

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**CURSO DE MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA**

**VARIABILIDADE DA QUÍMICA DEFENSIVA DE *Palythoa*  
*caribaeorum* (DUCHASSAING & MICHELOTTI 1860) NA  
REGIÃO DE ARRAIAL DO CABO, RJ**

Suélen Felix

Niterói, fevereiro de 2007

SUÉLEN FELIX

Aluna do curso de mestrado em Biologia Marinha da UFF

**VARIABILIDADE DA QUÍMICA DEFENSIVA DE *Palythoa caribaeorum*  
(DUCHASSAING & MICHELOTTI 1860) NA REGIÃO DE ARRAIAL DO  
CABO, RJ**

Orientadores:

Dr. Ricardo Coutinho

Dr. Renato Crespo Pereira

Universidade Federal Fluminense

Niterói, fevereiro de 2007

**VARIABILIDADE DA QUÍMICA DEFENSIVA DE *Palythoa caribaeorum*  
(DUCHASSAING & MICHELOTTI 1860) NA REGIÃO DE ARRAIAL DO  
CABO, RJ**

Elaborado por Suélen Felix  
Aluna do Curso de Mestrado em Biologia Marinha da UFF

Foi analisado e aprovado com  
grau: \_\_\_\_\_

---

Dr. Ricardo Coutinho  
Instituto de Estudos do Mar almirante Paulo Moreira

---

Dr. Renato Crespo Pereira  
Universidade Federal Fluminense

---

Dra. Helena Passeri Lavrado  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Bernardo Antonio Perez da Gama  
Universidade Federal Fluminense

Niterói, fevereiro de 2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

**FELIX, SUÉLEN**

Variabilidade da química defensiva de *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti 1860) na região de Arraial do Cabo, RJ.

IX + 81 pp

Dissertação: Mestrado em Biologia Marinha

1. Ecologia Química Marinha
2. Palytoxina
3. Defesas químicas

I – Universidade Federal Fluminense, Mestrado em Biologia Marinha

II – Título.

A minha família, ao meu grande  
amor, meus orientadores e meus  
amigos pelo incentivo.

“Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança”.

**Albert Einstein**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Gostaria de expressar meus agradecimentos a pessoas que com grandes gestos ou até mesmo com simples palavras foram de vital importância para a conclusão desse trabalho.

Agradeço primeiramente a Deus, que é a razão de tudo isso, a Nossa Senhora das Graças e a Santo Antônio, por ouvirem minhas preces todas as noites.

Aos meus pais pelo incentivo, pela confiança, pelos bons princípios e principalmente pelo grande amor que têm por mim. Aos meus irmãos por sentirem orgulho de mim e a minha tia por ter me dado força quando eu mais precisei.

Ao Pablo - o meu grande amor, que foi pessoa mais próxima e importante nesses últimos dois anos, por ter me amado, ter me respeitado, ter me feito uma pessoa melhor, ter me incentivado, ter acreditado em mim quando ninguém mais o fazia, e por ter compreendido as minhas crises nervosas. Te amo pra sempre.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Coutinho que viu meu potencial, acreditou e investiu. Minha dívida de gratidão será eterna. Ao meu co-orientador Dr. Renato Crespo Pereira, é uma honra trabalhar ao seu lado.

Ao Dr. Bernardo A. P. da Gama pela ajuda nas análises estatísticas e por ser um ótimo amigo. Aos parceiros Helô, Gláucia e Dudu, por alegrarem os meus dias com muito bom humor e pela amizade saudável e desinteressada, adoro vocês.

Ao IEAPM pelo apoio e estrutura oferecida para a realização desse trabalho.

A Dra. Eliane González Rodriguez por ser meu maior exemplo em docência.

Aos colegas da turma de mestrado Bruno, Isabel, Marcelo, Michele, Rachel, Sabrina, Thiago e Wagner pelo companheirismo.

Aos companheiros do Laboratório de Ecologia Química pelo alto astral e pela ajuda nos meus experimentos.

Aos colegas do BIOINC pela constante disponibilidade para me apoiar no que fosse preciso.

Aos amigos que me ajudaram nos trabalhos de campo: Mostacato, Lú Lage, Serginho, Damián e Valéria.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Marinha, que se esforçam para tornar o curso cada dia melhor.

Muito Obrigada!



## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b>	<b>01</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>02</b>
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>03</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1. Variabilidade ecológica da química defensiva de <i>P. caribaeorum</i> de Arraial do Cabo, RJ</b>	
<b><i>INTRODUÇÃO</i></b>	<b>19</b>
Objetivos	23
Hipóteses	23
<b><i>MATERIAIS E MÉTODOS</i></b>	<b>24</b>
Locais de estudo	24
Coleta e extração	25
Preparação dos alimentos artificiais	26
Caracterização dos Bioensaios	27
<i>Entre locais</i>	29
<i>Entre profundidades</i>	29
<i>Mesma profundidade</i>	30
<i>Sazonal</i>	31
Análise Bioestatística	32
<b><i>RESULTADOS</i></b>	<b>33</b>
Bioensaio entre locais	33
Bioensaio entre profundidades	37
Bioensaio mesma profundidade	41
Sazonal	43
<i>Sazonal 2m</i>	43
<i>Sazonal 4m</i>	45
<i>Sazonal 6m</i>	48
Peixes onívoros	50
<b><i>DISCUSSÃO</i></b>	<b>50</b>
<b><i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i></b>	<b>54</b>

**CAPÍTULO 2. Potencial antiincrustante dos extratos brutos polares e apolares de três tratamentos distintos de *Palythoa caribaeorum* de Arraial do Cabo, RJ**

<b><i>INTRODUÇÃO</i></b>	<b>60</b>
Objetivos	62
Hipóteses	63
<b><i>MATERIAIS E MÉTODOS</i></b>	<b>63</b>
Coleta de material	63
Obtenção dos extratos brutos	64
Testes das atividades antiincrustantes	64
Análise Bioestatística	67
<b><i>RESULTADOS</i></b>	<b>67</b>
Extratos polares	67
Extratos apolares	69
<b><i>DISCUSSÃO</i></b>	<b>71</b>
<b><i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i></b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>

## RESUMO

---

Os corais antozoários do gênero *Palythoa* são conhecidos por produzirem várias substâncias que atuam em diversas interações ecológicas como defesa do organismo contra predação, incrustação, competidores e microrganismos patogênicos. A palytoxina é a defesa química mais conhecida e estudada em *Palythoa*, considerada a mais potente toxina de origem marinha. O presente trabalho avaliou a variabilidade da química defensiva de colônias de *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo, RJ, coletadas em três profundidades distintas (2, 4 e 6 metros), através de testes de suscetibilidade à predação por peixes. Não foi constatada qualquer variabilidade espacial na suscetibilidade à predação, presumivelmente devido ao alto fluxo gênico entre os locais amostrados. Os testes que avaliaram a variabilidade temporal também não apontaram diferenças significativas, indicando que a produção de defesas químicas é regulada geneticamente e não ambientalmente. Foi testado também o potencial antiincrustante de extratos brutos polares e apolares de três tratamentos diferentes de *P. caribaeorum* (*Palythoa* com muco, *Palythoa* sem muco e Muco de *Palythoa*) e foi constatado que a proteção antiincrustante provida pelo muco provavelmente é física, e que a substância que atua como química defensiva é de natureza hidrofílica, presumivelmente a palytoxina ou um análogo correspondente, já que esta é a única substância polar com potencial defensivo descrita para o gênero *Palythoa*. Estudos complementares são necessários com intuito de se conhecer a substância majoritária presente em *P. caribaeorum* e suas correspondentes expressões ecológicas.

## ABSTRACT

---

Anthozoan corals of the genus *Palythoa* are known to produce several defensive compounds acting in diverse ecological interactions such as defense against predation, fouling, competition and pathogens microorganisms. Palytoxin is the best-known defense of *Palythoa*, being the most potent toxin described to marine environment. The present work assessed the variability of the defensive chemistry of *P. caribaeorum* colonies from Arraial do Cabo, RJ, collected at three different depths (2, 4 and 6 meters), through tests of susceptibility to predation by fishes. It was not found any spatial variability in susceptibility to predation, probably due to high gene flow between studied sites. The tests that assessed temporal variability did not show significant differences, what indicates that production of chemical defenses is regulated genetically rather than environmentally. It was also assessed the antifouling potential of polar and nonpolar crude extracts from three different *Palythoa* treatments (*Palythoa* with mucus, *Palythoa* without mucus and *Palythoa* mucus) and it was verified that antifouling protection provided by the mucus is probably of physical nature, rather than chemical, and that the compound acting as chemical defense is hydrophilic-nature, presumably palytoxin or its corresponding analog, since this is the only polar compound exhibiting defensive property described for the genus *Palythoa*. Further studies are necessary to know the major compound produced by *P. caribaeorum* and their corresponding ecological roles.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

*Palythoa caribaeorum* é um antozoário da ordem dos zoantídeos (Fig. 1), que apresenta ampla distribuição em toda costa oeste do Oceano Atlântico (Hetzl & Castro, 1994; Castro & Pires, 2001), habitando ambientes normalmente rasos (Kemp, *et al.*, 2006). Pertence à subclasse Hexacorallia (Zoantharia), portanto, é um organismo colonial, no qual os pólipos estão conectados por um retículo basal ou por tecido cenenquimal (Castro & Pires, 2001). Possui grande habilidade competitiva por espaço, podendo crescer perto ou sobre qualquer outro invertebrado sésil, estando no topo da hierarquia competitiva (Suchanek e Green, 1981). Pode dominar, em algumas regiões rasas, com percentuais de cobertura acima de 85%, através da morte ou do retardamento do crescimento de seus competidores por meios físicos - crescendo diretamente sobre os tecidos de outros invertebrados - ou químicos, pois contém uma potente toxina de alto peso molecular chamada palytoxina - cerca de 2676Da (Birkeland e Neudecker, 1981).



**Figura 1.** Fotografia de *Palythoa caribaeorum*

As colônias de *P. caribaeorum* são predominantes nos costões rochosos rasos da região sudeste do Brasil. Podem ser observadas crescendo

isoladamente, mas o mais comum é observá-las formando densas coberturas sobre os substratos (Oliveira, 2005). Em Arraial do Cabo, as colônias de *P. caribaeorum* recobrem cerca de 50% do substrato disponível e distribuem-se verticalmente desde o limite superior do infralitoral até em média 10 metros de profundidade, podendo se desenvolver em diferentes tipos de substratos como rochas de tamanhos variados, escombros depositados no fundo e sobre alguns organismos sésseis (Oliveira, 2005).

*P. caribaeorum* é um cnidário não hermatípico, é carnívoro e captura com seus tentáculos, organismos em suspensão – principalmente zooplâncton. Apesar de ser heterótrofo, associa-se simbioticamente a microalgas fotossintetizantes e lança mão dos recursos produzidos por elas quando as fontes alimentares são escassas (Johannes, 1974). Todos os indivíduos do gênero *Palythoa* apresentam dinoflagelados endosimbiontes normalmente chamados de zooxantelas (Kemp *et al.*, 2006). Dinoflagelados do gênero *Symbiodinium* são os mais comuns desses endosimbiontes fotossintéticos dentre os cnidários coloniais e os corais hermatípicos (Trench, 1997; Rowan, 1998; Baker, 2003). A presença de *Symbiodinium* contribui substancialmente para a produtividade, a sobrevivência e o sucesso dos seus hospedeiros (Muscatine e Porter, 1977). O metabolismo das zooxantelas também está associado ao processo de calcificação dos corais formadores de recifes (hermatípicos) (Goureau e Goureau, 1959; Chalker e Barnes, 1990), à mediação do fluxo de nutrientes elementares (D'Elia e Weibe, 1990), ao abastecimento de carbono fixado pela via fotossintética (Muscatine, 1989), tanto quanto, à produção de metabólitos secundários e de muco (Banin *et al.*, 2001 e Wild *et al.*, 2004). As zooxantelas se beneficiam do suprimento

constante de CO<sub>2</sub> e nutrientes (Cook *et al.*, 1988), da proteção contra herbívoros e contra danos causados por radiação UV (e.g. Lesser e Shick, 1989). A simbiose entre os cnidários e as zooxantelas é também ecologicamente importante, pois contribui para a produtividade primária dos recifes de coral (McLaughling e Zahl, 1959), favorece a reciclagem e a conservação de nutrientes (Taylor, 1983; Cook, 1985) e promove a construção da estrutura dos recifes pelos corais (Kemp *et al.*, 2006).

Os corais são componentes bênticos dos mais representativos em costões rochosos e recifes (Dinesen, 1983). A predação sobre esses organismos normalmente é limitada a poucas espécies de peixes e invertebrados especialistas (Sammarco e Coll, 1988), pois normalmente são capazes de deter consumidores generalistas (Van Alstyne *et al.*, 1994 e Pawlik *et al.*, 1995). Esses poucos predadores especializados são capazes de consumir a presa tóxica sem sofrer qualquer efeito através de resistência ou destoxificação dos metabólitos nocivos (Coll *et al.*, 1983). Portanto, o sucesso evolutivo alcançado em áreas com altos níveis de predação, é atribuído à produção de metabólitos secundários que exercem importantes papéis nas interações ecológicas e comportamentais entre os organismos, principalmente na defesa contra consumidores (Sammarco e Coll, 1988).

Embora tenha sido estabelecido que as zooxantelas sejam os produtores primários na associação coral-alga (Patton e Burris, 1983; Muscatine *et al.*, 1984), Michalek-Wagner *et al.* (2001) demonstraram que a produção de terpenos é realizada pelo coral hospedeiro e que, apesar de as zooxantelas influenciarem na quantidade da produção via metabolismo primário, elas não são essenciais para a produção.

Nas últimas décadas, houve um crescente aumento dos processos de degradação dos ambientes marinhos, particularmente sobre os recifes de corais, dentre as formas de expressão destas alterações destaca-se o fenômeno do branqueamento (Goreau e Haynes, 1994 e Brown, 1997). O branqueamento consiste na perda das zooxantelas e a conseqüente perda da pigmentação do coral (Brown, 1997) podendo levar o mesmo à morte, uma vez que a maior parte do carbono necessário ao metabolismo do coral é provida pelas zooxantelas (Muscatine *et al.*, 1981) e o carbono obtido através do consumo de zooplâncton não é suficiente para suprir as exigências metabólicas (Porter, 1974). Inicialmente este fenômeno está ligado às diversas variações ambientais (temperatura, irradiação solar, sedimentação). O “stress” causado por bruscas variações das condições ambientais leva a “quebra da simbiose” existente entre o coral e as zooxantelas (Michalek-Wagner e Bowden, 2000). As zooxantelas estão intrinsecamente associadas à assimilação e reciclagem de nitrogênio e de fósforo na relação coral-alga, portanto, a quebra da simbiose pode afetar a produção de metabólitos secundários indiretamente, pela supressão nutricional ou diretamente se elas realmente forem as responsáveis pela produção desses metabólitos (Michalek-Wagner e Bowden, 2000). Já foi constatado que corais que perdem as zooxantelas ficam mais susceptíveis a invasões bacterianas, incrustações por algas e predação, além de ter sua capacidade de ser alimentar, de competir por recursos, de crescer e de sobreviver afetada (Kushmaro *et al.*, 1997; Coll *et al.*, 1987; Oliveira, 2005).

Apesar de a produção de metabólitos secundários representar um custo metabólico significativo, a energia gasta para a produção desses metabólitos é perfeitamente compensada pelas múltiplas funções que eles exercem dentro



dos indivíduos que os produzem (Michalek-Wagner *et al.*, 2001). Esses metabólitos aumentam a capacidade do coral de se defender contra a predação (La Barre *et al.*, 1986; Wylie e Paul, 1989), aumentam a sua habilidade competitiva (Sammarco *et al.*, 1983; Maida *et al.*, 1995) e as oportunidades reprodutivas (Coll *et al.*, 1989, 1995), bem como sendo ativos contra infestações microbiológicas (Aceret *et al.*, 1995; Slattery *et al.*, 1995) e contra organismos incrustantes (Kiefer *et al.*, 1986; Michalek e Bowden, 1997).

A palytoxina (PTX), metabólito secundário mais importante e mais estudado em cnidários dos gêneros *Palythoa* e *Zoanthus* é uma macromolécula poliéter muito complexa e é o produto natural marinho mais potente já descoberto, tendo sua toxicidade comparada apenas a da toxina botulínica (Moore e Scheuer, 1971; Faulkner, 2000). A palytoxina foi isolada primeiramente a partir do zoantídeo *Palythoa toxica* (Moore e Scheuer, 1971) e, tanto ela quanto muitos análogos, têm sido encontrados em várias espécies dos gêneros *Palythoa* e *Zoanthus* (Attaway e Ciereszko, 1974; Beress *et al.*, 1983; Oku *et al.*, 2004) e em alguns dinoflagelados, principalmente em *Symbiodinium* (Moriya *et al.*, 1998) e em *Ostreopsis* (Lenoir *et al.*, 2004). Já é conhecido que essas substâncias ocorrem em organismos do Mar do Caribe, Indo-Pacífico, da costa oeste do Oceano Atlântico e do Oceano Índico (Moore e Scheuer, 1971, Gleibs *et al.*, 1995, Onuma *et al.*, 1999).

O seqüestro da palytoxina e de seus análogos é muito intenso nas cadeias alimentares marinhas, pois trata-se de um metabólito muito ativo, que não causa danos aos organismos que a seqüestram e que por sua vez, a usam como defesa nas interações ecológicas e evitam a predação (Mebis, 1998). A PTX tem sido encontrada em muitos animais marinhos que vivem associados a

colônias de zoantídeos, tais como, outros corais, esponjas, moluscos e crustáceos e em predadores como poliquetas, estrelas-do-mar e peixes (Mebis, 1998; Gleibs e Mebis, 1999). Estes últimos exibem alto nível de tolerância à palitoxina, pois podem seqüestrá-la, acumulá-la em altas concentrações na sua forma ativa dentro de seus órgãos e assim transportá-la através da cadeia alimentar (Gleibs e Mebis, 1999). Essa pode ser uma das explicações para a ampla distribuição da palitoxina na biota marinha.

A PTX é conhecida por causar intoxicação alimentar em humanos, através do consumo de crustáceos e peixes (Alcala *et al.*, 1988). Esse envenenamento é chamado de clupeotoxismo e causa paralisia abdominal, náuseas, diarreia, parestesia, espasmos musculares graves e insuficiência respiratória, podendo levar à morte (Alcala *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999).

Os principais análogos da PTX são a ostreocina, isolada do dinoflagelado bentônico *Ostreopsis* sp. (Lenoir *et al.*, 2004) e a toxina do caranguejo *Lophozozymus pictor* (LPTX), segundo Lau *et al.* (1995), esse caranguejo seqüestra a PTX e a transforma em LPTX. Recentemente, novos metabólitos polioxigenados de cadeia longa, chamados zooxantelatoxinas A e B, foram isoladas da alga marinha simbiote *Symbiodinium* sp. e apresentam potente ação vasoconstritora (Nakamura *et al.*, 1993, Morija *et al.*, 1998) e suas estruturas foram completamente determinadas (Asari *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1993, 1995, Moriya *et al.*, 1998).

Os análogos da palytoxina possuem grandes estruturas moleculares (cerca de 2900Da), e contém um grande número de átomos de oxigênio e carbonos olefinicos (Asari *et al.*, 1993, Moriya *et al.*, 1998). A zooxantelatoxina A causa trombose em coelhos, acompanhada por um aumento na

concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e elevada fosforilação da tirosina (Rho *et al.*, 1997; Moriya *et al.*, 1998). A zooxantelatixina B produz uma elevação na concentração de  $\text{Na}^+$  e uma redução da concentração de  $\text{K}^+$  nas células da aorta de coelhos (Moriya *et al.*, 1998), o que pode ser o indicativo de despolarização da membrana plasmática como as observadas resultantes da ação da palitoxina em células nervosas e musculares (Dubois & Cohen, 1977; Muramatsu *et al.*, 1984 e Moriya *et al.*, 1998).

A descoberta de análogos e de outros metabólitos em dinoflagelados que se associam com zoantídeos levanta uma questão que ainda não foi esclarecida; se a síntese dessas toxinas é originada na alga ou no hospedeiro. Muitos outros metabólitos foram isolados de *Palythoa*, os principais são glicerol-éteres (Pettit e Fujii, 1982), ácidos graxos bromados (Carballeira e Reyes, 1995), esteróis (Bergman *et al.*, 1951; Kelecom e Solé-Cava, 1981) e ecdisterois (Shigemori *et al.*, 1999), mas os seus efeitos nas interações ecológicas não foram estudados.

Estudos sobre a variabilidade das defesas químicas em invertebrados marinhos são muito raros, apesar da compreensão sobre a variação dos mecanismos defensivos e seus efeitos sobre a interação consumidor-presa em uma mesma espécie ser importantíssima porque: 1. é sobre a variabilidade que a evolução atua, 2. é pouco documentada e, portanto, muito depreciada nos ecossistemas marinhos, 3. tem importantes implicações para a regulação das populações, e 4. é importante para a compreensão do papel da regulação genética vs. fenotípica sobre a biodiversidade marinha (Hay, 1996). Estudos sobre a variação intraespecífica das defesas químicas de plantas, são de suma importância (Karban, 1992 e Alstad e Andow, 1995) e sugerem que estudos

similares sobre os organismos marinhos estejam rapidamente disponíveis (Hay, 1996). Por exemplo, em macroalgas marinhas, alguns estudos demonstram a existência de variabilidade espacial na quantidade de defesa em larga escala – ambientes temperado e tropical (Bolser e Hay, 1996), entre indivíduos submetidos a diferentes pressões de herbivoria (Paul e Van Alstyne, 1988), entre indivíduos numa mesma população (Sudatti *et al.*, 2006), ou mesmo diferenças qualitativas (tipos de substâncias) em indivíduos vivendo em diferentes profundidades (Gerwick *et al.* 1985).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Aceret, T.L., Sammarco, P.W. e Coll, J.C. 1995. Toxic effects of alcyonacean diterpenes on scleractinian corals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 188: 63-78.
- Alcala, A.C., Alcala, L.C., Garth, J.S., Yasumura, D. e Yasumoto, T. 1988. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon*, 26: 105-107.
- Alstad, D.N. e Andow, D.A. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 268: 1894-1896.
- Asari, T., Nakamura, H., Murai, A. e Kan, Y. 1993. Structures of periodate oxidation products with a conjugated diene or na exomethylene from zooxanthellation-A. *Tetrahedron Lett.*, 34: 4059-4062.
- Attway, D.H. e Ciereszko, L.S. 1974. Isolation and partial characterization of caribbean palytoxin. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Coral Reef Symp.*, pp. 497-504.

- Baker, A.C. 2003. Flexibility and specificity in coral-alga symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34: 661-689.
- Banin, E., Israely, T., Fine, M., Loya, Y. e Rosenberg, E. 2001. Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. *FEMS Microbiol. Lett.*, 199: 3-37.
- Beress, L., Zwick, J., KolKenbrock, H.J., Kaul, P.N. e Wassermann, O. 1983. A method for the isolation of the Caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zoanthid) *Palythoa caribaeorum*. *Toxicon*, 21: 285-290.
- Bergmann, W., Feeney, R.J. e Swift, A.N. 1951. Contribution to the study of marine natural products. Palysterol and other lipids components of sea anemones. *J. Org. Chem.*, 16: 1337-1344.
- Birkeland, C. e Neudecker, S. 1981. Foraging behavior of two Caribbean chaetodontids: *Chaetodon capistratus* and *C. aculeatus*. *Copeia*, 198: 169-178.
- Bolser, R.C. e Hay, M.E. 1996. Are tropical plants better defended? Palatability and defenses of temperate versus tropical seaweeds. *Ecology*, 77: 2269-2286.
- Brown, B.E. 1997. Disturbances to reefs in recent times. *In*: Birkeland, C. (Ed.) Life and Death of Coral Reefs. *Chapman & Hall, New York*, pp. 354- 79.
- Carballeira, N.M. e Reyes, M. 1995. Identification of a new 6-bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemone *Condylactis gigantea* and the zoanthid *Palythoa caribaeorum*. *J. Nat. Prod.*, 58: 1689-1694.
- Castro, C.B. e Pires, D.O. 2001. Brazilian coral reefs: What we already know and what is still missing. *B. Mar. Sci.*, 69: 357-371.

- Chalker, B.E. e Barnes, D.J., 1990. Gamma-Densitometry for the Measurement of Skeletal Density. *Coral Reefs.*, 9: 11-23.
- Coll, J.C., Bowden, B.F., Heaton, A., Scheuer, P.J., Li, M.K.W., Clardy J., Schulte, G.K. e Finer-Moore, J. 1989. Structures and possible functions of epoxipukalide and pukalide. *J. Chem. Ecol.*, 15: 1177-1191.
- Coll, J.C., Price, I.R., König, G.M. e Bowden, B.F. 1987. Algal overgrowth of alcyonacean soft corals. *Mar. Biol.*, 96: 129-35.
- Coll, J.C., Leone, P.A., Bowden, B.F., Carrol, A.R., König, G.M., Heaton, A., Nys, R., Maida, M., Alino, P.M., Willis, R.H., Babcock, R.C., Florian, Z., Clayton, M.N., Miller, R.L. e Aldersalde, P.L. 1995. Chemical aspects of mass spawning in corals. II Epi-thunbergol the sperm attractant in the eggs of the soft coral *Lobophytum crassum*. *Mar. Biol.*, 123: 137-143.
- Coll, J.C., Tapiolas, D.M., Bowden, B.F., Webb, L. e Marsh, H. 1983. Transformation of soft coral (Coelenterata, Octocorallia) terpenes by *Ovula ovum* (Mollusca, Prosobranchia). *Mar. Biol.*, 74: 35-40.
- Cook, C.B. 1985. Equilibrium populations and long-term stability of mutualistic algae and invertebrate hosts. *In: Boucher, D. (Ed.), The biology of mutualism. Oxford University Press, New York.*
- Cook, C.B., D'Elia, C.F. e Muller-Paker, G. 1988. Host feeding and nutrient sufficiency for zooxanthellae in the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Mar. Biol.*, 98: 253-262.
- D'Elia C.F. e Wiebe W.J. 1990. Biogeochemical nutrient cycles in coral reef ecosystems. *In: Dubinsky, Z. (Ed.) Coral reefs. Ecosystems of the world 25. Elsevier, New York, 49-74.*
- Dinesen, Z.D. 1983. Shade-dwelling corals of the great barrier-reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10: 173-185.

- Dubois, J.M. e Cohen, J.B. 1977. Effect of palytoxin on membrane potencial and current of frog myelinated fibers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 201: 148-155.
- Gerwick, W.H., Fenical, W. e Norris, J.N. 1985. Chemical variation in the tropical seaweed *Styopodium zonale* (Dictyotaceae). *Phytochemistry*, 24: 1279–1283.
- Gleibs, S. e Mebs, D. 1999. Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon*, 37: 1521-1527.
- Gleibs, S., Mebs, D. e Werding, B. 1995. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon*, 33: 1531-1537.
- Goreau, T.F. e Goreau, N.I. 1959. The physiology of skeleton formation in corals. 2. calcium deposition by hermatypic corals under various conditions in the reef. *Biol. Bull.*, 117: 239-250.
- Goreau, T.J. e Hayes, R.L. 1994. Coral bleaching and ocean hot-spots. *Ambio* , 23: 176-180.
- Hay, M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 200: 103-134.
- Hetzel, B. e Castro, C.B. 1994. Corais do sul da Bahia. *Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro – RJ, Brasil*, 189pp.
- Johannes, R.E. 1974. Sources of nutritional energy for reef corals. *Proc 2<sup>nd</sup> Int. Coral Reef Symp.*, 1: 133-137.
- Karban, R. 1992. Plant variation: its effects on populations of herbivorous insects. *In: Fritz, R.S. e Simms, E.L. (Eds.). Plant resistance to herbivores and pathogens. Univ. of Chicago Press, Chicago*, pp. 195-215.

- Kelecom, A. e Solé-Cava, A.M. 1981. Studies of Brazilian marine invertebrates. Comparative study of zoanthid sterols. The genus *Zoanthus*. *Mem. Inst. Butantan.*, 44/45: 451-462.
- Kemp, D.W., Cook, C.B., LaJeunesse, T.C. e Brooks, W.R. 2006. A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 335: 266-276.
- Kiefer, P.A., Rinehart, K.L. e Hooper, I.R. 1986. Renillafoulins antifouling diterpenes from the sea pansy *Renilla reniformis* (Octocorallia). *J. Org. Chem.*, 51: 4450-4454.
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M. E Loya, Y. 1997. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 147: 159-65.
- La Barre, S.C., Coll, J.C. e Sammarco, P.W. 1986. Defensive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef. II. The relationship between toxicity and feeding deterrence. *Biol. Bull.* 171: 565-76.
- Lau, C.O., Tan, C.H., Khoo, H.E., Ng, E.H., Yuen, R., Lewis, R.J., Corpuz, G.P. e Bignami, G.S. 1995. *Lophozozymus pictor* toxin: a fluorescent structural isomer of palytoxin. *Toxicon*, 33: 1373-1377.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.P., Bernard, C. e Hennion, M.C. 2004. First evidence of palytoxin analogues from na *Ostreopsis mascarensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern indian ocean. *J. Phycol.* 40: 1042-1051.
- Lesser, M.P. e Shick, J.M. 1989. Effects of irradiance and ultraviolet-radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida* - primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen-toxicity. *Mar. Biol.*, 102: 243-255.



- Maida, M., Sammarco, P.W. e Coll, J.C. 1995. Preliminary evidence for directional allelopathic effects of the soft coral *Sinularia flexibilis* (Alcyonacea, Octocorallia) on scleractinian coral recruitment. *Bull. Mar. Sci.*, 56: 303-311.
- Mclaughlin, J.J.A. e Zahl, P.A. 1959. Axenic zooxanthellae from various invertebrate hosts. *Ann. Ny. Acad. Sci.*, 77: 55-72.
- Mebs, D. 1998. Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon*, 36: 1519-1522.
- Michalek-Wagner, K., Bourne, D.J. e Bowden, B.F., 2001. The effects of different strains of zooxanthellae on the secondary-metabolite chemistry and development of the soft-coral host *Lobophytum compactum*. *Mar. Biol.*, 138: 753-760.
- Michalek-Wagner, K. e Bowden, B.F., 1997. A natural algacide from soft coral *Sinularia flexibilis* (Coelenterata Octocorallia Alcyonacea). *J. Chem. Ecol.*, 23: 259-273.
- Michalek-Wagner, K. e Bowden, B.F. 2000. Effects of bleaching on secondary metabolite chemistry of alcyonacean soft corals. *J. Chem. Ecol.*, 26: 1543-1562.
- Moore, R.E. e Scheuer, P.J. 1971. Palytoxin: a new marine toxin from coelenterate. *Science*, 172: 495-498.
- Moriya, T., Ishida, Y., Nakamura, H., Asari, T., Murai, A. e Ohizumi, Y. 1998. Vasoconstriction induced by zooxanthellatoxin-B, a polyoxygenated long-chain product from a marine alga. *Eur. J. Pharmacol.*, 350: 59-65.
- Muramatsu, I., Uemura, D., Fujiwara, M. e Narahashi, T. 1984. Characteristic of palytoxin-induced depolarization in squid axons. *J. Pharmacol. Exp., Ther.*, 231: 488-494.

- Muscatine, L. 1989. Adventures in symbiosis. *Am. Zool.*, 29: 1203-1208.
- Muscatine, L., Falkowski, P.G., Porter, J.W. e Dubinsky, Z. 1984. Fate of photosynthetic fixed carbon in light-adapted and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.*, 222: 181-202.
- Muscatine, L., McCloskey, L.R. e Marian, R.E. 1981. Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol. Oceanogr.*, 26: 601-611.
- Muscatine, L. e Porter, J.W. 1977. reef corals - mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, 27: 454-460.
- Nakamura, H., Asari, T., Fujimaki, K., Murai, A., Ohizumi, Y. e Kan, Y., 1995. Zooxanthellatoxin-B, vasoconstrictive congener of zooxanthellatoxin-A from a symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Tetrahedron Lett.*, 36: 7255-7258.
- Nakamura, H., Asari, T., Ohizumi, Y., Kobayashi, J., Yamasu, T. e Murai, A. 1993. Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. *Toxicon*, 31: 371-376.
- Oku, N., Sata, N.U., Matsunaga, S., Uchida, H. e Fusetani, N. 2004. Identification of palytoxin as a principle wich causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa* aff. *Margaritae*. *Toxicon*, 43: 21-25.
- Oliveira, M.A.L. 2005. Branqueamento em *Palythoa caribaeorum*: caracterização microbiológica e ecologia química. Programa de Pós-graduação em Biologia Marinha. Universidade Federal Fluminense, 113pp.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H. e Yasumoto, T. 1999. Identification of putative palytoxin as the causa of clupectoxism. *Toxicon*, 37: 55-65.

- Patton, J.S e Burris, J.E. 1983. Lipid synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Mar. Biol.*, 75: 131-136.
- Paul, V.J. e Van Alstyne, K.L. 1988. Antiherbivore defenses in *Halimeda*. Proc. 6<sup>th</sup> Int. Coral Reef Symp. 3: 133–138.
- Pawlik, J.R., Chanas, B., Toonen, R.J. e Fenical, W. 1995. Defenses of caribbean sponges against predatory reef fish .1. Chemical deterrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127: 183-194.
- Pettit, G.R. e Fujii, Y. 1982. Glycerol ethers of *Palythoa liscia*. *J. Nat. Prod.*, 45: 640-643.
- Porter, J.W. 1974. Zooplankton feeding by the Caribbean reef-building coral *Monastrea cavernosa*. Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Coral Reef Symp., 1: 111-125.
- Rho, M.C., Nakahata, H., Murai, A. e Ohizumi, Y. 1997. Tyrphostin 23 selectively blocks phosphorylation of p42 but not p38 mitogen-activated protein kinase by zooxanthellatoxin. *Eur. J. Pharmacol.*, 319: 375-378.
- Rowan, R. 1998. Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J. Phycol.*, 34: 407-417.
- Sammarco, P.W. e Coll, J.C. 1988. The chemical ecology of alcyonarian corals (Coelenterata: Octocorallia). In: Scheuer, P.J. (Ed.), Bioorganic marine chemistry. *Springer-Verlag, Berlin*, pp. 87-116.
- Sammarco, P.W., Coll, J.C., La Barre, S. e Willis, B. 1983. Competitive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia): allelopathic effects on selected scleractinian corals. *Coral Reefs*, 2: 173-178.
- Shigemori, H., Sato, Y., Kagata, T. e Kobayashi, J. 1999. Palythoalones A and B, new ecdysteroids from the marine zoanthid *Palythoa australiae*. *J. Nat. Prod.*, 62: 372-374.

- Slattery, M., McClintock, J.B. e Heine, J.N. 1995. Chemical defenses in Antarctic soft corals: evidence for anti-fouling compounds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 190: 61-77.
- Suchanek, T.H. e Green, D.J. 1981. Interspecific competition between *Palythoa caribaeorum* and other sessile invertebrates on St. Croix Reefs, U.S. Virgin Islands. *Proc. 4th Int. Coral Reef Symp.*, 2: 679-684.
- Sudatti, D.B., Rodrigues, S.V. e Pereira, R.C. 2006. Quantitative GC-ECD analysis of halogenated metabolites: determination of surface and within-thallus elatol of *Laurencia obtusa*. *J. Chem. Ecol.*, 32: 835-843.
- Taylor, D.L. 1983. The coral-algal symbiosis. In: Goff, L.J. (Ed.) *Algal symbiosis: a continuum of interaction strategies*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 19-35.
- Trench, R.K. 1997. Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses. *Proc. 8th Int. Coral Reef Sym.*, 2: 1275-86.
- Van Alstyne, K.L., Wylie, C.R. e Paul, V.J. 1994. Antipredator defenses in tropical pacific soft corals (Coelenterata, Alcyonacea) .2. The relative importance of chemical and structural defenses in 3 species of *Sinularia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 178: 17-34.
- Wild, C., Huettel, M., Klueber, A., Kremb, S.G., Rasheed, M.Y.M. e Jørgensen, B.B. 2004. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature*, 428: 66-70.
- Wylie, C.R. e Paul, V.J. 1989. Chemical defenses in 3 species of *Sinularia* (Coelenterata, Alcyonacea) - effects against generalist predators and the butterflyfish *Chaetodon unimaculatus* Bloch. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 129: 141-160.

## **CAPÍTULO 1: Variabilidade da química defensiva de *Palythoa caribaeorum* na região de Arraial do Cabo, RJ**

### **INTRODUÇÃO**

---

O organismo alvo deste estudo é *Palythoa caribaeorum*, um zoantídeo colonial, zooxantelado, sésil e muito comum, formado por pólipos de coloração laranja-marrom e cresce sobre substratos consolidados, principalmente em recifes e costões rasos na costa oeste do oceano Atlântico (Hetzl e Castro, 1994). Esse antozoário ocorre como pequenas colônias de apenas poucos centímetros até grandes colônias com muitos metros. Na maioria das vezes, as colônias vivem juntas formando uma densa cobertura sobre os substratos (Hetzl e Castro, 1994).

As colônias de *P. caribaeorum* produzem uma espessa camada de muco e, por esse motivo, são vulgarmente chamadas de "baba-de-boi". *P. caribaeorum* é um forte competidor no ambiente podendo recobrir extensas áreas, sendo o organismo bentônico sésil mais abundante e conspícuo de Arraial do Cabo, ocupando cerca de 50% do substrato consolidado disponível nos costões rochosos amostrados (Oliveira, 2005). Distribui-se verticalmente desde o limite superior do infralitoral até próximo a região arenosa que varia entre 5 - 11 m de profundidade entre os locais amostrados (Oliveira, 2005 e Castro *et al.*, 1995). Pode crescer sobre outros organismos sésseis ou retardar o crescimento destes e até mesmo causar a morte dos competidores através de processos químicos - alelopatia (Birkeland e Neudecker, 1981). Esse sucesso alcançado nas diversas interações biológicas é atribuído a produção de eficientes metabólitos secundários (Sammarco e Coll, 1988).

Muitas substâncias fisiologicamente ativas foram isoladas a partir de organismos marinhos, e possuem ações tóxicas (Ohizumi, 1997). As principais toxinas marinhas apresentam alta complexidade e são poliéteres (Faulkner, 2000). Toxinas isoladas de várias espécies do gênero *Palythoa*, incluindo as espécies *P. toxica* (Moore and Scheuer, 1971), *P. tuberculosa* (Kimura e Hashimoto, 1973), *P. caribaeorum* e *P. mamillosa* (Attaway e Ciereszko, 1974) e *Palythoa* sp. no Tahiti (Quinn *et al.*, 1974; Moore *et al.*, 1975) são conhecidas como as mais potentes substâncias biologicamente ativas de origem marinha (Kaul *et al.*, 1979). Apesar dessas toxinas apresentarem pequenas diferenças estruturais no anel hemiacetal (Moore *et al.*, 1975), ainda compartilham o mesmo nome, “palytoxina” que foi usado pela primeira vez por Scheuer para designar a toxina do zoantídeo *P. tóxica* (Scheuer, 1964).

Além das toxinas, outros produtos naturais de organismos marinhos têm chamado muita atenção nos últimos 30 anos (Faulkner, 2000). Dentre esses organismos marinhos incluem-se os zoantídeos, por serem fontes de produtos naturais com potencial bioativo (Faulkner, 1991). Entretanto, as origens biológicas desses produtos não foram bem esclarecidas (Nakamura *et al.*, 1993). Durante a última década, muitos autores reconheceram a importância das relações simbióticas no ambiente marinho, e especularam que muitos produtos naturais marinhos seriam produzidos pelos organismos simbiontes, porém, muitas dessas especulações necessitam de mais suportes experimentais (Faulkner, 2000).

Da mesma forma que acontece com os demais produtos naturais, ainda não se sabe quem é o responsável pela produção da palytoxina (Usami *et al.*, 1995). Já é conhecida a associação simbiótica de *Palythoa* com dinoflagelados

do gênero *Symbiodinium* (Kemp *et al.*, 2006), entretanto, há especulações de que dinoflagelados do gênero *Ostreopsis* também possam colonizar os tecidos de *Palythoa*, assim estabelecendo uma relação simbiótica (Usami *et al.*, 1995), e tanto *Symbiodinium* quanto *Ostreopsis* são gêneros conhecidos por produzirem tanto a palytoxina quanto seus análogos (Usami *et al.*, 1995, Moriya *et al.*, 1998, Ukena *et al.*, 2001 e Lenoir *et al.*, 2004). Entretanto, manipulações das infecções de corais por zooxantelas diferentes mostraram que os dinoflagelados determinam apenas a quantidade de metabólitos que o coral vai produzir através do provimento de energia para a síntese através da produção primária, mas o tipo de metabólito sintetizado é determinado pelo coral hospedeiro (Michalek-Wagner *et al.*, 2001).

Relativamente poucos estudos sobre constituintes de zoantídeos marinhos têm sido relatados (Faulkner, 1998). A descoberta da palytoxina nesses organismos teve um impacto importante sobre a busca de outras substâncias que esses organismos poderiam ter, pois a complexidade dessa toxina tornou a busca e o estudo de outros metabólitos bioativos pouco desafiadores (Faulkner, 2000). Algumas outras substâncias foram isoladas a partir de zoantídeos, a grande maioria de origem lipídica como glicerol-éteres (Pettit e Fujii, 1982), ácidos graxos bromados (Carballeira e Reyes, 1995), esteróis (Bergman *et al.* 1951; Kelecom e Solé-Cava, 1981) e ecdisteróis (Shigemori, *et al.* 1999), entretanto, nenhum teve sua atividade ecológica testada, e os testes, quando realizados, só abrangeram aspectos farmacológicos.

Em 1969 surgiram indícios de que *Palythoa toxica* apresentava variações na composição de palytoxina (Scheuer, 1969). Em 1982 e,

posteriormente, em 2001 foi sugerida a existência de variações sazonais e regionais (Moore *et al.*, 1982 e Ukena *et al.*, 2001), porém essa questão nunca foi estudada apropriadamente.

Existem consideráveis informações sobre diferenças na susceptibilidade à predação entre espécies marinhas, sobre as defesas químicas específicas que produzem essas diferenças e sobre o potencial dos efeitos sobre os padrões e processos ecológicos (Hay e Steinberg, 1992, Pawlik *et al.*, 1995 e Hay e Fenical, 1996). Entretanto, existe muito pouca informação sobre a variabilidade intraespecífica, suas causas, e suas repercussões na organização de populações e comunidades (Hay, 1996). Embora a variação na produção esteja começando a ser investigada, a variação entre as diferentes partes do organismo, entre diferentes indivíduos de uma população e entre diferentes populações da mesma espécie necessitam ser mais abordadas (Hay, 1996). Já existem várias informações sobre a variabilidade de defesas químicas em macroalgas, entretanto esses estudos em invertebrados ainda são raros. Para organismos marinhos em geral, a frequência e a magnitude da variação intraespecífica dos metabólitos secundários não são conhecidas, mas estima-se que essas variações sejam muito comuns (Hay, 1996).

*P. caribeorum* é um zoantídeo colonial que forma extensas coberturas sobre os substratos não apresentando diferenciação clara entre as colônias. Entretanto, é esperado verificar a presença de variabilidade na produção de defesas químicas entre indivíduos de uma mesma população e entre indivíduos de populações diferentes, uma vez que cada local amostrado apresenta características físicas e biológicas distintas. Em geral, em regiões tropicais, a variabilidade nos parâmetros ambientais tende a ser menor do que em



ambientes subtropicais e temperados (Krebs, 2004), entretanto, devido à presença de ressurgência sazonal em Arraial do Cabo, que altera a temperatura e a quantidade de nutrientes na água (Valentin, 1984), esperamos verificar também variabilidade temporal, na produção de defesas químicas.

### **Objetivo**

O presente estudo se propôs a avaliar a variabilidade espacial e temporal, da química defensiva de *Palythoa caribaeorum* na região de Arraial do Cabo, através de testes de suscetibilidade a predação por peixes onívoros.

### **Hipóteses**

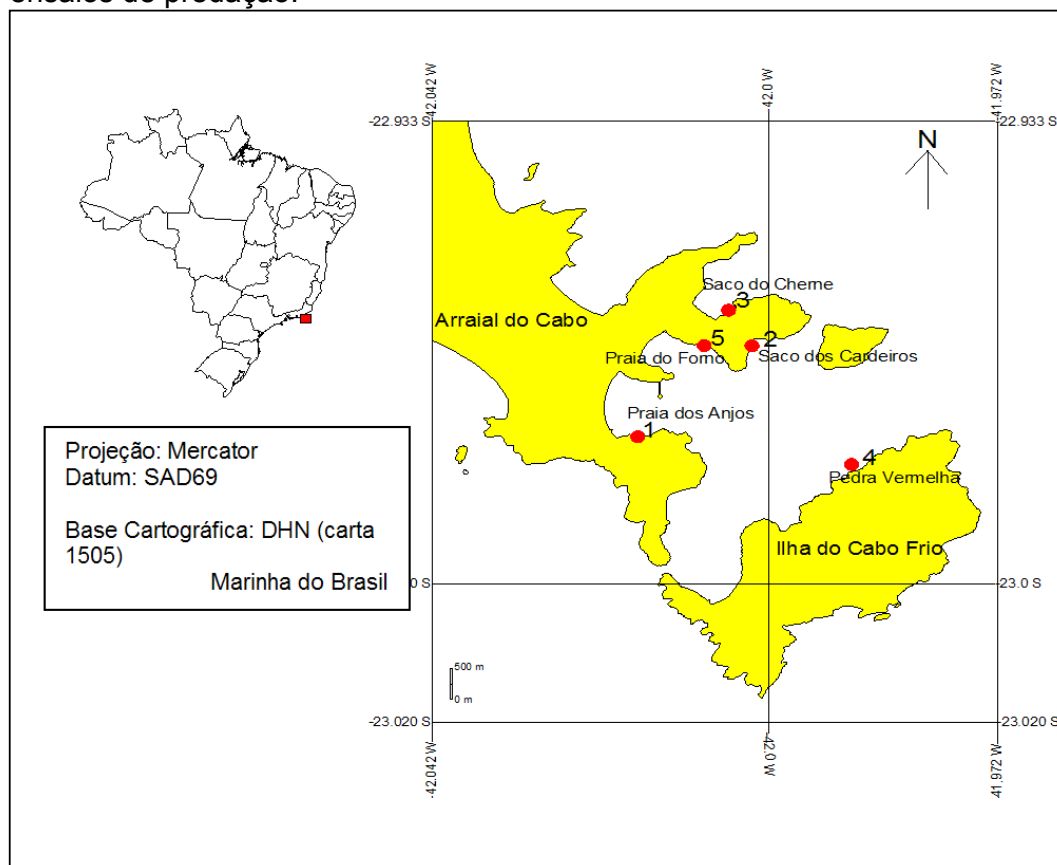
Considerando-se que algumas espécies de invertebrados sésseis apresentam variações intraespecíficas na produção de defesas químicas e que em Arraial do Cabo, apesar de se encontrar numa região tropical, apresenta sazonalidade marcante em função do processo de ressurgência, espera-se que *Palythoa caribaeorum*, nessa região, apresente variação na produção de defesas químicas de acordo com:

- Locais expostos a diferentes condições ambientais
- Profundidades diferentes
- Características individuais
- Sazonalidade ambiental da região

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Locais de estudo**

Arraial do Cabo está situado na costa sudeste brasileira, no Estado do Rio de Janeiro, distante aproximadamente 165 Km da cidade do Rio de Janeiro. As amostras de *P. caribaeorum* foram coletadas em quatro locais no município de Arraial do Cabo ( $22^{\circ}58' S$  &  $42^{\circ}01'25'' O$ ): Praia dos Anjos - Área 1 ( $22^{\circ}58'45''S$  &  $42^{\circ}01'01''O$ ), Saco dos Cardeiros - Área 2 ( $22^{\circ}57'55''S$  &  $42^{\circ}00'08''O$ ), Saco do Cherne - Área 3 ( $22^{\circ}57'42''S$  &  $42^{\circ}00'22''O$ ) e Pedra Vermelha - Área 4 ( $22^{\circ}58'57'' S$  &  $41^{\circ}59'15'' O$ ). A área 5 - Praia do Forno ( $22^{\circ}57'58'' S$  &  $42^{\circ}00'27'' W$ ) corresponde ao local onde foram realizados os ensaios de predação.



**Figura 1.** Localização dos locais amostrados em Arraial do Cabo-RJ: 1- Praia dos Anjos; 2- Saco dos Cardeiros; 3- Saco do Cherne; 4- Pedra Vermelha; e 5- Praia do Forno

Os locais de estudo foram escolhidos de acordo com as condições ambientais a que são expostos e a distribuição vertical de *P. caribaeorum*. Na Pedra Vermelha *P. caribaeorum* distribui-se verticalmente de 1 – 8 m de profundidade e este local é um ponto de referência para os estudos em Biologia Marinha, pois está localizado em uma área de conservação, tendo, portanto pouca influência antrópica e condições ambientais normalmente estáveis. *P. caribaeorum* distribui-se verticalmente na Praia dos Anjos de 1 – 5 m. Apesar da pouca profundidade o estudo foi conduzido devido a Praia dos Anjos ser o local mais impactado antropicamente, pois é influenciado diretamente pelo Cais da Pesca pelo do Porto de Arraial do Cabo, além de eventualmente receber despejos de esgoto urbano. O Saco dos Cardeiros localiza-se em uma enseada, mas que apresenta forte hidrodinamismo na incidência de ventos do quadrante NE, neste local *P. caribaeorum* distribui-se de 1 – 9 m de profundidade. O Saco do Cherne também está situado em uma enseada, apresenta forte hidrodinamismo e é o local mais distante do Porto de Arraial do Cabo, recebendo, portanto pouca influência antrópica. Neste local *P. caribaeorum* é encontrado de 1 – 11 m de profundidade (Obs. pessoal).

### **Coleta e extração**

As amostras de tecido de *P. caribaeorum* para a avaliação da suscetibilidade à predação foram coletadas por mergulho autônomo em profundidades que variavam de 2 a 6 metros de profundidade. No Saco dos Cardeiros, no Saco do Cherne e na Pedra Vermelha foram coletadas amostras de três profundidades distintas: 2, 4 e 6 m. Na Praia dos Anjos foi realizada coleta somente a 4 m, devido a pouca profundidade no local e ao forte hidrodinamismo que impossibilitou as coletas a 2 m de profundidade. Foram

realizadas coletas em duas épocas do ano, a primeira em outubro de 2005 (início do período ressurgência) e a segunda em maio de 2006 (período de subsidência). Os organismos foram retirados do substrato com auxílio de espátulas e acondicionados em sacos plásticos. Em laboratório as amostras foram subdivididas em pequenos pedaços para facilitar a extração; foi estabelecido um peso padrão de 150 g de tecido por amostra. As amostras foram colocadas em frascos plásticos e, logo em seguida, congeladas para posterior extração.

A extração foi feita a temperatura ambiente com etanol a 70% (diluído com água destilada) seguindo a metodologia de Bignami *et al.* (1992) para garantir, que caso as amostras de tecido de *P. caribaeorum* contivessem a palytoxina, que esta substância estaria presente nas iscas que seriam oferecidas aos peixes. Cada amostra foi extraída 3 vezes, a primeira com duração de 24 h, a segunda com 48 h e a terceira com 96 h. Após a extração, cada extrato foi filtrado e submetido a evaporador rotatório sob pressão reduzida com banho-maria a uma temperatura de 40°C, para a retirada dos solventes. Os extratos brutos orgânicos foram obtidos após a retirada da água com auxílio de exaustor e dessecador a temperatura ambiente.

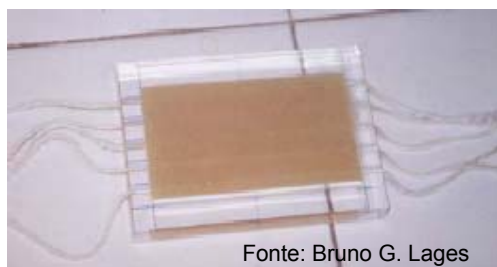
### **Preparação dos alimentos artificiais**

O extrato bruto de cada amostra de tecido submetido à extração foi incorporado em alimentos artificiais (iscas) para o bioensaio de avaliação da suscetibilidade à predação contra peixes generalistas.

A preparação das iscas seguiu a metodologia descrita por Fenical e Pawlik (1991). Os extratos foram incorporados nas iscas numa quantidade de

extrato proporcional à concentração natural encontrada no tecido coralino. Essas quantidades de extratos foram expressas em peso por volume de tecido coralino (volume da placa X peso total do extrato/ volume do tecido coralino).

As iscas foram preparadas com 0,625 mg de carragenana (Sigma C – 1013, tipo I), 15 ml de água deionizada e 5 ml de purê de atum moído e dissolvido em água destilada. Inicialmente, o extrato foi dissolvido com uma pequena quantidade de água destilada (1 ml) e, em seguida, homogeneizada com o purê de atum essa mistura foi aquecida a uma temperatura de aproximadamente 40°C. A carragenana foi misturada a água deionizada e então aquecida até adquirir uma consistência líquida onde foi imediatamente incorporado a mistura de purê de atum com extrato bruto. Em seguida essa mistura final foi vertida em molde de acrílico com volume de 20 ml, transpassados paralelamente por 5 fios de barbante de algodão (Fig. 2). Após esfriarem, as iscas foram cortadas em pedaços de 1,0 x 1,0 x 2,5 cm, resultando em 10 iscas por molde.



Fonte: Bruno G. Lages

**Figura 2.** Molde de acrílico utilizado para a preparação das iscas para os ensaios de predação.

### ***Caracterização dos bioensaios***

Para os bioensaios, as iscas foram amarradas em cordas de nylon que tinham um peso em uma extremidade e uma bóia de isopor na outra para

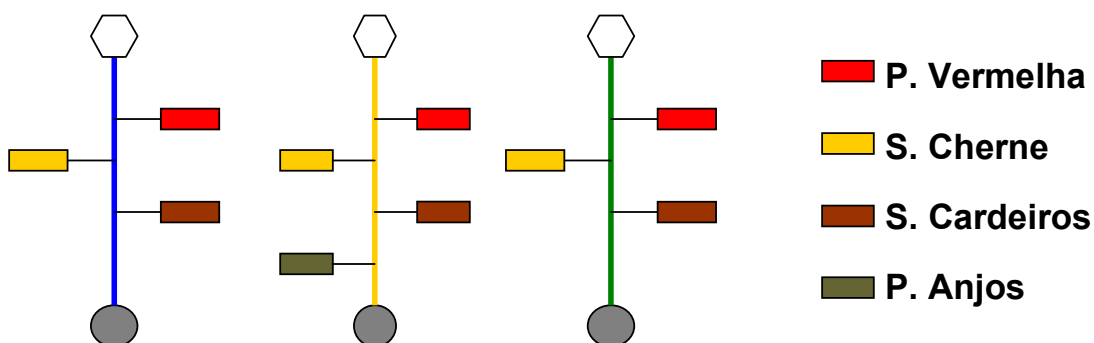
garantir que as cordas ficassem eretas. As cordas com as iscas (experimentos) foram colocadas na região infralitoral em 09/2006 (Fig. 3) do costão norte da Praia do Forno – Área 5 (Fig. 1), em profundidades que variavam entre 2 e 4 m. Cada experimento tinha 20 réplicas ( $n=2$ ) que e eram levadas pra campo de 3 a 4 experimentos por dia. Cada bateria possuía uma corda de nylon de cor diferente, para que pudesse ser facilmente diferenciada das outras. Os bioensaios foram acompanhados da superfície, através de mergulho livre. As iscas foram oferecidas a peixes onívoros e cada bioensaio teve a duração de aproximadamente 4h. Após o término de cada experimento, as iscas foram retiradas da água e a área consumida de cada réplica foi quantificado em porcentagem com o auxílio de uma régua. Durante o experimento, algumas das 20 réplicas de cada bateria de testes foram perdidas em campo, devido a condições ambientais (forte hidrodinamismo e baixa visibilidade causada por partículas em suspensão) e por danos nas iscas causados por ouriços-do-mar ou outros organismos. Os ensaios **entre locais** e **entre profundidades** foram realizados com amostras de ambas as coletas (10/2005 e 05/2006) e o ensaio de **mesma profundidade** somente com amostras de 4m da coleta de 10/2005.



**Figura 3.** Par de iscas amarradas numa corda de nylon na região infralitoral da Praia do Forno.

- **Entre locais**

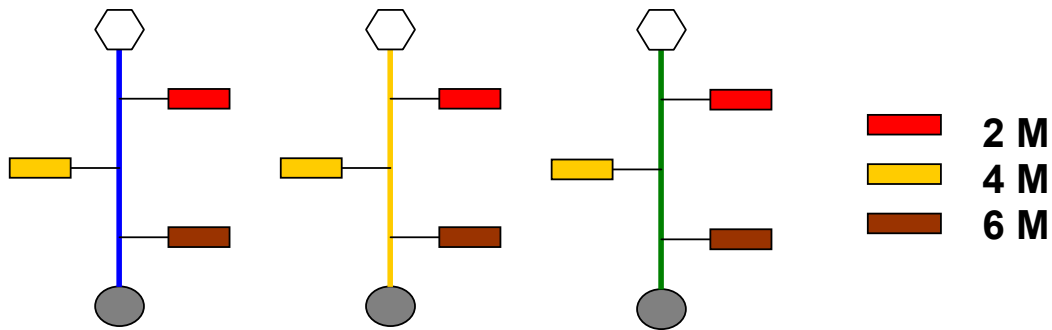
O bioensaio **entre locais** tinha o objetivo de verificar diferenças na produção de defesas químicas entre locais expostos a diferentes condições ambientais, para isso, foram conjugadas iscas do S. Cardeiros, do S. Cherne e da P. Vermelha em cordas de coloração azul que representavam a profundidade de 2 m, do S. Cardeiros, do S. Cherne, da P. Vermelha e da P. Anjos em cordas de coloração amarela que representavam a profundidade de 4 m, e S. Cardeiros, do S. Cherne e da P. Vermelha em cordas de coloração verde que representavam a profundidade de 6 m (Fig. 4).



**Figura 4.** Caracterização dos experimentos de 2 m de profundidade (corda azul), 4 m de profundidade (corda amarela) e 6 m de profundidade (corda verde) para o bioensaio **entre locais**. Cada experimento tinha 20 réplicas.

- **Entre profundidades**

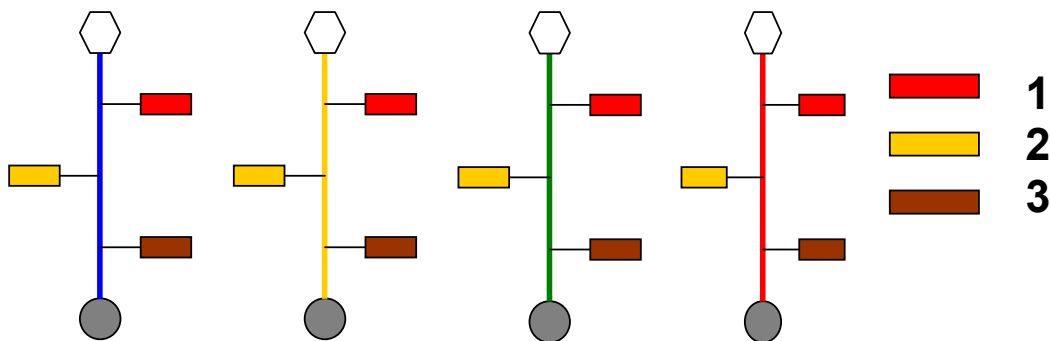
O bioensaio **entre profundidades** avaliou se havia diferença na produção de defesa química entre amostras de *P. caribaeorum* de diferentes profundidades. Os experimentos consistiam em conjugar iscas de 2, 4 e 6 m em cordas de nylon de coloração azul que representavam amostras do S. dos Cardeiros, em cordas de coloração amarela que representavam amostras do S. do Cherne, e em cordas de coloração verde que representavam amostras da P. Vermelha (Fig. 5).



**Figura 5.** Caracterização do experimento do Saco dos Cardeiros (corda azul), do experimento do Saco do Cherne (corda amarela) e do experimento da Pedra Vermelha (corda verde) para o bioensaio **entre profundidades**. Cada experimento consistia de 20 réplicas

- **Mesma Profundidade**

Para os ensaios de **mesma profundidade** que avaliou a variabilidade na produção de defesas de acordo com características individuais, foram coletadas 3 amostras distintas a 4 m de profundidade em cada local. Foram confrontadas 3 iscas de 4 m para o S. dos Cardeiros em cordas de nylon de cor azul, 3 iscas de 4 m para o S. do Cherne em cordas de nylon de cor amarela, 3 iscas de 4m para a P. Vermelha em cordas de nylon de cor verde, e 3 iscas de 4 m para a P. dos Anjos em cordas de cor vermelha (Fig. 6).

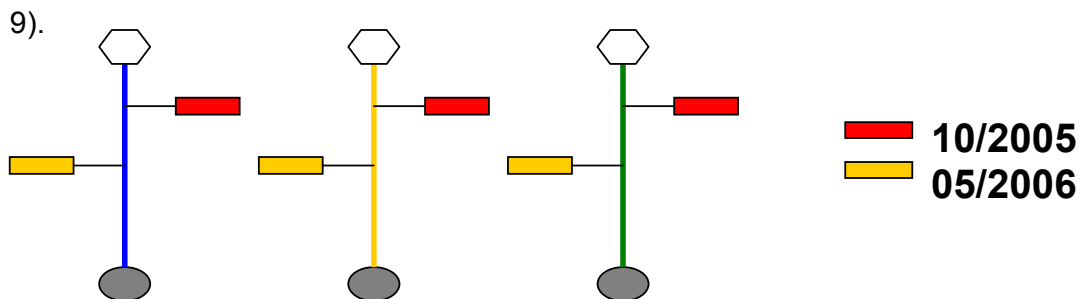


**Figura 6.** Caracterização dos experimentos do Saco dos Cardeiros (corda azul), do Saco do Cherne (corda amarela), da Pedra Vermelha (corda verde) e da Praia dos Anjos (corda vermelha) para o bioensaio **mesma profundidade**. Cada número representado na legenda corresponde a uma amostra. Cada experimento tinha 20 réplicas.

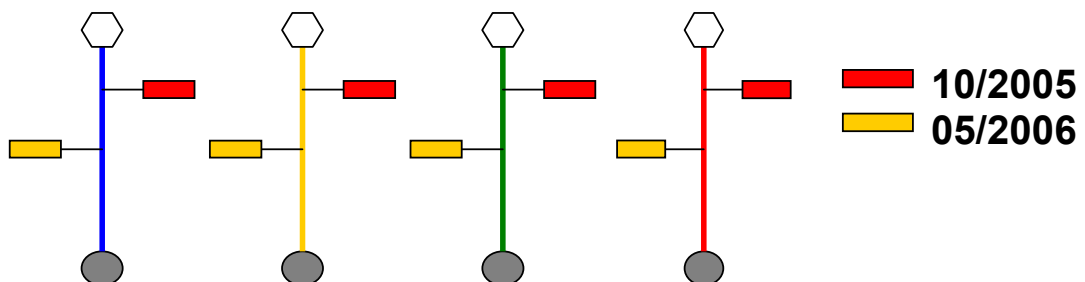


- **Sazonal**

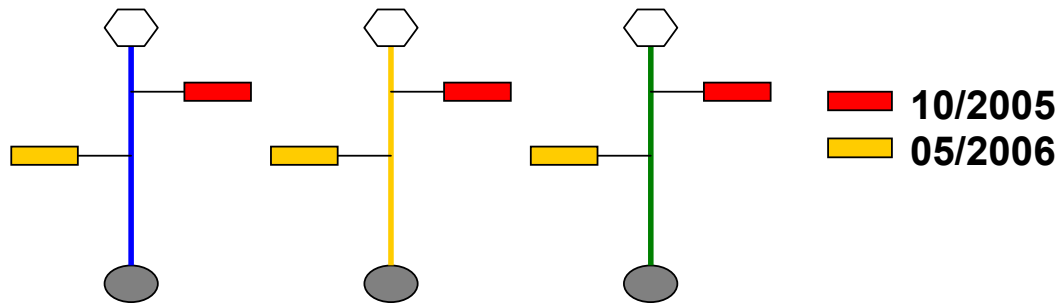
Para os ensaios **sazonais** onde foi avaliada se havia diferença significativa na produção de defesas químicas entre diferentes épocas do ano, foram confrontadas uma isca feita com amostras da coleta realizada em 10/2005 com uma isca da coleta de 05/2006 para cada profundidade de cada local. Nos ensaios sazonais de 2 m, as cordas azuis figuravam iscas do S. dos Cardeiros, as cordas amarelas do S. do Cherne e as cordas verdes da P. Vermelha (Fig. 7). Nos ensaios sazonais de 4m, as cordas azuis figuravam iscas do S. dos Cardeiros, as cordas amarelas do S. do Cherne, as cordas verdes da P. Vermelha e as cordas vermelhas da P. dos Anjos (Fig. 8). Nos ensaios sazonais de 6m as cordas azuis figuravam iscas do S. dos Cardeiros, as cordas amarelas do S. do Cherne e as cordas verdes da P. Vermelha (Fig.



**Figura 7.** Caracterização dos ensaios sazonais de 2 m de profundidade, em azul o experimento com iscas do Saco dos Cardeiros, em amarelo o experimento com iscas do Saco do Cherne e em verde o experimento com iscas da Pedra Vermelha. Cada experimento consistia de 20 réplicas.



**Figura 8.** Caracterização dos ensaios sazonais de 4 m de profundidade, em azul experimento do Saco dos Cardeiros, em amarelo do Saco do Cherne, em verde da Pedra Vermelha e em vermelho da Praia dos Anjos. Cada experimento possuía 20 réplicas.



**Figura 9.** Caracterização dos ensaios sazonais de 6 m de profundidade, em azul, experimentos do Saco dos Cardeiros, em amarelo do Saco do Cherne e em verde da Pedra Vermelha. Cada experimento possuía 20 réplicas.

### ***Análise Bioestatística***

Para avaliar as diferenças da suscetibilidade das iscas a predação nos ensaios **entre locais**, **entre profundidades** e **mesma profundidade** primeiramente foram testadas as premissas da normalidade e da homogeneidade e em seguida foi utilizado o teste paramétrico ANOVA monofatorial. Para a avaliação das diferenças nos ensaios **sazonais**, inicialmente foi testada a normalidade dos dados pelos testes Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors e, em seguida, foi aplicado o teste-*t* para amostras dependentes.

## RESULTADOS

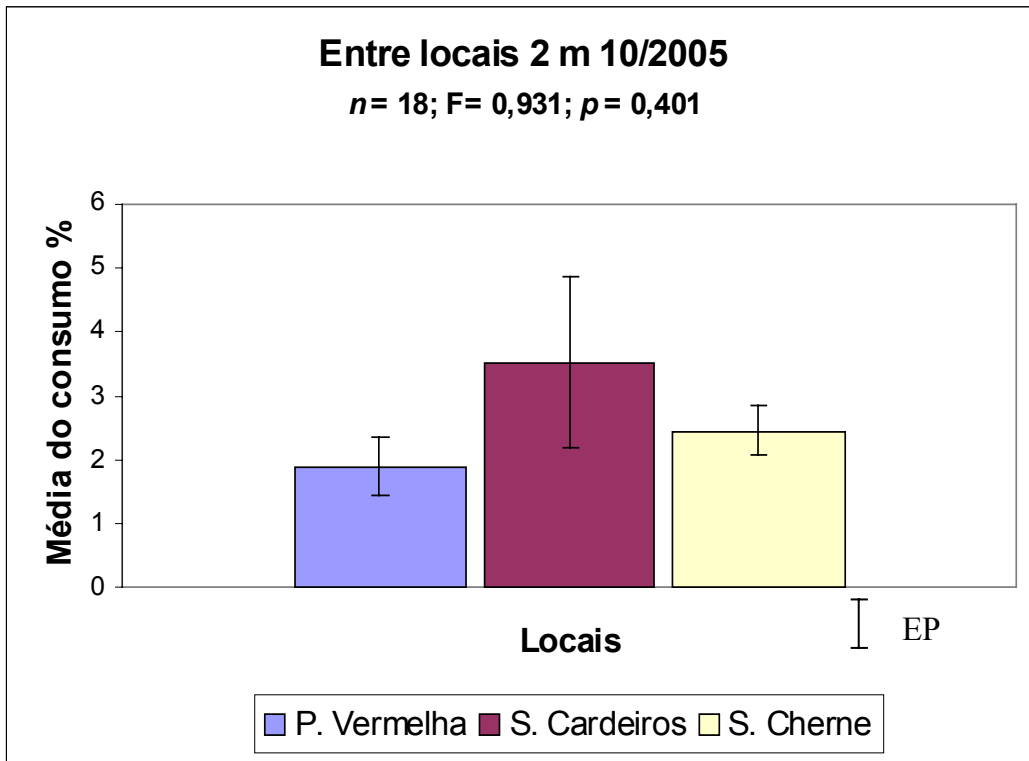
---

### ***Bioensaio entre locais***

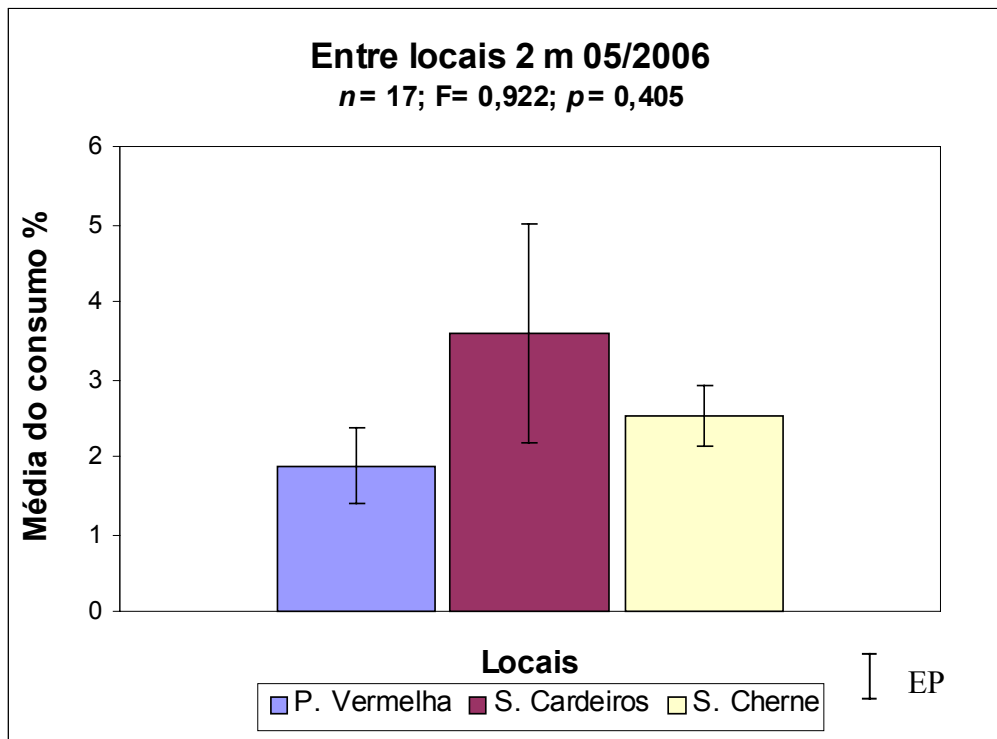
No bioensaio denominado **entre locais** foram confrontadas iscas feitas com extratos brutos de cada área estudada respeitando-se as respectivas profundidades (Fig. 4). Os resultados do teste de predação para a avaliação da susceptibilidade ao consumo por peixes onívoros dos extratos brutos de 2 m, mostraram que não houve diferença significativa no consumo das iscas entre os locais testados ( $p = 0,401$  para 10/2005 e  $p = 0,405$  para 05/2006), e ao compararmos os resultados entre as duas coletas, verificamos que também não houve diferença no padrão de suscetibilidade, com as iscas do S. Cardeiros sendo as mais consumidas, seguidas das do S. Cherne e então pelas da P. Vermelha (Figs. 10 e 11).

No ensaio com amostras de 4 m também não foi verificada diferença significativa da suscetibilidade de consumo entre as iscas feitas com extratos brutos das áreas testadas ( $p = 0,500$  para 10/2005 e  $p = 0,210$  para 05/2006). Diferente dos ensaios a 2 m, não houve correlação positiva no padrão de consumo entre as amostras das duas coletas, porém, iscas da P. Anjos foram menos suscetíveis a predação (Figs. 12 e 13).

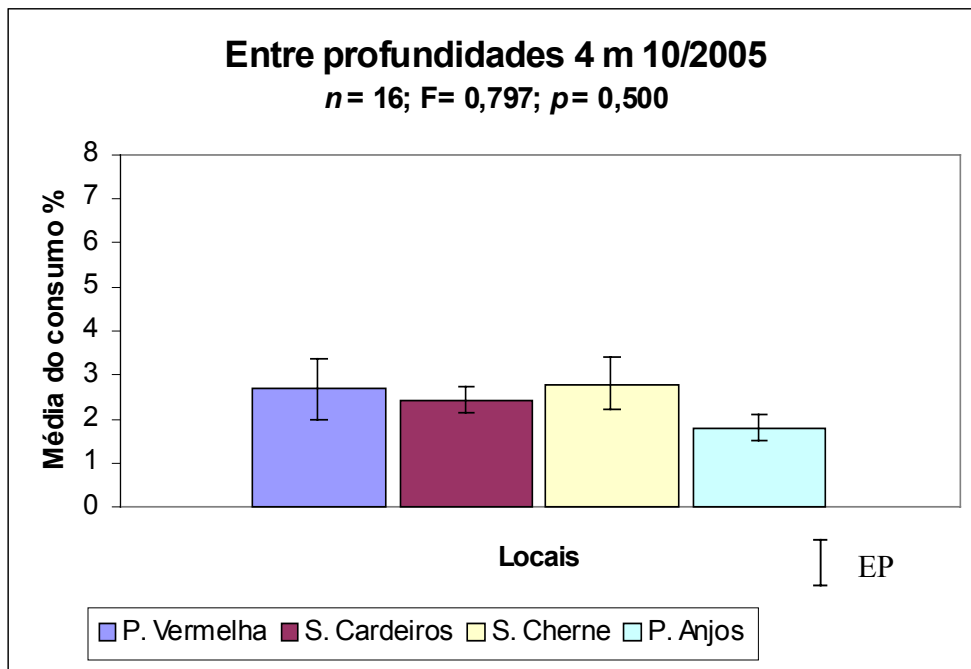
Para as amostras de 6 m, mais uma vez não foi encontrada diferença significativa no consumo entre as iscas dos locais amostrados ( $p = 0,359$  para 10/2005 e  $p = 0,598$  para 05/2006). Os padrões de consumo entre as duas coletas foram diferentes, porém, como no ensaio de 2 m, as iscas da P. Vermelha foram menos consumidas que as demais (Fig.14 e 15).



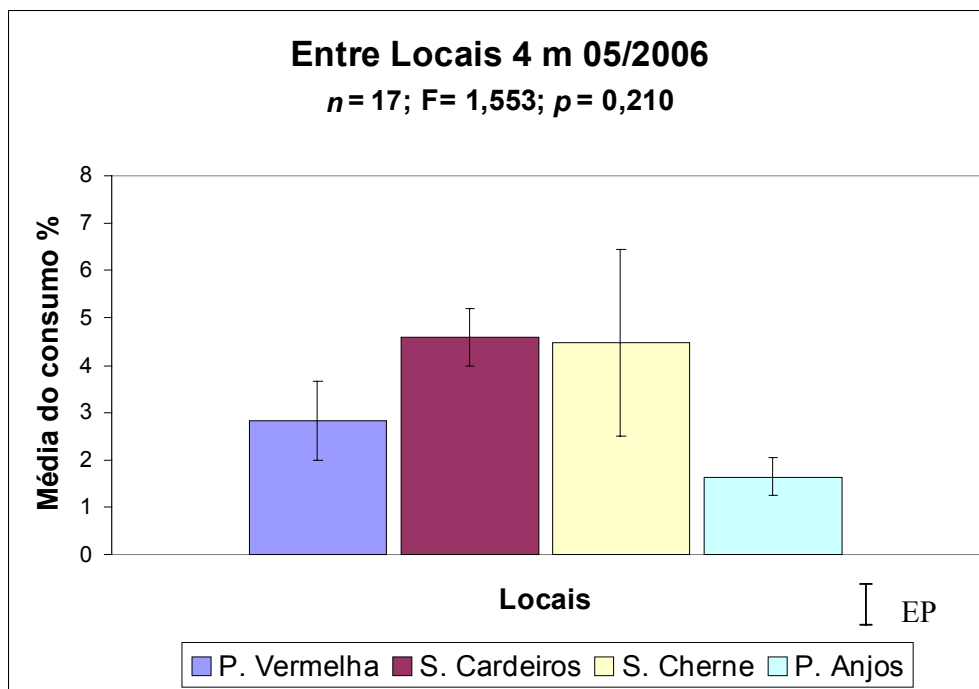
**Figura 10.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três áreas amostradas (P. Vermelha, S. Cardeiros e S. Cherne) a 2 m de profundidade em 10/2005. EP = erro padrão



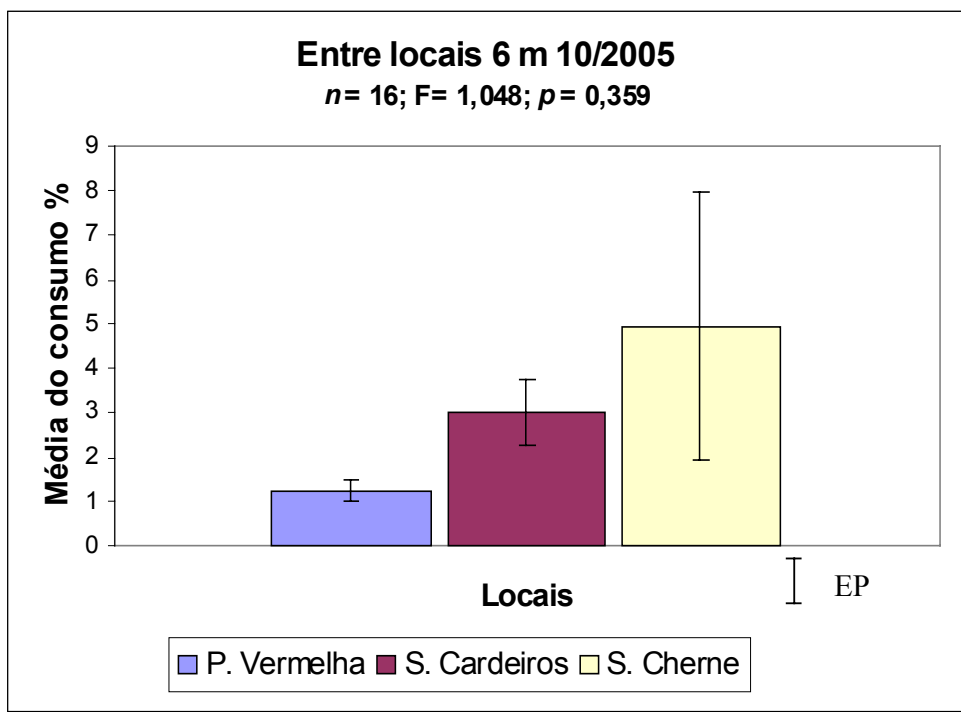
**Figura 11.** Comparação do percentual médio de consumo da iscas feitas com extratos brutos das três áreas amostradas (P. Vermelha, S. Cardeiros e S. Cherne) a 2 m de profundidade em 05/2006. EP = erro padrão



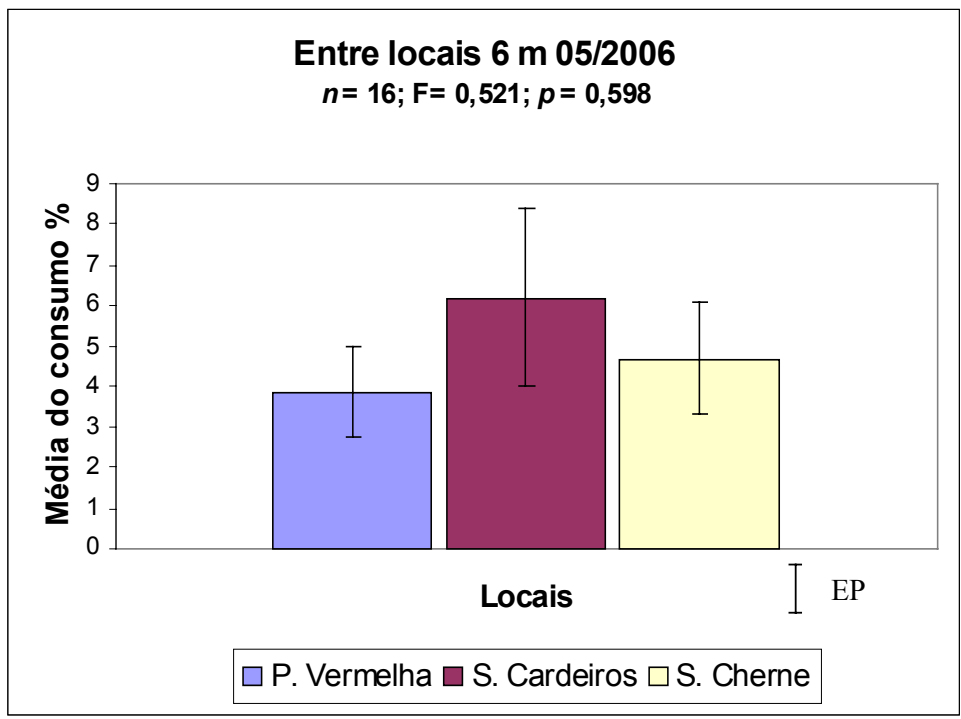
**Figura 12.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos das quatro áreas amostradas (P. Vermelha, S. Cherne, P. Anjos e S. Cardeiros) a 4 m de profundidade em 10/2005. EP = erro padrão



**Figura 13.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos das quatro áreas amostradas (P. Vermelha, S. Cherne, P. Anjos e S. Cardeiros) a 4 m de profundidade em 05/2006. EP = erro padrão



**Figura 14.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três áreas amostradas (P. Vermelha, S. Cardeiros e S. Cherne) a 6 m de profundidade em 10/2005. EP = erro padrão



**Figura 15.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três áreas amostradas (P. Vermelha, S. Cardeiros e S. Cherne) a 6 m de profundidade em 05/2006. EP = erro padrão

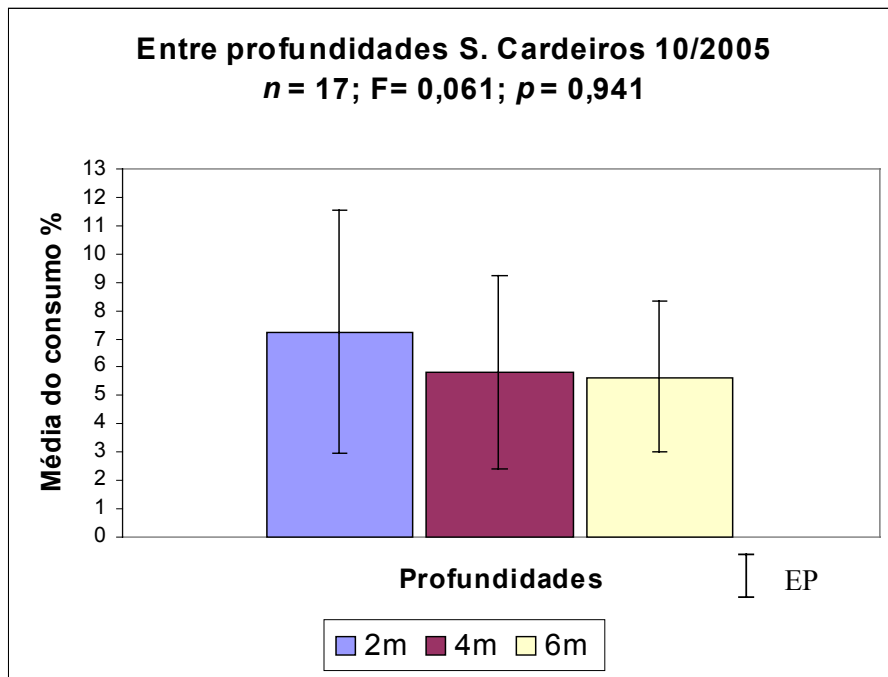
### **Bioensaio entre profundidades**

No ensaio **entre profundidades** foram confrontadas iscas feitas com extratos brutos de colônias de *P. caribaeorum* coletadas em 3 profundidades distintas dentro de sua mesma área (Fig. 5). O experimento foi feito para amostras das duas coletas realizadas. No teste feito com amostras do Saco dos Cardeiros não foram verificadas diferenças significativas no consumo das iscas das três profundidades testadas, tanto para os extratos de 10/2005 ( $p = 0,941$ ) quanto pros extratos de 05/2006 ( $p = 0,691$ ). Ao verificarmos as tendências de suscetibilidade à predação entre os dois períodos amostrados, não se encontrou nenhum padrão de consumo comparável (Figs. 16 e 17).

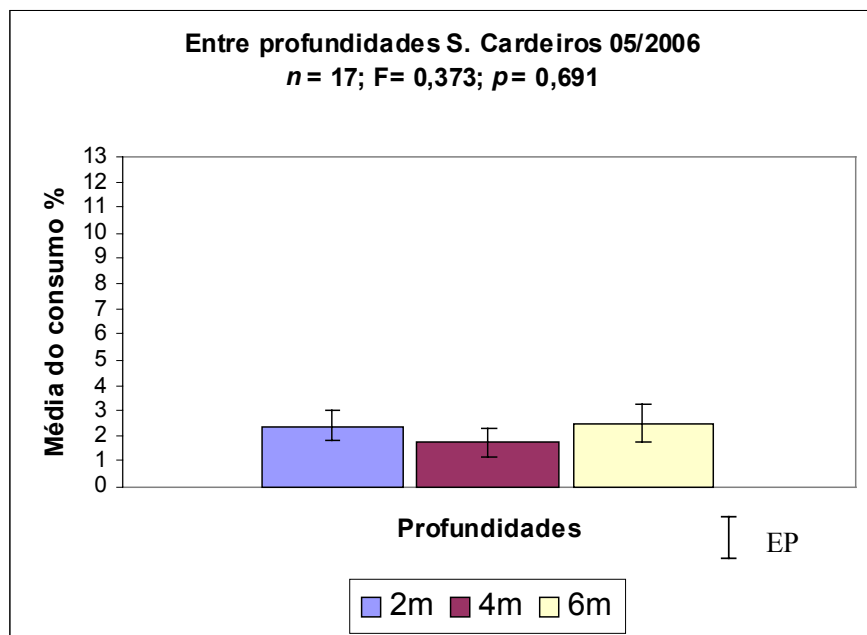
Nos testes realizados com as amostras do S. Cherne, também não verificamos diferença significativa entre o consumo das iscas das três profundidades amostradas para ambas as coletas ( $p = 0,261$  para 10/2005 e  $p = 0,406$  para 05/2006). Ao compararmos os resultados das duas coletas constatamos uma inversão da susceptibilidade à predação entre os dois períodos amostrados, com 2 m sendo mais consumido e 6 m menos consumido em 10/2005 e 2 m sendo o menos consumido e 6 m sendo o mais consumido em 05/2006 (Figs. 18 e 19).

Nos testes com amostras da P. Vermelha, mais uma vez não foi encontrada diferença significativa no consumo das iscas entre as profundidades, com níveis de significância de  $p = 0,725$  e  $p = 0,620$ , para 10/2005 e 05/2006, respectivamente. Mais uma vez houve um padrão de inversão no consumo das iscas entre os resultados dos dois períodos de coleta. Em 10/2005 2 m foi o mais consumido e 6 m foi o menos consumido

enquanto que em 05/2006 6 m foi o mais suscetível e 2 m foi o menos suscetível (Figs. 20 e 21).

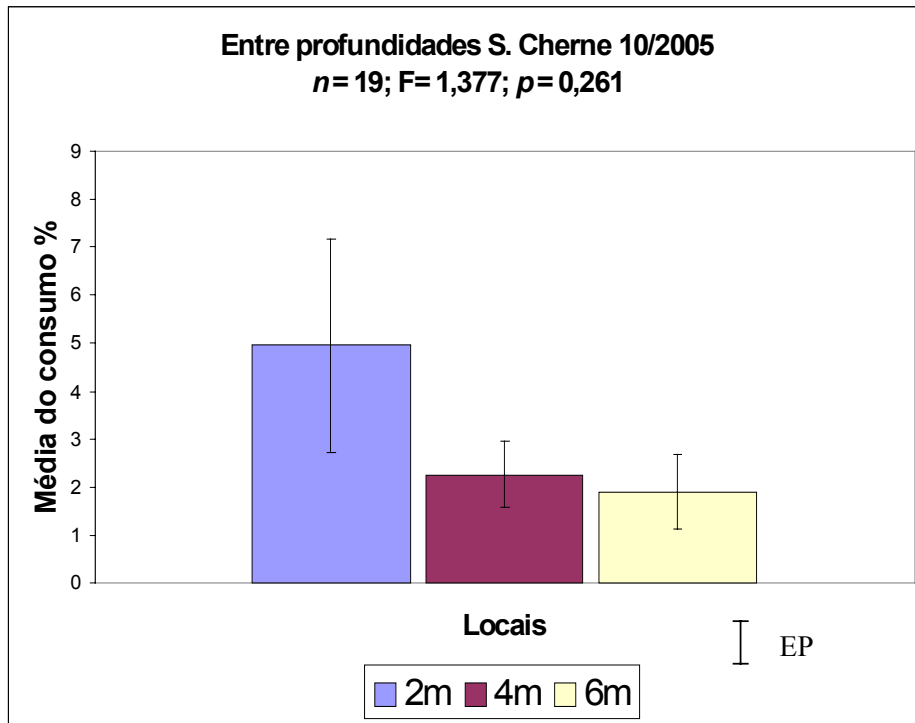


**Figura 16.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três profundidades amostradas (2, 4 e 6 m) no Saco dos Cardeiros em 10/2005. EP = erro padrão

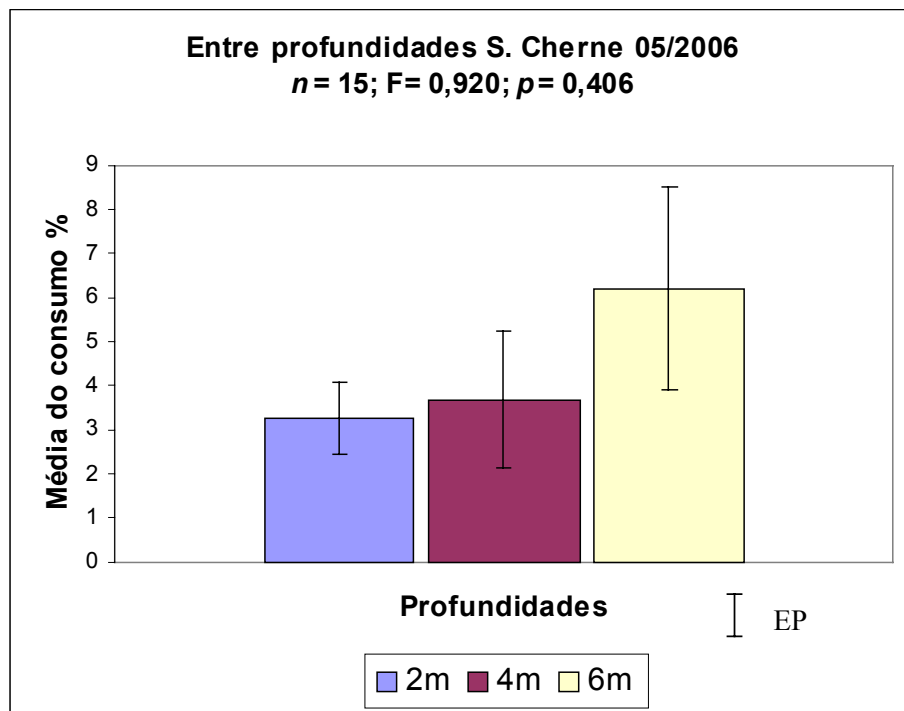


**Figura 17.** Comparação do percentual de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três profundidades amostradas (2, 4 e 6 m) no Saco dos Cardeiros em 05/2006. EP = erro padrão

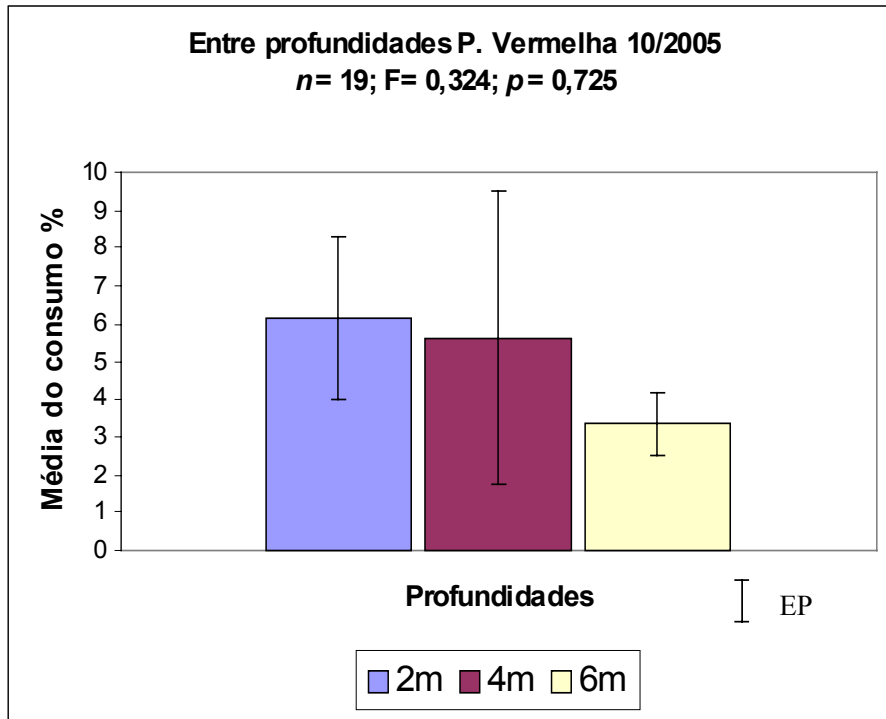




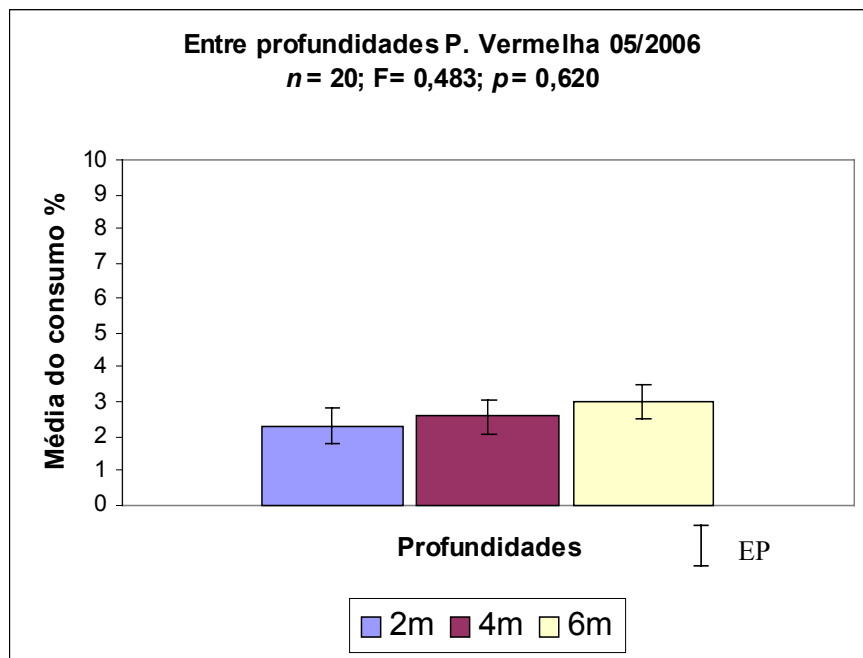
**Figura 18.** Comparação do percentual de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três profundidades amostradas (2, 4 e 6 m) no Saco do Cherne em 10/2005. EP = erro padrão



**Figura 19.** Comparação do percentual de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três profundidades amostradas (2, 4 e 6 m) no Saco dos Cardeiros em 05/2006. EP = erro padrão



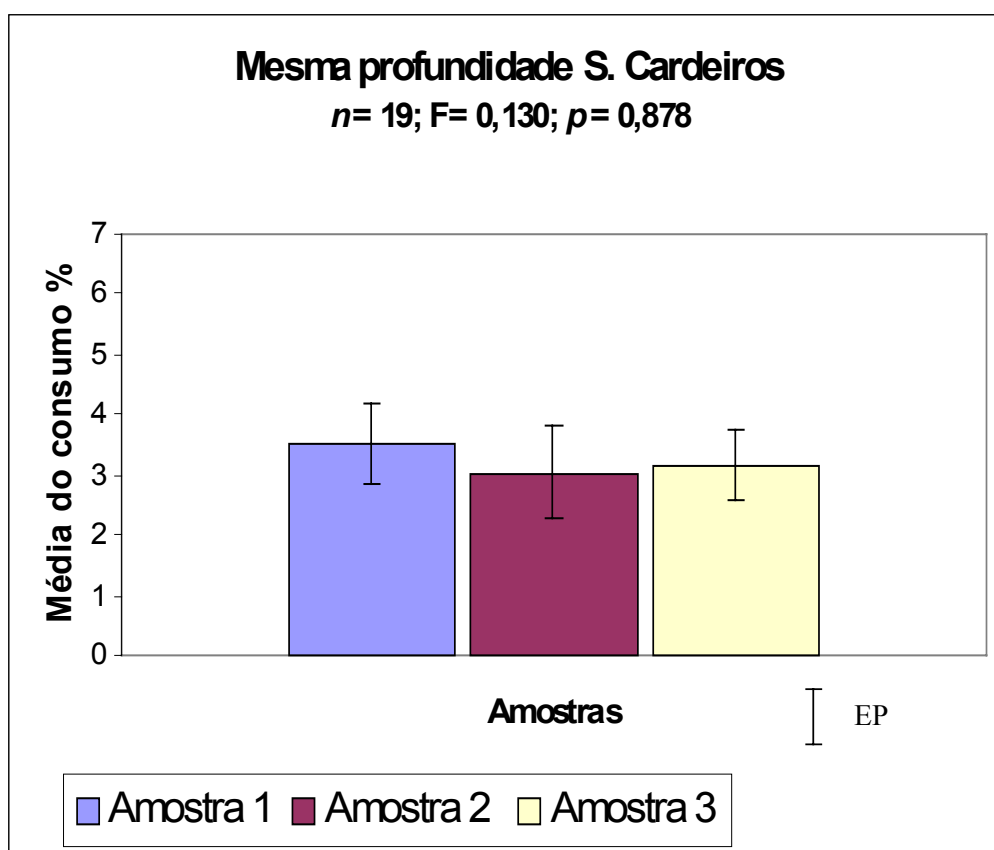
**Figura 20.** Comparação do percentual de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três profundidades amostradas (2, 4 e 6 m) na Pedra Vermelha em 10/2005. EP = erro padrão



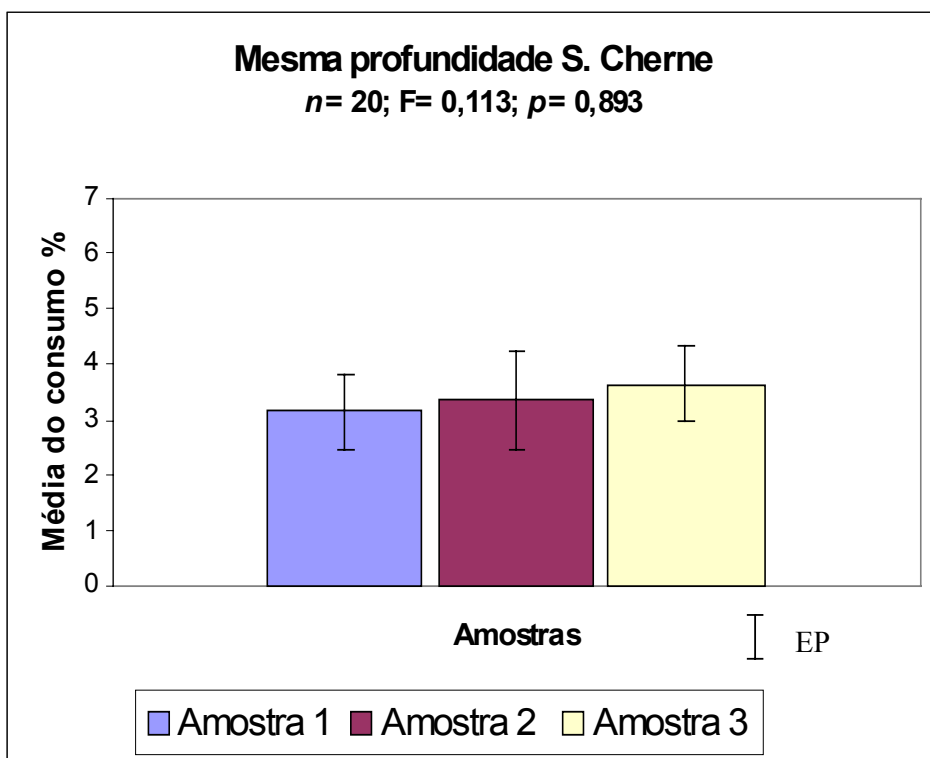
**Figura 21.** Comparação do percentual de consumo das iscas feitas com extratos brutos das três profundidades amostradas (2, 4 e 6 m) na Pedra Vermelha em 05/2006. EP = erro padrão

### **Bioensaio de mesma profundidade**

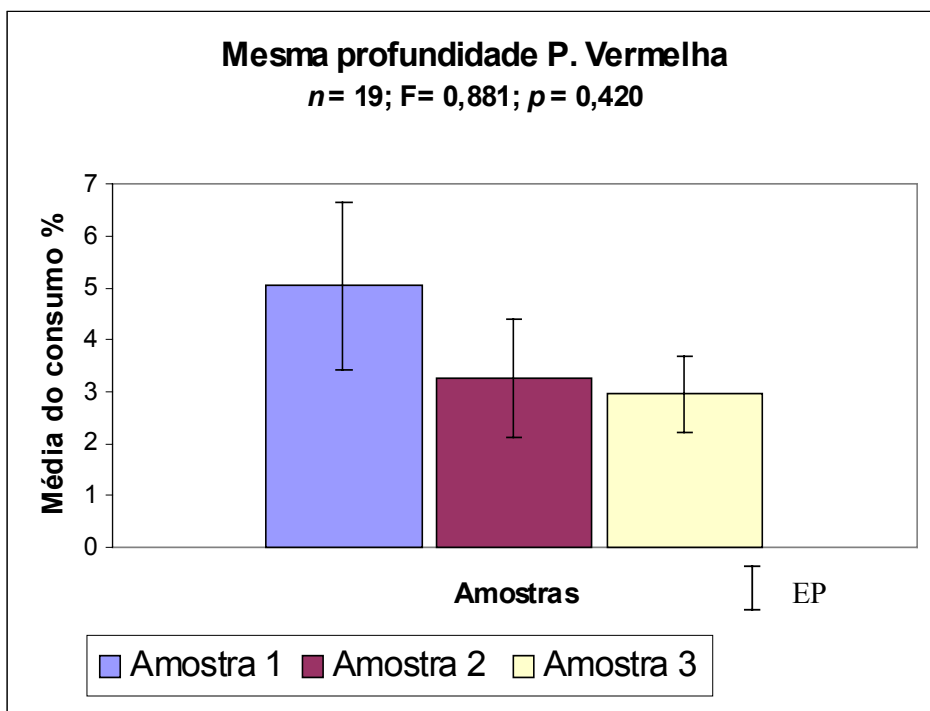
No bioensaio de **mesma profundidade**, foram confrontadas três iscas feitas com amostras distintas coletadas em cada local em 10/2005 a 4 m de profundidade (Fig. 6). Não houve diferença significativa no consumo entre as iscas do S. Cardeiros com  $p = 0,878$  (Fig.22), do S. Cherne com  $p = 0,893$  (Fig. 23), da P. Vermelha ( $p = 0,420$ ) (Fig.24) e da P. Anjos ( $p = 0,902$ ) (Fig. 25).



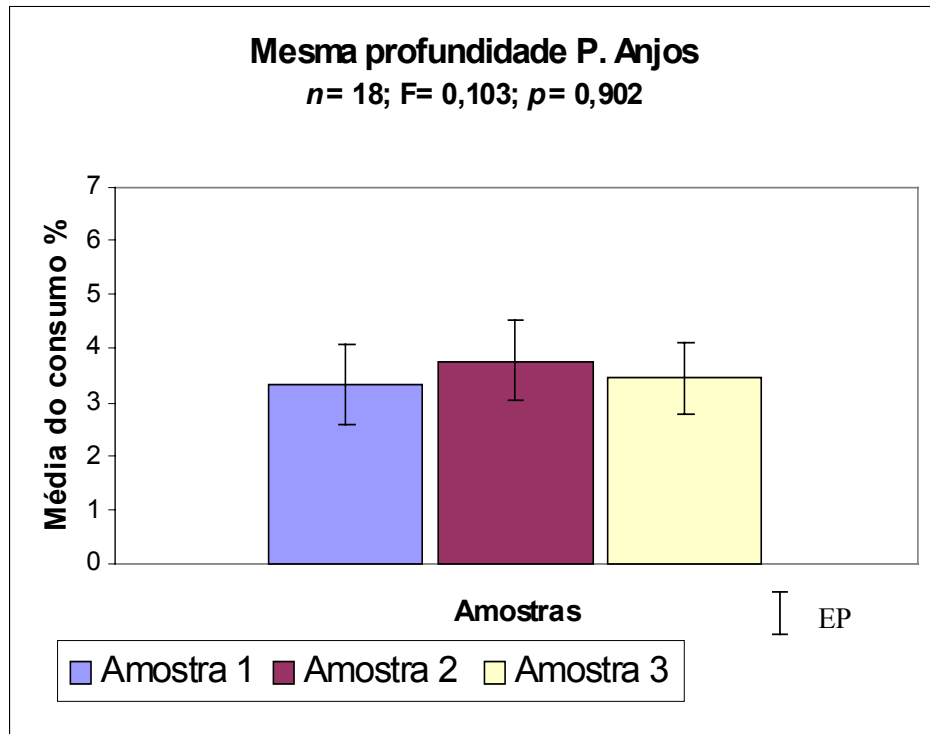
**Figura 22.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de três amostras distintas de 4 m de profundidade do S. Cardeiros em 10/2005. EP = erro padrão



**Figura 23.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de três amostras distintas de 4 m de profundidade do S. Cherne em 10/2005. EP = erro padrão



**Figura 24.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de três amostras distintas de 4 m de profundidade da P. Vermelha em 10/2005. EP = erro padrão



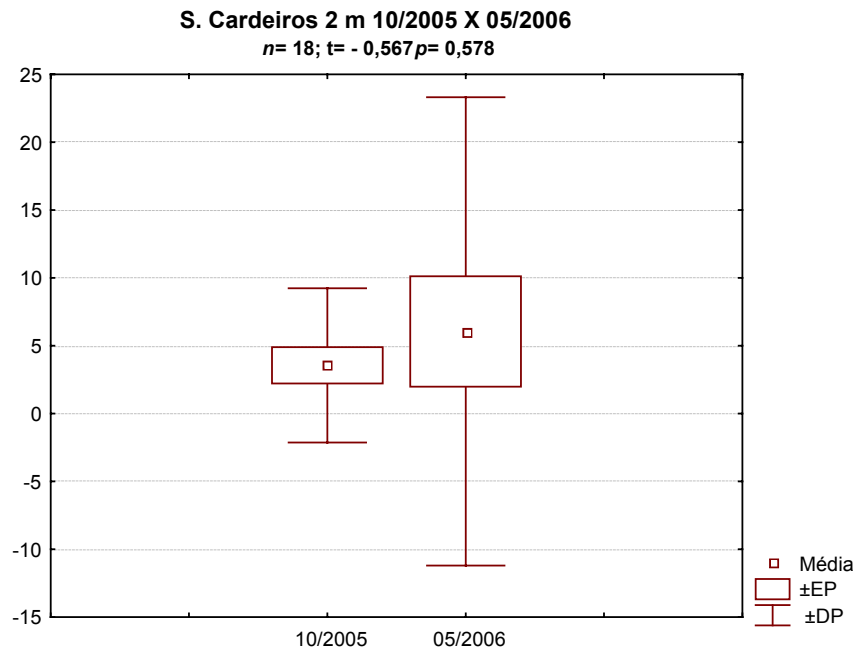
**Figura 25.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de três amostras distintas de 4 m de profundidade da P. Anjos em 10/2005. EP = erro padrão

### **Sazonal**

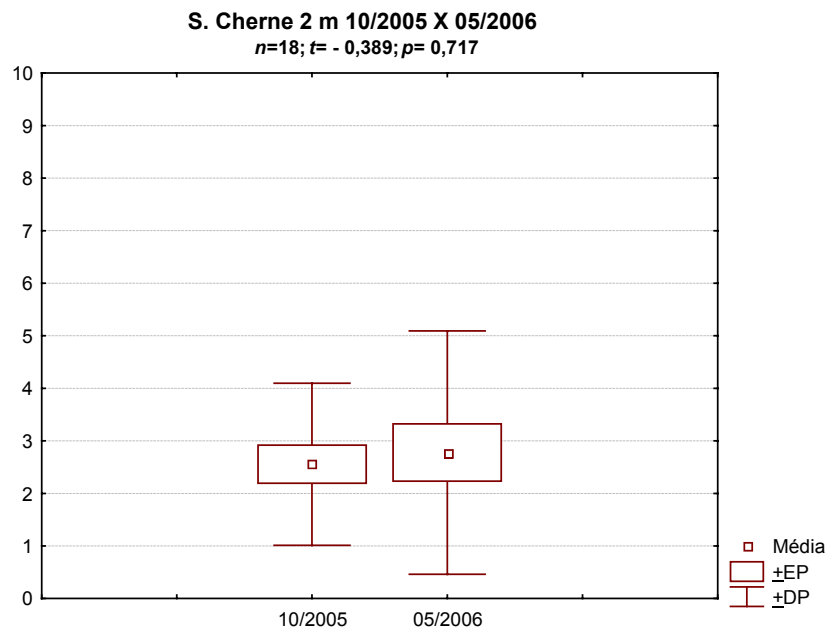
Os bioensaios **sazonais** foram divididos em três dias, sendo testada a cada dia uma profundidade diferente. Nesses testes, foram confrontadas uma amostra de 10/2005 com uma de 05/2006 coletadas na mesma área e na mesma profundidade.

- **Sazonal 2m**

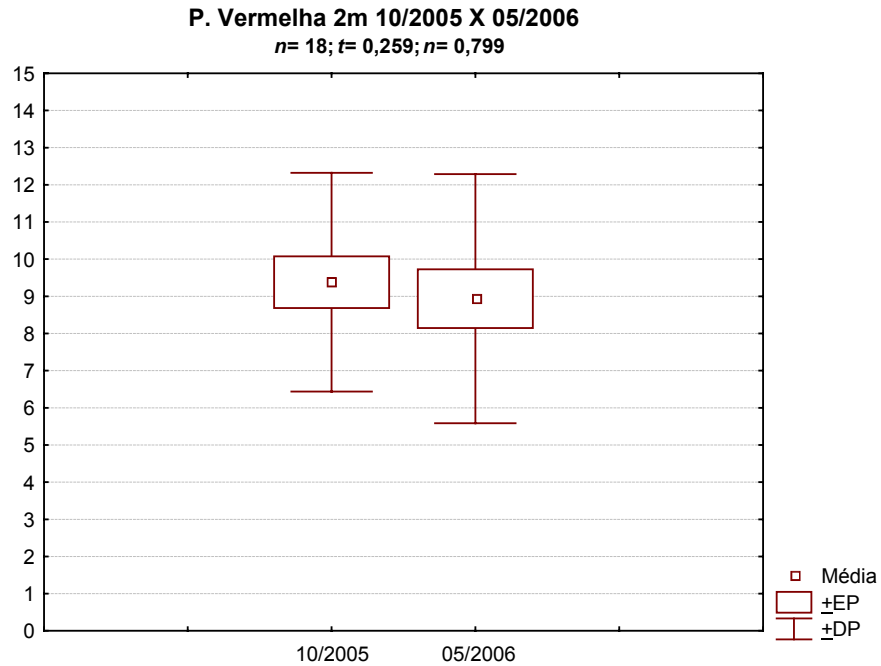
Os testes sazonais de 2 m (Fig. 7) mostraram que nessa profundidade não houve diferença significativa entre consumo das iscas coletadas em diferentes períodos em todas as áreas testadas, com  $p = 0,578$  no S. Cardeiros (Fig. 26), com  $p = 0,717$  no S. Cherne (Fig. 27) e com  $p = 0,799$  na P. Vermelha (Fig. 28).



**Figura 26.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas no S. Cardeiros a 2 m em 10/2005 e em 05/2006.



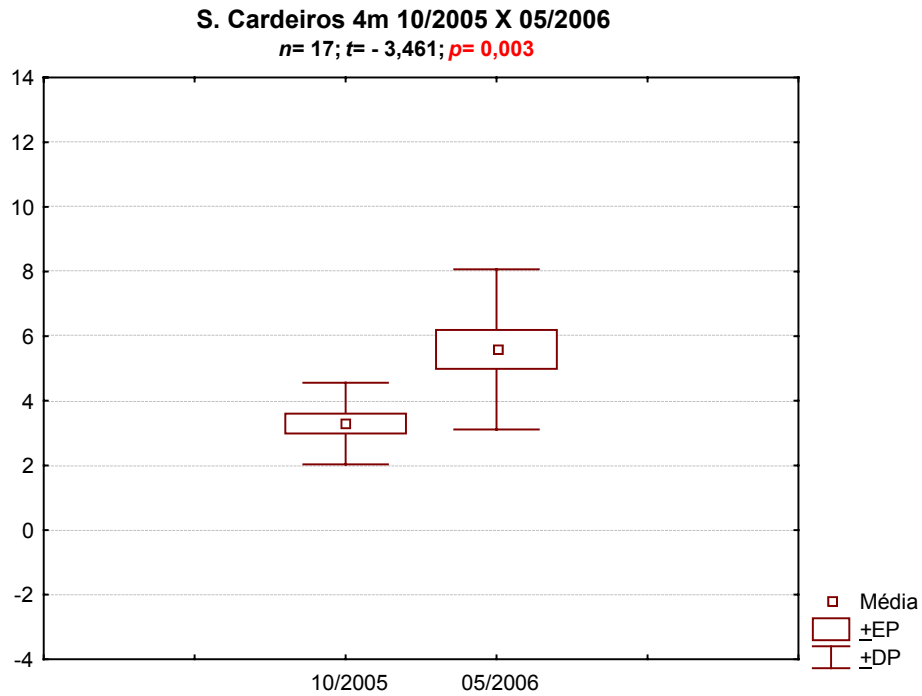
**Figura 27.** Comparação do percentual de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas no S. Cherne a 2 m em 10/2005 e em 05/2006.



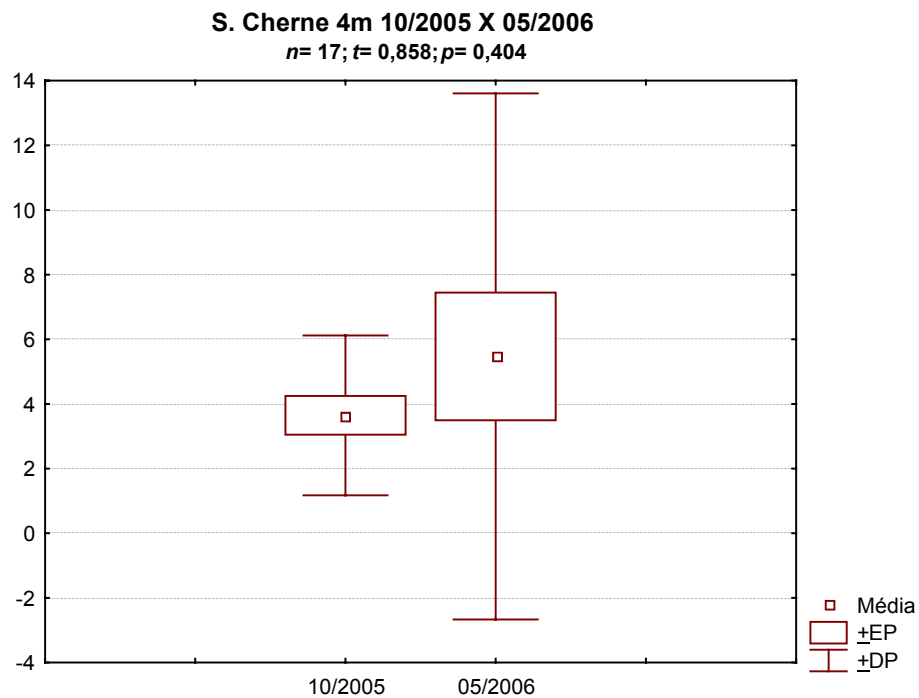
**Figura 28.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas na P. Vermelha a 2 m em 10/2005 e em 05/2006.

- **Sazonal 4m**

Nos ensaios com amostras de 4 m de profundidade (Fig. 8), verificamos uma diferença significativa ( $p = 0,032$ ) entre o consumo das iscas de 10/2005 e 05/2006 feitas com extratos brutos de amostras coletadas no S. Cardeiros a 4 m de profundidade (Fig. 29). Nas amostras das demais áreas não foram verificadas diferenças significativas. S. Cherne com  $p = 0,404$  (Fig. 30), P. Vermelha com  $p = 0,789$  (Fig. 31) e P. Anjos com  $p = 0,901$  (Fig. 32).

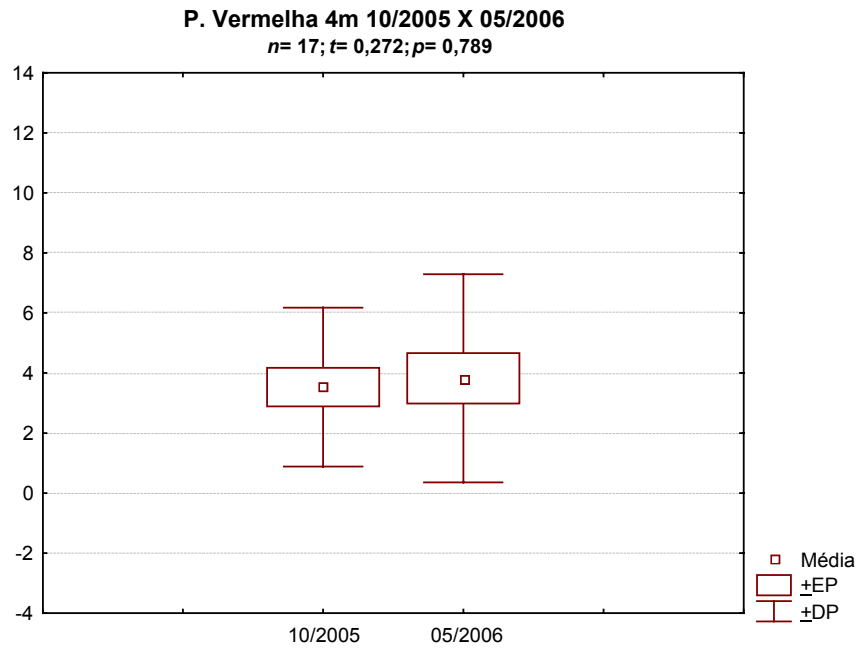


**Figura 29.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas no S. Cardeiros a 4 m em 10/2005 e em 05/2006.

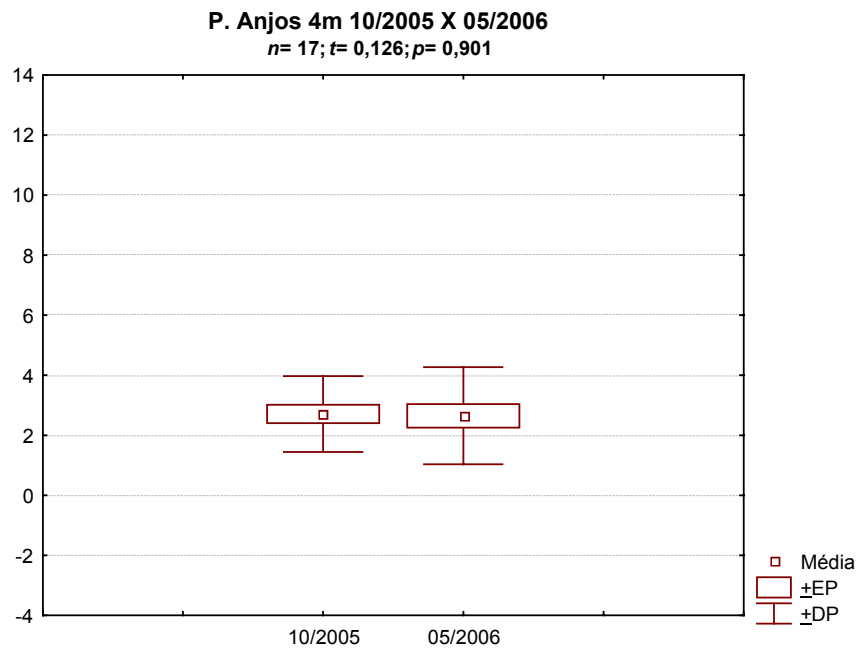


**Figura 30.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas no S. Cherne a 4 m em 10/2005 e em 05/2006.





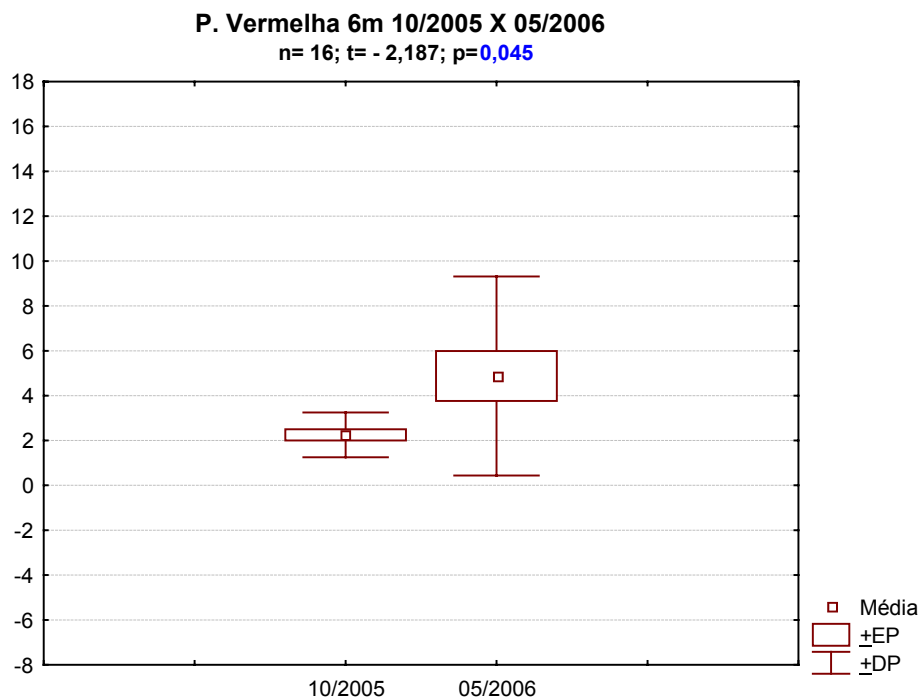
**Figura 31.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas na P. Vermelha a 4 m em 10/2005 e em 05/2006.



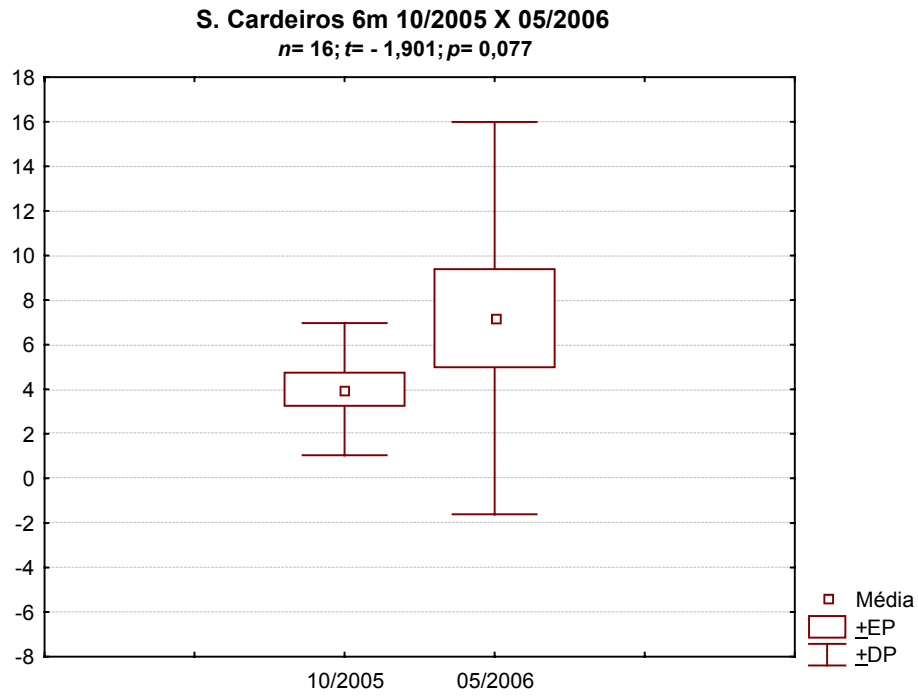
**Figura 32.** Comparação do percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas na P. Anjos a 4 m em 10/2005 e em 05/2006.

- **Sazonal 6m**

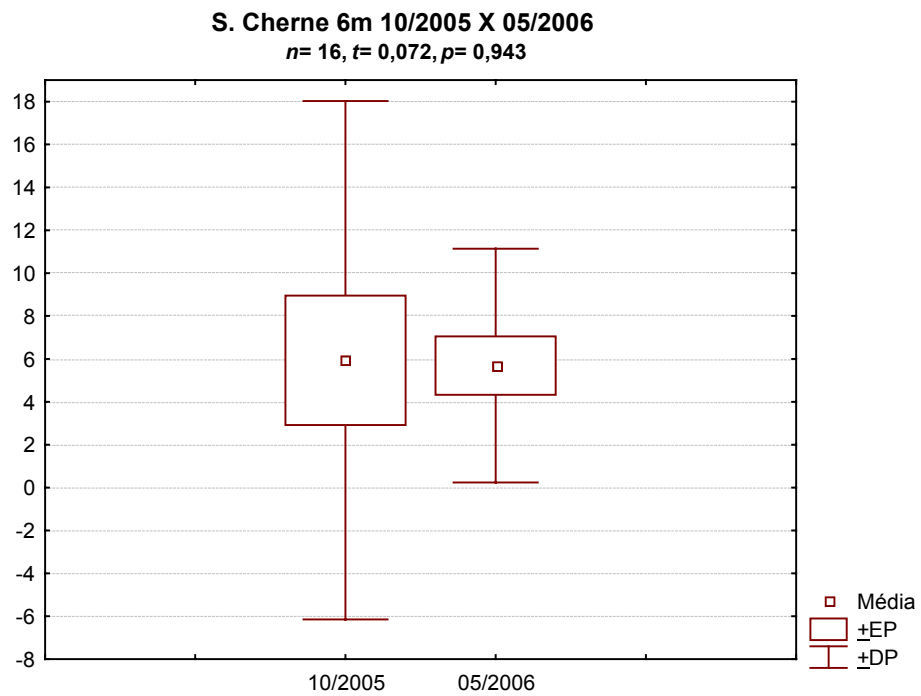
Nos bioensaios sazonais realizados com amostras coletadas a 6 m de profundidade (Fig. 9), também foi encontrada uma diferença significativa, mas não a consideraremos devido ao fato de se aproximar muito do limite adotado ( $\alpha= 0,05$ ), evitando assim incorrer em um erro do tipo 1. O consumo das iscas na Pedra Vermelha foi maior em 05/06 do que em 10/2005 ( $p = 0,045$ ) (Fig. 33). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas no consumo das iscas entre esses dois períodos no S. Cardeiros ( $p = 0,077$ ) (Fig. 34) e no S. Cherne com ( $p= 0,943$ ) (Fig. 35).



**Figura 33.** Percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas na P. Vermelha a 6 m em 10/2005 e em 05/2006.



**Figura 34.** Percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas no S. Cardeiros a 6 m em 10/2005 e em 05/2006.



**Figura 35.** Percentual médio de consumo das iscas feitas com extratos brutos de amostras coletadas no S. Cherne a 6 m em 10/2005 e em 05/2006.

### **Peixes onívoros**

Os grupos de peixes onívoros aos quais foram oferecidas as iscas feitas com os extratos brutos de tecido coralino foram observados no local por mergulho livre e identificados por censo visual. As espécies observadas pertencem às famílias *Labridae*, *Chaetodontidae*, *Haemulidae* e *Pomacentridae*.

### **DISCUSSÃO**

---

No presente estudo, foi verificado, através de testes de suscetibilidade a predação, se a química defensiva do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* do município de Arraial do Cabo varia espacial e temporalmente. Os resultados mostraram que a química defensiva de *P. caribaeorum* não varia verticalmente entre indivíduos de uma mesma população, não varia horizontalmente entre populações diferentes e não varia horizontalmente em uma mesma população. Nos testes para avaliar a variabilidade temporal da defesa química de *P. caribaeorum* foi verificada apenas uma diferença significativa entre amostras coletadas em diferentes épocas, o que sugere a ausência de variação quali ou quantitativa na química defensiva produzida em decorrência da sazonalidade.

Apesar da existência de muitos dados que suportem a hipótese de que o coral seja o produtor dos metabólitos secundários, ainda não existe evidência conclusiva de que o animal produza ou controle a produção (Michalek-Wagner *et al.*, 2001). Entretanto, neste caso, se ou a microalga simbiote ou o coral hospedeiro forem os responsáveis pela produção da química defensiva, a variabilidade dos metabólitos secundários pode estar relacionada com cepas de zooxantelas ou corais hospedeiros geneticamente diferentes (Rowan e

Powers, 1991) que podem ter características bioquímicas e fisiológicas distintas (Schoenberg e Trench, 1980).

Como não foi verificada diferença espacial na produção de metabólitos secundários, sugerimos que essa ausência de variabilidade possa estar associada com a alta semelhança genética entre as cepas das zooxantelas presentes no tecido coralino de *P. caribaeorum* ou entre os próprios corais dos pontos amostrados. A proximidade entre os locais amostrados proporciona um elevado fluxo gênico, e esse fator pode estar influenciando a produção de defesas, uma vez que essas variações genéticas não estão sendo suficientes pra desencadear discrepâncias significativas no potencial defensivo do coral estudado (Michalek-Wagner *et al.*, 2001).

A atividade fotossintética das zooxantelas pode suprir até 87% da demanda de carbono necessária para os processos respiratórios do coral (Muscatine *et al.*, 1981). Por outro lado o coral hospedeiro supre as zooxantelas com nutrientes e dióxido de carbono (Cook *et al.*, 1988). Os resultados dos testes sazonais mostraram que mesmo sem haver diferença significativa nos resultados dos testes de predação, as iscas feitas com amostras coletadas em outubro de 2005 foram ligeiramente menos consumidas o que pode estar associado à quantidade de nutrientes disponível na água. A fertilização do mar decorrente da ressurgência de Cabo Frio - que é mais freqüente nos últimos meses do ano – favorece o desenvolvimento do fitoplâncton e, conseqüentemente, do zooplâncton que é a principal fonte de alimento de *P. caribaeorum*. Em maio, durante o período de subsidência, os níveis de nutrientes na água diminuem, o que pode afetar o zooplâncton tornando este um recurso não tão disponível quanto é em outubro (Gonzales-

Rodriguez, *et al.*, 1992 e Guimaraens e Coutinho, 1996). Apesar de as zooxantelas conseguirem retirar parte do CO<sub>2</sub> necessário do bicarbonato, através da anidrase carbônica (Riegl e Branch, 1995), a diminuição no consumo do zooplâncton acarreta na diminuição da quantidade de CO<sub>2</sub> e principalmente de nutrientes translocados do coral hospedeiro para as zooxantelas que por sua vez diminuem a translocação de carbono orgânico para o coral. Dessa forma, durante o mês de outubro, a maior produção e defesas químicas em *P. caribaeorum*, provavelmente permite uma alocação de recursos para a produção de metabólitos secundários maior do que em maio.

Na verdade, ainda não se sabe se a variabilidade é desencadeada por fatores genéticos ou ambientais, mas dados os efeitos ecológicos dos metabólitos secundários marinhos, essa variação pode ter efeitos ecológicos significativos (Paul, 1992 e Hay, 1996). Substâncias chamadas briostatinas (utilizadas no combate do câncer em humanos) produzidas pelo briozoário *Bugula neritina* só estão presentes em poucas populações das várias estudadas dentro de uma comunidade, o que indica controle ambiental da produção de briostatinas (Pettit, 1991). A gorgônia *Briarium asbetinum* produz entre 5 e 15 metabólitos secundários diferentes, mas a produção desses metabólitos varia quantitativamente com a profundidade, o que indica controle genético no aspecto qualitativo e controle ambiental no aspecto quantitativo (Harvell *et al.*, 1993).

Independente se o controle é genético ou ambiental, uma questão relevante emerge da constatação de ausência de variabilidade espacial na química defensiva de *P. caribaeorum* em Arraial do Cabo. A variabilidade na química defensiva é um aspecto de grande relevância, pois é nela que se

estabelece a evolução das interações entre os organismos (Hay, 1996). Por exemplo, se a variabilidade é grande, menor será a possibilidade de adaptação do consumidor às diferentes concentrações de um determinado metabólito. No ambiente marinho, diversos consumidores pequenos (ex. crustáceos, moluscos, etc) vivem e/ou se alimentam de macroalgas ou gorgônias e, deste modo, minimizam a ação de predadores (Hay, 1992). Sob as colônias de *P. caribaeorum* em Arraial do Cabo vive uma fauna extremamente rica e variada principalmente de crustáceos, poliquetas e moluscos (obs. pessoal) que, em princípio, não é afetada pela química defensiva deste coral. Seria a ausência de variabilidade o aspecto fundamental para que esta associação tenha se estabelecido? Estudos neste sentido podem ser bastante profícuos.

Em síntese, o trabalho comprova a ausência de variabilidade espacial da química defensiva de *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo, possivelmente, devido ao alto fluxo gênico existente entre os locais amostrados, mostrando um provável controle genético sobre a produção de defesas. O trabalho também apontou a ausência de variabilidade temporal na produção da química defensiva o que indica que em Arraial do Cabo a variabilidade na produção de defesas químicas não sofre grande influência ambiental sendo dirigida principalmente por regulação genética, tal como ocorre para a variabilidade espacial. Apesar de se estimar que *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo produza como defesa química majoritária a palytoxina, são necessários estudos complementares para identificar essas substâncias e testar quimicamente a variabilidade quali e quantitativa das defesas químicas produzidas por este organismo, relacionando com as possíveis influências genéticas e ambientais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Attway, D.H. e Ciereszko, L.S. 1974. Isolation and partial characterization of caribbean palytoxin. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Coral Reef Symp. I, Great Barrier Reef Committee*, pp. 497-504.
- Bergmann, W., Feeney, R.J. e Swift, A.N. 1951. Contribution to the study of marine natural products. Palysterol and other lipids components of sea anemones. *J. Org. Chem.*, 16: 1337-1344.
- Bignami, G.S., Raybould, T.J.G., Sachinvala, N.D., Grothaus, P.G., Simpson, S.B., Lazo, C.B., Byrnes, J.B., Moore, R.E., Vann, D.C., 1992. Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunoassays for the Measurement of Palytoxin in Biological Samples. *Toxicon* 30, 687-700.
- Birkeland, C. e Neudecker, S. 1981. Foraging behavior of two Caribbean chaetodontids: *Chaetodon capistratus* and *C. aculeatus*. *Copeia*, 198: 169-178.
- Carballeira, N.M. e Reyes, M. 1995. Identification of a new 6-bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemone *Condylactis gigantea* and the zoanthid *Palythoa caribaeorum*. *J. Nat. Prod.*, 58: 1689-1694.
- Castro, C.B., Echeverria, C.A. e Pires, D.O. 1995. Distribuição de cnidaria e echinodermata no infralitoral de costões rochosos de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Biol.*, 55: 471-480.
- Coll, J.C., Price, I.R., König, G.M. e Bowden, B.F. 1987. Algal overgrowth of alcyonacean soft corals. *Mar. Biol.*, 96: 129-35.



- Cook, C.B., D'Elia, C.F. e Muller-Paker, G. 1988. Host feeding and nutrient sufficiency for zooxanthellae in the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Mar. Biol.*, 98: 253-262.
- Faulkner, D.J. 1991. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 8: 97-148.
- Faulkner, D.J. 1998. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 15:113–158.
- Faulkner, D.J. 2000. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.*, 17: 1-6.
- Fenical, W. e Pawlik, J.R. 1991. Defensive properties of secondary metabolites from the Caribbean gorgonian coral *Erythropodium caribaeorum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 75: 1-8.
- Gonzalez-Rodriguez, E.J.L., Valentin, J.L., Andre, S.A. 1992. Upwelling and downwelling at Cabo Frio (Brazil): Comparison of biomass and primary production responses. *J. Plank. Res.*, 14: 289-306.
- Guimaraens, M.A. e Coutinho, R. 1996. Spatial and temporal variation of benthic marine algae at the Cabo Frio, upwelling region, RJ, Brazil. *Aqua. Bot.*, 52: 283-299.
- Harvell, C.D., Fenical, W., Roussis, V., Ruesink, J.L., Griggs, C.C. e Greene, C.H. 1993. Local and geographic variation in the defensive chemistry of a West Indian gorgonian coral (*Briareum asbestinum*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 93: 165-173.
- Hay, M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 200: 103-134.
- Hay, M.E. e Fenical, W. 1996. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. *Oceanography*, 9: 10-20.

- Hay, M.E. e Steinberg, P.D. 1992. The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. *In*: Rosenthal, J.A. e Berenbaum, M.R. (Eds.) *Herbivores: their interaction with secondary metabolites, evolutionary and ecological processes*. Academic Press, San Diego, pp. 371-413.
- Hetzel, B. e Castro, C.B. 1994. *Corais do sul da Bahia*. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, 189pp.
- Kaul, P.N., Farmer, D., Ueda, K. e Takano, S. 1979. Pharmacology of palytoxin – the most potent marine toxin. *Proc. West. Pharmac. Soc.*, 17: 294-301.
- Kelecom, A. e Solé-Cava, A.M. 1981. Studies of Brazilian marine invertebrates. Comparative study of zoanthid sterols. The genus *Zoanthus*. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45: 451-462.
- Kemp, D.W., Cook, C.B., LaJeunesse, T.C. e Brooks, W.R., 2006. A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 335: 266-276.
- Kimura, S. e Hashimoto, Y. 1973. Purification of the toxin in a zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Publs. Seto. Mar. Bio. Lab.* 20: 713-718.
- Krebs, C.J. 2004. *Ecology, the experimental analysis of distribution and abundance*. Harper & Row Publ., New York.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.P., Bernard, C. e Hennion, M.C. 2004. First evidence of palytoxin analogues from na *Ostreopsis mascaensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern indian ocean. *J. Phycol.* 40: 1042-1051.

- Michalek-Wagner, K., Bourne, D.J., Bowden, B.F., 2001. The effects of different strains of zooxanthellae on the secondary-metabolite chemistry and development of the soft-coral host *Lobophytum compactum*. *Mar. Biol.*, 138, 753-760.
- Moore, R.E. e Scheuer, P.J. 1971. Palytoxin: a new marine toxin from coelenterate. *Science*, 172: 495-498.
- Moore, R.E., Dietrich, R.F., Hatton, B., Higa, T. e Scheuer, P.J. 1975. The nature of the  $\lambda$ 263 chromophore in the palytoxins, *J. Org. Chem.*, 40: 540-542.
- Moore, R.E., Helfrich P., e Patterson G.M.L. 1982. The deadly seaweed of Hanna. *Oceanus*, 25:54-63.
- Moriya, T., Ishida, Y., Nakamura, H., Asari, T., Murai, A., Ohizumi, Y., 1998. Vasoconstriction induced by zooxanthellatoxin-B, a polyoxygenated long-chain product from a marine alga. *Eur. J. Pharmacol.*, 350: 59-65.
- Muscatine, L., McCloskey, L.R. e Marian, R.E. 1981. Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol. Oceanogr.*, 26: 601-611.
- Nakamura, H., Asari, T., Ohizumi, Y., Kobayashi, J., Yamasu, T. e Murai, A. 1993. Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthela *Symbiodinium* sp. *Toxicon*, 31: 371-376.
- Ohizumi, Y., 1997. Application of physiologically active substances isolated from natural resources to pharmacological studies. *Jpn. J. Pharmacol.*, 73: 263-289.

- Oliveira, M.A.L. 2005. Branqueamento em *Palythoa caribaeorum*: caracterização microbiológica e ecologia química. *Programa de Pós-graduação em Biologia Marinha. Universidade Federal Fluminense*, 113pp.
- Paul, V.J. 1992. *Ecological roles of marine natural products*. Comstock, Ithaca, pp. 245.
- Pawlik, J.R., Chanas, B., Toonen, R.J. e Fenical, W. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. chemical deterrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127: 183-194.
- Pettit, G.R. 1991. the bryostatins. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 57: 153-195.
- Pettit, G.R. e Fujii, Y. 1982. Glycerol ethers of *Palythoa liscia*. *J. Nat. Prod.*, 45: 640-643.
- Quinn, R.J., Kashiwagi, M., Moore, R.E. e Norton, T.R. 1974. Anticancer activity of zoanthids and associated toxin, palytoxin, against Ehrlich ascites tumors and P-388 lymphocytic leukaemia in mice. *J. Pharm. Sci.*, 63: 257-260.
- Riegl, B. e Branch, G.M. 1995. Effects of sediment on the energy budgets of four scleractinian (Bourne 1900) and five alcyonacean (Lamouroux, 1816) corals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 186: 259-275.
- Rowan, R. e Powers, D.A. 1991. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-alga symbiosis. *Science*, 251: 1348-1350.
- Sammarco, P.W. e Coll, J.C. 1988. The chemical ecology of alcyonarian corals (Coelenterata: Octocorallia). *In*: Scheuer, P.J. (Ed.), *Bioorganic marine chemistry*. Springer-Verlag, Berlim, pp. 87-116.
- Scheuer, P. J., 1969. The chemistry of some toxins isolated from marine organisms. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 27, 322-39.

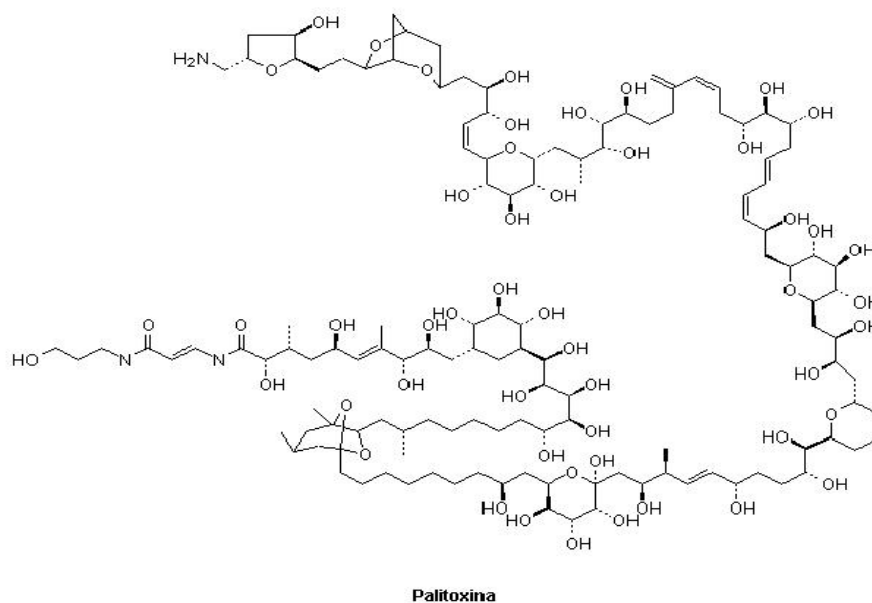
- Scheuer, P.J. 1964. The chemistry of some toxins isolated from marine organisms. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 22: 265-269.
- Schoenberg, D.A. e Trench, R.K. 1980. Genetic variation in *Symbiodinium* (*Gymnodinium*) *microdiaticum* Freudenthal and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microdiaticum*. *Proc. R. Soc. Lond.*, 207B: 405-427.
- Shigemori, H., Sato, Y., Kagata, T. e Kobayashi, J. 1999. Palythoalones A and B, new ecdysteroids from the marine zoanthid *Palythoa australiae*. *J. Nat. Prod.*, 62: 372-374.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y. e Yasumoto, T., 2001. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 65: 2585-2588.
- Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y. e Yasumoto, T. 1995. Palytoxin Analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 5389-5390.
- Valentin, J.L. 1984. Analyse des parametres hydrobiologiques dans la remontee de Cabo Frio (Bresil). *Marine Biology* 82: 259-276.

## CAPÍTULO 2: Potencial antiincrustante dos extratos brutos polares e apolares de três tratamentos distintos de *Palythoa caribaeorum* de Arraial do Cabo, RJ

### INTRODUÇÃO

---

Os antozoários formam um grupo que apresenta grande riqueza e diversidade de defesas químicas que, por sua vez, expressam várias funções ecológicas. Como resultado da sua natureza sésil, os antozoários estariam mais suscetíveis a epibiose (Pérez *et al.*, 2005), entretanto, são protegidos pelos vários metabólitos secundários que produzem (Coll, 1992 e Paul, 1992), incluindo a palytoxina que é uma molécula polar (hidrofílica) com alta complexidade estrutural (Fig. 1) (Scheuer, 1964 e Attaway e Ciereszko, 1974).



**Figura 1.** Estrutura molecular da palytoxina.

A produção de metabólitos secundários representa um custo metabólico significativo, entretanto, a energia gasta para a produção dessas substâncias é perfeitamente compensada pelas diversas funções que elas exercem dentro

dos indivíduos que os produzem (Michalek-Wagner *et al.*, 2001). Esses metabólitos atuam como defesa contra predadores (Van Alstyne *et al.*, 1994), interagem na competição interespecífica por espaço - alelopatia (La Barre *et al.*, 1986), evitam a colonização por outros organismos sobre o tecido coralino (Coll *et al.*, 1987) e exibem atividade antimicrobiana (Slattery *et al.*, 1995 e Sammarco e Coll, 1992). Além da palytoxina, a espécie *Palythoa caribaeorum* produz uma espessa camada de muco que também pode atuar na proteção deste coral contra organismos incrustantes (Ducklow e Mitchell, 1979)

Já é conhecido que as zooxantelas contribuem substancialmente com a produção primária nos corais (Goreau *et al.*, 1979), entretanto, mais da metade do carbono assimilado pelas zooxantelas é esxudado na forma de muco (Crossland, *et al.*, 1980 e Davies, 1984). A maior parte dos requerimentos nutricionais do coral hospedeiro é provida pelo carbono fixado fotossinteticamente pelas zooxantelas (Muscatine *et al.*, 1981, Banin *et al.*, 2001). O muco contém grande quantidade de arabinose o que indica que, pelo menos a porção polissacarídica do muco é de origem algal, pois a arabinose não é um carboidrato de origem animal (Meikle *et al.*, 1988). Já é conhecido que indivíduos que sofrem branqueamento, ou seja, que apresentam a quebra da relação simbiótica com as zooxantelas, têm a produção tanto de metabólitos secundários quanto de muco prejudicada (Michalek-Wagner e Bowden, 2000). A ineficiência na produção de defesas químicas e de muco em decorrência da perda dos dinoflagelados simbiontes afeta a capacidade de alimentação, a competição por recursos, a capacidade de crescimento e a taxa de sobrevivência, além de tornar os indivíduos mais suscetíveis a invasões microbianas, a predação e à incrustação por algas e outros organismos

(Kushmaro *et al.*, 1997 e Oliveira, 2005). O branqueamento pode levar os corais à morte, pois, a quantidade de carbono obtida através do consumo de zooplâncton não é suficiente para suprir suas exigências metabólicas (Porter, 1974).

Além de atuar evitando as incrustações (Ducklow e Mitchell, 1979 e Oliveira, 2005), o muco também pode evitar a dessecação - quando há exposição ao ar durante a maré baixa (Krupp, 1984), a sedimentação (Schuhmacher, 1977) e prover resistência a doenças – agregando microrganismos que produzem atividade antibiótica (Ritchie, 2006). O muco, composto basicamente por proteínas, carboidratos, triglicerídeos e colesterol, tem a habilidade de agregar várias partículas e também alguns organismos como zooplâncton e fitoplâncton presentes na coluna d'água (Wild *et al.*, 2004), sendo, portanto, um excelente meio nutritivo para vários microorganismos como fungos, bactérias e vírus (Wild *et al.*, 2004).

### **Objetivos**

Considerando-se que a polaridade das moléculas é responsável pelas interações destas com outras moléculas e que os produtos naturais mais ativos contra a incrustação biológica são apolares, o propósito do presente trabalho foi testar o potencial antiincrustante dos extratos brutos polares (hidrofílicos) e apolares (lipofílicos) de três tratamentos diferentes de *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo, RJ. Em outras palavras, objetivou identificar se o metabólito ativo é de natureza hidrofílica e/ou lipofílica tendo assim indícios para sugerir que a palytoxina, ou um correspondente análogo, seja produzida por *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo.



## **Hipóteses**

- Todos os tratamentos apresentam defesas químicas de natureza hidrofílica.
- Todos os tratamentos apresentam defesas químicas de natureza lipofílica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### ***Coleta de material***

Para a avaliação da atuação dos metabólitos secundários frente a organismos incrustantes, foi coletada uma amostra com aproximadamente 500g de tecido coralino de *P. caribaeorum* através de mergulho autônomo na Enseada da Praia dos Anjos a 4 metros de profundidade em maio de 2006. A amostra foi acondicionada em saco plástico e levada para o laboratório. No laboratório a mistura de água e muco que havia do saco plástico foi descartada e a amostra foi dividida em duas partes, uma das partes tinha peso igual à 225g, foi subdividida em pequenos pedaços para facilitar o processo de extração com EtOH (70%) e então congelado. Esse tratamento recebeu o nome de ***Palythoa com muco***. A outra parte da amostra teve o muco retirado por várias vezes com o auxílio de espátula plástica, até que o organismo não o produzisse mais seguindo a metodologia descrita por Wild *et al.* (2004). O tecido coralino sem o muco foi cortado em pequenos pedaços, armazenado em potes e então congelado. Esse tratamento foi chamado de ***Palythoa sem muco*** e tinha peso igual à 150g. O muco retirado teve peso igual à 100g, também foi armazenado e congelado, sendo o tratamento ***Muco de Palythoa***.

### **Obtenção dos extratos brutos**

Os três tratamentos foram descongelados, colocados em potes de vidro e então extraídos três vezes com EtOH 70% (diluído com água destilada) seguindo a metodologia de Bignami *et al.* (1992) para garantir que caso o organismo produzisse a palytoxina, que esta estaria presente. Cada tratamento foi extraído três vezes, a primeira extração com duração de 24 h, a segunda 48 h e a terceira 96 h. Após a extração os extratos aquosos foram filtrados e então submetidos à partição com hexano, rendendo cada tratamento dois extratos brutos, sendo um extrato polar (hidrofílico) e o outro apolar (lipofílico). Os solventes dos extratos foram retirados com auxílio de evaporador rotatório com pressão reduzida e banho-maria com temperatura igual a 40°C. Após a retirada do solvente, a água foi evaporada a temperatura ambiente com auxílio de exaustor e dessecador. Cada tratamento possuía 2 extratos brutos: ***Palythoa* com Muco polar e *Palythoa* com Muco apolar; *Palythoa* sem Muco polar e *Palythoa* sem Muco apolar; e Muco de *Palythoa* polar e Muco de *Palythoa* apolar.**

### **Testes das atividades antiincrustantes**

Os experimentos foram realizados em dois tempos: primeiro foram testados os extratos polares de todos os três tratamentos e, logo em seguida, foram testados os extratos apolares dos tratamentos. Para os experimentos de avaliação da atividade antiincrustante dos extratos, foram utilizados mexilhões da espécie *Perna perna* coletados durante a maré baixa, no costão rochoso da Praia de Itaipu, Niterói, RJ.

A metodologia utilizada para a avaliação do potencial antiicrustante dos extratos, baseou-se nos trabalhos realizados com juvenis de *Mytilus edulis* (Ina *et al.*, 1989; Goto *et al.*, 1992 e Satutio *et al.*, 1993) que receberam modificação comprovadamente eficaz para a utilização de *Perna perna* sugerida por Da Gama *et al.* (2003).

Os extratos foram solubilizados em solvente (metanol para os extratos polares e diclorometano para os extratos apolares) e incorporados em uma concentração proporcional a natural em papéis de filtro com o diâmetro de uma placa de petri (9 cm de diâmetro) cortados em trama quadriculada (padrão “tabuleiro de xadrez”). Os filtros utilizados no tratamento controle (controle independente) receberam apenas o solvente que foi usado para solubilizar os extratos. Após secos, os filtros quadriculados foram colocados em placas de petri estéreis, sobrepondo um disco de papel de filtro íntegro. Foi então adicionada um pouco de água do mar e 3 indivíduos de *Perna perna* (Fig. 2), que foram selecionados inicialmente por tamanho (2-3 cm) e depois pelo potencial de exploração do substrato (Fig. 3). O uso de um controle independente é justificável devido a fato dos extratos dos tratamentos polares serem hidrossolúveis e, portanto, são liberados na água, podendo afetar a fixação dos biscoos sobre o controle dependente.



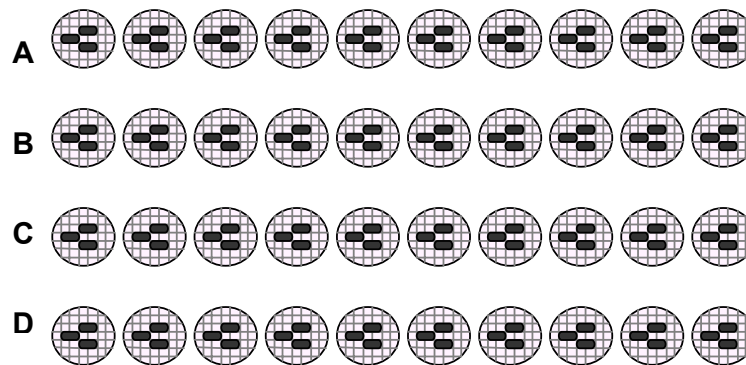
**Figura 2.** Exemplo de cada réplica dos experimentos, papel de filtro íntegro (controle dependente) no fundo da placa, papel de filtro quadriculado (tratamento) e 3 mexilhões *P. perna*.



Fonte: Bernardo A.P.G.

**Figura 3.** Mexilhão *P. perna* expondo o pé e explorando o substrato.

Cada tratamento possuía 10 réplicas ( $n= 10$ ) e foram testados 4 conjuntos de placas por vez: ***Palythoa* com muco** (polar ou apolar), ***Palythoa* sem muco** (polar ou apolar), **Muco de *Palythoa*** (polar ou apolar) e o **Controle** (Fig. 4). Os experimentos tiveram duração de 24 horas e, após esse período, foi quantificado o número total de biscoitos fixados em cada réplica. Ao término do experimento os mexilhões de cada tratamento foram colocados em potes plásticos perfurados e mantidos no aquário por mais 24h, com a finalidade de se observar possíveis mortalidades dos organismos, ocasionadas pela exposição aos extratos testados.



**Figura 4.** Esquema de montagem dos experimentos de incrustação: **A)** Tratamento controle; **B)** Tratamento ***Palythoa* com muco** (polar ou apolar); **C)** Tratamento ***Palythoa* sem muco** (polar ou apolar); e **D)** Tratamento **Muco de *Palythoa*** (polar ou apolar).

## Análise Bioestatística

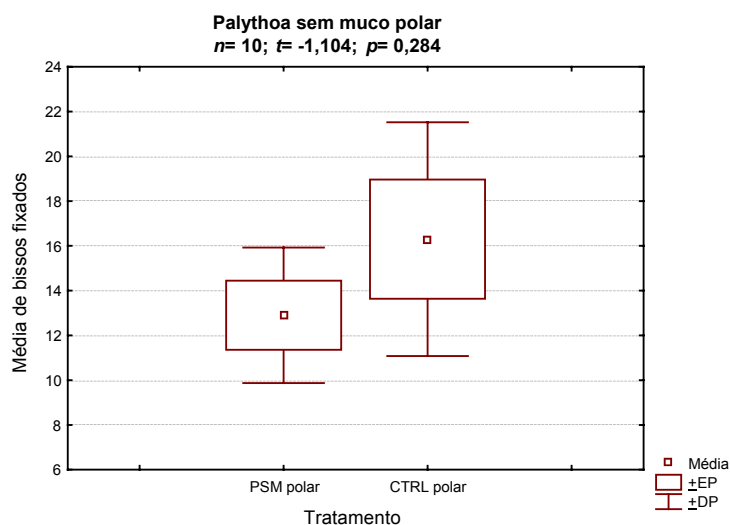
A média do total de bissos fixados em cada tratamento foi comparada a média do total de bissos fixados no controle independente. Inicialmente foi testada a normalidade dos dados pelos testes Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors e, em seguida, foi aplicado o teste-*t* para amostras independentes.

## RESULTADOS

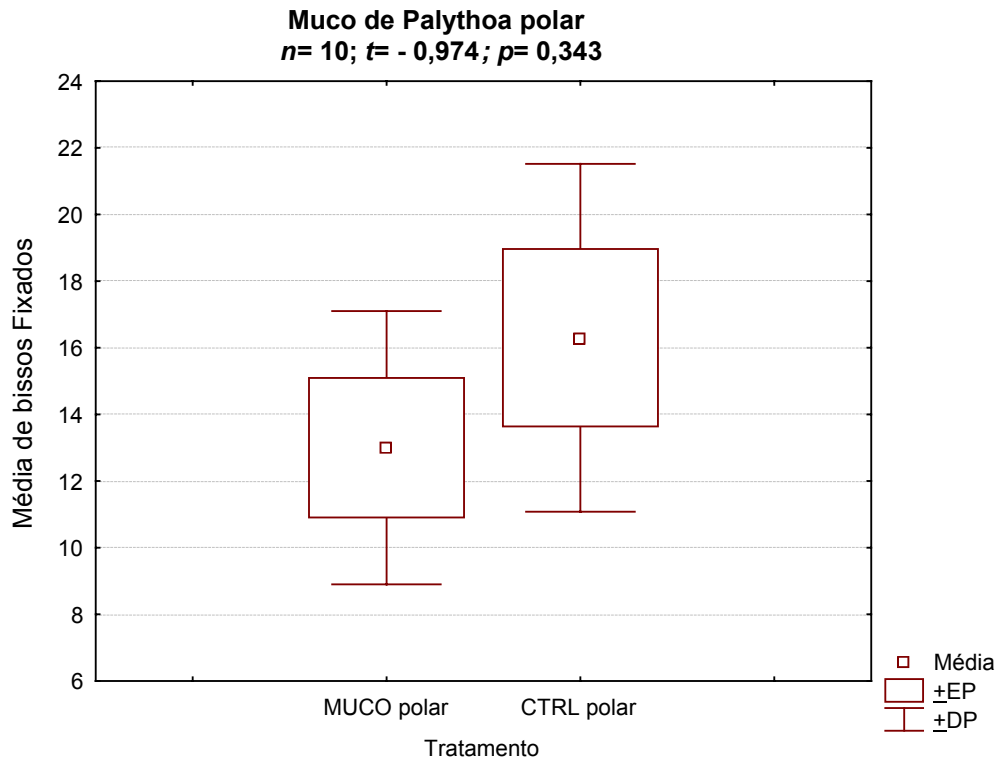
---

### Extratos polares

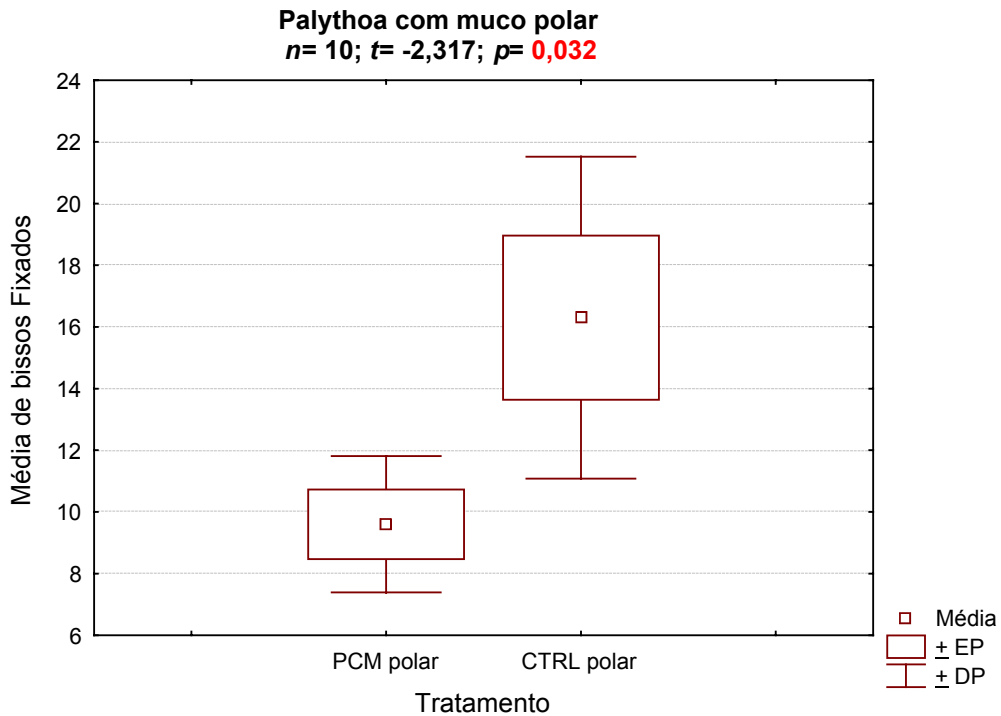
Os resultados do teste de avaliação do potencial antiincrustante dos extratos polares dos três tratamentos testados mostraram que **Palythoa sem muco** (PSM) (Fig. 5) e **Muco de Palythoa** (MUCO) (Fig. 6) tiveram o número total de bissos fixados igual a 129 e 130, respectivamente. Esse número foi inferior ao número de bissos fixados no tratamento **Controle** (CTRL) (163), porém, essa diferença não foi significativa. O extrato polar do tratamento **Palythoa com muco** (PCM) (Fig.7) teve um total de 96 bissos fixados e mostrou ser ativo contra incrustações.



**Figura 5.** Média do número total de bissos fixados do tratamento polar **Palythoa sem muco** em comparação com o **Controle**.



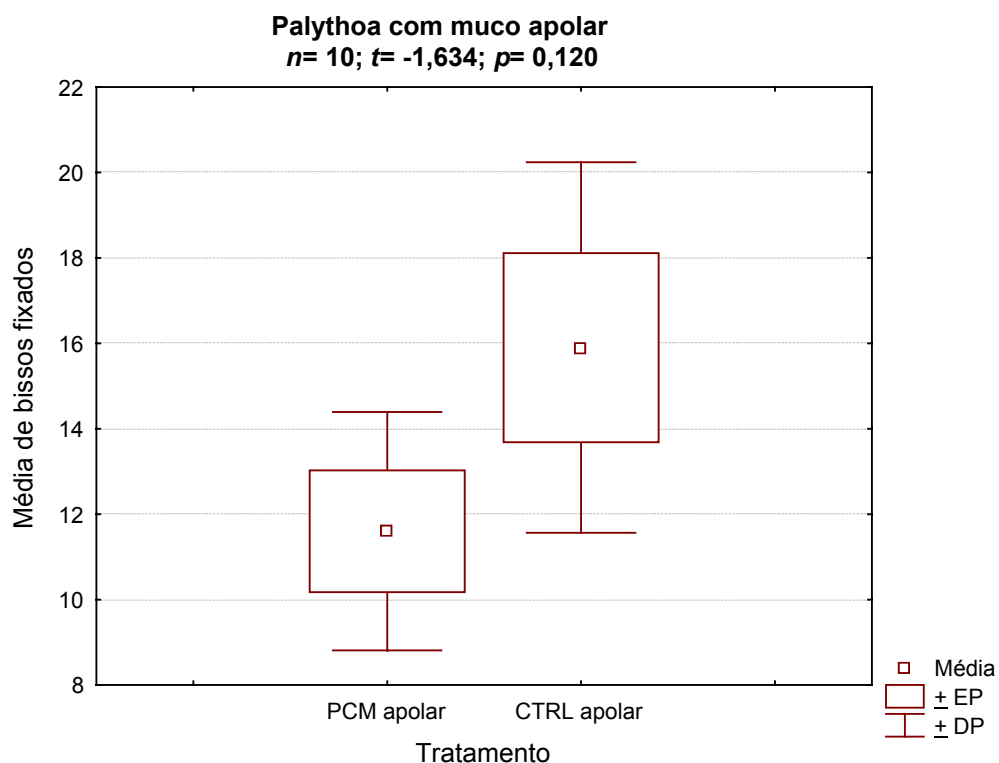
**Figura 6.** Média do número total de bissos fixados do tratamento polar **Muco de Palythoa** em comparação com o **Controle**.



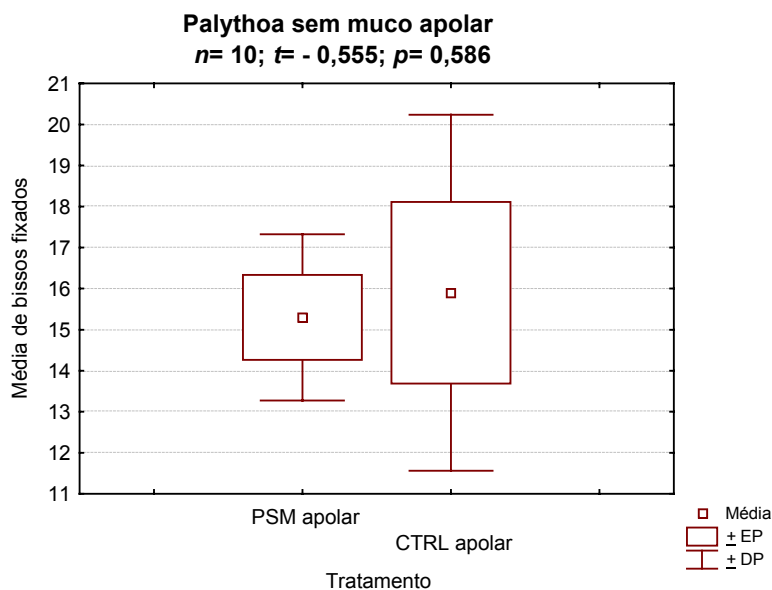
**Figura 7.** Média do número total de bissos fixados do tratamento polar **Palythoa com muco** em comparação com o **Controle**.

### Extratos apolares

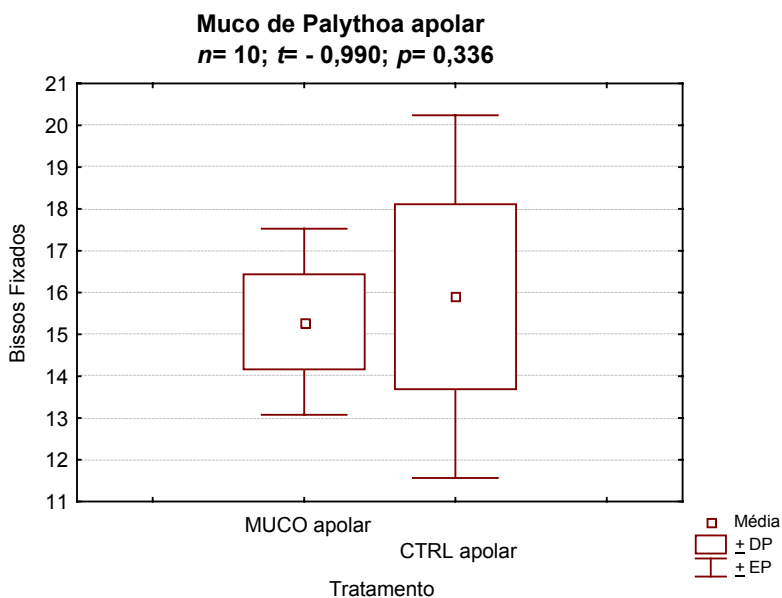
Os testes de avaliação da atividade antiincrustante dos extratos apolares revelaram que ***Palythoa* com muco** (Fig. 8), ***Palythoa* sem muco** (Fig. 9) e **Muco de *Palythoa*** (Fig. 10) tiveram um número total de bissos fixados igual a 116, 154 e 153, respectivamente. O tratamento **Controle** teve 159 bissos fixados, mas, apesar da diferença entre o número de bissos de cada tratamento e o controle, não foi verificada nenhuma diferença significativa, o que indica que os extratos brutos apolares não apresentam atividade antiincrustante.



**Figura 8.** Média do número total de bissos fixados do tratamento apolar ***Palythoa* com muco** em comparação com o **Controle**.



**Figura 9.** Média do número total de bissos fixados do tratamento apolar *Palythoa sem muco* em comparação com o **Controle**.



**Figura 10.** Média do número total de bissos fixados do tratamento apolar **Muco de Palythoa** em comparação com o **Controle**.

Após 24 horas, não foi verificada mortalidade entre os mexilhões utilizados nos experimentos, tanto para os expostos aos extratos apolares quanto para os expostos aos extratos polares.



## DISCUSSÃO

---

O presente trabalho testou o potencial antiincrustante dos extratos brutos polares e apolares de três tratamentos diferentes de *P. caribaeorum* coletados na Praia do Anjos em Arraial do Cabo, RJ em maio de 2006.

Os extratos brutos apolares dos três tratamentos (***Palythoa com muco***, ***Palythoa sem muco e Muco de Palythoa***), não apresentaram atividade antiincrustante, sendo assim, concluímos que a produção de terpenos ou outros metabólitos secundários apolares é ausente ou muito pequena para que possa se expressar em *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo.

Entre os extratos brutos polares, os tratamentos ***Palythoa sem muco*** e ***Muco de Palythoa*** não apresentaram ação contra incrustação e ***Palythoa com muco*** mostrou potencial antiincrustante. O potencial contra incrustação do extrato polar de ***Palythoa com muco*** pode ser devido ao somatório das ações antiincrustantes do muco e do próprio organismo que individualmente não são eficazes.

A atividade antiincrustante é propiciada predominantemente por substâncias presentes na superfície de organismos marinhos, sendo elas de natureza lipofílica (Dworjanyn *et al.*, 2006). Portanto, os resultados do presente trabalho, permitem pressupor que *P. caribaeorum* deve ser espécie alvo para estudos futuros de alocação de recursos para defesa (Cronin, 2001), uma vez que a espécie é conhecida por produzir uma toxina que pode estar fornecendo a proteção contra epibiontes (Attaway e Ciereszko, 1974).

Os resultados desse trabalho são conflitantes com os resultados obtidos por Oliveira (2005), que verificou pronunciada ação antiincrustante no muco de *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo. O motivo desses resultados contraditórios

pode estar associado às diferentes metodologias adotadas em cada trabalho. No trabalho de Oliveira (2005) os papéis filtro quadriculados foram embebidos diretamente no muco, em campo, e no presente trabalho, os extratos brutos feitos com o muco de *P. caribaeorum* foram incorporados nos papéis filtro quadriculados. No momento da coleta de muco para a extração foi tomado o cuidado de rejeitar o muco que veio do campo com o organismo, pois em campo o muco tem a capacidade de agregar muitas partículas e muitos organismos como microalgas, bactérias, fungos e vírus, que podem produzir substâncias químicas que poderiam alterar os resultados reais dos testes de incrustação. Oliveira (2005) também fez uma caracterização das bactérias associadas a *P. caribaeorum*, dentre elas estão: *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Streptococcus*, todas conhecidas por produzirem toxinas (Ritchie e Smith, 1997). Além disso, os corais podem favorecer a colonização do muco por microrganismos específicos que se associam de forma mutualística (Ritchie e Smith, 1997 e 2004). Esses microrganismos produzem metabólitos secundários que atuam contra incrustação e contra a adesão de patógenos (Hay, 1996 e Ritchie, 2006)

Vários trabalhos citam o muco como proteção contra organismos incrustantes (e.g. Kiefer *et al.*, 1986; Michalek-Wagner e Bowden, 1997), porém, não mencionam se a proteção é química ou física. Entretanto, Brown e Bythell (2005) relataram que a proteção provida pelo muco é física, descrevendo esse polissacarídeo como uma barreira física entre o coral e o ambiente. Com base nos resultados obtidos no presente estudo constatamos que a proteção provida ao coral *P. caribaeorum* pelo muco realmente seja física.

A presença de atividade antiincrustante no tratamento polar **Palythoa com muco** também pode ser um indício de que *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo sintetize a palytoxina, uma vez que esta substância foi a única defesa química polar descrita para o gênero encontrada em toda pesquisa bibliográfica. Melo *et al.* (2005) avaliaram a toxicidade dos extratos brutos hexânico (apolar) e etanólico (polar) de *P. caribaeorum* de três locais em Pernambuco, e verificaram que apenas os extratos polares tiveram ação tóxica, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho.

Alíquotas de 10 mg dos extratos brutos polares de cada um dos três tratamentos (***Palythoa com muco***, ***Palythoa sem muco*** e ***Muco de Palythoa***) foram analisados por RMN  $H^1$  para confirmar a presença da palytoxina, entretanto, além de não possuímos o padrão da substância, a visualização por RMN só é possível quando a toxina está pura e mesmo assim apresenta sinais muito próximos e congestionados (Ukena *et al.*, 2001). Alíquotas do tratamento Muco de *Palythoa* (polar e apolar) foram analisadas tanto por RMN  $H^1$  quanto por UV e essas análises revelaram apenas a presença de carboidratos e colesterol, indicando ausência de substâncias com alguma atividade defensiva.

Sintetizando, os resultados mostraram que a defesa contra as incrustações não é provida por substâncias apolares o que contradiz a nossa hipótese de que *P. caribaeorum* produz química defensiva de natureza lipofílica. Que, ao contrário do que era imaginado, o extrato polar do indivíduo sem o muco não foi eficaz contra as incrustações, e que a presença de atividade antiincrustante verificada no extrato polar de ***Palythoa com muco*** pode ser um indício de que *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo sintetiza a palytoxina ou algum análogo correspondente, já que não foi encontrada

qualquer outra substância de natureza hidrofílica relatada para o gênero. Entretanto, é de suma importância que em trabalhos futuros sejam feitas avaliações mais específicas para confirmar a presença da palytoxina nas colônias de *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Attway, D.H. e Ciereszko, L.S. 1974. Isolation and partial characterization of caribbean palytoxin. *Proceedings of the Second International Coral Reef Symposium I, Great Barrier Reef Committee*, pp. 497-504.
- Banin, E., Israely, T., Fine, M., Loya, Y. e Rosenberg, E. 2001. Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. *FEMS Microbiol. Lett.*, 199: 3-37.
- Bignami, G.S., Raybould, T.J.G., Sachinvala, N.D., Grothaus, P.G., Simpson, S.B., Lazo, C.B., Byrnes, J.B., Moore, R.E., Vann, D.C., 1992. Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunoassays for the Measurement of Palytoxin in Biological Samples. *Toxicon* 30, 687-700.
- Brown, B.E. e Bythell, J.C. 2005. Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 296: 291-309.
- Coll, J.C. 1992. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.*, 92:613-631.
- Coll, J.C., Price, I.R., König, G.M. e Bowden, B.F. 1987. Algal overgrowth of alcyonacean soft corals. *Mar. Biol.*, 96: 129-35.
- Cronin, G. 2001. Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: chemical defense patterns in relation to defense theories. In: McClintock,

- J.B. e Baker, B.J. (Eds.) Marine chemical ecology. *CRC Press, New York*, pp 325–353.
- Crossland, C., Barnes, D. e Borowitzka, M. 1980. Diurnal lipid and mucus production in the staghorn coral *Acropora acuminata*. *Mar. Biol.*, 60: 81-90.
- Da Gama, B.A.P., Pereira, R.C., Soares, A. R., Teixeira, V.L. e Yoneshigue-Valentin, Y. 2003. Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling*, 19: 161-169.
- Davies, P.S. 1984. The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora cydouxii*. *Coral Reefs*, 2: 181-186.
- Ducklow, H.W. e Mitchell, R. 1979. Bacterial population and adaptation in the mucus layers on living corals. *Limnol. Oceanogr.*, 24: 715-725.
- Dworjanyn, S.A., De Nys, R. e Steinberg, P.D. 2006. Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 318:153-163.
- Goreau, T.F., Goreau, N.I. e Goreau, T.J. 1979. Corals and coral reefs. *Sci. Am.*, 241: 124-135.
- Goto, R., Kado, R., Muramoto, K. e Kamiya, H. 1992. Fatty acids as antifoulants in a marine sponge. *Biofouling*, 6: 61-68.
- Hay, M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 200: 103-134.
- Ina, K., Takasawa, R., Yagi, A., Yamashita, M. Etoh, H. e Sakata, K. 1989. An improved bioassay method for antifouling substances using the blue mussel *Mytilus edulis*. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 3319-3321.

- Kiefer, P.A., Rinehart, K.L. e Hooper, I.R. 1986. Renillafoulins antifouling diterpenes from the sea pansy *Renilla reniformis* (Octocorallia). *J. Org. Chem.*, 51: 4450-4454.
- Krupp, D. A. 1984. Mucus production by corals exposed during an extreme low tide. *Pacif. Sci.*, 38: 1–11.
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M. E Loya, Y. 1997. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 147: 159-65.
- La Barre, S.C., Coll, J.C. e Sammarco, P.W. 1986. Defensive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef. II. The relationship between toxicity and feeding deterrence. *Biol. Bull.* 171: 565-76.
- Meikle, P., Richards, G. e Yellowlees, D. 1988. Structural investigations on the mucus from 6 species of coral. *Mar. Biol.*, 99: 187-193.
- Melo, L.F.A., Silva, D.G., Silva, L., Pérez, C.D. e Câmara, C. 2005. Avaliação da toxicidade de extratos brutos hexânico e etanólico de três espécies de cnidários sobre *Artemia salina* Leach. *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*.
- Michalek-Wagner, K. e Bowden, B.F., 1997. A natural algacide from soft coral *Sinularia flexibilis* (Coelenterata Octocorallia Alcyonacea). *J. Chem. Ecol.*, 23: 259-273.
- Michalek-Wagner, K. e Bowden, B.F. 2000. Effects of bleaching on secondary metabolite chemistry of alcyonacean soft corals. *J. Chem. Ecol.*, 26: 1543-1562.
- Michalek-Wagner, K., Bourne, D.J. e Bowden, B.F., 2001. The effects of different strains of zooxanthellae on the secondary-metabolite chemistry and

- development of the soft-coral host *Lobophytum compactum*. *Mar. Biol.*, 138: 753-760.
- Muscantine, L., McCloskey, L.R. e Marian, R.E. 1981. Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol. Oceanogr.*, 26: 601-611.
- Oliveira, M.A.L. 2005. Branqueamento em *Palythoa caribaeorum*: caracterização microbiológica e ecologia química. *Programa de Pós-graduação em Biologia Marinha. Universidade Federal Fluminense*, 113pp.
- Paul, V.J. 1992. Ecological roles of marine natural products. *Comstock, Ithaca*, pp. 245.
- Paul, V.J. e Van Alstyne, K.L. 1992. Activation of chemical defenses in tropical green algae *Halimeda* spp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 160: 191-203.
- Pérez, C.D., Vila-Nova, D.A. e Santos, A.M. 2005. Associated community with the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) from littoral of Pernambuco, Brazil. *Hydrobiol.*, 548:2007-215.
- Porter, J.W. 1974. Zooplankton feeding by the Caribbean reef-building coral *Monastrea cavernosa*. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Coral Reef Symp.*, 1: 111-125.
- Ritchie, K.B. 2006. Regulation of microbial populations by coral surface and mucus-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 322: 1-14.
- Ritchie, K.B. e Smith, G.W. 1997. Physiological comparison of bacteria from various species of scleratinian corals. *Proc. 8<sup>th</sup> Symp. Reef Studies*, 1: 521-526.
- Ritchie, K.B. e Smith, G.W. 2004. Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers. *In: Rosenberg, E. e Loya, Y (Eds.) Coral health and disease. Springer-Verlag, Berlin*, p. 159-263.

- Sammarco, P.W. e Coll, J.C. 1992. Chemical adaptation in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 88: 93- 104.
- Satuito, C.G., Katsuyama, I., Kitajima, F. e Fusetani, N. 1993. A new “mussel test” for antifouling substances. *Oebalia*, 19: 479-484.
- Scheuer, P.J. 1964. The chemistry of some toxins isolated from marine organisms. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 22: 265-269.
- Schuhmacher, H. 1977. Ability in fungiid corals to overcome sedimentation. *Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Coral Reef Symp.*, 503–509.
- Slattery, M., McClintock, J.B. e Heine, J.N. 1995. Chemical defenses in Antarctic soft corals: evidence for anti-fouling compounds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 190: 61-77.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y., Yasumoto, T., 2001. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci Biotech Bioch* 65, 2585-2588.
- Van Alstyne, K.L., Wylie, C.R. e Paul, V.J. 1994. Antipredator defenses in tropical pacific soft corals (coelenterata, alcyonacea) .2. the relative importance of chemical and structural defenses in 3 species of *Sinularia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 178: 17-34.
- Wild, C., Huettel, M., Klueter, A., Kremb, S.G., Rasheed, M.Y.M. e Jergensen, B.B. 2004. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature*, 428: 66-70.



## CONCLUSÕES

---

- Os resultados revelaram não haver variabilidade espacial da química defensiva das colônias de *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo.
- Variações ambientais características de diferentes épocas do ano, não desencadeiam variabilidade temporal da química defensiva das colônias de *P. caribaeorum*.
- Em Arraial do Cabo a produção de defesas químicas por *Palythoa caribaeorum* é regulada geneticamente.
- *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo não sintetiza defesas químicas de natureza lipofílica.
- A proteção antiincrustante provida pela camada de muco é física e não química.
- O fato de termos encontrado atividade antiincrustante a partir de um extrato polar pode ser um indício de que a palytoxina, ou um análogo correspondente seja produzido por *P. caribaeorum* de Arraial do Cabo, uma vez que esta é a única substância com potencial defensivo de natureza hidrofílica descrita para o gênero.