o pH da solução foi ajustado ($8,20 \pm 0,02$) por gotejamento de solução de hidróxido de sódio (0,2M) usando uma pipeta Pasteur. A solução foi transferida para uma garrafa de Duran de 25mL e estocada por refrigeração (4-8°C) antes do uso. A solução oxidante de periodato era preparada no dia antes do uso.

3.5.9 - Solução de peróxido de hidrogênio aquoso 10% v/v

A solução de 30% de peróxido de hidrogênio w/w (10mL) foi cuidadosamente pipetada com um dispenser descartável plástico com 10mL e transferido para uma garrafa de Duran de 50mL. Água deionizada (20mL) foi adicionada a garrafa de Duran usando cilindro com medição de 25mL. A solução foi misturada várias vezes e estocada a 4-8°C por um período de 7 dias.

3.5.10 - Solução de ácido hidrolórico 0,003M

Usando uma pipeta calibrada, 0,5mL de ácido hidrolórico 0,1M foi pipetado em um frasco volumétrico de 20mL previamente preenchido com 16,2mL de água deionizada. A solução foi misturada várias vezes e transferida para uma garrafa de Duran de 20mL. A solução

foi estocada a temperatura ambiente por período máximo de 1 mês.

3.6 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE CALIBRAÇÃO PSP E SOLUÇÃO SPIKING

3.6.1 - PSP estoque 1 e 2

As soluções de calibração NRC são combinadas em duas soluções PSP estoques padrão de trabalho, PSP estoque 1 e PSP estoque 2. Ao preparar as soluções PSP estoques 1 e 2, os frascos volumétricos usados são pesados após cada adição das soluções de calibração e ácido hidrolórico diluente (0,003M HCl). Uma nota é feita para cada peso no livro de padrões de análises de toxinas. Destes valores, as concentrações das toxinas nas PSP estoques 1 e 2 são calculadas e registradas no livro de padrões de análises de toxinas. A data de validade das soluções estoques, número da ampola NRC, número do equipamento balanceado são registrados no livro de padrões de análises de toxinas.

Para preparar PSP estoque 1 (NEO e GTX1,4 somente), coloque um frasco (vial) de 2mL em uma balança de 5 casas e tare. Transfira o volume correto de cada de solução de calibração NRC e ácido clorídrico, como na tabela 1, usando pipetas calibradas. O frasco foi misturado várias vezes por inversão e a solução estoque aliqnotada (~350mL) foi inserido no frasco de vidro âmbar de borosilicato de tampa rosqueada usando uma pipeta calibrada. Cada frasco (vial) foi estocado por refrigeração (4-8°C) até o uso.

Quadro 1: Volume de GTX 1,4, NEO e ácido Clorídrico (0,003M) usados no preparo da solução estoque 1 PSP

	NEO	GTX1,4	HCL
Solução de Calibração NRC (μM)	52,7	75,1	
Volume de solução de calibração NRC (μL)	61	28	1890
Stoque 1 PSP (μM)	1,99	1,99	

Para preparar a solução estoque 2 (STX, dcSTX, GTX2,3 e GTX5) foi usado um frasco de 3mL e seguido os procedimentos descritos para preparar a solução estoque 1, referindo-se a tabela 2 para a correta transferência de volume.

Quadro 2: Volume de GTX 2,3, dcSTX, GTX2,3, GTX5 e ácido Clorídrico (0,003M) usados no preparo da solução estoque 2 PSP

	STX	dcSTX	GTX2,3	GTX5	HCL

Solução de Calibração NRC (μM)	66,3	59	157	65	
Volume de solução de calibração NRC (μL)	72,4	81,76	31	74	2148
Stoque 2 PSP (μM)	2,00	2,01	2,03	2,01	

3.6.2 - Soluções trabalho PSP 1 e 2 e soluções de calibração

No dia das análises, frascos de PSP estoque 1 e 2 eram removidos do refrigerador e levados a temperatura ambiente. Uma diluição quádrupla foi realizada em ambas as soluções estoques de PSP para preparar duas soluções diluídas de soluções trabalho PSP. Para preparar a solução trabalho PSP1, foi transferido 100 μL de solução estoque 1 PSP e 300 μL de HCl (0,003 M) um frasco de vidro de 2mL de borosilicato com sépta e misturado usando um vórtex.

Para preparar a solução trabalho PSP2, foi transferido 150 μL de solução estoque 2 PSP e 450 μL de HCl (0,003 M) um frasco de vidro de 2mL de borosilicato com sépta e misturado usando um vortex. As soluções de calibração PSP são preparadas por diluição das soluções trabalho PSP 1 e 2 com 0,003M de HCl como detalhado nas tabelas 3 e 4. Cada frasco foi misturado após a preparação usando um vórtex. As soluções padrões de calibração PSP 1 são oxidadas por periodato somente, enquanto as soluções padrões de calibração PSP2 são oxidadas por periodato e peróxido.

Quadro 3: Preparação de solução de calibração PSP da solução trabalho 1 PSP diluída.

Toxina (μM)	Volume de solução trabalho PSP (1 μL)	Volume de HCl 0,003M	Etiqueta
Concentração	60	60	PSP 1
0,5	120	0	PSP1 0,5
0,375	90	30	PSP1 0,375
0,25	60	60	PSP 1 0,25
0,125	30	90	PSP 1 0,125

0,05	12	108	PSP1 0,005
------	----	-----	------------

Quadro 4: Preparação de solução de calibração PSP da solução trabalho 2 PSP diluída.

Toxina (μM)	Volume de solução trabalho PSP ($2\mu\text{L}$)	Volume de HCl 0,003M	Etiqueta
Concentração	90	90	PSP 2
0,5	180	0	PSP2 0,5
0,375	135	45	PSP2 0,375
0,25	90	90	PSP 2 0,25
0,125	45	135	PSP 2 0,125
0,05	18	162	PSP2 0,05

3.6.3 - Preparação de solução spiking PSP

A solução spiking PSP foi produzida das soluções padrões de GTX1,4, NEO, dcSTX, STX, GTX2,3 e GTX5. Para a preparação da solução spiking PSP, os vials de vidro âmbar foram pesados após a adição de cada solução de calibração e HCl (0,003M). Uma anotação foi feita de cada peso no livro de padrões de análises de toxinas. Destes valores, as concentrações das toxinas na solução spiking PSP foram calculados e registrados no livro de padrões de análises de toxinas. A data de validade da solução spiking PSP, número da ampola NRC, número da balança foram registrados no livro de padrões de análises de toxinas. Para preparar a solução spiking PSP, foi colocado um frasco (vial) de 2mL em uma balança de 5 casas e tarada. O volume correto de cada de solução de calibração NRC e ácido clorídrico, foi adicionado como mostra na tabela 5, usando pipetas calibradas. O frasco foi misturado várias vezes por inversão e alíquotas ($\sim 280\mu\text{L}$) da solução spiking PSP foi inserido no frasco de vidro âmbar de boroselicato de tampa rosqueada com $350\mu\text{L}$ usando uma pipeta calibrada. Cada frasco (vial) foi estocado por refrigeração ($4-8^\circ\text{C}$) até o uso.

Quadro 5: Volumes de GTX1,4, NEO, GTX2,3, dcSTX, GTX5 e ácido clorídrico (0,003M) usados no preparo de solução spiking PSP.

	STX	dcSTX	NEO	GTX1,4	GTX2,3	GTX5	HCl
Solução estoque [toxina] (μM)	157,6	65	65	80	157,6	65	

Volume de solução estoque	62,86	153	153	71	63	450	124,86
[Toxina] solução spiking (μM)	8,76	8,80	8,80	8,79	8,80	20	

3.7 - ANÁLISE DE SAXITOXINAS

As ostras para análise de saxitoxinas foram coletadas nos pontos de amostragem para fitoplancton nos seus respectivos locais de cultivo. As ostras coletadas para análise são da espécie *Crassostrea gasar*. Um total de 80 ostras foram abertas e o tecido mole removido das valvas. Os tecidos das ostras coletadas foram processados após as coletas, em seguida, congelado para análise. Os tecidos foram analisados para a presença de PSP toxinas usando o método de derivatização pré coluna [91].

Uma porção de 10 g de cada amostra de tecido comestível de ostra foi extraída em 10 mL de HCl 0,1 M fervendo por 5 minutos em um “beacker” de 50 mL, em seguida colocado em um refrigerador por 5 minutos para esfriar. A mistura foi transferida para um tubo de 50 mL e centrifugado por 10 minutos a 4500 rpm (3600g).

O sobrenadante foi colocado em um novo tubo graduado de 50 mL. O becker foi lavado com 7 mL de água e o enxágue colocado e novamente centrifugado novamente por 10 min a 4500 rpm (3600xg). O sobrenadante foi coletado no mesmo tubo graduado contendo a primeira porção do extrato. O volume de extrato foi completado até 20mL com água.

3.7.1 - Limpeza C18

Uma parte do extrato (1mL) foi passado através de um cartucho de SPE C₁₈ (Supelco) previamente condicionado com 6mL de metanol seguido de 6mL de água. O extrato foi coletado em tubo de centrífuga de 5mL. O cartucho foi então lavado com 2mL de água e combinado com o primeiro extrato.

Um cartucho de SPE de troca iônica de 3 mL de ácido carboxílico SPE (COOH) da Applied Separations (Spe-ed™) foi condicionado com 10 mL de acetato de amônio 0,01 M. Então uma alíquota de 1 mL de moluscos do extrato de ostra da etapa de limpeza SPE C18 foi diluído em 5 mL com água e o pH ajustado para 6,0 ($\pm 0,2$) com 1% de NH₄OH (Hidróxido de Amônio). A solução ajustada foi passada através do cartucho de SPE-COOH e o eluido coletado como fracção 1A. Depois 4 mL de água foi passada pelo cartucho e coletada como fracção 1B. As fracções 1A e 1B continham as toxinas C. As toxinas, GTX1,4, GTX2,3, B1, B2 e dcGTX2,3 foram recuperados com 4mL de solução de NaCl 0,01M como fracção 2.

O cartucho foi então eluído com 5 mL de solução de NaCl 0,3M e coletado como fração 3. Esta fração continha STX, NEO e dcSTX. Todas as frações foram analisadas por HPLC após oxidações com periodato. Para aumentar a sensibilidade do método (se necessário), cada fração pode ser concentrada até 1 mL sob uma corrente de nitrogênio 40°C antes das reações de oxidação sem afetar a análise.

3.7.2 - Oxidação com periodato

O a solução de periodato era preparada diariamente misturando-se 5 mL de ácido periódico 0,03 M (1,71 g a 250 mL com água), formiato de amônio 0,3M (4,73 g a 250 ml com água), e Na₂HPO₄ 0,3 M (20,1 g a 250 mL com água) e o pH ajustado para pH 8,2 com NaOH 0,2 M. Então um volume de 100 mL de solução padrão ou extrato de amostra após limpeza de troca iônica foi adicionada a 500 mL de reagente de periodato em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e misturado bem por vórtex. A solução reagiu por 1 min a temperatura ambiente, então 5 mL de ácido acético concentrado foi adicionado à solução e então misturado. O conteúdo ficava por 10 min à temperatura ambiente antes de injetar 50 µL (ou 100 µL) no sistema de Cromatografia Líquida (HPLC-FLD).

3.7.3 - Oxidação com peróxido

Um volume de 25 mL de H₂O₂ aquoso a 10% (p / v) foi adicionado a 250 mL de NaOH 1 M (4 g a 100 mL com água) em um tubo de microcentrífuga de plástico 1,5 mL. Então 100 mL de solução padrão ou extrato de amostra após a limpeza com C18 foi adicionado, misturado por vortex e permitido reagir por 2 min a temperatura ambiente. Um volume de 20 µL de ácido acético glacial foi então adicionado e misturado com a solução reagente. Uma alíquota de 25 µL desta solução foi analisada por HPLC - FLD.

3.7.4 – Quantificação

Saxitoxina, dcSTX, NEO, GTX_{2,3} (juntos) e GTX_{1,4} (juntos) foram as únicas toxinas (PSP) que foram quantificados neste estudo porque eram os únicos padrões analíticos que estavam disponíveis. Porém, estes padrões são os mais tóxicos e mais comumente encontrado toxinas PSP em mariscos. A resposta do detector (área do pico) foi determinada a partir de uma série de padrões de calibração através das reações de oxidação e da faixa linear estabelecida. Cada toxina foi determinada quantitativamente em tecido de ostras por comparação direta com padrões analíticos em concentrações previstas na amostra.

Por conveniência, duas misturas padrão analíticas foram usadas para quantificar as toxinas, sendo uma consistindo em saxitoxina (STX), dcSTX, e GTX_{2,3} e a segunda

consistindo de toxinas hidroxiladas, NEO e GTX1,4 (usadas apenas para oxidação de periodato).

4 - RESULTADOS

4.1 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

A análise de variância multivariada mostrou diferenças entre os meses, estações chuvosas e secas do presente estudo. O período seco apresentou alta profundidade, transparência, salinidade, alcalinidade, dureza, DBO (demanda bioquímica de oxigênio), DQO (demanda química de oxigênio), sulfato, nitrito e nitrato que os demais meses. Os dois últimos parâmetros aumentaram na estação seca em relação à estação chuvosa. Por outro lado, em março (estação chuvosa), observou-se um padrão oposto para esses parâmetros em relação aos demais meses avaliados.

Um padrão singular foi observado no município Augusto Corrêa, em relação aos demais pontos amostrais. As águas apresentaram maior salinidade, alcalinidade, dureza, DBO, DQO, cor aparente, sólidos totais suspensos e sólidos totais dissolvidos. A qualidade da água foi alterada em termos de oxigênio dissolvido (inferior a 5 mg/L, de acordo com o limite estipulado pela legislação brasileira para água salobra), nitrato (até 0,40 mg/L) e nitrito apresentou os maiores valores ($0,08 \pm 0,18$ mg/L).

O oxigênio dissolvido também foi alterado em novembro ($2,7 \pm 1,7$ mg/L) na amostra de Salinas, com média de 4,86 mg/L. Em todos os meses avaliados, período sazonal, profundidade da Zona Eufótica (ZUE) e local de cultivo de ostras, os teores de nitrato estavam acima do limite estipulado pela legislação brasileira para águas salobras. A concentração de nitrato é um parâmetro crítico para a qualidade da água (o limite é de até 0,040 mg/L, de acordo com a legislação brasileira) atingindo valores médios de 39 mg/L na estação seca, 49 mg/L na água superfície, e 72 mg/L na ostreicultura em Augusto Corrêa.

4.2 - MICROALGAS

Foram identificadas 102 espécies distribuídas em quatro divisões de microalgas: as diatomáceas (Bacillariophyta) foram o grupo de algas mais representativo, com 84 espécies, seguidas das dinoflageladas (Dinophyta) com 11 espécies (Anexo). A amostra coletada em março (estação chuvosa) apresentou a menor densidade ($82,56 \pm 173,7 \times 10^3$ org/L), enquanto que em novembro foi observada a maior densidade ($377,2 \pm 584,7 \times 10^3$ org/L) (Figura 3A). A avaliação geral das amostras coletadas nos períodos seco e chuvoso revelou maior densidade nos meses secos ($323,3 \pm 463,4 \times 10^3$ org/L) do que nos meses chuvosos (Figura 3B).

As diatomáceas foram predominantemente identificadas em junho (estação chuvosa), setembro (mês seco) e novembro (mês seco) (Figura 3A). Em março (estação chuvosa), os dinoflagelados foram mais representativos, compreendendo 76% da composição da amostra. A representatividade das espécies de cianobactérias aumentou de setembro a novembro (período

seco), correspondendo a 30% e 46% das microalgas, respectivamente (Figura 3A). Não houve diferença significativa na densidade entre os municípios produtores de ostras ($H = 1,5$; $p = 0,83$) e profundidades da ZEE ($H = 1,86$; $p = 0,40$) (Figura 3D). Elevada representatividade das cianobactérias foi observada em Curuçá (72%). O desvio padrão reflete o elevado número de espécies menos abundantes (com baixas densidades) contrabalançando as outras poucas espécies que foram mais representativas (mais abundantes).

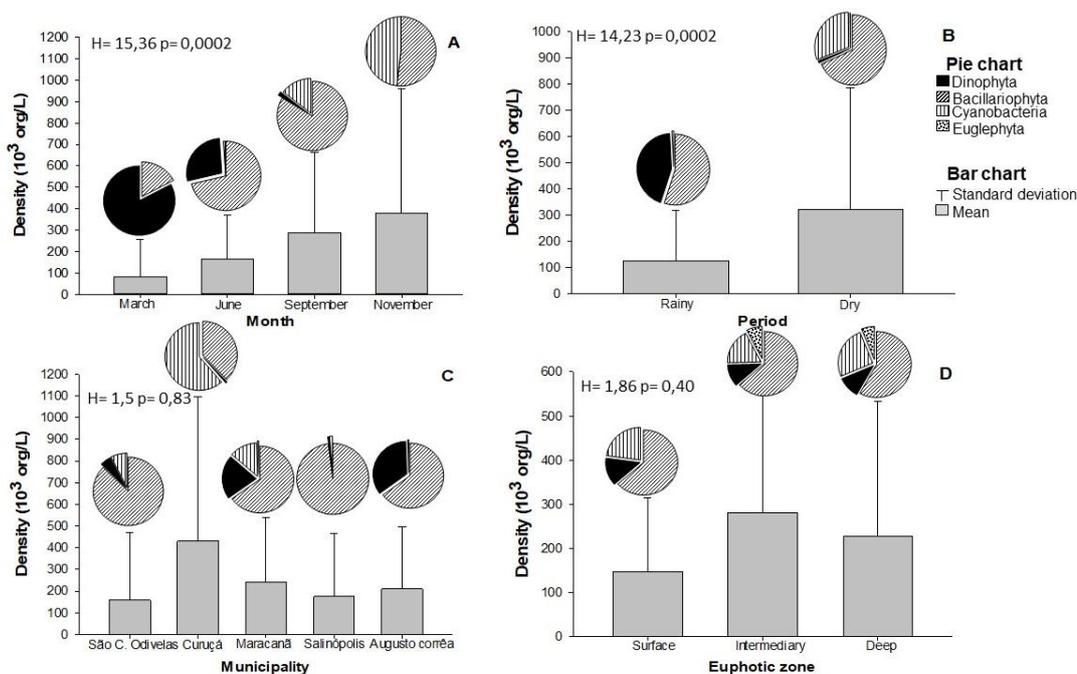


Figura 3 - Variação espacial e temporal da média e desvio padrão da densidade de microalgas na região de ostreicultura do Estado do Pará (Brasil) por (A) Mês; (B) período sazonal; (C) localização e (D) profundidade da Zona Eufótica (EuZ). Os valores representam a média por parâmetro proposto e em cada quadrante, apresentamos os dados analisados de forma individual e independente.

4.3 – ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA

Os dois primeiros eixos da análise de redundância (RDA) representaram 28,2% da variação das espécies quanto aos fatores físico-químicos e climáticos. A precipitação foi o fator ambiental que mais influenciou a distribuição das espécies entre as regiões de cultivo de ostras ($r = 0,938$). O eixo 1 (15,0%) estabeleceu um padrão sazonal das amostras, onde as amostras de março (período chuvoso) foram estabelecidas no quadrante positivo e correlacionadas com as variáveis DST ($r = 0,632$) com as espécies *Ostreopsis* sp., *Cyclotella striata* (Kütz.) Grunow, *Cymatosira belgica* Grunow e *Trachelomonas volvocana* (Ehrenberg) Ehrenberg como indicadores importantes para a estação chuvosa (IndVal = 50% ep = 0,03). Por outro lado, as amostras de setembro e novembro (período seco) foram posicionadas no quadrante negativo

(Figura 4). Essas amostras foram correlacionadas com a velocidade do vento ($r = -0,879$), transparência ($r = 0,500$), DQO ($r = -0,640$) e salinidade ($r = -0,665$). As espécies *Pseudonitzschia seriata* (Cleve) H. Peragallo, *Thalassionema frauenfeldii* (Grunow) Tempère & Peragallo, *Chaetoceros* sp., *Cyclotella stylonum* Brightwell e cianobactérias filamentosas foram indicadores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) desse período com IndVal de 64%, 77,7 %, 55,6%, 66,7% e 58,5%, respectivamente.

O eixo 2 (13,2%) separou as amostras de junho dos demais meses de acordo com as espécies de dinoflagelados do gênero *Peridinium* sp1., *Alexandrium* spp., *Prorocentrum* sp. e *Gymnodinium* sp. Essas espécies foram indicadores de junho com IndVal = 27,6% ($p = 0,04$), IndVal = 26,7% ($p = 0,011$), IndVal = 20,6% ($p = 0,026$), IndVal = 20,0% ($p = 0,04$), respectivamente. No entanto, não foram encontradas variáveis ambientais correlacionadas com este eixo, ou seja, não foi possível especificar os fatores ambientais que promoveram o crescimento dessas espécies no mês de junho.

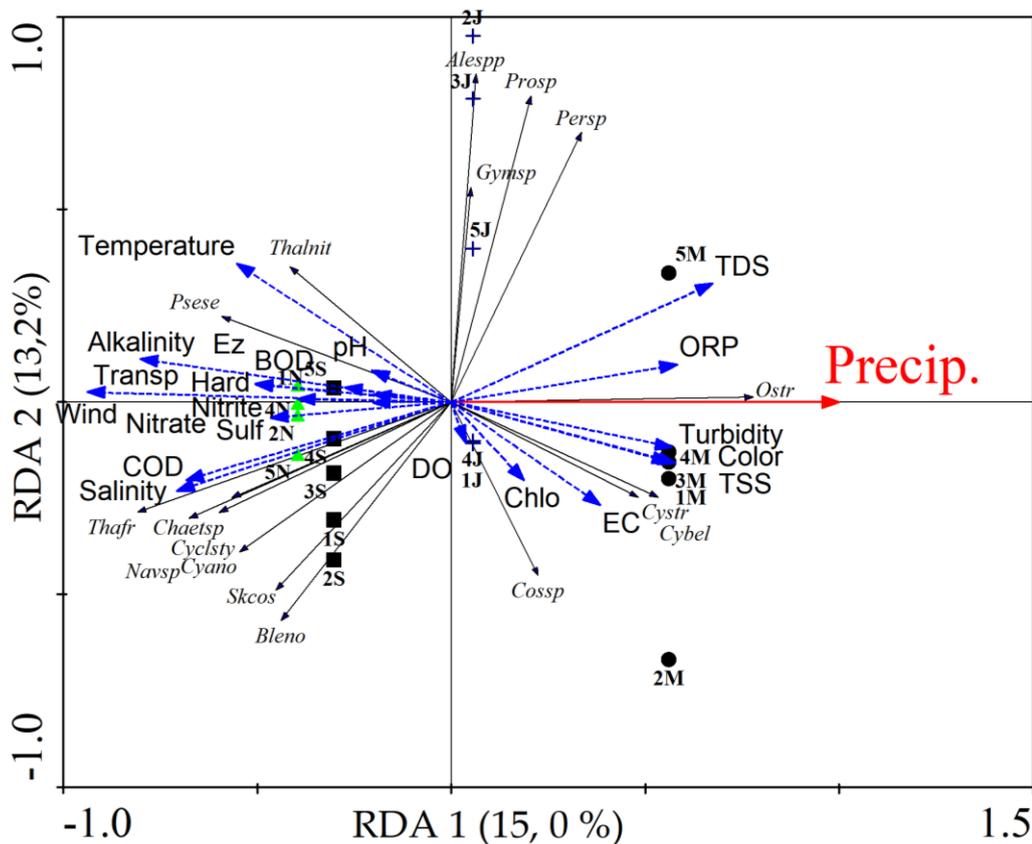


Figura 4 - Análise de redundância (RDA) entre distribuição espaço-temporal de microalgas e fatores ambientais na região de ostreicultura do Estado do Pará (Brasil): Precip.—precipitação; TDS—sólidos totais dissolvidos; ORP—potencial de redução de oxidação; Cor—cor aparente; TDS—sólidos totais dissolvidos; TSS—sólidos totais em suspensão; Ez—zona eufótica; Vento—velocidade do vento; Transp—transparência; Sulf—Sulfato; Duro—Dureza; DO—oxigênio dissolvido; DQO—demanda química de oxigênio; DBO—demanda bioquímica de oxigênio; EC—condutividade elétrica; Clo—clorofila-a; Alespp—*Alexandrium* spp.; Gymssp—*Gymnodinium* sp.; Prosp—*Prorocentrum* sp.; Persp—*Peridinium* sp.; Ostr—*Ostreopsis* sp.; Cystr—*Cyclotella striata*; Cybel—*Cymatosira belgica*; Cosp—*Coscinodiscus* sp.; Bleno—*Bleakeleya notate*; Skcos—*Skeletonema costatum*; Cyano—*Filamentous cyanobacteria*; Navsp—*Navicula* sp.; Cyclsty—*Cyclotella stylonum*; Chaetosp—

Chaetoceros sp.; *Thafr*—*Thalassionema frauenfeldii*; *Psepe*—*Pseudonitzschia seriata*; *Thalnit*—*Thalassionema nitzschioides*.

4.4 - IDENTIFICAÇÃO DE PSPS EM OSTRAS POR HPLC-FLD

O perfil da toxina PSP foi identificado comparando cromatogramas de amostra com padrões certificados (dc-STX, GTX2,3, STX, NEO e GTX1.4). A concentração de cada toxina PSP foi determinada usando gráficos de calibração com cinco níveis de concentração. As variantes GTX2,3, STX e dc-STX foram detectadas em todas as regiões do estudo (Figura 3).

Os valores de PSP variaram durante o período avaliado de 0,00032 a 0,421 mg STX equiv./Kg de carne de ostra. As concentrações das variantes GTX1,4 e NEO (Figura 4) ficaram abaixo dos limites de detecção (LOD).

Nas amostras de Augusto Corrêa, as concentrações de PSP nas ostras variaram de 0,0005 (março) a 0,155mg STX equiv./Kg de carne de ostra (setembro). Em Salinópolis, as concentrações variaram de 0,0002 421 mg STX equiv./Kg (março) a 0,421 mg STX equiv./Kg de carne de ostra (setembro). Nas amostras de Curuçá, as concentrações de PSP ficaram abaixo do LOD, com concentrações variando de 0,0018 (setembro) a 0,031 mg STX equiv./Kg de carne de ostra (novembro). Da mesma forma Curuçá, nas amostras do Maracanã, as concentrações ficaram abaixo do LOD e variaram de 0,0003 mg STX equiv./Kg (março) a 0,141 mg STX equiv./Kg de carne de ostra (setembro). Nas amostras de São Caetano de Odivelas, as concentrações de PSP variaram de 0,0004 a 0,106 mg STX equiv./Kg de carne de ostra em setembro. Em Curuçá, 0,031 mg STX equiv./Kg de carne de ostra de GTX2.3 foi detectado em novembro (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentrações equivalentes de ficotoxinas identificadas em regiões de ostreicultura do Estado do Pará (Amazônia, Brasil). Em STX equiv./Kg, Kg refere-se a carne de ostra.

Sampling Points	Months	GTX1,4 (Mg STX Equiv./Kg)	GTX2,3 (Mg STX Equiv./Kg)	STX (Mg STX Equiv./Kg)	dc-STX (Mg STX Equiv./Kg)	NEO (Mg STX Equiv./Kg)
São Caetano de Odivelas	Março	<LOD	<LOD	0.00249	<LOD	<LOD
	Junho	<LOD	0.0038	0.00052	0.00102	<LOD
	Setembro	<LOD	0.0049	0.106	0.00046	<LOD
	Novembro	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Curuçá	Março	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Junho	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Setembro	<LOD	0.0076	<LOD	0.0018	<LOD
	Novembro	<LOD	0.031	<LOD	<LOD	<LOD
Maracanã	Março	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Junho	<LOD	0.0044	0.000707	0.00273	<LOD
	Setembro	<LOD	0.083	0.141	0.00032	<LOD
	Novembro	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Salinópolis	Março	<LOD	<LOD	0.00024	<LOD	<LOD
	Junho	<LOD	0.003	0.00044	<LOD	<LOD
	Setembro	<LOD	<LOD	0.421	0.001	<LOD

	Novembro	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Augusto Corrêa	Março	<LOD	0.018	0.0172	0.00059	<LOD
	Junho	<LOD	0.012	<LOD	0.0018	<LOD
	Setembro	<LOD	0.023	0.155	0.00103	<LOD
	Novembro	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Os níveis de toxina detectados estão abaixo do valor considerado de risco à saúde humana, estabelecido pelo Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ministério da Agricultura, Pecuária). e Abastecimento, MAPA). A regulamentação brasileira segue as recomendações da União Européia, cujo limite máximo aceitável para PSP é 80 µg STX eq./100 g de carne de marisco.

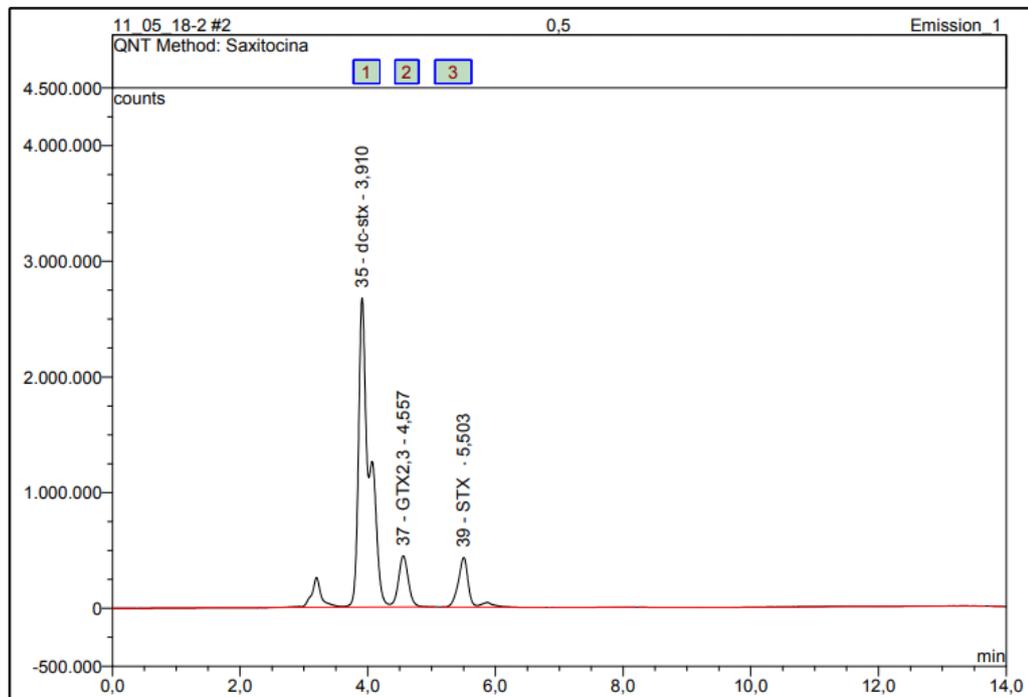


Figura 5 - Cromatograma HPLC-FLD de padrões de toxina PSP (dc-STX, GTX2,3 e STX) usando oxidação pré coluna com periodato. Identidade do pico: 1-dc-STX; 2-GTX2,3; 3-STX.

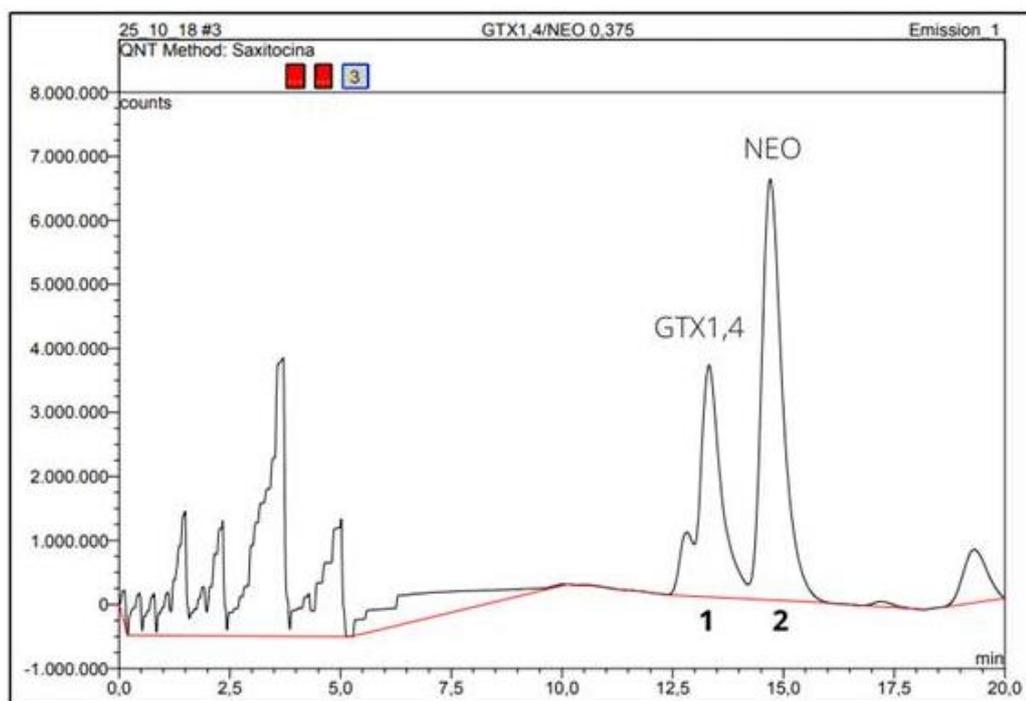


Figura 6 - Cromatograma HPLC-FLD de padrões de toxina PSP (GTX-1,4 e NEO) usando oxidação pré-coluna com periodato. Identidade do pico: 1-GTX1,4; 2--NEO.

5 - DISCUSSÃO

A sazonalidade, principalmente a precipitação, é a principal variável que influencia a dinâmica das microalgas e as propriedades físico-químicas da água na microrregião conhecida como Salgado Paraense. A precipitação é amplamente reconhecida como a variável climatológica mais importante na região tropical, incluindo a região costeira amazônica [92], que tem a bacia amazônica como principal promotora do ciclo hidrológico de toda a região [93].

O setor costeiro da Amazônia apresenta um total médio anual de precipitação que varia em torno de 3400 mm e apresenta a maior amplitude pluviométrica entre o trimestre mais úmido (fevereiro a abril) e o menos chuvoso (setembro a novembro), aproximadamente 560 mm quando comparado para outras regiões da Amazônia Oriental [92], confirmando a maior importância das chuvas para esta região. A precipitação influencia os aportes de sedimentos, matéria orgânica e salinidade na região de estudo [8]. Nas regiões costeiras da Amazônia, chuvas fortes durante os primeiros seis meses do ano (média de 326,8 mm) diluem os efeitos da influência marinha nas águas estuarinas [94]. Por outro lado, aumentam a influência de corpos limnéticos em águas costeiras, como no rio Tocantins sobre o estuário do rio Pará [95].

Sampaio *et al.* , (2020) estudaram a região de ostreicultura do nordeste do Pará, mesma região onde nosso estudo foi realizado. Eles descobriram que as variáveis avaliadas mudaram entre os períodos sazonais, incluindo salinidade, oxigênio dissolvido e potencial redox, consistente com o presente estudo. As alterações nas características físico-químicas da água parecem ser características dos locais de cultivo, inseridos em áreas de mangue. As variações das características físico-químicas foram mais perceptíveis em Augusto Corrêa, que possui a maior extensão de manguezais e contato direto com o Oceano Atlântico. Apesar da forte sazonalidade, a fração microplancônica do fitoplâncton coletado não apresenta variações temporais e espaciais significativas revelando um ambiente favorável para esses organismos ao longo do ano. Nossos resultados se opõem à análise realizada anteriormente em Bragança, outro ponto da região litorânea do Pará [94] . Os grupos de microalgas, no entanto, apresentaram comportamento esperado, como a representatividade e abundância de diatomáceas em ambientes salobras e salinos no mundo e na região de estudo [75,94,96] .

Os dinoflagelados foram o segundo grupo mais abundante em águas mais salobras do que salinas. As espécies identificadas são potencialmente produtoras de PSP [97] . Dentre os dinoflagelados identificados, destacamos *Ostreopsis* sp., que apresentou alta densidade ($614,7 \times 10^3$ org/L) no mês menos chuvoso, em comparação com a densidade das demais microalgas do presente estudo. A *ostreopsis* é um pequeno dinoflagelado marinho bentônico que freqüentemente forma florações tóxicas em águas temperadas e tropicais. Existem registros deste dinoflagelado no Atlântico NE, em Portugal, associado a ventos fracos, que permitem a

formação de floração no substrato, e ondas altas, que ressuspenderam as células à superfície [72]. No Brasil, esse dinoflagelado foi identificado no Arquipélago dos Currais em florações mucilaginosas e de coloração marrom atingindo a ordem de 105 células por cm² associadas aos perfis de ovatoxina-a e ovatoxina-b [73]. Em nosso estudo, a *Ostreopsis* foi identificada ao nível da microscopia óptica. Análises adicionais são necessárias para confirmar se ele se enquadra em uma espécie já descrita e se a espécie é produtora de toxinas.

Diferentes espécies de dinoflagelados produzem vários análogos de PSP, e surtos dessas toxinas previamente estudados têm sido atribuídos principalmente à ingestão de mexilhões e, menos frequentemente, a outros bivalves [98,99]. Os mexilhões são mais propensos a acumular toxinas por longos períodos e, assim, atingir níveis mais elevados de contaminação do que outros moluscos, representando um vetor de transmissão para humanos. No estado de Santa Catarina, Brasil, em 2006, uma concentração máxima de 600 µg STX equiv./Kg de carne de ostra foi encontrada em mexilhões marrons *Perna perna* [100], em áreas onde altas densidades de *Gymnodinium catenatum*. A ocorrência de PSP em áreas de maricultura vem sendo investigada desde 2006 no Estado de Santa Catarina. Em 2013, a toxicidade de PSP foi analisada em mexilhões da espécie *Perna perna* em uma fazenda de cultivo em uma área de maricultura na cidade de Arraial do Cabo, Estado do Rio de Janeiro [101].

Os dinoflagelados (Dinophyta) foram mais representativos no mês de junho (estação chuvosa) no Maracanã ($39,12 \pm 52,4 \times 10^3$ org/L) e Augusto Corrêa ($15,6 \pm 33,0 \times 10^3$ org/L), e durante a análise do eixo de redundância 2 (13,2%) separaram as amostras de junho dos demais meses de acordo com as espécies de dinoflagelados *Peridinium* sp.1., *Alexandrium* spp., *Prorocentrum* sp. e *Gymnodinium* sp. A presença de dinoflagelados nos meses úmidos e secos de 2017, principalmente em amostras de junho a setembro, sugere que *Alexandrium* spp. e *Gymnodinium* sp. pode ter proliferado ao longo do ano.

Após as análises de densidade, os valores máximos reportados foram no mês de junho (estação chuvosa), e em geral, os valores de densidade estão correlacionados com a toxicidade encontrada nos tecidos das ostras. Esses fatos indicam a possível correlação entre toxinas PSP e moluscos, e a ocorrência de espécies tóxicas, nas quais a presença da toxina PSP parece coincidir com a maior densidade de *Alexandrium* spp., e *Gymnodinium* sp. identificados durante o estudo.

Os resultados deste estudo estão de acordo com estudos estatísticos de longo prazo realizados em todo o mundo [102]. No entanto, não é previsível quando uma floração de dinoflagelados se desenvolverá e nem a densidade populacional de algumas espécies tóxicas. Condições climáticas e ambientais, como mudanças na salinidade, aumento da temperatura da água e aumento de nutrientes e luz solar, desencadeiam a germinação do cisto para um estágio

vegetativo que permite uma reprodução rápida [102].

Na Sardenha, as espécies de *Alexandrium* foram as principais causas de toxicidade em moluscos. Neste estudo, observou-se uma discrepância na abundância, ou seja, o baixo número de células e o alto nível de toxicidade [103,104], semelhante aos presentes estudos, onde as densidades de *Alexandrium* spp. ($11,4 \times 10^3$ org/L), e *Gymnodinium* sp. ($10,9 \times 10^3$ org/L) foram baixos, mas suficientes para produzir toxinas detectáveis.

A presença de espécies de *Alexandrium* não implica que a contaminação PST ocorra em moluscos, pois variáveis (período de amostragem, velocidade do vento, ressurgência e outros) podem ter um efeito importante [105] principalmente no consumo dessas algas por diferentes tipos de moluscos. Por exemplo, os mexilhões são capazes de acumular mais PSTs e mais rapidamente durante a proliferação de algas, ao contrário das vieiras, eles retêm altos níveis de toxinas por muito mais tempo e ostras e alguns moluscos têm baixa toxicidade [106]. Isso pode explicar as baixas concentrações de variantes de PSP em nosso estudo, mas esses níveis podem ter sido muito maiores no ambiente, mas as amostras coletadas foram apenas de ostras e não de mexilhões que também são cultivados nos municípios, mas para consumo comunitário.

Houve diferença nos perfis de toxina PSP, onde GTX2,3 foi encontrado em todos os locais de cultivo de ostras, seguido por STX e dc-STX. Os perfis NEO e GTX1,4 não foram detectados. Isso pode ser explicado, em parte, pela metodologia aplicada na extração de toxinas. O método de extração de ácido 0,1 M HCL em ebulição converte C3,4 em GTX1,4 e GTX6 (B2) em NEO, fazendo com que toxinas com uma porção N-sulfocarbamoil na posição 13 sejam convertidas em suas contrapartes carbamoil em baixo pH [107].

Moluscos contaminados por microalgas produtoras de PSP podem apresentar diferentes perfis de toxinas do organismo causador [108]. Essa transformação pode ser devido a diversos fatos, como as propriedades químicas das toxinas, como a epimerização, que ocorre espontaneamente nas toxinas. Os diferentes perfis também podem ser devidos à transformação química dentro do marisco, uma vez que redutores naturais comumente encontrados em mariscos, como glutathione e cisteína, podem causar a eliminação do grupo N-1 OH e também a eliminação do grupo O-sulfato. na posição 11 [108], ou mesmo pela atividade enzimática do marisco, uma vez que as enzimas carbamoilase catalisam a hidrólise da porção carbamoila ou N-sulfocarbamoila das toxinas PSP, transformando-as nos análogos carbamoila correspondentes.

Pela primeira vez, as variantes GTX2,3, STX e dc-STX foram detectadas na região amazônica, especificamente na zona costeira, apresentando resultados de grande relevância, que devem nortear os programas de monitoramento da qualidade da água e segurança alimentar na região. região. Embora as concentrações estimadas de toxinas não representem riscos para a

população consumidora de ostras, nossos resultados destacam a necessidade de controlar o nível de toxinas para proteger a saúde dos consumidores e evitar danos à economia pesqueira devido à interdição de áreas cultivadas.

6 - CONCLUSÃO

Este estudo apresenta a primeira ocorrência na Amazônia das variantes GTX2,3, STX e dc-STX em regiões de ostreicultura no nordeste do Estado do Pará em concentrações não prejudiciais à saúde humana. No entanto, nossos resultados destacam um risco potencial para os consumidores que exigem atenção dos órgãos públicos sobre a qualidade da água e a segurança alimentar. Destacamos também a primeira ocorrência de *Ostreopsis*, um dinoflagelado bentônico cosmopolita associado à produção de toxinas. Mudanças na qualidade da água em regiões de ostreicultura da Amazônia Atlântica podem estar associadas à falta de saneamento básico nos municípios e aos ciclos biogeoquímicos dos manguezais. Os fatores ambientais influenciam a dinâmica populacional das microalgas na região de ostreicultura. A identificação de toxinas paralíticas de moluscos em ostras estão associadas a presença de espécies de microlagas potencialmente produtoras de toxinas no período de março a novembro de 2017.

BIBLIOGRAFIA

- [1] FAO. Poisson from a petri dish. vol. 32. 2021. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- [2] ISAAC-NAHUM VJ. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros do litoral amazônico: um desafio para o futuro. *Revista Amazonia* 2006;33–6.
- [3] GRADVOHL MPGM. Avaliação técnico-financeira de um cultivo da ostra-do-mangue, *Crassostrea brasiliana* (LAMARCK , 1818), na comunidade GRACIOSA , município de TAPEROÁ , BAHIA. 2014.
- [4] DUTRA FM, BITTENCOURT F, FEIDEN A. Perfil Aquícola de Pequenas Propriedades Fronteiriças do Sudoeste do Paraná/Brasil. *Extensio: Revista Eletrônica de Extensão* 2014;11:180. <https://doi.org/10.5007/1807-0221.2014v11n17p180>.
- [5] BARRETO NE, SOUSA OV, VIEIRA RHSF. Moluscos bivalves: organismos bioindicadores da qualidade microbiológica das águas: uma revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 2008;2:17–29.
- [6] MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. 2011.
- [7] HOSHINO P. Avaliação e comparação de projetos comunitários de ostreicultura localizados no nordeste paraense. 2009.
- [8] SAMPAIO DS, SANTOS MLS, TAGLIARO CH, BEASLEY CR. Variation in environmental characteristics of waters among amazon coast oyster culture units. *Acta Amazon* 2020;50:295–304. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000250>.
- [9] IBGE. Produção da pecuária municipal 2020. Rio de Janeiro: 2020.
- [10] KARLSON B, CUSACK C, BRESNAN E. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. vol. 1037. 2010.
- [11] SMAYDA TJ. Bloom dynamics : physiology , behavior , trophic effects. *Limnol Oceanogr* 1997;5:1132–6.
- [12] ANDERSON DM, GLIBERT PM, BURKHOLDER JM. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 2002;25:704–26. <https://doi.org/10.1007/BF02804901>.
- [13] RAJA R, SHANMUGAN H, GANESAN V, CARVALHO IS. Biomass from Microalgae: An Overview. *Oceanography: Open Access* 2014;02:1–7. <https://doi.org/10.4172/2332-2632.1000118>.
- [14] BRODIE J, CHAN CX, de CLERCK O, COCK JM, COELHO SM, GACHON C, *et al.* The Algal Revolution. *Trends Plant Sci* 2017;22:726–38. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.005>.
- [15] BURKI F, ROGER AJ, BROWN MW, SIMPSON AGB. The New Tree of Eukaryotes. *Trends Ecol Evol* 2020;35:43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>.

- [16] GONÇALVES CA, FIGUEREDO CC. What we really know about the composition and function of microalgae cell coverings? - An overview. *Acta Bot Brasilica* 2020;34:599–614. <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0309>.
- [17] DROBAC D;, TOKODI N;, SIMEUNOVIC J;, BALTIC V;, STANIC D;, SVIRCEV Z. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013;64:305–16. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2320>.
- [18] YANG Y, CHEN J, CHEN X, JIANG Q, LIU Y, XIE S. Cyanobacterial bloom induces structural and functional succession of microbial communities in eutrophic lake sediments. *Environmental Pollution* 2021;284:117157. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117157>.
- [19] Tamele I, Silva M, Vasconcelos V. The Incidence of Marine Toxins and the Associated Seafood Poisoning Episodes in the African Countries of the Indian Ocean and the Red Sea. *Toxins (Basel)* 2019;11:58. <https://doi.org/10.3390/toxins11010058>.
- [20] Band-Schmidt CJ, Durán-Riveroll LM, Bustillos-Guzmán JJ, Leyva-Valencia I, López-Cortés DJ, Núñez-Vázquez EJ, *et al.* Paralytic toxin producing dinoflagellates in Latin America: Ecology and physiology. *Front Mar Sci* 2019;6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00042>.
- [21] Wang D-Z. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review. *Mar Drugs* 2008;6:349–71. <https://doi.org/10.3390/md20080016>.
- [22] Farabegoli F, Blanco L, Rodríguez L, Vieites J, Cabado A. Phycotoxins in Marine Shellfish: Origin, Occurrence and Effects on Humans. *Mar Drugs* 2018;16:188. <https://doi.org/10.3390/md16060188>.
- [23] Giménez-Campillo C, Pastor-Belda M, Campillo N, Arroyo-Manzanares N, Hernández-Córdoba M, Viñas P. Determination of Cyanotoxins and Phycotoxins in Seawater and Algae-Based Food Supplements Using Ionic Liquids and Liquid Chromatography with Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Toxins (Basel)* 2019;11:610. <https://doi.org/10.3390/toxins11100610>.
- [24] Metcalf JS, Banack SA, Wessel RA, Lester M, Pim JG, Cassani JR, *et al.* Toxin Analysis of Freshwater Cyanobacterial and Marine Harmful Algal Blooms on the West Coast of Florida and Implications for Estuarine Environments. *Neurotox Res* 2021;39:27–35. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00248-3>.
- [25] Rodríguez-Cabo T, Moroño Á, Arévalo F, Correa J, Lamas JP, Rossignoli AE, *et al.* Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in Mussels from the Eastern Cantabrian Sea: Toxicity, Toxin Profile, and Co-Occurrence with Cyclic Imines. *Toxins (Basel)* 2021;13:761. <https://doi.org/10.3390/toxins13110761>.

- [26] LLWELLYN LE. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat Prod Rep* 2006;23:200–22. <https://doi.org/10.1039/b501296c>.
- [27] ZHANG C, LIM P, LI X, GU H, LI X, ANDERSON DM. Wind-driven development and transport of *Gymnodinium catenatum* blooms along the coast of Fujian, China *Caiyun. Reg Stud Mar Sci* 2020;39:24. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101397>. Wind-driven.
- [28] BEN-GIGIREY B, ROSSIGNOLI AE, RIOBÓ P, RRODRÍGUEZ F. First report of paralytic shellfish toxins in marine invertebrates and fish in Spain. *Toxins (Basel)* 2020;12:1–12. <https://doi.org/10.3390/toxins12110723>.
- [29] BATES N, MORRISON C, FLAIG L, TURNER AD. Paralytic shellfish poisoning and palytoxin poisoning in dogs. *Veterinary Record* 2020;187:46. <https://doi.org/10.1136/vr.105686>.
- [30] SUNESEN I, MÉNDEZ SM, MANCERA-PINEDA JE, BOTTEIN DMY, ENEVOLDESEN H. The Latin America and Caribbean HAB status report based on OBIS and HAEDAT maps and databases. *Harmful Algae* 2021;102:101920. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101920>.
- [31] PROENÇA LAO, MAFRA JR. Ocorrência de ficotoxinas na costa brasileira. In: Sociedade Brasileira de Ficologia (org.). X Reunião Brasileira de Ficologia, Rio de Janeiro: 2005, p. 57–77.
- [32] HWANG SJ. Eutrophication and the ecological health risk. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:1–6. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176332>.
- [33] Sá LLC de, Vieira JM dos S, Mendes R de A, Pinheiro SCC, Vale ER, Alves FA dos S, *et al.* Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do Rio Tapajós, no Município de Santarém (Pará, Brasil). *Rev Panamazonica Saude* 2010;1. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000100022>.
- [34] DEEP PR, BHATTACHARYYA S, NAYAK B. Cyanobacteria in wetlands of the industrialized Sambalpur District of India. *Saline Syst* 2013;9:14. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-9-14>.
- [35] Srivastava A, Ahn C-Y, Asthana RK, Lee H-G, Oh H-M. Status, Alert System, and Prediction of Cyanobacterial Bloom in South Korea. *Biomed Res Int* 2015;2015:1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/584696>.
- [36] SOUSA EB. Fatores ambientais reguladores da dinâmica do fitoplâncton e das cianobactérias dos mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belém, PARÁ, BRASIL. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.
- [37] GER KA, URRUTIA-CORDERO P, FROST PC, HANSSON LA, SARNELLE O,

- WILSON AE, *et al.* The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. *Harmful Algae* 2016;54:128–44. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.005>.
- [38] LIU L, CHEN H, LIU M, YANG JR, XIAO P, WILKINSON DM, *et al.* Response of the eukaryotic plankton community to the cyanobacterial biomass cycle over 6 years in two subtropical reservoirs. *ISME Journal* 2019;13:2196–208. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0417-9>.
- [39] XU H, LIU W, ZHANG S, WEI J, LI Y, PEI H. Cyanobacterial bloom intensities determine planktonic eukaryote community structure and stability. *Science of the Total Environment* 2022;838:2003–5.
- [40] NDLELA LL, OOBERHOLSTER PJ, van WYK JH, CHENG PH. An overview of cyanobacterial bloom occurrences and research in Africa over the last decade. *Harmful Algae* 2016;60:11–26. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.001>.
- [41] AUBRIOT L, ZABALETA B, BORDET F, SIENRA D, RISSO J, ACHKAR M, *et al.* Assessing the origin of a massive cyanobacterial bloom in the Río de la Plata (2019): Towards an early warning system. *Water Res* 2020;181:115944. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115944>.
- [42] MATSON PG, BOYERr GL, BRIDGEMAN TB, BULLERJAHN GS, KANE DD, MCKAY RML, *et al.* Physical drivers facilitating a toxigenic cyanobacterial bloom in a major Great Lakes tributary. *Limnol Oceanogr* 2020;65:2866–82. <https://doi.org/10.1002/lno.11558>.
- [43] HUO D, GAN N, GENG R, CAO Q, SONG L, YU G, *et al.* Cyanobacterial blooms in China: diversity, distribution and cyanotoxins. *Harmful Algae* 2021;109:3.
- [44] Paerl HW, Gardner WS, Havens KE, Joyner AR, McCarthy MJ, Newell SE, *et al.* Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae* 2016;54:213–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.009>.
- [45] CATHARINE A., BERNARD C., SPOOF L., BRUNO M. Microcystins and Nodularins. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017, p. 107–26. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch11>.
- [46] WOOD SA., PUDDICK J., HAWES I., STEINER K., DIETRICH DR., HAMILTON DP. Variability in microcystin quotas during a *Microcystis* bloom in a eutrophic lake. *PLoS One* 2021;16:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254967>.
- [47] MELARAM R., NEWTON AR., CHAFIN J. Microcystin Contamination and Toxicity: Implications for Agriculture and Public Health. *Toxins (Basel)* 2022;14:350.

<https://doi.org/10.3390/toxins14050350>.

- [48] Stewart I, Seawright AA, Shaw GR. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds--an overview. *Adv Exp Med Biol* 2008;619:613–37. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_28.
- [49] Cherry C, Buttke D, Wild MA. Freshwater harmful algal blooms and cyanotoxin poisoning in domestic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2015;247:1004–5.
- [50] Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, *et al.* Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 1998;352:21–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12285-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12285-1).
- [51] Yuan M, Carmichael WW, Hilborn ED. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon* 2006;48:627–40. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.031>.
- [52] Poot-Delgado CA, Okolodkov YB, Rendón-von Osten J. Spatio-temporal Variation of Harmful Planktonic Microalgae and Cyanobacteria Along the Central Coast of Campeche, Southeastern Gulf of Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 2022;108:15–23. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03203-w>.
- [53] Rahav E, Bar-Zeev E. Sewage outburst triggers Trichodesmium bloom and enhance N₂ fixation rates. *Sci Rep* 2017;7:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04622-8>.
- [54] Detoni AMS, Costa LDF, Pacheco LA, Yunes JS. Toxic Trichodesmium bloom occurrence in the southwestern South Atlantic Ocean. *Toxicon* 2016;110:51–5. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.003>.
- [55] Patocka J, Gupta RC, Wu Q hua, Kuca K. Toxic potential of palytoxin. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science* 2015;35:773–80. <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1506-3>.
- [56] Stewart I, Eaglesham GK, McGregor GB, Chong R, Seawright AA, Wickramasinghe WA, *et al.* First report of a toxic nodularia spumigena (Nostocales/Cyanobacteria) bloom in sub-tropical Australia. II. bioaccumulation of nodularin in isolated populations of mullet (Mugilidae). *Int J Environ Res Public Health* 2012;9:2412–43. <https://doi.org/10.3390/ijerph9072412>.
- [57] Carlsson P, Rita D. Sedimentation of Nodularia spumigena and distribution of nodularin in the food web during transport of a cyanobacterial bloom from the Baltic Sea to the Kattegat. *Harmful Algae* 2019;86:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.05.005>.
- [58] Karlson B, Andersen P, Arneborg L, Cembella A, Eikrem W, John U, *et al.* Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe. *Harmful Algae* 2021;102:101989. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101989>.

- [59] Straquadine NRW, Kudela RM, Gobler CJ. Hepatotoxic shellfish poisoning: Accumulation of microcystins in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and Asian clams (*Corbicula fluminea*) exposed to wild and cultured populations of the harmful cyanobacteria, *Microcystis*. *Harmful Algae* 2022;115:35623692. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102236>.
- [60] Li J, Persson KM. Quick detection method for paralytic shellfish toxins (PSTs) monitoring in freshwater - A review. *Chemosphere* 2021;265:128591. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128591>.
- [61] Carty S, Parrow MW. Dinoflagellate. *Freshwater Algae of North America* 2015;2:1–4.
- [62] Taylor FJR. The biology of dinoflagellates. *Botanical Monographs. Botanical Monographs* 1987;21:785.
- [63] Benoiston AS, Ibarbalz FM, Bittner L, Guidi L, Jahn O, Dutkiewicz S, *et al.* The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2017;372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>.
- [64] Falkowski PG, Oliver MJ. Mix and match: How climate selects phytoplankton. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:813–9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1751>.
- [65] Kubryakov AA, Lishaev PN, Aleskerova AA, Stanichny SV, Medvedeva AA. Spatial distribution and interannual variability of cyanobacteria blooms on the North-Western shelf of the Black Sea in 1985-2019 from satellite data. *Harmful Algae* 2021;110:102128. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102128>.
- [66] Pitcher GC, Louw DC. Harmful algal blooms of the Benguela eastern boundary upwelling system. *Harmful Algae* 2021;102:101898. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101898>.
- [67] Liu M, Gu H, Krock B, Luo Z, Zhang Y. Toxic dinoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* and their cysts in Taiwan Strait and their relationship to global populations. *Harmful Algae* 2020;97:101868. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101868>.
- [68] Quijano-scheggia S, Olivos-ortiz A, Bustillos-guzmán JJ, Garcés E, Gaviño-rodríguez JH, Galicia-pérez MA, *et al.* Bloom of *Gymnodinium catenatum* in Bahía Santiago and Bahía Manzanillo, Colima, Mexico. 2012;60:173–86.
- [69] Barbera-Sánchez AmeliaL, Soler JF, Rojas De Astudillo L, Chang-Yen I. Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in Margarita Island, Venezuela. *Rev Biol Trop* 2004;52:89–98.
- [70] Branco S, Oliveira MMM, Salgueiro F, Vilar MCP, Azevedo SMFO, Menezes M. Morphology and molecular phylogeny of a new PST-producing dinoflagellate species:

- Alexandrium fragae sp. nov. (Gonyaulacales, dinophyceae). Harmful Algae 2020;95:101793. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101793>.
- [71] Chomérat N, Bilien G, Derrien A, Henry K, Ung A, Viallon J, *et al.* *Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo (Dinophyceae, Gonyaulacales) from French Polynesia (South Pacific Ocean): A revisit of its morphology, molecular phylogeny and toxicity. Harmful Algae 2019;84:95–111. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.02.004>.
- [72] SANTOS M, OLIVEIRA PB, MOITA MT, DAVID H, CAEIRO MF, ZINGONE A, *et al.* Occurrence of *Ostreopsis* in two temperate coastal bays (SW Iberia): insights from the plankton. Harmful Algae 2019;86:20–36. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.003>.
- [73] TIBIRIÇÁ CEJA, LEITE IP, BATISTA TVV, FERNANDES LF, CHOMÉRAT N, HERVE F, *et al.* *Ostreopsis* cf. *Ovata* bloom in currais, Brazil: Phylogeny, toxin profile and contamination of mussels and marine plastic litter. Toxins (Basel) 2019;11. <https://doi.org/10.3390/toxins11080446>.
- [74] Pereira LCC, Dias JA, Carmo JA do, Polette M. Prefácio: A Zona Costeira Amazônica Brasileira. Revista de Gestão Costeira Integrada 2009;9:3–7. <https://doi.org/10.5894/rgci172>.
- [75] SOUSA EB, COSTA VB, PEREIRA LCC, COSTA RM. Microfitoplâncton de águas costeiras amazônicas: ilha Canela (Bragança, PA, Brasil). Acta Bot Brasílica 2008;22:626–36. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000300004>.
- [76] Costa RM, Matos JB, Pinto KST, Cajueiro L, Pereira C. Phytoplankton of a dynamic Amazon sandy beach. J Coast Res 2013:1751–6. <https://doi.org/10.2112/SI65-296>.
- [77] Queiroz JBM, Oliveira ARG de, Costa KG da, Brito EP, Fernandes FD dos S, Nunes ZMP, *et al.* Phytoplankton of the shipping sector of São Marcos Bay (Amazon Coast): A potential risk area for the establishment of non-indigenous species. Reg Stud Mar Sci 2022;49:102121. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102121>.
- [78] Andrade MP, Magalhães A, Pereira LCC, da Costa RM. Effects of environmental variables on mesozooplankton dynamics in an Amazonian estuary. Ecohydrology & Hydrobiology 2022:20–1. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2022.05.002>.
- [79] Vieira JMDS, Azevedo MTDP, de Oliveira Azevedo SMF, Honda RY, Corrêa B. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. Toxicon 2003;42:709–13. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.08.004>.
- [80] SCHRAMM MA, PROENÇA LAO. Cultivo de moluscos: Monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas. Panorama Da Aquicultura 2008;106:48–54.
- [81] APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION . Standard methods for the

- examination of water and wastewater. 23rd ed. Washington: Unity State American: American Public Health Association; 2017.
- [82] BICUDO CEM, MENEZES M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. 2nd ed. São Carlos, Brasil: RiMA; 2006.
- [83] KOMÁREK J, ANAGNOSTIDIS K. Chroococcales. In Süßwasserflora von mitteleuropafreshwater flora of central Europa. Cyanoprocaryota 1. Teil, Berlin, Germany: Spektrum Akademischer Verlag; 2008, p. 548.
- [84] Sato S, Nishimura T, Uehara K, Sakanari H, Tawong W, Hariganeya N, *et al.* Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific Coast, with Special Reference to a Novel Clade from Japan. PLoS One 2011;6:e27983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027983>.
- [85] APHA. American public health association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2012:1946.
- [86] Krawczyk D, GONGLEWSKI N. Determining Suspended Solids Using a Spectrophotometer. Sewage and Waste 1969;31:1159–64.
- [87] Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 2001;4:9–18.
- [88] GALLAGHER ED, LEGENDRE P. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. Oecologia 2001;129:271–80.
- [89] VALENTIN JL. Ecologia numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interciência; 2012.
- [90] Mccune B, Melford MJ. PC-ORD : multivariate analysis of ecological data 1999.
- [91] LAWRENCE JF, NIEDZWIADK B. Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning. J AOAC Int 2001;84:1099–108.
- [92] AMANAJÁS JC, BRAGA CC. Padrões espaço temporal pluviométrico na Amazônia oriental utilizando análise multivariada. Revista Brasileira de Meteorologia 2012;27:423–34.
- [93] FASSONI-ANDRADE AC, FLEISCHMANN AS, PAPA F, PAIVA RCD, WONGCHUIG S, MELACK JM, *et al.* Amazon hydrology From space: scientific advances and future challenges. Reviews of Geophysics 2021;59:1–97. <https://doi.org/10.1029/2020RG000728>.
- [94] SOUSA EB, COSTA VB, PEREIRA LCC, COSTA RM. Variação temporal do fitoplâncton e dos parâmetros hidrológicos da zona de arrebentação da ilha Canela (Bragança, Pará, Brasil). Acta Bot Brasilica 2009;23:1084–95.
- [95] ROSÁRIO RP. Análise de processos oceanográficos no estuário do rio Pará. UFPA,

2016.

- [96] COSTA BO. Variação nictemeral do microfitoplâncton em um estuário do Nordeste Paraense, Brasil. Universidade Federal do Pará, 2010.
- [97] RAPOSO MIC, GOMES MTSR, BOTELHO MJ, RUDNITSKAYA A. Paralytic shellfish toxins (PST)-transforming enzymes: a review. *Toxins (Basel)* 2020;344:20. <https://doi.org/10.3390>.
- [98] RODRIGUES SM, CARVALHO M, MESTRE T, FERREIRA JJ, COELHO M, PERALTA R, *et al.* Paralytic shellfish poisoning due to ingestion of *Gymnodinium catenatum* contaminated cockles - Application of the AOAC HPLC official method. *Toxicon* 2012;59:558–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.01.004>.
- [99] CARVALHO IL, PELERITO A, RIBEIRO I, CORDEIRO R, NÚNCIO MS, VALE P. Paralytic shellfish poisoning due to ingestion of contaminated mussels: a 2018 case report in Caparica (Portugal). *Toxicon* X 2019;4. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100017>.
- [100] SCHRAMM MA, TAMANAHA MS, BEIRÃO LH, PROENÇA LAO. Toxinas paralisantes em mexilhão *Perna perna* em áreas de cultivo da costa Sul do Brasil: estudo de caso. *Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition* 2006;17:443–50.
- [101] SOUZA DA, ZANETTE GB, NEVES MHCB, SCHRAMM MA, PROENÇA LAO, OLIVEIRA MM. Cultivo de moluscos bivalves: algas nocivas e bases para programa de monitoramento de ficotoxinas em fazenda de maricultura de Arraial do Cabo, RJ. *Boletim Do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego* 2015;9:119–39. <https://doi.org/10.19180/2177-4560.v9n115-07>.
- [102] ANDERSON D. Dynamic era of climactic and environmental change. *Harmful Algae* 2012 2015;2014:3–17.
- [103] Lugliè A, Satta CT, Pulina S, Bazzoni AM., PADEDDA B, Sechi N. Le problematiche degli harmful algal blooms (HABs) in Sardegna. *Biol Mar Mediterr* 2011;18:2–9.
- [104] BAZZONI AM, CADDEO T, PULINA S, PADEDDA BM, SATTI CT, SECHI N, *et al.* Spatial distribution and multiannual trends of potentially toxic microalgae in shellfish farms along the Sardinian coast (NW Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess* 2015;187:1–18. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4250-3>.
- [105] VALBI E, RICCI F, CAPELLACCI S, CASABIANCA S, SCARDI M, PENNA A. A model predicting the PSP toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* occurrence in the coastal waters of the NW Adriatic Sea. *Sci Rep* 2019;9:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40664-w>.

- [106] LIU Y, YU R-C, KONG F-Z, CHEN Z-F. Paralytic shellfish toxins in phytoplankton and shellfish samples collected from the Bohai Sea, China. *Mar Pollut Bull* 2017;115:324–31.
- [107] ANON. Official method 2005.06 quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using pre-chromatographic oxidation and liquid Chromatography With Fluorescence Detection. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International; 2005.
- [108] OSHIMA Y. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. *Harmful Marine Algal Blooms* 1995:475–80.

ANEXOS

Article

Evaluation of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Oyster Farming and Microalgae in the Atlantic Amazon Evidences Safety but Highlights Potential Risks of Shellfish Poisoning

Francisco Arimatéia dos Santos Alves ^{1,2}, Eliane Brabo de Sousa ³, Maíra Pompeu Martins ¹ ,
Cássia Christina da Silva Rocha ², Silvia Maria Mathes Faustino ⁴, Rosivaldo Alcântara Mendes ²,
Marcelo de Oliveira Lima ⁵ and Maria Paula Cruz Schneider ^{1,*}

¹ Laboratory of Genomics and Biotechnology, Biological Sciences Institute, Federal University of Pará, Augusto Correa 01, Belém 66075-110, PA, Brazil

² Seção de Meio Ambiente, Laboratório de Análise de Resíduos Orgânicos, Instituto Evandro Chagas/SVC/MS, Rod. Br. 316, Km 7, Ananindeua 67030-000, PA, Brazil

³ Seção de Meio Ambiente, Laboratório de Cianobactérias e Bioindicadores Aquáticos, Instituto Evandro Chagas/SVC/MS, Rod. Br. 316, Km 7, Ananindeua 67030-000, PA, Brazil

⁴ Algae Cultivation Laboratory, Federal University of Amapá, Rod. JK, km 02, Macapá 68902-280, AP, Brazil

⁵ Seção de Meio Ambiente, Laboratório de Metais e Ecotoxicologia, Instituto Evandro Chagas/SVC/MS, Rod. Br. 316, Km 7, Ananindeua 67030-000, PA, Brazil

* Correspondence: mariapaulacruzschneider@gmail.com



Citation: Alves, F.A.d.S.; de Sousa, E.B.; Martins, M.P.; da Silva Rocha, C.C.; Faustino, S.M.M.; Mendes, R.A.; de Oliveira Lima, M.; Schneider, M.P.C. Evaluation of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Oyster Farming and Microalgae in the Atlantic Amazon Evidences Safety but Highlights Potential Risks of Shellfish Poisoning. *Toxins* **2022**, *14*, 654. <https://doi.org/10.3390/toxins14100654>

Received: 20 July 2022

Accepted: 19 August 2022

Published: 22 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Marine phycotoxins are organic compounds synthesized by some species of microalgae, which accumulate in the tissues of filter-feeder organisms such as bivalve mollusks. These toxins can cause acute intoxication episodes in humans, a severe threat to aquaculture and fisheries. In the State of Pará, Brazil, oyster farming has community, artisanal and sustainable bases, using mangroves as cultivation environment and seed banks. In small-scale production, there are often no established methods of safeguarding the health of consumers elevating the potential risks of shellfish poisoning outbreaks. Our study evaluated the presence of phycotoxins in oysters cultivated in five municipalities in the region of the Atlantic Amazon (Pará, Brazil) assessing the quality of the final product. We further evaluated the microalgae, water quality, and the spatio-temporal variation of physicochemical factors in the same area. Diatoms dominated the microalgae composition, followed by dinoflagellates, some of which are reported to be potentially toxic and producers of paralytic shellfish toxins. For the first time, we describe the occurrence of the potentially toxic dinoflagellate *Ostreopsis* sp. in the Amazon region. Furthermore, for the first time, toxins were detected in oyster farming in the northeast of the State of Pará, namely GTX2,3, STX, and dc-STX nevertheless, with nontoxic values. The identified toxins represent a potential threat to shellfish consumers.

Keywords: dinoflagellates; paralytic shellfish poison; gonyautoxin; saxitoxin

Key Contribution: Variants GTX2,3; STX; and dc-STX were detected in oysters in the Amazon region. The dinoflagellate *Ostreopsis* sp. is associated with toxin production in oyster farming in Pará State; Brazil. Oyster growing areas met the Brazilian food surveillance standards for toxins.

1. Introduction

Marine phycotoxins are organic compounds produced by unicellular microalgae (Chromista), mostly by dinoflagellates and diatoms [1]. Among dinoflagellates, the planktonic species *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Gymnodinium*, and benthic species *Prorocentrum*, and *Ostreopsis*, are the most reported toxin producers [2–6]. The genus *Pseudo-nitzschia* are the main planktonic diatoms involved in these toxic events [7]. Although cyanobacteria, also called blue-green algae, are true bacteria, they are likewise responsible for producing a wide range of phycotoxins in marine environments [8,9].

Outbreaks of intoxication in humans due to marine biotoxins occur mainly through consuming contaminated shellfish. Despite their high nutritional value, marine shellfish have caused concern about the health quality of products as it is a suitable substrate for the proliferation of pathogenic microorganisms and bioaccumulating toxic substances in their tissues. The five major human toxic syndromes associated with algal toxins poisoning are amnesic shellfish poisoning (ASP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP), azaspiracid shellfish poisoning (AZP), and paralytic shellfish poisoning (PSP) [10].

PSP is one of the most studied intoxications, causing severe symptoms in humans. The associated paralytic shellfish toxins (PSTs) are categorized according to the structural characteristics of their functional groups. In decreasing order of toxicity, they are divided into carbamoyl toxins (saxitoxin—STX, neosaxitoxin—NEO, and gonyautoxins—GTX1 to GTX4); decarbamoyl derivatives (dcGTX1 to dcGTX4, dcSTX and dcNEO), and N-sulfocarbamoyl derivatives (four C-toxins (C1–4), gonyautoxin-5 (GTX5, formerly B1) and gonyautoxin-6 (GTX-6), formerly B2 [11,12]. Due to the potential impacts caused by PSTs-contaminated seafood consumption on marine wildlife and human health, the detection, and control of such toxins are required [13].

The monitoring of shellfish growing regions for changes in water quality is carried out as a food safety measure in many countries which have established limits on the consumption of shellfish contaminated by phycotoxins [14,15]. In Brazil, a rapid expansion of oyster cultivation in coastal regions' communities highlights the importance of monitoring water quality and the associated risk of accumulating these marine toxins in shellfish [16]. Studies on the retention of microalgae phycotoxins in bivalve mollusks are scarce, recent, and concentrated in the southern regions of the country where most of the shellfish marine farms are located, comprising 97.9% of the national oyster and oyster seeds production [17–19]. Santa Catarina is the only Brazilian State that monitors bivalve cultivation areas [17,20].

The Brazilian Amazon coast occupies a coastal strip between the Oiapoque River at Amapá State (5° N, 51° W) and the São Marcos Bay at Maranhão State (2° S, 44° W). Meteorological and oceanographic features are marked by high annual precipitation (up to 3300 mm), high temperatures (>20 °C) with low annual thermal variation, wide continental shelf (~330 km), macrotidal regime (ranging from 6 m to 12 m), extensive area of mangroves, fluvial discharge from dozens of estuaries, including that of the Amazon river, high sediment accretions, and high input of nutrients and organic matter [21,22]. The Amazon Region contains the largest river basin in the world, the Amazon River, which contributes to approximately 16% of freshwater discharged into the oceans [23]. This region includes the coast of Pará State, with extensive areas of mangroves, where oyster farming has community, artisanal and sustainable bases, using the mangroves as a cultivation environment and seed bank [24]. The State of Pará is increasing the production of oysters, and it has the potential to expand production even further, considering the extension and relative preservation of the mangrove coast and the low impact of urban and industrial development [25,26]. The main cultivated and commercialized species is *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), harvested from their natural environment [24].

Although *C. gasar* is farmed in small-scale production, since in the northern coast of Brazil the activity is growing both in production and technological improvement, meeting the sanitary quality standards of food safety surveillance agencies is crucial [24,27,28]. Periodic monitoring of the cultured oysters and water quality evaluating the bioaccumulation of toxins in farming products is fundamental to ensure safe seafood production for human consumption. Thus, the objective of this study was to assess the water quality and the spatio-temporal variation of physicochemical factors and microalgae in the oyster farming region of the Atlantic Amazon in Pará State (Brazil), monitoring the presence of phycotoxins in oysters cultivated on a small scale in the region known as the “Salgado Paraense”. Although in reduced concentrations, toxins were identified, presenting a potential threat to shellfish consumers.

2. Results

2.1. Physicochemical Characteristics of Water

The multivariate analysis of variance showed differences between months, rainy and dry seasons of the present study. The dry period presented high depth, transparency, salinity, alkalinity, hardness, BOD (biochemical oxygen demand), COD (chemical oxygen demand), sulfate, nitrite, and nitrate than other months. The latter two parameters were increased in the dry season compared to the rainy season. On the other hand, in March (rainy season), an opposite pattern for these parameters was observed compared to the other evaluated months (Supplemental Table S1).

A singular pattern was observed in the municipality Augusto Corrêa, compared to the other sample points. The waters had higher salinity, alkalinity, hardness, BOD, COD, apparent color, total suspended solids, and total dissolved solids. The water quality was altered in terms of dissolved oxygen (less than 5 mg/L, according to the limit stipulated by Brazilian legislation for brackish water), nitrate (up to 0.40 mg/L), and nitrite showed the highest values (0.08 ± 0.18 mg/L).

Dissolved oxygen was also altered in November (2.7 ± 1.7 mg/L) in the Salinas sample, with an average of 4.86 mg/L. In every evaluated month, seasonal period, depth of Euphotic Zone (EuZ), and oyster farming location, nitrate levels were above the limit stipulated by Brazilian legislation for brackish water. Nitrate concentration is a critical parameter for water quality (the limit is up to 0.040 mg/L, in accordance with Brazilian legislation) reaching average values of 39 mg/L in the dry season, 49 mg/L on the water surface, and 72 mg/L in the oyster farming in Augusto Corrêa.

2.2. Microalgae

A total of 102 species distributed in four microalgae divisions were identified: diatoms (Bacillariophyta) were the most representative algae group, with 84 species, followed by dinoflagellates (Dinophyta) with 11 species. The sample collected in March (rainy season) presented the lowest density ($82.56 \pm 173.7 \times 10^3$ org/L), while in November, the highest density was observed ($377.2 \pm 584.7 \times 10^3$ org/L) (Figure 1A). The overall evaluation of samples collected in dry and rainy periods revealed higher density in the dry months ($323.3 \pm 463.4 \times 10^3$ org/L) than in the rainy months (Figure 1B).

Diatoms were predominantly identified in June (rainy season), September (dry month), and November (dry month) (Figure 1A). In March (rainy season), dinoflagellates were more representative, comprising 76% of the sample composition. The representativeness of cyanobacteria species increased from September to November (dry period), corresponding to 30% and 46% of the microalgae, respectively (Figure 1A). There was no significant difference in density among oyster farming municipalities ($H = 1.5$; $p = 0.83$) and depths of the EuZ ($H = 1.86$; $p = 0.40$) (Figure 1C, D). Elevated representativeness of cyanobacteria was observed in Curuçá (72%). The standard deviation reflects the high number of less abundant species (with low densities) counterbalancing the other few species that were more representative (more abundant).

2.3. Redundancy Analysis

The first two axes of the redundancy analysis (RDA) represented 28.2% of the species variation concerning physicochemical and climatic factors. Precipitation was the environmental factor that most influenced species distribution among oyster farming regions ($r = 0.938$). Axis 1 (15.0%) established a seasonal pattern of the samples, where the March samples (rainy period) were established in the positive quadrant and correlated with the STD variables ($r = 0.632$) with the species *Ostreopsis* sp., *Cyclotella striata* (Kütz.) Grunow, *Cymatosira belgica* Grunow, and *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg as important indicators for the rainy season (IndVal = 50% and $p = 0.03$). On the other hand, the samples from September and November (dry period) were positioned in the negative quadrant (Figure 2). These samples were correlated with wind speed ($r = -0.879$), transparency ($r = 0.500$), COD ($r = -0.640$), and salinity ($r = -0.665$). The species *Pseudonitzschia*

seriata (Cleve) H. Peragallo, *Thalassionema frauenfeldii* (Grunow) Tempère&Peragallo, *Chaetoceros* sp., *Cyclotella stilorum* Brightwell, and filamentous cyanobacteria were statistically significant indicators ($p < 0.05$) of this period with IndVal of 64%, 77.7%, 55.6%, 66.7%, and 58.5%, respectively.

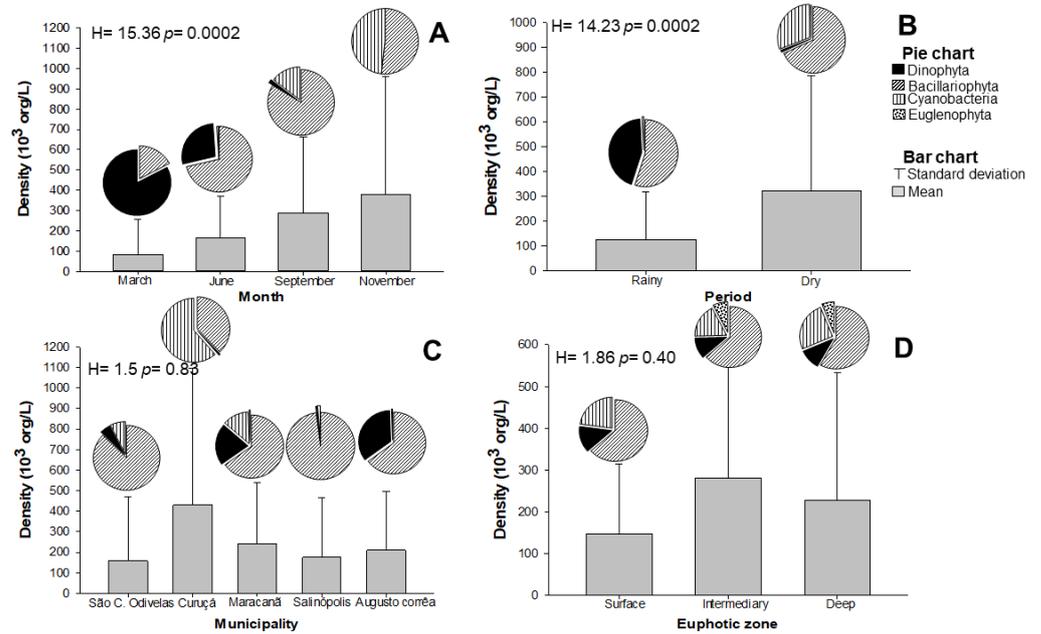


Figure 1. Spatial and temporal variation of the average and standard deviation of microalgae density in the oyster farming region of the State of Pará (Brazil) by (A) Month; (B) seasonal period; (C) location, and (D) Euphotic Zone (EuZ) depth. The values represent the average per proposed parameter and at each quadrant, we present individually and independently analyzed data.

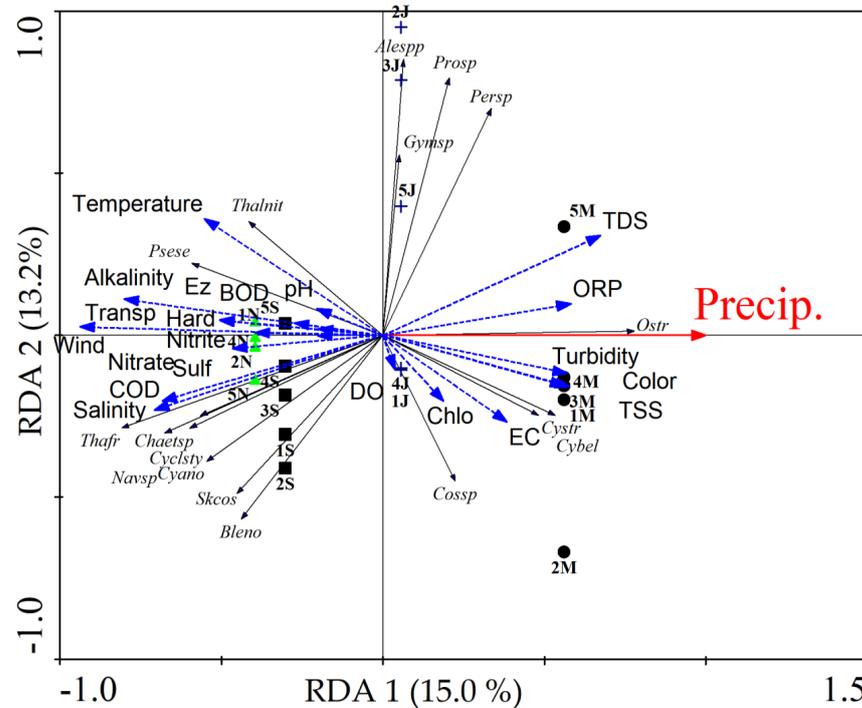


Figure 2. Redundancy analysis (RDA) between spatio-temporal distribution of microalgae and environmental factors in the oyster farming region of the State of Pará (Brazil): Precip.—precipitation;

TDS—total dissolved solids; ORP—oxidation-reduction potential; Color—apparent color; TDS—total dissolved solids; TSS—total suspended solids; Ez—euphotic zone; Wind—wind speed; Transp—transparency; Sulf—Sulfate; Hard—Hardness; DO—dissolved oxygen; COD—chemical oxygen demand; BOD—biochemical oxygen demand; EC—electrical conductivity; Chlo—chlorophyll-*a*; *Alespp*—*Alexandrium* spp.; *Gymssp*—*Gymnodinium* sp.; *Prosp*—*Prorocentrum* sp.; *Persp*—*Peridinium* sp.; *Ostr*—*Ostreopsis* sp.; *Cystr*—*Cyclotella striata*; *Cybel*—*Cymatosira belgica*; *Cossp*—*Coscinodiscus* sp.; *Bleno*—*Bleakeleya notata*; *Skcos*—*Skeletonema costatum*; *Cyano*—*Filamentous cyanobacteria*; *Navsp*—*Navicula* sp.; *Cyclsty*—*Cyclotella stylonum*; *Chaetsp*—*Chaetoceros* sp.; *Thafr*—*Thalassionema frauenfeldii*; *Psepe*—*Pseudonitzschia seriata*; *Thalnit*—*Thalassionema nitzschioides*.

Axis 2 (13.2%) separated June samples from the other months according to the dinoflagellate species *Peridinium* sp., *Alexandrium* spp., *Prorocentrum* sp., and *Gymnodinium* sp. These species were indicators of June with IndVal = 27.6% ($p = 0.04$), IndVal = 26.7% ($p = 0.011$), IndVal = 20.6% ($p = 0.026$), IndVal = 20.0% ($p = 0.04$), respectively. However, there were no environmental variables correlated with this axis, that is, it was not possible to specify the environmental factors that promoted the growth of these species in June.

2.4. Identification of PSPs in Oysters by HPLC-FLD

The PSP toxin profile was identified by comparing sample chromatograms with certified standards (dc-STX, GTX2,3, STX, NEO, and GTX1.4). The concentration of each PSP toxin was determined using calibration charts with five concentration levels. The GTX2,3, STX, and dc-STX variants were detected in all study regions (Figure 3).

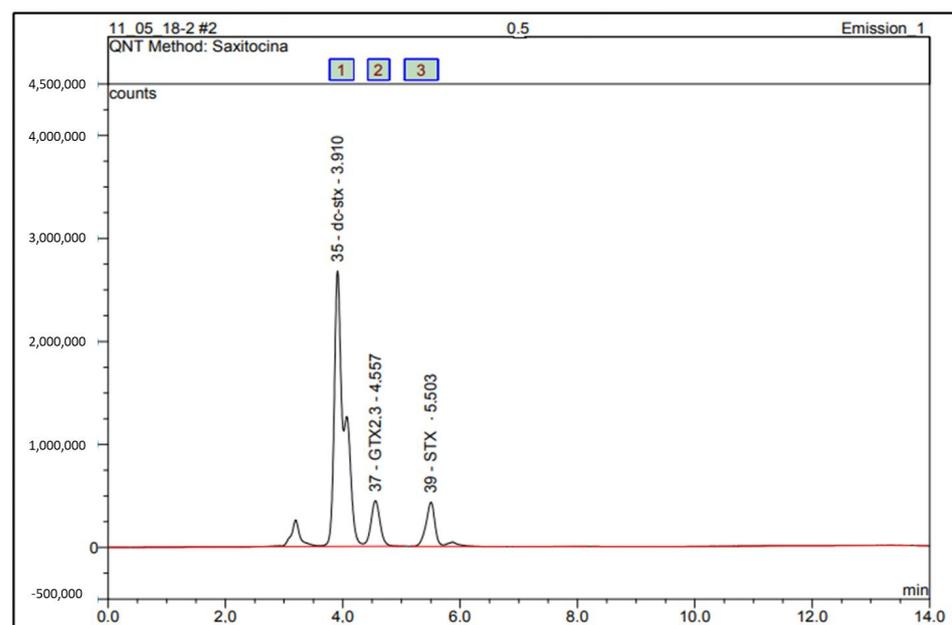


Figure 3. HPLC-FLD chromatogram of PSP toxin standards (dc-STX, GTX2,3 e STX) using pre-column oxidation with periodate. Peak identity: 1—dc-STX; 2—GTX2,3; 3—STX.

PSP values ranged during the evaluated period from 0.00032 to 0.421 mg STX equiv./Kg of oyster flesh. The concentrations of the GTX1,4 and NEO variants (Figure 4) were below the limits of detection (LOD).

In Augusto Corrêa samples, PSP concentrations in oysters ranged from 0.0005 (March) to 0.155 mg STX equiv./Kg of oyster flesh (September). In Salinópolis, concentrations ranged from 0.00024 mg STX equiv./Kg (March) to 0.421 mg STX equiv./Kg of oyster flesh (September). In the Curuçá samples, PSP concentrations were below the LOD, with concentrations ranging from 0.0018 (September) to 0.031 mg STX equiv./Kg of oyster flesh (November). Likewise Curuçá, in the Maracanã samples, the concentrations were below the LOD and ranged from 0.0003 mg STX equiv./Kg (March) to 0.141 mg STX equiv./Kg of

oyster flesh (September). In São Caetano de Odivelas samples, PSP concentrations ranged from 0.0004 to 0.106 mg STX equiv./Kg of oyster flesh in September. In Curuçá, 0.031 mg STX equiv./Kg of oyster flesh of GTX2.3 was detected in November (Table 1).

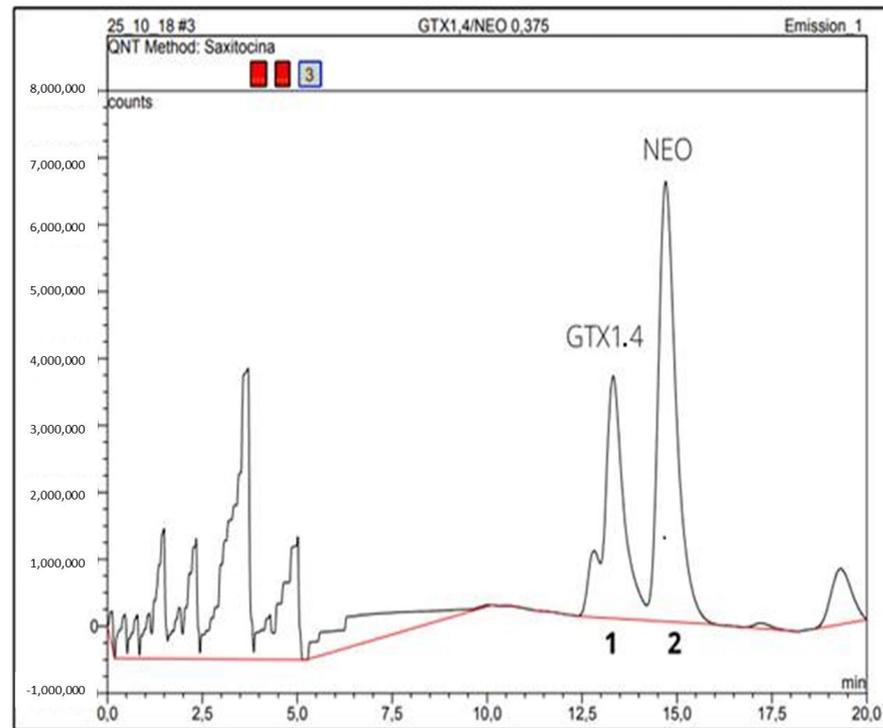


Figure 4. HPLC-FLD chromatogram of PSP toxin standards (GTX-1,4 and NEO) using pre-column oxidation with periodate. Peak identity: 1—GTX1.4; 2—NEO.

Table 1. Equivalent concentrations of phycotoxins identified in oyster farming regions of the State of Pará (Amazônia, Brazil). In STX equiv./Kg, Kg refer to oyster flesh.

Sampling Points	Months	GTX1,4 (Mg STX Equiv./Kg)	GTX2,3 (Mg STX Equiv./Kg)	STX (Mg STX Equiv./Kg)	dc-STX (Mg STX Equiv./Kg)	NEO (Mg STX Equiv./Kg)
São Caetano de Odivelas	March	<LOD	<LOD	0.00249	<LOD	<LOD
	June	<LOD	0.0038	0.00052	0.00102	<LOD
	September	<LOD	0.0049	0.106	0.00046	<LOD
	November	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Curuçá	March	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	June	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	September	<LOD	0.0076	<LOD	0.0018	<LOD
	November	<LOD	0.031	<LOD	<LOD	<LOD
Maracanã	March	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	June	<LOD	0.0044	0.000707	0.00273	<LOD
	September	<LOD	0.083	0.141	0.00032	<LOD
	November	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Salinópolis	March	<LOD	<LOD	0.00024	<LOD	<LOD
	June	<LOD	0.003	0.00044	<LOD	<LOD
	September	<LOD	<LOD	0.421	0.001	<LOD
	November	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Augusto Corrêa	March	<LOD	0.018	0.0172	0.00059	<LOD
	June	<LOD	0.012	<LOD	0.0018	<LOD
	September	<LOD	0.023	0.155	0.00103	<LOD
	November	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

The detected toxin levels are below the value considered as a risk to human health, established by the National Program for Hygienic-Sanitary Control of Bivalves Mollusks (PNCMB) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA). Brazilian regulation follows the recommendations of the European Union, whose maximum acceptable limit for PSP is 80 µg STX eq./100 g of shellfish meat.

3. Discussion

Seasonality, especially precipitation, is the main variable that influences the dynamics of microalgae and physicochemical properties of water in the microregion known as “Salgado Paraense”. Precipitation is widely recognized as the most important climatological variable in the tropical region, including the Amazonian coastal region [29], which has the Amazon basin as the main promoter of the hydrological cycle of the entire region [30].

The coastal sector of the Amazon has an average annual total of precipitation that varies around 3400 mm and has the highest rainfall amplitude between the wettest quarter (February to April) and the least rainy (September to November), approximately 560 mm when compared to other regions of the Eastern Amazon [29], confirming the greater importance of rainfall for this region. Rainfall influences the inputs of sediments, organic matter, and salinity in the study region [31]. In the coastal regions of the Amazon, heavy rains during the first six months of the year (average of 326.8 mm) dilute the effects of marine influence on estuarine waters [32]. On the other hand, they increase the influence of limnetic bodies on coastal waters, as in the Tocantins River over the Pará River estuary [33].

Sampaio et al. (2020) studied the oyster farming region of northeastern Pará, the same region where our study was carried out. They found that the evaluated variables changed between the seasonal periods, including salinity, dissolved oxygen, and redox potential, consistent with the present study. The alterations in the physicochemical characteristics of the water seem to be characteristics of the cultivation sites, inserted in mangrove areas. Physicochemical characteristics variations were more noticeable in Augusto Corrêa, which has the largest extension of mangroves and direct contact with the Atlantic Ocean. Despite the strong seasonality, the microplankton fraction of the collected phytoplankton has no significant temporal and spatial variations revealing a favorable environment for these organisms throughout the year. Our results oppose the analysis previously conducted in Bragança, another point in the coastal regions of Pará [32]. The microalgae groups, however, showed expected behavior, such as the representativeness and abundance of diatoms in brackish and saline environments in the world and in the study region [32,34–37].

Dinoflagellates were the second most abundant group in waters more brackish than saline. The identified species are potentially PSP producers [38]. Among the identified dinoflagellates, we highlight *Ostreopsis* sp., which had a high density (614.7×10^3 org/L) in the least rainy month, compared to the density of the other microalgae in the present study. *Ostreopsis* is a small, benthic, marine dinoflagellate that frequently forms toxic blooms in temperate and tropical waters [39]. There are records of this dinoflagellate in the NE Atlantic, in Portugal, associated with light winds, which allow the formation of bloom in the substrate, and high waves, which resuspend the cells to the surface [40]. In Brazil, this dinoflagellate was identified in the Currais Archipelago in mucilaginous and brownish-colored blooms reaching the order of 10^5 cells per cm² associated with ovatoxin-a and ovatoxin-b profiles [41]. In our study, *Ostreopsis* was identified at the optical microscopy level. Further analyses are required to confirm if it falls within an already described species and if the species is a toxin producer.

Different species of dinoflagellates produce various PSP analogs, and outbreaks of these toxins previously studied have been mainly attributed to the ingestion of mussels and, less frequently, to other bivalves [42,43]. Mussels are more likely to accumulate toxins for long periods and thus reach higher levels of contamination than other mollusks, representing a vector of transmission to humans. In Santa Catarina State, Brazil, in 2006, a maximum concentration of 600 µg STX equiv./Kg of oyster flesh was found in brown

mussels *Perna perna* [44], in areas where high densities of *Gymnodinium catenatum*. The occurrence of PSP in shellfish farming areas has been investigated since 2006 in the State of Santa Catarina. In 2013, PSP toxicity was analyzed in mussels of the *Perna* species in a culture farm in a mariculture area in the city of Arraial do Cabo, State of Rio de Janeiro [45].

The dinoflagellates (Dinophyta) were more representative in the month of June (rainy season) in Maracanã ($39.12 \pm 52.4 \times 10^3$ org/L) and Augusto Corrêa ($15.6 \pm 33.0 \times 10^3$ org/L), and during the analysis of redundancy axis 2 (13.2%) separated the June samples from the other months according to the dinoflagellate species *Peridinium* sp., *Alexandrium* spp., *Prorocentrum* sp., and *Gymnodinium* sp. The presence of dinoflagellates in the wet and dry months of 2017, mainly in samples from June to September, suggests that *Alexandrium* spp. and *Gymnodinium* sp. may have proliferated over time. Following the density analyses, the maximum values reported were in the month of June (rainy season), and in general, the density values are correlated with the toxicity found in the tissues of the oysters. These facts indicate the possible correlation between PSP toxins and mollusks, and the occurrence of toxic species, in which the presence of PSP toxin seems to coincide with the higher density of *Alexandrium* spp., and *Gymnodinium* sp. identified during the study.

The results of this study are in agreement with long-term statistical studies conducted throughout the world [46]. However, it is not predictable when a bloom of dinoflagellates will develop and neither is the population density of some toxic species. Climatic and environmental conditions such as changes in salinity, rising water temperature, and increased nutrients and sunlight trigger cyst germination to a vegetative stage that allows for rapid reproduction [46].

In Sardinia, *Alexandrium* species were the main causes of toxicity in mollusks. In this study, a discrepancy in abundance was observed, that is, the low number of cells and the high level of toxicity [47,48], similar to the present studies, where the densities of *Alexandrium* spp. (11.4×10^3 org/L), and *Gymnodinium* sp. (10.9×10^3 org/L) were low but sufficient to produce detectable toxins.

The presence of *Alexandrium* species does not imply that PST contamination occurs in mollusks, as variables (sampling period, wind speed, upwelling, and others) can have an important effect [5], mainly in the consumption of these algae by different types of mollusks. For example, mussels are able to accumulate more PSTs and more quickly during algal blooms, unlike scallops, they retain high levels of toxins for much longer and oysters and some clams have low toxicity [49]. This may explain the low concentrations of PSP variants in our study, but these levels may have been much higher in the environment, but the samples collected were only from oysters and not from mussels that are also cultivated in the municipalities, but for community consumption.

There was a difference in the PSP toxin profiles, where GTX2,3 was found in all oyster farming locations, followed by STX and dc-STX. The profiles, NEO and GTX1,4 were not detected. This can be explained, in part, by the methodology applied in the extraction of toxins. The boiling acid 0.1M HCL extraction method converts C3,4 to GTX1,4 and GTX6 (B2) to NEO, causing toxins with an N-sulfocarbamoyl moiety at position 13 to be converted to their carbamoyl counterparts at low pH [50].

Mollusks contaminated by PSP-producing microalgae may present different toxin profiles from the causative organism [51]. This transformation may be due to different facts, such as the chemical properties of toxins, such as epimerization, which occurs spontaneously in toxins. The different profiles could also be due to chemical transformation within the shellfish, since natural reductants commonly found in shellfish, such as glutathione and cysteine, can cause elimination of the N-1 OH group and also the elimination of the O-sulfate Group at position 11 [51], or even by shellfish enzymatic activity, since carbamoylase enzymes catalyze the hydrolysis of the carbamoyl or N-sulfocarbamoyl moiety of PSP toxins, thus turning them into the corresponding carbamoyl analogues.

For the first time, the variants GTX2,3, STX, and dc-STX were detected in the Amazon region, specifically in the coastal area, presenting results of great relevance, which must guide the monitoring programs on water quality and food security in the region. Although

the estimated toxin concentrations did not pose risks to the oyster consumer population, our results highlight the necessity of controlling the level of toxins to protect the consumers' health and avoid damage to the fishing economy due to interdiction of cultivated areas.

4. Conclusions

This study presents the first occurrence in the Amazon of the variants GTX2,3, STX, and dc-STX in oyster farming regions in the northeast of the State of Pará in not harmful concentrations to human health. However, our results highlight a potential risk for consumers who demand public agencies' attention on water quality and food safety. We also emphasize the first occurrence of *Ostreopsis*, a cosmopolitan benthic dinoflagellate associated with toxin production. Changes in water quality in oyster farming regions of the Atlantic Amazon may be associated with the lack of basic sanitation in the municipalities and the biogeochemical cycles of mangroves.

5. Materials and Methods

5.1. Study Site and Samples

The study area is located on the Brazilian Amazon coast, in the northeast of the State of Pará, in the hydrographic microregion known as "Salgado Paraense", which comprises 12 municipalities and a population of 320,256 inhabitants. The climate of the region is megathermic type Af, according to the Köppen classification, characterized as a hot-humid tropical climate, with rainfall in all seasons and an annual mean temperature between 24 to 26 °C [52]. The Amazon coastal region has the wettest quarter from February to April and the least rainy period from September to November [29]. The rains are more abundant from December to May, with rainfall amounts usually exceeding 200 mm per month, but often even exceeding 300 mm. In this region, mangroves can extend for more than 40 km towards the land following the course of numerous small estuaries and bays under macrotidal regimes [53].

The microregion known as "Salgado Paraense" has an average Human Development Index (HDI) of 0.578, an economy predominantly based on agriculture, aquaculture, plant extraction, hunting and fishing, public administration, services, and commerce [20]. The oyster farming occurs in communities in the municipalities of São Caetano de Odivelas (Pererú de Fátima community), Curuçá (Lauro Sodré community), Maracanã (Nazaré do Seco community), Salinópolis (Santo Antônio de Urindeua), and Augusto Corrêa (Nova Olinda) (Figure 5). In these five communities, water samples (aliquots of 1 L) were collected with a Van Dorn bottle at three depths of the Euphotic Zone (EuZ) [54]: near the surface (0.74 ± 0.26 m), intermediate depths (1.1 ± 0.30 m), and deep euphotic zone (2.13 ± 0.6 m). The samples were stored in polypropylene bottles and fixed with lugol acetic [55]. Samples were taken in March, June (rainy months), September, and November 2017 (dry months). *Crassostrea gasar* oysters were collected in the same period, 10 specimens by oyster farming point/month, totaling 200 samples collected during the study period. The oyster's size ranged from 80 to 99 mm, with a total average weight of 29 g and an average weight of the edible part of 12 g.

5.2. Microalgae and Chlorophyll-A

For qualitative microalgae analysis, a 20 µm plankton net was used to drag the water subsurface horizontally for three minutes. The collected material was fixed with 4% formalin solution [55] and analyzed by triocular microscope (Axio Lab. A1, Carl Zeiss, Jena, Germany) with measuring eyepieces (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Jena, Germany).

Quantitative microalgae samples were obtained from the water collected using the Van Dorn bottle fixed by lugol acetic. Counting of microalgae using inverse microscopy (Observer D1 Zeiss, Germany) followed the method outlined in APHA 2012, section 10200F [55]. All cells (coenobia, frustules, lorica cells, colonies, or filaments) were considered one organism (org/L). Identification, nomenclature, and taxonomic classification were in accordance with the specialized literature [56–59]. The taxonomic identification of the

Ostreopsis genus was performed based on its morphological characteristics using light microscopy and, despite its fine teak, contour, teardrop shape, dimensions, golden-brown chloroplasts were the main characteristics observed for this genus [60,61].

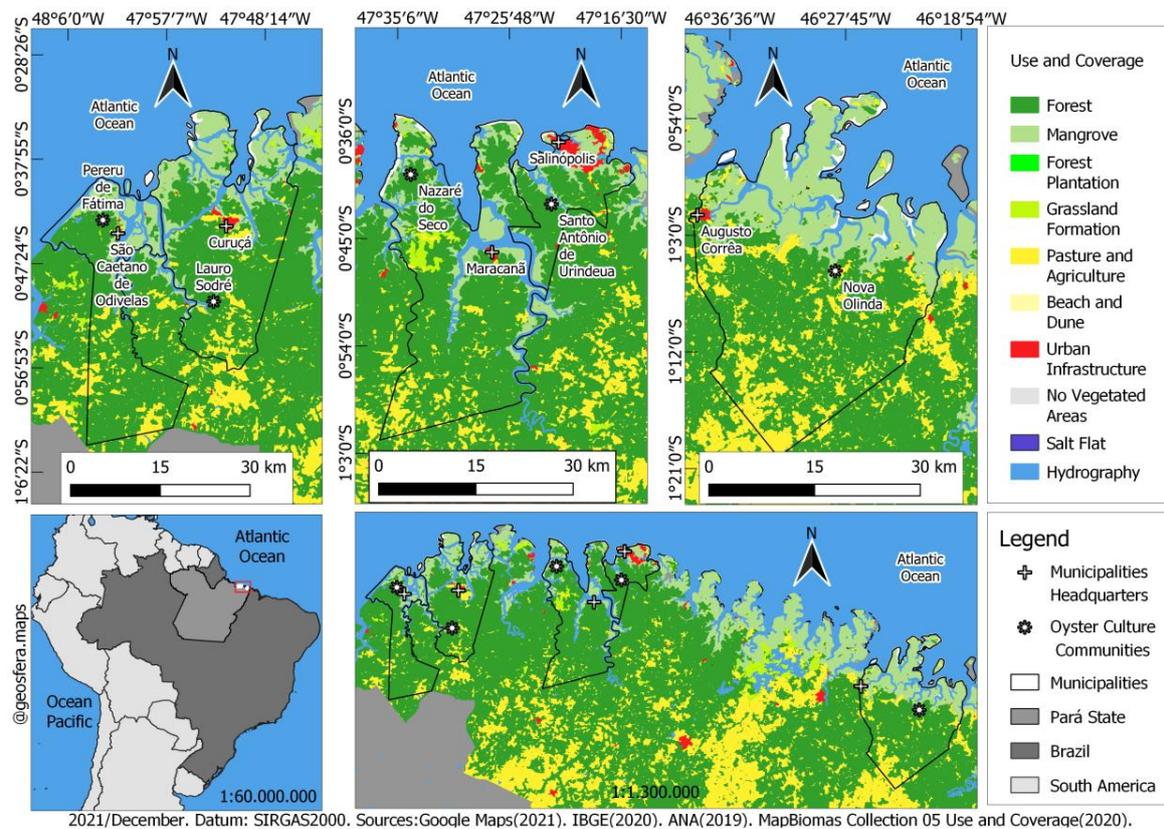


Figure 5. Geographical map of sampling points. Uper image: Northeast coast of Pará divided by municipalities with oyster farming activities (Eastern Amazon, Brazil). The municipalities studied are indicated with a plus sign. From left to right: São Caetano de Odivelas (Pererú de Fátima community), Curuçá (Lauro Sodré community), Maracanã (Nazaré do Seco community), Salinópolis (Santo Antônio de Urindeua), and Augusto Corrêa (Nova Olinda). Bottom image, left: Location of the state of Pará, northern Brazil, eastern Amazonia. Bottom image, right: sampling points are enlarged in the map (⚙ indicates oyster culture communities' location). Geographic coordinates of the sampling points are provided in the methods section.

The chlorophyll-a samples were vacuum filtered through 0.45 μm pore size cellulose filters. The pigments were extracted with 90% acetone and chlorophyll-a were measured according to Standard Methods 10,200 H with a Hach DR6000 spectrophotometer [55].

5.3. Physicochemical Characteristics of Water

Water transparency was measured using a Secchi disk. Temperature ($^{\circ}\text{C}$), the potential of hydrogen (pH), salinity, electrical conductivity (EC), total dissolved solids (TDS), and dissolved oxygen (DO) were measured in situ using a HI 9828 multiparametric probe (HANNA[®], Smithfield, UT, USA). Parameters were measured of the water samples collected from three depths through the Van Dorn bottle. Analyses followed the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, section 1060 [55].

Turbidity and apparent color variation were determined by the 2130 B nephelometric method [55] and total suspended solids (TSS) by the photometric method [62]. The biochemical oxygen demand (BOD) was determined by the 5210 B method and the chemical oxygen demand (COD) by the closed reflux colorimetric method (5220D), both determined by UV-VIS spectrometry (DR 3900 model), according to Baird et al. (2012). Nitrite (NO_2^-),

nitrate (NO_3^-), hardness, and sulfate (SO_4^{2-}) were determined in an ICS Dual 2000 ion chromatograph (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) with chemical suppression of eluent conductivity, following method 4110 B [55].

The water quality was evaluated according to the conditions and standards of the National Council of the Environment (Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA Resolution 357/2005), considering the environment as class I of brackish water (salinity > 0.5‰ to 30‰), since the water can be destined to aquaculture and fishing activity [63]. Precipitation and wind data were provided by the National Institute of Meteorology [64].

5.4. Statistical Analysis

The variations of environmental factors were analyzed using a Two-Way Nonparametric Multivariate Analysis of Variance PERMANOVA, since the values even transformed did not reach the multivariate normality through the tests of Mardia and Doornik, and Hansen Omnibus. A Univariate Analysis of Variance was performed using the Kruskal–Wallis tests and Dunn's post hoc test for density values. For all tests, a statistical significance lower than 5% ($p < 0.05$) was considered. Analyses were performed using the free software Past 4.06 for Windows [65].

The indicator species of the environment (IndVal—Indicative value of the species) were determined as previously described [66]. The statistical significance of IndVal was tested by the Monte Carlo technique through 9,999 permutations [67] using the PCORD 5 software [68]. From the matrix of significantly indicator species, the RDA, canonical ordering analysis was performed using a biological matrix with the significant indicator species (IndVal) transformed into Hellinger and the environmental matrix contains the values of the physicochemical variables, precipitation, and winds, transformed into Rangin [67].

5.5. Extraction and Clean-Up Procedure for Shellfish Samples

A total of 80 oysters from the 200 collected samples were opened and their soft tissues were removed from the valves, rinsed with water, and used for quantification of toxins. Extraction and cleaning of oyster samples were performed according to the HPLC pre-column oxidation reference method for PSPs, following AOAC Official Method 2005.06 [50]. Briefly, a 10 g portion of the oyster soft tissue was extracted in 10 mL of 0.1M HCl and boiled for 5 min. The mixture was cooled and centrifuged for 10 min at 4500 rpm; 1 mL of the supernatant was cleaned in a 3 mL SPE C18 cartridge (Supelclean Supelco, Bellefonte, PA, USA) and then diluted to 5 mL with water. The pH was adjusted to 6.0 (± 0.2) with 1% NH_4OH . The adjusted solution was passed through a 3 mL SPE (COOH) cartridge (Bakerbond, J.T. Baker, USA), and toxins GTX1,4, GTX2.3, and dcGTX2.3 were recovered with 4 mL of 0.01M NaCl solution (fraction 1). The cartridge was then eluted with 5 mL 0.3M NaCl Solution and collected as fraction 2 containing STX, NEO, and dcSTX. The recovered fractions were then analyzed by HPLC-FLD.

5.6. HPLC-FLD Analysis

Oxidation products of PSP toxins were obtained [69] and the HPLC-FLD analyses were performed using an Ultimate 3000 Chromatograph with a fluorescence detector (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Chromeleon™ 7.2 software (Thermo Fischer Scientific, USA) performed data acquisition and peak integration. Separation was performed on a Supelcosil LC-18 column, 150 × 4.6 mm, 5 μm (Supelco, USA) equipped with a C18 guard column (SecurityGuard™, 4 × 3 mm, Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mobile phase A was made of 0.1M ammonium formate, pH 6 and mobile phase B was made of 0.1M ammonium formate in 5% acetonitrile, pH 6. The column was kept at 32 °C, where 20 μL per sample. Detection wavelengths were set at 340 nm for excitation, 395 nm for quantification, and 430 nm for fluorescence confirmation. The PSP oxidation products were eluted using the following gradient: 100% mobile phase A for the first 5 min, 95% mobile phase A for 5 to 9 min, 70% mobile phase B for 9 to 11 min, 100% mobile phase A in the last 3 min. Before analysis, the pre-column and column were cleaned to avoid or

reduce the occurrence of ghost peaks. The procedure consists of elution with deionized water and acetonitrile through the pre-column and column with a flow of 0.2 mL/minute lasting 2 h for each eluent.

Toxins were identified by comparing retention times with wavelength standards and rates. For the quantification of toxins, several matching matrix calculation curves were prepared on oyster extracts (C18 or COOH) using NRC Certified Reference Materials: GTX1,4, STX, dc-STX, GTX2,3, NEO (Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canada). Individual toxin levels were converted to saxitoxin equivalents using the toxicity equivalence factors (TEFs) of STX group toxins proposed by the EFSA panel [70]. The EU Reference Laboratory has adopted this approach for Marine Biotoxins, which recommends their routine use by monitoring laboratories.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxins14100654/s1>, Table S1: Measurement of the physicochemical parameters and analysis of the water samples from the oyster farming region of the State of Pará, Brazil.

Author Contributions: Conceptualization, F.A.d.S.A., E.B.d.S. and M.P.C.S.; methodology, F.A.d.S.A., E.B.d.S. and C.C.d.S.R.; validation, F.A.d.S.A., E.B.d.S. and C.C.d.S.R.; formal analysis, F.A.d.S.A. and E.B.d.S.; resources, R.A.M., M.d.O.L., and M.P.C.S.; writing—original draft preparation, F.A.d.S.A., E.B.d.S. and M.P.M.; writing—review and editing, F.A.d.S.A., E.B.d.S., M.P.M. and M.P.C.S.; supervision, S.M.M.F., R.A.M., M.d.O.L. and M.P.C.S.; funding acquisition, M.P.C.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Amazon Research Foundation (FAPESPA ICAAF 173/2014), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant number. 315214/2020-1), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Finance Code 001). The authors thank the BIONORTE Post-Graduation Program.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tamele, I.J.; Silva, M.; Vasconcelos, V. The Incidence of Marine Toxins and the Associated Seafood Poisoning Episodes in the African Countries of the Indian Ocean and the Red Sea. *Toxins* **2019**, *11*, 58. [CrossRef] [PubMed]
2. Band-Schmidt, C.J.; Durán-Riveroll, L.M.; Bustillos-Guzmán, J.J.; Leyva-Valencia, I.; López-Cortés, D.J.; Núñez-Vázquez, E.J.; Hernández-Sandoval, F.E.; Ramírez-Rodríguez, D.V. Paralytic toxin producing dinoflagellates in Latin America: Ecology and physiology. *Front. Mar. Sci.* **2019**, *6*, 42. [CrossRef]
3. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in Action*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2020.
4. Taylor, M.; McIntyre, L.; Ritson, M.; Stone, J.; Bronson, R.; Bitzikos, O.; Rourke, W.; Galanis, E. Outbreak of Diarrhetic Shellfish Poisoning associated with mussels, British Columbia, Canada. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 1669–1676. [CrossRef] [PubMed]
5. Valbi, E.; Ricci, F.; Capellacci, S.; Casabianca, S.; Scardi, M.; Penna, A. A model predicting the PSP toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* occurrence in the coastal waters of the NW Adriatic Sea. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4166. [CrossRef]
6. Wang, D.Z. Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 349–371. [CrossRef] [PubMed]
7. Farabegoli, F.; Blanco, L.; Rodriguez, L.P.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G. Phycotoxins in Marine Shellfish: Origin, Occurrence and Effects on Humans. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 188. [CrossRef]
8. Gimenez-Campillo, C.; Pastor-Belda, M.; Campillo, N.; Arroyo-Manzanares, N.; Hernandez-Cordoba, M.; Vinas, P. Determination of Cyanotoxins and Phycotoxins in Seawater and Algae-Based Food Supplements Using Ionic Liquids and Liquid Chromatography with Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Toxins* **2019**, *11*, 610. [CrossRef]
9. Metcalf, J.S.; Banack, S.A.; Wessel, R.A.; Lester, M.; Pim, J.G.; Cassani, J.R.; Cox, P.A. Toxin Analysis of Freshwater Cyanobacterial and Marine Harmful Algal Blooms on the West Coast of Florida and Implications for Estuarine Environments. *Neurotox. Res.* **2021**, *39*, 27–35. [CrossRef]
10. Morabito, S.; Silvestro, S.; Faggio, C. How the marine biotoxins affect human health. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 621–631. [CrossRef]

11. Costa, P.R.; Robertson, A.; Quilliam, M.A. Toxin profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Portuguese coast, as determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2046–2062. [[CrossRef](#)]
12. Qiu, J.; Wright, E.J.; Thomas, K.; Li, A.; McCarron, P.; Beach, D.G. Semiquantitation of Paralytic Shellfish Toxins by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using Relative Molar Response Factors. *Toxins* **2020**, *12*, 398. [[CrossRef](#)]
13. Reis Costa, P.; Braga, A.C.; Turner, A.D. Accumulation and Elimination Dynamics of the Hydroxybenzoate Saxitoxin Analogues in Mussels *Mytilus galloprovincialis* Exposed to the Toxic Marine Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxins* **2018**, *10*, 428. [[CrossRef](#)]
14. Vale, P.; Botelho, M.J.; Rodrigues, S.M.; Gomes, S.S.; Sampayo, M.A.d.M. Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986–2006): A review of exposure assessment. *Harmful Algae* **2008**, *7*, 11–25. [[CrossRef](#)]
15. Farrell, H.; Ajani, P.; Murray, S.; Baker, P.; Webster, G.; Brett, S.; Zammit, A. Diarrhetic Shellfish Toxin Monitoring in Commercial Wild Harvest Bivalve Shellfish in New South Wales, Australia. *Toxins* **2018**, *10*, 446. [[CrossRef](#)]
16. da Silva, P.M.; Magalhães, A.R.M.; Barracco, M.A. Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **2012**, *92*, 571–579. [[CrossRef](#)]
17. Futigami, L.d.S.; Dutra, M.d.O.; Verruck, S. Ocorrência de ficotoxinas diarreicas em ostras e mexilhões cultivados entre 2019 e 2020 em Governador Celso Ramos, SC. *Rev. Bras. Agrotecnologia* **2021**, *11*, 363–369. [[CrossRef](#)]
18. Pigozzi, L.; Freitas, V.S.; Salazar, V.A.; Verruck, S. Avaliação da presença de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves na região da Costeira do Ribeirão em Florianópolis, Santa Catarina. *Sci. Plena* **2021**, *17*, 081501. [[CrossRef](#)]
19. Ramos, T.K.; Costa, L.D.F.; Yunes, J.S.; Resgalla, C., Jr.; Barufi, J.B.; Bastos, E.O.; Horta, P.A., Jr.; Rorig, L.R. Saxitoxins from the freshwater cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* can contaminate marine mussels. *Harmful Algae* **2021**, *103*, 102004. [[CrossRef](#)]
20. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In *Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2017: Abastecimento de Água e Esgotamento Sanitário*; IBGE: Rio de Janeiro, Brazil, 2020; p. 124.
21. Barros, D.F.; Albernaz, A.L. Possible impacts of climate change on wetlands and its biota in the Brazilian Amazon. *Braz. J. Biol.* **2014**, *74*, 810–820. [[CrossRef](#)]
22. Pereira, L.C.C.; Sousa-Felix, R.C.d.; Costa, R.M.d.; Jimenez, J.A. Challenges of the recreational use of Amazon beaches. *Ocean Coast. Manag.* **2018**, *165*, 52–62. [[CrossRef](#)]
23. Jezequel, C.; Tedesco, P.A.; Darwall, W.; Dias, M.S.; Frederico, R.G.; Hidalgo, M.; Hugueny, B.; Maldonado-Ocampo, J.; Martens, K.; Ortega, H.; et al. Freshwater fish diversity hotspots for conservation priorities in the Amazon Basin. *Conserv. Biol.* **2020**, *34*, 956–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sampaio, D.d.S.; Tagliaro, C.H.; Schneider, H.; Beasley, C.R. Oyster culture on the Amazon mangrove coast: Asymmetries and advances in an emerging sector. *Rev. Aquac.* **2019**, *11*, 88–104. [[CrossRef](#)]
25. Ferreira, A.C.; Lacerda, L.D. Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectives. *Ocean Coast. Manag.* **2016**, *125*, 38–46. [[CrossRef](#)]
26. Oliveira, A.M.S.; Barauna, R.A.; Marcon, D.J.; Lago, L.A.B.; Silva, A.; Lusio, J.; Tavares, R.D.S.; Tacao, M.; Henriques, I.; Schneider, M.P.C. Occurrence, antibiotic-resistance and virulence of *E. coli* strains isolated from mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) farmed in estuaries of Amazonia. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *157*, 111302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Silva, O.L.L.; ModestoVeríssimo, S.M.; Rosa, A.M.B.P.d.; Iguchi, Y.B.; Nunes, E.d.S.C.d.L.; Moraes, C.M.d.; Cordeiro, C.A.M.; Xavier, D.d.A.; Pinto, A.S.O.; Joele, M.R.S.P.; et al. Effect of environmental factors on microbiological quality of oyster farming in Amazon estuaries. *Aquac. Rep.* **2020**, *18*, 100437. [[CrossRef](#)]
28. Conceição, M.V.R.; Costa, S.S.; Schaan, A.P.; Ribeiro-dos-Santos, Â.K.C.; Silva, A.; Graças, D.A.d.; Schneider, M.P.C.; Baraúna, R.A. Amazonia Seasons Have an Influence in the Composition of Bacterial Gut Microbiota of Mangrove Oysters (*Crassostrea gasar*). *Front. Genet.* **2021**, *11*, 602608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Amanajás, J.C.; Braga, C.C. Padrões espaço-temporal pluviométricos na Amazônia Oriental utilizando análise multivariada. *Rev. Bras. Meteorol.* **2012**, *27*, 423–434. [[CrossRef](#)]
30. Fassoni-Andrade, A.C.; Fleischmann, A.S.; Papa, F.; Paiva, R.C.D.d.; Wongchuig, S.; Melack, J.M.; Moreira, A.A.; Paris, A.; Ruhoff, A.; Barbosa, C.; et al. Amazon Hydrology From Space: Scientific Advances and Future. *Rev. Geophys.* **2021**, *59*, 1–97. [[CrossRef](#)]
31. Sampaio, D.d.S.; Santos, M.d.L.S.; Tagliaro, C.H.; Beasley, C.R. Variation in environmental characteristics of waters among Amazon coast oyster culture units. *Acta Amaz.* **2020**, *50*, 295–304. [[CrossRef](#)]
32. Sousa, E.B.d.; Costa, V.B.d.; Pereira, L.C.C.; Costa, R.M.d. Variação temporal do fitoplâncton e dos parâmetros hidrológicos da zona de arrebentação da Ilha Canela (Bragança, Pará, Brasil). *Acta Bot. Bras.* **2009**, *23*, 1084–1095. [[CrossRef](#)]
33. Rosário, R.P. *Análise de Processos Oceanográficos No Estuário do Rio Pará*; Universidade Federal do Pará: Belém, Brazil, 2016.
34. Costa, B.O.d. *Variação Nictemeral do Microfitoplâncton em um Estuário do Nordeste Paraense, Brasil*; Universidade Federal do Pará: Belém, Brazil, 2010.
35. Reis, F.N.d.; Belúcio, L.F.; Pamplona, F.C.; Reis, L.T.L.; Veiga, G.D.d.; Melo, N.F.A.C.d. Microphytoplankton dynamics in Curuperé estuary at the Amazonian mangrove ecosystem. *Bol. Inst. Pesca* **2020**, *46*, e513. [[CrossRef](#)]
36. Santana, D.d.S.; Paiva, R.d.S.; Pereira, L.C.C.; Costa, R.M.d. Microphytoplankton of the Marapanim Estuary (Pará, Northern Brazil). *Trop. Oceanogr.* **2010**, *38*, 161–172. [[CrossRef](#)]
37. Sousa, E.B.d.; Costa, V.B.d.; Pereira, L.C.C.; Costa, R.M.d. Microfitoplâncton de águas costeiras amazônicas: Ilha Canela (Bragança, PA, Brasil). *Acta Bot. Bras.* **2008**, *22*, 626–636. [[CrossRef](#)]

38. Raposo, M.I.C.; Gomes, M.; Botelho, M.J.; Rudnitskaya, A. Paralytic Shellfish Toxins (PST)-Transforming Enzymes: A Review. *Toxins* **2020**, *12*, 344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Zingone, A.; Escalera, L.; Aligizaki, K.; Fernandez-Tejedor, M.; Ismael, A.; Montresor, M.; Mozetic, P.; Tas, S.; Totti, C. Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report. *Harmful Algae* **2021**, *102*, 101843. [[CrossRef](#)]
40. Santos, M.; Oliveira, P.B.; Moita, M.T.; David, H.; Caeiro, M.F.; Zingone, A.; Amorim, A.; Silva, A. Occurrence of *Ostreopsis* in two temperate coastal bays (SW Iberia): Insights from the plankton. *Harmful Algae* **2019**, *86*, 20–36. [[CrossRef](#)]
41. Tibiriçá, C.; Leite, I.P.; Batista, T.V.V.; Fernandes, L.F.; Chomerat, N.; Herve, F.; Hess, P.; Mafra, L.L., Jr. *Ostreopsis* cf. *ovata* Bloom in Currais, Brazil: Phylogeny, Toxin Profile and Contamination of Mussels and Marine Plastic Litter. *Toxins* **2019**, *11*, 446. [[CrossRef](#)]
42. Rodrigues, S.M.; de Carvalho, M.; Mestre, T.; Ferreira, J.J.; Coelho, M.; Peralta, R.; Vale, P. Paralytic shellfish poisoning due to ingestion of *Gymnodinium catenatum* contaminated cockles—application of the AOAC HPLC official method. *Toxicon* **2012**, *59*, 558–566. [[CrossRef](#)]
43. Carvalho, I.L.; Pelerito, A.; Ribeiro, I.; Cordeiro, R.; Nuncio, M.S.; Vale, P. Paralytic shellfish poisoning due to ingestion of contaminated mussels: A 2018 case report in Caparica (Portugal). *Toxicon X* **2019**, *4*, 100017. [[CrossRef](#)]
44. Schramm, M.A.; Tamanaha, M.S.; Beirão, L.H.; Proença, L.A.O. Toxinas paralisantes em mexilhão *Perna perna* em áreas de cultivo da costa sul do Brasil: Estudo de caso. *Aliment. Nutr. Araraquara* **2009**, *17*, 443–450.
45. Souza, D.A.d.; Zanette, G.B.; Neves, M.H.C.B.; Schramm, M.A.; Proença, L.A.d.O.; Oliveira, M.M.d. Cultivo de moluscos bivalves: Algas nocivas e bases para programa de monitoramento de ficotoxinas em fazenda de maricultura de Arraial do Cabo, RJ. *Bol. Do Obs. Ambient. Alberto Ribeiro Lamego* **2015**, *9*, 119–139. [[CrossRef](#)]
46. Anderson, D. HABs in a changing world: A perspective on harmful algal blooms, their impacts, and research and management in a dynamic era of climatic and environmental change. *Harmful Algae* **2015**, *2012*, 3–17.
47. Lugliè, A.; Satta, C.T.; Pulina, S.; Bazzoni, A.M.; Padedda, B.M.; Nicola, S. Le problematiche degli Harmful Algal Blooms (HAB) in Sardegna. *Biol. Mar. Mediterr.* **2011**, *18*, 2–9.
48. Bazzoni, A.M.; Caddeo, T.; Pulina, S.; Padedda, B.M.; Satta, C.T.; Sechi, N.; Luglie, A. Spatial distribution and multiannual trends of potentially toxic microalgae in shellfish farms along the Sardinian coast (NW Mediterranean Sea). *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, 86. [[CrossRef](#)]
49. Liu, Y.; Yu, R.C.; Kong, F.Z.; Chen, Z.F.; Dai, L.; Gao, Y.; Zhang, Q.C.; Wang, Y.F.; Yan, T.; Zhou, M.J. Paralytic shellfish toxins in phytoplankton and shellfish samples collected from the Bohai Sea, China. *Mar. Pollut. Bull.* **2017**, *115*, 324–331. [[CrossRef](#)]
50. Anon, A. Official method 2005.06 quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. In *AOAC Official Methods for Analysis*; International, A., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2005.
51. Oshima, Y. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In *Harmful Marine Algal Blooms*; Lassus, P., Arzul, G., Gentien, P., Marcaillou, C., Eds.; Lavoisier Publishers: Paris, France, 1995; pp. 475–480.
52. Fisch, G.; Marengo, J.A.; Nobre, C.A. Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. *Acta Amaz.* **1998**, *28*, 101. [[CrossRef](#)]
53. Souza-Filho, P.W.M. The Amazon Macrotidal Mangrove Coast (AMMC): Morphological scenes, mapping and area quantification using remote sensing data. *Rev. Bras. Geofísica* **2005**, *23*, 427–435. [[CrossRef](#)]
54. Cole, G.A. *Textbook of Limnology*, 4th ed.; Waveland Press: Long Grove, IL, USA, 1994.
55. Baird, R.; Bridgewater, L.; Association, A.P.H.; Association, A.W.W.; Federation, W.E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*; American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, 2012; Volume 22.
56. Bicudo, C.E.M.; Menezes, M. *Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave Para Identificação e Descrições*, 2nd ed.; RiMa Editora: São Carlos, Brazil, 2017.
57. Komárek, K.; Anagnostidis, K. Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa freshwater flora of central Europa. In *Cyanoprocarvota 2. Teil/Part 2*; Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M., Eds.; Spektrum Akademischer Verlag: Berlin, Germany, 2007; p. 759.
58. Komárek, J.; Anagnostidis, K. Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropafreshwater flora of central Europa. In *Cyanoprocarvota 1. Teil. Spektrum Akademischer Verlag*; Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., Eds.; Spektrum Akademischer Verlag: Berlin, German, 2008; pp. 1–556.
59. Round, F.E.; Crawford, R.M.; Mann, D.G. *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1990; p. 747.
60. Sato, S.; Nishimura, T.; Uehara, K.; Sakanari, H.; Tawong, W.; Hariganeya, N.; Smith, K.; Rhodes, L.; Yasumoto, T.; Taira, Y.; et al. Phylogeography of *ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27983. [[CrossRef](#)]
61. Hoppenrath, M.; Murray, S.A.; Chomérat, N.; Horiguchi, T. *Marine Benthic Dinoflagellates—Unveiling Their Worldwide Biodiversity*; Schweizerbart Science Publisher: Stuttgart, Germany, 2014.
62. Krawczyk, D.; Gonglewski, N. Determining Suspended Solids Using a Spectrophotometer. *Sew. Ind. Wastes* **1959**, *31*, 1159–1164.
63. Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. In *Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005*. Available online: www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf (accessed on 18 April 2022).
64. INMET. Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil. In *Normais Climatológicas (1991–2020)*; INMET: Brasília, DF, Brazil, 2022.

65. Hammer, Ø.; Harper, D.; Ryan, P. Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis PAST. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 9–18.
66. Legendre, P.; Gallagher, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* **2001**, *129*, 271–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Valentin, J.L. *Ecologia Numérica: Uma Introdução à Análise Multivariada de Dados Ecológicos*, 2nd ed.; Editora Interciência: Rio de Janeiro, Brazil, 2012; p. 168.
68. McCune, B.; Mefford, M.J. *PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 7.0 for Windows*; Wild Blueberry Media: Corvallis, OR, USA, 2016.
69. Lawrence, J.F.; Niedzwiedek, B.; Menard, C.; Lau, B.P.; Lewis, D.; Kuper-Goodman, T.; Carbone, S.; Holmes, C. Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 1035–1044. [[CrossRef](#)]
70. Alexander, J.; Benford, D.; Cockburn, A.; Cravedi, J.-P.; Dogliotti, E.; Domenico, A.D.; Fernández-Cruz, M.L.; Fink-Gremmels, J.; Fürst, P.; Galli, C.; et al. Marine biotoxins in shellfish—Saxitoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* **2009**, *7*, 1019. [[CrossRef](#)]