

# ANÁLISE DE TOXINAS DIARRÉICAS EM DUAS ESPÉCIES DE *PROROCENTRUM* (DINOPHYCEAE) ISOLADAS EM ÁREA DE CULTIVO DE MOLUSCOS.

PROENÇA, L.A.\*; SCHMITT, F.; GUIMARÃES, S.P. & L.R. RÖRIG

Centro de Ciências Tecnológicas, da Terra e do Mar / CTTMar  
Universidade do Vale do Itajaí / UNIVALIRua Uruguai 458, Itajaí, 88 302-202 Fone/fax:  
047 341 76 33

E-mail: proenca@cttmar.univali.rct-sc.br

\* Autor a quem as correspondências devem ser enviadas.

## RESUMO

As ficotoxinas ácido ocadaico (AO) e dinofisistoxina 1 (DTX1) são poliéteres produzidos por alguns dinoflagelados dos gêneros *Prorocentrum* e *Dinophysis*. Estas toxinas podem ser acumuladas nos tecidos de moluscos filtradores e intoxicar seres humanos que venham a consumir estes moluscos. A produção de AO e DTX1 por duas espécies de dinoflagelados do gênero *Prorocentrum*, isoladas de uma área de cultivo de moluscos em Santa Catarina, foi investigada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pré-coluna e detecção por fluorescência. Os resultados indicam que as cepas isoladas de *P. micans* Ehrenberg 1833 and *P. obtusum* Ostenfeld 1908 não são produtoras de AO ou DTX1 e estes organismos podem ser excluídos do rol das espécies potencialmente produtoras de DSP que ocorrem na região.

**Palavras Chave:** Ácido ocadaico, dinoflagelado, ficotoxinas, CLAE, moluscos

## ANALYSIS OF DIARRHETIC TOXINS IN TWO *PROROCENTRUM* (DINOPHYCEAE) SPECIES ISOLATED FROM A MUSSEL CULTURE AREA.

## ABSTRACT

The diarrhetic shellfish toxins, okadaic acid (OA) and dinophysistoxin 1 (DTX1), are polyeters produced by some species of the *Dinophysis* and *Prorocentrum* genera. These toxins can accumulate into the mussel tissues and later intoxicate human consumers. The production of AO and DTX1 by *Prorocentrum micans* Ehrenberg 1833 and *P. obtusum* Ostenfeld 1908, two especies isolated from a mussel culture area, was investigated by the pre-column derivatization HPLC-FLD method. Results showed that these two dinoflagellate do not produce AO or DTX1 and they can be ruled out from the potentially toxin producing algae roll find in the mussel culture area.

**Key Words:** Okadaic Acid, Dinoflagellate, phycotoxins, HPLC, mussel

## INTRODUÇÃO

Distúrbios gastrointestinais severos podem ser causados pela ingestão de moluscos contaminados com toxinas que compõem o venenamento diarréico por con-

sumo de mariscos (diarrhetic shellfish poisoning, DSP). As toxinas do DSP são produzidas por alguns dinoflagelados dos gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum* e podem ser acumuladas nos tecidos de moluscos durante o processo de filtração. As toxinas deste

veneno, que produz na intoxicação aguda diarréia, vômito e náusea, incluem os poliéteres ácido ocadaico (AO) e dinofisistoxinas, DTX1 e DTX2. Além de causar distúrbios gastrointestinais, ao ácido ocadaico tem sido atribuída uma potente ação produtora de tumores no sistema digestivo após exposição prolongada (Suganuma *et al.* 1988). O DSP foi descoberto primeiramente no Japão em 1976 (Yasumoto *et al.*, 1978) e sua ocorrência em áreas de cultivo, ou de extração de moluscos filtradores, representa um risco a saúde pública podendo comprometer a produção e causar danos econômicos a produtores ou extratores. No sentido de se assegurar a qualidade do produto, programas de monitoramento de toxicidade de moluscos e da ocorrência de espécies potencialmente tóxicas são desenvolvidos em diversas localidades (Andersen, 1996). Da mesma forma, estudos são realizados para se conhecer a biologia das espécies e fatores que controlam sua distribuição e ou a produção de toxinas. Atualmente, o DSP é encontrado na Europa, na Oceania, nas Américas do Norte e do Sul, onde ocorre no Chile, Argentina e Uruguai (Hallegraeff, 1995). Recentemente, o AO foi detectado em moluscos cultivados na região sul do Brasil (Proença *et al.* 1998a, Proença *et al.*, 1998b). Neste contexto, este trabalho visa contribuir ao reconhecimento de espécies tóxicas produtoras de toxinas diarreicas de ocorrência em áreas de cultivo de moluscos no litoral de Santa Catarina. A produção de AO e DTX1 foi analisada em duas espécies de *Prorocentrum* utilizando-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## MATERIAL E MÉTODOS

*P. micans* e *P. obtusum* foram isolados a partir de amostras coletadas na área de cultivo de moluscos da Enseada de Armação do Itapocoróy, no município de Penha, SC (26°36' lat. S e 48°36' long. W). Os indivíduos foram concentrados por filtração reversa e

isolados um a um com auxílio de capilar sob um microscópio invertido. Inicialmente, as células isoladas foram mantidas em tubos de 20 ml em meio de cultivo K (Keller & Gillard, 1985) a  $60 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  e um fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 de escuro, a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após um período de 15 dias, os organismos foram transferidos para um frasco tipo erlenmeyer de 250 ml e mantidos por repicagem após atingida a fase estacionária (Guimarães *et al.* 1997).

As análises cromatográficas foram feitas utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu, composto de um sistema de degassificação por borbulhamento de hélio, uma bomba de alta pressão LC10-AD, capaz de realizar gradientes quaternários e um detetor de fluorescência RF-551 configurado para 365 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente. As amostras, diluídas na fase móvel, foram injetadas por meio de um injetor Rheodine 7725i equipado com um *loop* de 50  $\mu\text{l}$ . A cromatografia ocorreu em uma coluna Waters NOVAPACK (de 4,6 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento) empacotada com partículas ODS de 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A cromatografia durou 20 minutos e a fase móvel foi composta de acetonitrila 80%. As análises cromatográficas seguiram o protocolo utilizado para a determinação de toxinas em moluscos segundo Lee *et al.* (1987) com modificações.

Um volume conhecido do cultivo das algas obtido na fase exponencial de crescimento foi centrifugado e aproximadamente  $17 \times 10^4$  e  $30 \times 10^4$  células de *P. obtusum* e *P. micans*, respectivamente, foram concentradas. Ao concentrado, 3 ml de metanol 80 % foram adicionados, e a fração lipossolúvel foi extraída por sonicação com sonda de ultrassom, por aproximadamente 4 minutos (Sonics) a baixa temperatura. A eficiência da ruptura das células foi conferida por microscopia. Ao extrato metanólico foram adicionados 1 ml de água e 3 ml de diclorometano. O extrato foi agitado e centrifugado a 2700 rpm por 3 minutos. A fase inferior, de diclorometano, foi

separada e a superior reextraída. As frações de diclorometano foram unidas e secas em corrente de nitrogênio. Ao extrato seco foram adicionados 0,35 µg de ácido deoxicólico (DEO) como padrão interno e este foi derivatizado em presença de 200 µl de solução metanólica de 9-antrildiazometano (ADAM) a 1% (Lee *et al.*, 1987). A amostra foi então incubada a 40°C em banho Maria por 1 hora e após seca em corrente de N<sub>2</sub>. O excesso de ADAM e algum possível interferente foram eliminados utilizando-se um cartucho de extração de fase sólida de sílica (Whaters SEPPack) seguindo-se o protocolo de Pereira *et al.* (1995). O tempo de retenção do AO foi determinado utilizando-se o AO puro (SIGMA) derivatizado conforme os passos descritos acima. A quantificação de AO nas amostras foi feita utilizando-se solução padrão de ácido deoxicólico. O tempo de retenção de DTX1 foi obtido com a análise de extrato de *P. lima* (cepa PL2UV) cedido pelo Centro Oceanográfico de Vigo, Espanha.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as espécies testadas não produzem AO ou DTX1. A ausência das toxinas fica clara quando comparados os cromatogramas de *P. micans* e *P. obtusum* com o de *P. lima*, conforme Figura 1. Este resultado corrobora anteriores, os quais não incluem *P. micans* e *P. obtusum* como produtores de DSP (Steidinger & Tangen, 1997). No entanto, ressalta-se que a toxicidade em uma mesma espécie pode variar. *Dinophysis acuta*, por exemplo, aumenta a produção de toxinas em função da limitação de nutrientes (Johansson *et al.* 1996). Algumas espécies de *Prorocentrum* produzem poliésteres não tóxicos similares ao AO, que podem ter sua estrutura molecular alterada, apresentando assim uma toxicidade potencial (Wright & Cembella, 1998). Em espécies de outros grupos, como diatomáceas produtoras do veneno amnésico, a produção da toxina ácido domóico em cultivo esta as-

sociada a fase posterior à exponencial, quando as células interrompem o processo de divisão (Bates, 1998). Já as espécies produtoras de toxinas paralisantes (paralytic shellfish poisoning - PSP) podem apresentar ou não toxicidade, conforme variáveis ambientais.

Embora os resultados indiquem que as espécies investigadas não sejam produtoras de toxinas, o ácido ocadaico foi detectado em moluscos oriundos de cultivos no litoral centro norte de Santa Catarina em 1995 (Proença & Rörig, 1995; Proença *et al.* 1998b). Este resultado, associado a depoimentos de pescadores e registros informais de intoxicação massiva em consumidores de moluscos

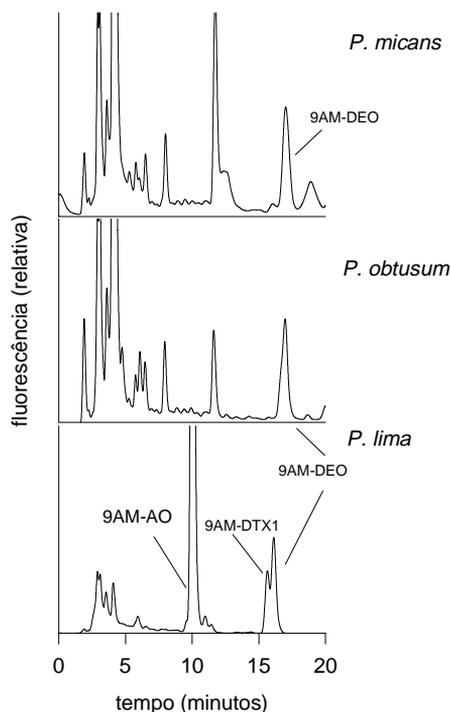


Figura 1: Cromatogramas de fluorescência dos extratos de dinoflagelados *Prorocentrum micans*, *P. obtusum* e *P. lima* (cepa PL2V, IOE, Vigo) para análise de toxinas diarreicas derivatizadas com 9-antril-diazometano: ácido ocadaico (9AM-AO), dinofisistoxina 1 (9AM-DTX1) e do padrão interno ácido deoxicólico (9AM-DEO). Detalhes da cromatografia ver texto.

(Zenebon & Pregnotato, 1992), leva a crer que DSP seja um fenômeno recorrente nesta região (Proença & Rörig, 1995). Diversas espécies de *Dinophysis* e *Prorocentrum* foram identificadas em áreas de cultivo, ou próximas. Além de *P. micans* e *P. obtusum*, elas incluem: *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. rotundata*, *D. tripos*, *D. ovum*, *D. caudata*, *P. gracile*, *P. minimum*, *P. lima* e *P. maculosum* (Cardoso, 1993; Rörig et al 1998). A literatura inclui as espécies *Prorocentrum lima*, *P. mexicanum*, *P. minimum*, *P. belizeanum* e *P. concavum* como sendo tóxicas, produtoras de AO ou DTX1 (Steidinger & Tangen, 1997). Embora muitas espécies ocorram, até o momento, a produção de AO na região de estudos foi confirmada apenas em *D. acuminata* (Proença et al., 1999), restando um grande número a ser testado.

A investigação sobre os organismos potencialmente produtores de toxinas na região é importante, visto que nos últimos anos o cultivo de moluscos bivalves tem crescido de forma acelerada em enseadas do litoral de Santa Catarina. Este sucesso é função das condições oceanográficas locais, do envolvimento da comunidade de pescadores artesanais, do esforço de órgãos governamentais de fomento e de pesquisas acadêmicas. Em um curto espaço de tempo, o estado se tornou o maior produtor nacional, totalizando 600 produtores com uma produção de 7000 ton.ano<sup>-1</sup>, movimentando aproximadamente R\$ 1 x 10<sup>7</sup>. O conhecimento das espécies potencialmente tóxicas auxilia na gestão do cultivo de moluscos. Em alguns países onde existe a ocorrência de DSP o controle da qualidade do produto é feito em base a abundância de espécies produtoras de toxinas na água (Andersen, 1996). As duas espécies de *Prorocentrum* analisadas, e de comum ocorrência em áreas de cultivo, em princípio podem ser excluídas da lista de espécies potencialmente tóxicas e possíveis causadoras de DSP na região. Os estudos prosseguirão no sentido de se identificar quais espécies de algas de ocorrência em áreas de

cultivo devem ser monitoradas de perto em função da produção de toxinas. O conhecimento de quais as espécies tóxicas de ocorrência nas áreas de cultivo é uma ferramenta a mais para o controle sanitário do produto e a gestão da atividade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Andersen, P. 1996. Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. IOC-UNESCO, Paris, 102 p.
- Bates, S.S. 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In: Physiological ecology of harmful algal blooms Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Hallegraeff, G.M. (eds.), Springer, Berlin, pp. 405-426.
- Cardoso, L.S. 1993. Dinoflagelados da Ilha do Arvoredo e da Paria de Ponta das Canas - SC, Brasil (setembro a Fevereiro de 1992): Considerações taxonômicas e ecológicas. tese de mestrado. UFRGS, Porto Alegre. 306 p.
- Guimarães, S., Rörig, L., Resgalla Jr., C. & Proença, L.A. 1997. Testes preliminares de crescimento de *Prorocentrum micans* (Dinophyceas) no laboratório de cultivos da Facimar, utilizando-se diferentes meios de cultivo. X Semana Nacional de Oceanografia, Itajaí 5 a 10 de outubro. 348-350.(Resumo)
- Hallegraeff, G.M. 1995. Harmful algal blooms: a global overview. In: Manual on harmful marine algae. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. and Cembella, A.D. (eds.), UNESCO, Paris, pp. 1-27.
- Johansson, N., Granéli, E., Yasumoto, T., Carlsson, P. & Legrand, C. 1996. Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. In: Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto, T., Oshima, Y. and Fukuyo, Y. (eds.), IOC-UNESCO, Paris, pp. 277-280.

- Keller, M.D. & Guillard, R. 1985. Factors significant to marine dinoflagellate culture. Elsevier Sciences Maine. In: Toxic dinoflagellates, Anderson, P.M.; Baden, A.W. & D.G. Baden (eds.). 113-116.
- Lee, J.S., Murata, M. & Yasumoto, T. 1987. Analytical methods for determination of diarrhetic shellfish toxins. In Mycotoxins and Phycotoxins. Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 327-333.
- Pereira, A., Klein, D., Sohet, K., Houvenaghel, G. & Braekman, J.C. 1995. Improvement to the HPLC-Fluorescence analysis method for the determination of acid DSP toxins. In Harmful marine algal blooms. Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P. and Marcaillou, C. (eds.), Lavoisier, Intercept Ltd. Paris, pp. 333-338.
- Proença, L.A.; Rörig, L.; Barreiros, M.A. & N. Lagos. 1998a. A possible case of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina State, Southern Brazil. Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, Caxambú, MG. 257-263.
- Proença, L.A., Schmitt, F., Costa, T. & Rörig, L. 1998b. Just a diarrhea? Evidences of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina - Brazil. Ciência e Cultura, 50(6): 458-461.
- Proença, L.A. & Rörig, L. 1995. Mussel production and toxic algal blooms in Santa Catarina State, southern Brazil. IOC/ UNESCO Harmful Algal News 12/13, 5
- Proença, L.A., Schmitt, F., Silva, M. Guimarães, S. & Rörig, L. 1999. Produção de ácido okadaico, uma toxina diarreica, por *Dinophysis acuminata* em Santa Catarina. Atlântica, 19.
- Rörig, L., Lugli, D.O., Guimarães, S., Proença, L.A., Manzoni, G. & Marenzi, A. 1998. Monitoração de microalgas planctônicas potencialmente tóxicas na área de maricultura da Enseada de Armação de Itapocoroy - Penha - SC. Notas Técnicas da FACIMAR 2:71-79
- Steidinger, K.A. & Tangen, K. 1997. Dinoflagellates. In: Identifying Marine Phytoplakton. Tomas, C.R. (ed.), Academic Press, San Diego, pp. 387-584.
- Suganuma, M., Fujiki, H., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K. & Sugimura, T. 1988. Okadaic acid: an additional non- phorbol - 12 - tetradecanoate 13-acetate-type tumor promoter. Proc Natl Acad Sci. USA 85, 1768-1771.
- Wright, J.L.C. & Cembella, A.D. 1998. Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxin. In: Physiological ecology of harmful algal blooms, Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Hallegraef, G.M. (eds.), Springer, Berlin, pp. 427-452.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Ogury, O., Igarashi, Y. & Fujita, N. 1978. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. Bull. Jap. Soc. Sc. , Fish. 46, 1405-1411.
- Zenebon, O. & Pregnoatto, N.P. 1992. Memórias técnico-científicas da divizo de bromatologia e química. In: 100 Anos de Saúde Pública. Antunes, J.L.F., Nascimento, C.B., Nassi, L.C. and Pregnoatto, N.P. (eds.), Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo, pp. 173-198.