

JEANETE LOPES NAVES

Estudos sobre dinoflagelados isolados da Costa Norte
do Estado de São Paulo: monitoramento, aspectos
moleculares, biológicos e químicos.

São Paulo

2008

INTRODUÇÃO

Os oceanos são essenciais para o suprimento de alimentos, na determinação do clima, como via de transporte e também como ambiente recreacional. Vários fatores estão afetando o balanço energético ambiente (Pianka, 1974) e tornando eventos naturais como as florações, problemas de saúde pública e econômica.

O aumento das florações de algas nocivas (HAB – Harmful algal blooms) foi anunciado em 1974 de forma global, causando desconfiança em alguns pesquisadores (Anderson, 1989). Os dados reunidos nos anos seguintes estabeleceram um aumento não só no número de eventos, mas também na variedade de espécies e toxinas envolvidas (Hallegraeff, 1993).

Explicações para esse crescente aumento são atribuídas a uma combinação de temperatura, salinidade, luz, concentração de nutrientes, aumento da utilização das águas costeiras para aquicultura, transporte de organismos para novas áreas pela água de lastro de navios e sementes de mariscos contaminados (Holligan, 1985; Maclean 1989; Halegraeff *et al.*, 1988, Hallegraeff, 1993; Leong e Tagushi, 2004).

As perdas econômicas causadas pelas florações levaram ao estudo do ciclo de vida e interações ecológicas, taxonomia e aspectos moleculares das microalgas envolvidas nesses eventos (Walker, 1984; Faust, 1990; Moncheva *et al.*, 2001; Elbrächter, 2003).

As toxinas produzidas pelas microalgas também foram alvo de pesquisas. Mostrando atividade biológica altamente específica, foram estudadas quanto ao mecanismo de ação, detecção e determinação de estrutura química (Yasumoto e Murata, 1993; Hilgemann, 2003, Fuwa *et al.*, 2003).

A exploração farmacológica dos metabólitos secundários de microalgas revelou uma importante fonte de novas substâncias, estimulando o uso de técnicas avançadas para a síntese e aplicação médica desses compostos (Tringali, 1997; Mayer e Hamann, 2005).

1. Dinoflagelados

As toxinas de dinoflagelados são em geral compostos não protéicos e de baixo peso molecular (250-3500 Da), apresentando estruturas químicas, solubilidade e modos de ação bem diferenciados. Podem ser hidro ou lipofílicas, termolábeis ou não, sendo algumas altamente estáveis (Gasthwaite, 2000).

Um dos principais metabólitos produzidos por dinoflagelados é a saxitoxina ($C_{10}H_{17}N_7O_4$) e seus derivados, que estão envolvidos nas intoxicações paralisantes (PSP). São toxinas termoestáveis, hidrossolúveis e de alta neurotoxicidade (Shimizu, 1987), podendo ser encontradas em dinoflagelados do gênero *Alexandrium* e outros.

As brevetoxinas (BTX-2, $C_{50}H_{70}O_{14}$, BTX-9, $C_{50}H_{74}O_{14}$), produzidas principalmente pelo dinoflagelado *Gymnodinium breve*, provocam intoxicações do tipo neurotóxicas (NSP). Estão envolvidas moléculas cíclicas lipossolúveis contendo vários grupamentos éteres (Nakanish, 1985).

Nas intoxicações do tipo diarréicas (DSP) podem estar envolvidos o ácido ocadáico ($C_{44}H_{68}NO_{13}$), as dinofisistoxinas, yessotoxina ($C_{55}H_{80}O_{21}S_2Na_2$) e pectenotoxinas, que apresentam estrutura molecular geral do tipo poliéter, com oxigênio e sem átomos de nitrogênio, são termo-estáveis e insolúveis em água. Os dinoflagelados que causam este tipo de intoxicação são dos gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum* (Murata *et al.*, 1982, 1986, 1987).

A ciguatoxina ($C_{60}H_{86}O_{19}$), maitotoxina ($C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$), palitoxina ($C_{129}H_{223}N_3O_{54}$) e o ácido ocadáico estão envolvidos na intoxicação ciguaterica, onde estão presentes os dinoflagelados *Gambierdiscus toxicus* e outros do gênero *Prorocentrum* (Yasumoto e Murata, 1993).

1.1. Substância bioativas

Muitas vezes, uma substância apresenta uma atividade biológica que não necessariamente a caracteriza como venenosa. Nesse caso, podemos usar o termo 'molécula bioativa', que é uma expressão de uso comum que incluem substâncias que podem afetar processos celulares em baixas concentrações, de forma benéfica ou nociva. No caso das ficotoxinas, essas são caracterizadas pela sua capacidade de ação ($\mu\text{g toxin kg}^{-1}$) e sua especificidade de ação (canais iônicos em membranas) (Skulberg, 2000).

Os dinoflagelados foram os primeiros microorganismos reconhecidos como fonte primária de certos metabólitos, como as toxinas de mariscos. Essas substâncias têm alta afinidade por um sítio específico de um receptor. A saxitoxina produzida pelo gênero *Alexandrium*, por exemplo, e todos os seus derivados (21 formas descritas) bloqueiam a transmissão neural pela ligação ao canal de sódio dependente de voltagem, causando inibição do fluxo de íons Na^+ e impedindo as células nervosas de produzirem potenciais de ação (Steidinger, 1983; Kulagina *et al.*, 2004). Outra toxina, conhecida como ácido ocadáico, produzida por espécies pertencentes aos gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum*, inibe proteínas fosfatases que regulam várias funções celulares, como o ciclo da divisão celular, o metabolismo de fosfato, os níveis de enzimas intracelulares e funções da musculatura lisa (Vieytes *et al.*, 1997).

1.2. Potencial para aplicação

O potencial para aplicação de substâncias produzidas por dinoflagelados está diretamente relacionado à diversidade de atividades biológicas apresentadas por esses compostos. O bloqueio de receptores nicotínicos por borbotoxina (Tem-Hage *et al.*, 2002), atividade antifúngica e hemolítica por anfidinolídeos (Echigoya *et al.*, 2002), citotoxicidade contra células de tumor de colon humano por carobenolideo-1 (Kobayashi e Ishibashi, 1997) são alguns exemplos da variedade de compostos e modos de ação que podemos encontrar.

Muitas vezes uma única substância apresenta diversas linhas de pesquisa. A brevetoxina tem estudos sobre métodos de determinação e quantificação (Truman *et al.*, 2005), caracterização do sítio de ligação em ratos e peixes (Dechraoui *et al.*, 2006) e metabolismo e eliminação de brevetoxina em ostras (Plakas *et al.*, 2004).

Outros compostos já tem definido o seu potencial de aplicação, como é o caso do ácido ocadáico útil para entender vários processos celulares (Fernandez *et al.*, 2002), modelo para analisar efeitos terapêuticos de drogas anti-psicóticas (He *et al.*, 2005) e utilizado em estudos anti-tumorais devido a sua atividade como inibidor de proteína fosfatase 2A (Liu e Sidell, 2005).

A pectenotoxina é candidata a agente quimioterápico (Chae *et al.*, 2005) enquanto a maitotoxina é estimulante da síntese e secreção do fator de crescimento (Obara *et al.*, 1999). Em alguns casos, estudos com compostos de dinoflagelados alcançam níveis de patente (Tabela 1).

Tabela 1. Algumas patentes relacionadas a dinoflagelados tóxicos e/ou suas biotoxinas (modificado de Camacho *et al.*, 2007)

TÍTULO	REFERÊNCIA	ANO
Biomarcadores de alga tóxica	US 7,109,297	2006
Cigua-dart método para detecção de toxinas ciguatericas	US 7,015,045	2006
Toxina hidro solúvel produzida por espécies de <i>Pfiesteria</i>	US 2006/0111557	2006
Uso de bloqueadores de canais de sódio e seus análogos para o tratamento de dependência em nicotina	WO 2006/084765	2006
Derivados da brevetoxina para o tratamento de fibrose cística, disfunção mucociliar e doenças pulmonares.	WO 2005/028482	2005

1.3. Aspectos moleculares

O conceito morfológico de espécie permite distinções morfológicas, incluindo ultra-estrutura. Em microalgas onde a plasticidade morfológica é relativamente comum, a biologia molecular entra como ferramenta de apoio para os estudos taxonômicos.

Classificações baseadas em morfologia têm entrado em conflito com as filogenias, o que tem gerado novas questões sobre a evolução dos dinoflagelados, que ainda são discutidas (Loeblich, 1976; Taylor, 1980; Fensome *et al.*, 1993).

A hipótese de dispersão global pode ser examinada usando análises moleculares das populações (Scholin *et al.*, 1994, Bolch *et al.*, 1998) assim como a biogeografia de espécies tóxicas e o esclarecimento das diferenças quanto à produção de compostos ativos. John *et al.* (2003) utilizou seqüências moleculares e registros fósseis para explicar a distribuição biogeográfica entre espécimes de *Alexandrium tamarense* e Tengs *et al.*, (2003) utilizou seqüências de DNA ribossomal para estudar diferenças fenotípicas de toxicidade.

Dependendo o objetivo, determinadas técnicas são mais utilizadas, como o uso de marcadores moleculares para estimar a variabilidade genética de uma população (Amos e Hoelzel, 1992) e a região ITS Para estudos de microdiversidade (inter e intra-específico) (Oliveira, 2001).

1.4. Saúde pública

O consumo de peixes ou mariscos contaminados por uma ou mais toxinas derivadas de microalgas tem sido responsabilizado por casos de intoxicação humana, com sintomas tais como diarreias, amnésias e paralisias, podendo nos casos graves levar à morte (Daranas *et al.*, 2001).

As principais espécies tóxicas são registradas entre os dinoflagelados, do gênero *Alexandrium*, *Dinophysis* e *Prorocentrum* e espécies como *Gymnodinium catenatum*. A lista de espécies tóxicas tem aumentado assim como a atividade humana na zona costeira.

Muitos países criaram programas de monitoramento para proteger a saúde pública, entretanto muitas áreas não apresentam controle, e vários casos de intoxicações humanas tem sido reportado. O comprometimento de áreas de maricultura (mexilhões e peixes), reservas naturais de alimentos e os riscos para a saúde humana levaram organizações internacionais a criar programas de estudos sobre fatores ecológicos e oceanográficos que controlam a distribuição e dinâmica de populações de microalgas tóxicas (GEOHAB, 2001).

O conhecimento gerado por esses programas levaram à criação de redes de monitoramento que levam em consideração observações ambientais, amostras de fitoplâncton, mariscos ou peixes, análise das amostras, avaliação e divulgação dos resultados e planos de ação.

No Brasil, apenas Santa Catarina, responsável por 95% da produção de ostras e mariscos do país, mantém um programa de monitoramento de algas e presença de toxinas na carne dos moluscos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, D.M. 1989. Toxic algal blooms and red tides: A global perspective. In: Red Tides: Biology environmental science and toxicology edited by T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto. Elsevier Science Publishing, New York. pp. 11-16.
- AMOS, B., HOELZEL, A.R. 1992. Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. *Biological Conservation* 61: 133-144.
- BOLCH, C.J.S., BLACKBURN, S.I., HALLEGRAEFF, G.M. AND VAILLANCOURT, R.E. 1998. Molecular genetic variation among different global populations of *Gymnodinium catenatum* revealed by PAPD-PCR. In: Harmful Halgae, edited by B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt. Sunta de Galicia Intergovernmental Oceanograph Commission of UNESCO pp. 283-286.
- CAMACHO, F.G., RODRÍGUEZ, J.G., MIRÓN, A.S., GARCÍA, M.C., BELARBI, E.H., CHISTI, Y., GRIMA, E.M. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol Adv* 25 (2): 176-94.
- CHAE, H.D., CHOI, T.S., KIM, B.M., JUNG, J.H., BANG, Y.J., SHIN, D.Y. 2005. Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors. *Oncogene*. 24(30): 4813-9.
- DARANAS, A.H., NORTE, M., FERNANDEZ, J.J. 2001. Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101-1132.
- DECHRAOUI, M.B., WACKSMAN, J.J., RAMSDELL, J.S. 2006. Species selective resistance of cardiac muscle voltage gated sodium channels: Characterization of brevetoxin and ciguatoxin binding sites in rats and fish. *Toxicon* 48 (6): 702-712.

- ECHIGOYA, R., RHODES, L., OSHIMA, Y., SATAKE, M, 2005. The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from *Amphidinium carterae* collected in New Zealand. *Harmful Algae* 4 (2): 383-389.
- ELBRÄCHTER, M. 2003. Dinophyte reproduction: progress and conflicts. *J Phycol* 39: 629-632.
- FAUST, M.A. 1990. Morphologic details of six benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrophyta) from a mangrove island, Twin Cays, Belize, Including two new species. *J Phycol* 26: 548-558.
- FENSOME, R.A., TAYLOR, F.J.R., NORRIS, G., SARJEANT, W.A.S., WHARTO, D.I., WILLIAMS, G.L. 1993. A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontology Special Publication número 7*. 351 p.
- FERNÁNDEZ, J.J., CANDENAS, M.L., SOUTO, M.L., TRUJILLO, M.M., NORTE, M. 2002 Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem*. 9(2): 229-62.
- FUWA, H., KAINUMA, N., SATAKEB, M., SASAKIB, M. 2003. Synthesis and biological evaluation of gambierol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 2519-2522.
- GARTHWAITE, I. 2000 Keeping shellfish safe to eat: a brief review of shellfish toxins, and methods for their detection. *Trends in Food Science and Technology* 11: 235-244.
- GEOHAB, 2001. Global ecology and Oceanography of Harmful algal blooms, Science Plan edited by P. Gilbert and G. Pitcher. SCOR and IOC, Baltimore and Paris. 87 p.
- HALLEGRAEFF, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32: 79-99.

- HALLEGRAEFF, G.M., STEFFENSEN, D.A., WETHERBEE, R. 1988. Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *Journal of Plankton Research* 10: 533-541.
- HE, J., YANG, Y., XU, H., ZHANG, X., LI, X.M. 2005. Olanzapine attenuates the okadaic acid-induced spatial memory impairment and hippocampal cell death in rats. *Neuropsychopharmacology* 30 (8):1511-20.
- HILGEMANN, D.W. 2003. From a pump to a pore: How palytoxin opens the Gates. *PNAS* 100 (2): 386-388.
- HOLLIGAN, P.M. 1985. Marine dinoflagellates blooms – growth strategies and environmental exploitation. In: *Toxic dinoflagellates* edited by D.M. Anderson, A.W. White and D.G. Baden. Elsevier, NY. pp. 133-139.
- JOHN, U., FENSOME, R.A., MEDLIN, L.K. 2003. The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* “species complex” (Dinophyceae). *Molec Biol Evol* 20: 1015-1027.
- KOBAYASHY, J., ISHIBASHI, M. 1997. Amphidinolides: unique macrolides from marine dinoflagellates. *Heterocycles* 44: 543-572.
- KULAGINA, N.V., O'SHAUGHNESSY, T.J., MA, W., RAMSDELL, J.S., PANCRAZIO, J.J. 2004. Pharmacological effects of the marine toxins, brevetoxin and saxitoxin, on murine frontal cortex neuronal networks. *Toxicon* 44(6): 669-676.
- LIU, J., SIDELL, N. 2005. Anti-estrogenic effects of conjugated linoleic acid through modulation of estrogen receptor phosphorylation. *Breast Cancer Res Treat.* 94 (2): 161-9.
- LOEBLICH, A.R. 1976. Dinoflagellate evolution: speculation and evidence. *J Protozool* 23:13-28.

- MACLEAN, J.L. 1989. Indo-Pacific red tide, 1985-1988. *Marine Pollution Bulletin* 20: 304-310.
- MAYER, A.S., M.T. HAMANN. 2005. Marine Pharmacology in 2001-2002: compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Toxicology and Pharmacology*. 140(3-4): 265-86.
- MONCHEVA, S., GOTSIS-SKRETAS, O., PAGOU, K., KRASTEVA, A. 2001. Phytoplankton blooms in Black Sea and Mediterranean Coastal ecosystems subjected to anthropogenic eutrophication: Similarities and Differences. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 53: 281-295.
- MURATA, M., KUMAGAI, M., LEE, J.S., YASUMOTO, T., 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett* 28: 5869-5872.
- MURATA, M., SANO, M., IWASHITA, T., NAOKI, H., YASUMOTO, T. 1986. The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agric Biol Chem* 50: 2693-2695.
- MURATA, M., SHIMATANI, M., SUGITANI, H., OSHIMA, U., YASUMOTO, T., 1982. Isolation and structure elucidation of the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 43: 549-552.
- NAKANISH, K. 1985. The chemistry of brevetoxins: a review. *Toxicon* 23 (3): 473-479.

- OBARA, Y., TAKAHASHI, M., NAKAHATA, N., OHIZUMI, Y. 1999 Maitotoxin-induced nerve growth factor production accompanied by the activation of a voltage-insensitive Ca²⁺ channel in C6-BU-1 glioma cells. *Br J Pharmacol* 127 (7): 1577-82.
- OLIVEIRA, M. C. 2001. Estudios de la macro y micro biodiversidad de las algas. Secuenciamiento del DNA ribosomal (rDNA). In: *Sustentabilidad de la Biodiversidad, un Problema Actual. Bases Científico-Técnicas, Teorizaciones Y Proyecciones* organizado por K. Alveal y T. Antezana T. Concepción: Universidad de Concepción. pp. 85-96.
- PIANKA, E. R. 1974. *Evolutionary Ecology*. Harper and Row Publishers, New York, 356 p.
- SCHOLIN, C.A., HERZOG, M., SOGIN, M., ANDERSON, M.D. 1994. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) species: II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *J Phycol* 30: 999-1011.
- SHIMIZY, Y. 1987. Dinoflagellates toxins. In: *The biology of dinoflagellates*, edited by F.J.R. Taylor, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 282-315.
- SKULBERG, O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *J Appl Phycol* 12: 341-348.
- STEIDINGER, K. A 1983. A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. In: *Progress in Phycological Research* edited by F.E. Round and D.J. Chapman. Elsevier, Amsterdam. 2: 147-188.
- STEVEN, M., PLAKAS, Z. W., KATHLEEN, R. EL SAID, EDWARD, L.E. 2004. Brevetoxin metabolism and elimination in the Eastern oyster (*Crassostrea*

virginica) after controlled exposures to *Karenia brevis*
Toxicon 44 (6): 677-685.

TAYLOR, F.J.R. 1980. On dinoflagellate evolution. BioSystems 13: 65-108.

TENGS, T. BOWERS, A.H. GLASGOW JR, H.B. BURKHOLDER, J.M. OLDACH, D.
2003. Identical ribosomal DNA sequence data from *Pfiesteria piscida*
(Dinophyceae) isolates with different toxicity phenotypes. Environ Res 93: 88-
91.

TEN-HAGE, L., ROBILLOT, C., TURQUET, J., LE GALL, F., LE CAER, J.P.,
BULTEL, V., GUYOT, M., MOLGÓ, J. 2002. Effects of toxic extracts and purified
borbotoxins from *Prorocentrum borbonicum* (Dinophyceae) on vertebrate
neuromuscular junctions. Toxicon. 40(2):137-48.

TRINGALI, C. 1997. Bioactive metabolites from marine algae: recent results. Curr
Org Chem 1: 175-394.

TRUMAN, P., KEYZERS, R. A., NORTHCOTE, P. T. 2005. Lipophilic toxicity from
the marine dinoflagellate *Karenia brevisulcata*: use of the brevetoxin
neuroblastoma assay to assess toxin presence and concentration. Toxicon 46
(4): 441-445.

VIEYTES, M.R., FONTAL, O.I., LEIRA, F., BAPTISTA, J.M.V., BOTANA, L.M. 1997.
A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. Anal Biochem 258:
258-264.

WALKER, L.M. 1984. Life histories, dispersal, and survival in marine, planktonic
dinoflagellates. In: Marine Plankton Cycle Strategies, edited by K.A. Steindinger
and L.M. Walker. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 19-34.

YASSUMOTO, T., MURATA, M. 1993. Marine toxins. Chem Rev 93: 1897-1909.

RESUMO

Dinoflagelados foram os primeiros microorganismos reconhecidos como fonte primária de certos metabólitos, também conhecidos como ficotoxinas. Em geral são compostos não protéicos, de baixo peso molecular (250-3500 Da), apresentam estruturas químicas e modos de ação bem diferenciados. Envolvidos em florações, mortandade de peixes e intoxicações de seres humanos, devido ao consumo de mariscos contaminados, tornaram alvo de diversas pesquisas.

Atividade antifúngica, hemolítica e citotoxicidade contra células tumorais são alguns exemplos da variedade de compostos e modos de ação que podemos encontrar. Como exemplo do potencial de aplicação, a pectenotoxina é candidata a agente quimioterápico e a maitotoxina é um estimulante da síntese e secreção do fator de crescimento. Em alguns casos, estudos com compostos de dinoflagelados alcançam níveis de patente.

O risco à saúde pública e as perdas econômicas causadas pelas florações levaram ao estudo do ciclo de vida e interações ecológicas, taxonomia e aspectos moleculares das microalgas envolvidas nesses eventos. Também levou a criação de programas de monitoramento que levam em consideração observações ambientais, amostras de fitoplâncton, mariscos ou peixes, análise das amostras, avaliação e divulgação dos resultados e planos de ação em caso de eventos tóxicos.

Considerando os estudos já realizados com dinoflagelados, estudamos algumas espécies isoladas do litoral norte do Estado de São Paulo sob aspectos biológicos, moleculares, químicos e monitoramento.

A abordagem biológica revelou a presença de compostos capazes de inibir a proliferação celular e de alterar de alguma forma o citoesqueleto das células tumorais T47D nos extratos polares de *A. fraterculus*, *P. gracile* e *P. mexicanum*.

Observamos também um possível potencial genotóxico das espécies *A. fraterculus* e *P. gracile*.

Os aspectos moleculares, biológicos e químicos foram utilizados como ferramenta para o estudo de uma espécie de *Ostreopsis* cf *ovata*. A biologia molecular associada a morfologia nos levou a identificar duas cepas, mostrando que são geneticamente idênticas entre si e entre os espécimes isolados do Rio de Janeiro e Mediterrâneo e diferente daqueles de origem asiática, contribuindo para a compreensão da taxonomia, biogeografia e filogenia deste gênero.

Ambas as cepas mostraram atividade hemolítica, mas as frações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência não tiveram a hemólise inibida por ouabaína. A análise por espectrometria de massa também não foi conclusiva devido à falta de padrão da toxina estudada. Portanto, sugerimos que os compostos hemolíticos presentes nas amostras sejam distintos da palitoxina e de seus análogos. No entanto, analisando os cromatogramas de espectrometria de massa, verificamos que a atividade biológica encontrada para as nossas amostras estão relacionadas a um conjunto de compostos.

O programa de monitoramento piloto na maricultura da Praia da Cocanha em Caraguatatuba, litoral Norte do Estado de São Paulo foi realizado durante um ano. As análises de toxinas paralisantes (PSP) em bioensaios com camundongos e espectrometria de massa não detectaram toxinas nos mexilhões em concentrações que poderiam provocar intoxicação ao homem. Mas confirmamos o alerta quanto à presença de espécies potencialmente tóxicas no ambiente durante o período de estudo.

Os aspectos abordados mostram como os compostos produzidos por dinoflagelados podem interferir de alguma forma na vida humana. Por um lado

encontramos as finalidades farmacológicas na busca de novas drogas por outro o risco à saúde através do consumo de mariscos contaminados. Em ambos os casos, a continuidade das pesquisas trará muitos benefícios ao Homem.

ABSTRACT

Dinoflagellates were the first microorganisms recognized as a primary source of certain metabolites, also known as phycotoxins. In general, compounds are non proteic, with low molecular weight (250-3500 Da), and have different chemical structures and modes of action. Frequently involved in algal blooms, killing fish and poisoning of humans due to consumption of contaminated seafood, they became the target of several researchers.

Antifungal, hemolytic and cytotoxic activities against tumor cells are representative of the variety and modes of action that can be found. As examples of potential applications, the pectenotoxin is considered promising candidate for cancer chemotherapy; and the maitotoxin is described as stimulant of the synthesis and secretion of growth factor. In some cases, dinoflagellates compounds reached patent levels.

The need to protect human health and fisheries industry led to studies of life cycle, ecologic interactions and taxonomic and molecular aspects of microalgae involved in harmful blooms. These events led to the establishment of monitoring programs to detect phytotoxins and toxic microalgae in mariculture farms worldwide.

Based on researches carried out with others dinoflagellate, we studied some species isolated in the North coast of the state of São Paulo, on biological, molecular, chemical and monitoring aspects.

Biologic assays indicated the presence of compounds in the dinoflagellates extracts that are able to inhibit cell proliferation and to induce changes in T47D cells cytoskeleton. We suggest a genotoxic potential for the compounds in the polar extracts of *A. fraterculus* and *P. gracile*.

Biologic, molecular and chemical aspects were used to study two strains of *Ostreopsis cf ovata*. Molecular biology showed that both are genetically identical to *O. ovata* isolated from the Mediterranean Sea and Rio de Janeiro, but different from *O. ovata* collected in Asian waters. This result allowed a better understanding of genetic diversity and the recognition of more reliable (stable) morphological characters.

Using mouse erythrocytes assay, hemolytic activity was detected in both strains of *O. cf ovata*. However, the hemolytic component was not inhibited by ouabain. Analyses by mass spectrometry of polar extract were inconclusive due to the lack of toxins standards. Therefore, we suggest that the compounds in the samples are distinct from palytoxin. Mass spectrometry results indicate that the biological activity of our samples can be related to several substances.

The monitoring program in the mussel farm at Cocanha Beach, Caraguatatuba, was carried during one year. Mouse bioassays for paralytic shellfish poisoning toxins (PSP) performed in mussels showed that concentrations were below regulatory levels for human consumption. These low levels of PSPs were also confirmed by mass spectrometry. However, potentially toxic species were detected, and a long-term monitoring program is proposed and highly recommended.

Research shows that compounds produced by dinoflagellates can interfere in human life both in positive and negative ways. On one side is the search for new drugs for pharmacological purposes; on the other hand the health risk represented by the consumption of contaminated seafood. In both cases, the continuity of the research will bring many benefits to humans.

CONCLUSÃO

O fitoplâncton tem uma função fundamental na produção de oxigênio nos oceanos que ocupam cerca de três quartos da superfície do Planeta e constitui o primeiro e quantitativamente mais importante dos elos da cadeia biológica dos mares e oceanos. Entre os principais grupos que compõem o fitoplâncton estão os dinoflagelados que em determinadas situações se proliferam dando origem as florações ou 'marés vermelhas'.

São conhecidas pelo menos 90 espécies de microalgas marinhas produtoras de toxinas, dessas 70 são dinoflagelados (<http://ioc.unesco.org/hab/data.htm>). Além das toxinas, dinoflagelados produzem compostos com ampla variação de atividade biológica incluindo atividade citotóxica, antifúngica, antitumor, antibiótica, imunossupressora e neurotóxica.

Levando em consideração a produção de metabólitos secundários de ampla diversidade de atividade biológica, iniciamos o estudo sobre alguns dinoflagelados da costa brasileira. Para isso, adotamos estratégias de estudos com aspectos biológicos, moleculares, químicos e monitoramento.

A abordagem biológica revelou o modo de ação de extratos polares de dinoflagelados em linhagem de células de tumor de mama humano. Verificamos que os extratos de *A. fraterculus*, *P. gracile* e *P. mexicanum* apresentam compostos capazes de inibir a proliferação celular e de alterar de alguma forma o citoesqueleto das células tumorais T47D. A literatura descreve substâncias como ácido ocadáico e maitotoxina com modos de ação similares ao que encontramos. A observação de micronúcleos nas células tratadas com extrato de *A. fraterculus* e *P. gracile* e células hipodiplóides, mostram um efeito sobre os cromossomos o que leva ao processo de morte celular. O isolamento e identificação desses compostos podem

gerar boas ferramentas para estudo de processos celulares de linhagens tumorais e até mesmo o uso terapêutico dessas substâncias.

Os aspectos moleculares e químicos foram utilizados como ferramenta para o estudo de uma espécie de *Ostreopsis* cf *ovata* do litoral norte do estado de São Paulo. A biologia molecular associada a morfologia nos levou a identificar as duas cepas estudadas, mostrando que são geneticamente idênticas entre si e entre os espécimes isolados do Rio de Janeiro e Mediterrâneo. Esse grupo de *Ostreopsis ovata* se mostrou diferente daqueles de origem asiática. Esses dados, apesar de serem pontuais, contribuem para a compreensão da taxonomia, biogeografia e filogenia de um gênero de microalga ainda pouco estudado.

A identificação molecular e a relação com espécies de outras regiões contribuem também para os estudos relacionados à síntese de toxinas e os fatores que desencadeariam essa produção.

Sabendo que o gênero *Ostreopsis* está associado à produção de palitoxina e análogos e essas toxinas são compostos hemolíticos, estudamos a espécie *O. cf ovata* isolada de São Paulo sob aspectos biológicos e químicos. Ambas as cepas mostraram atividade hemolítica, mas as frações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência não tiveram a hemólise inibida por ouabaína. Se nos limitássemos aos aspectos biológicos, os resultados mostrariam a ausência de palitoxina nas nossas amostras. A análise por espectrometria de massa também não foi conclusiva devido à falta de padrão da toxina estudada. Portanto, nossos dados sugerem sugerem que compostos hemolíticos presentes nas amostras sejam distintos da palitoxina e de seus análogos. No entanto, analisando os cromatogramas de espectrometria de massa, verificamos que a atividade biológica encontrada para as nossas amostras estão relacionadas a um conjunto de compostos.

Análises utilizando padrão de toxina para os ensaios biológicos e analíticos poderiam confirmar a presença de palitoxina e sua relação com a atividade hemolítica do extrato polar do dinoflagelado *O. cf ovata* do litoral de São Paulo.

As ficotoxinas produzidas por dinoflagelados podem ser acumuladas por organismos filtradores. Algumas estão associadas à intoxicação humana através do consumo de mariscos ou peixes contaminados, representando um grave problema sanitário e econômico que afeta tanto países industrializados como países em desenvolvimento. Portanto, realizamos um programa de monitoramento piloto durante um ano na maricultura da Praia da Cocanha em Caraguatatuba, litoral Norte do Estado de São Paulo.

As análises de toxinas paralisantes (PSP) em bioensaios com camundongos e espectrometria de massa não detectaram toxinas nos mexilhões em concentrações que poderiam provocar intoxicação ao homem. Mas confirmamos o alerta quanto à presença de espécies potencialmente tóxicas no ambiente durante o período de estudo. A ausência de eventos tóxicos por anos consecutivos não cria um ambiente livre deles, mostrando que somente um programa contínuo de monitoramento poderia garantir a comercialização dos mexilhões e proteger a saúde pública e os recursos pesqueiros,

Este trabalho é um estudo sobre algumas espécies de dinoflagelados do litoral do Estado de São Paulo. Os aspectos estudados mostram como os compostos produzidos por dinoflagelados podem interferir de alguma forma na vida humana. Por um lado encontramos as finalidades farmacológicas na busca de novas drogas por outro o risco à saúde através do consumo de mariscos contaminados. Em ambos os casos, a continuidade das pesquisas trará muitos benefícios ao Homem.