JEANETE LOPES NAVES

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

São Paulo

2008

JEANETE LOPES NAVES

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

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia.

Orientador: Prof. José Carlos de
Freitas

São Paulo

2008

Naves, Jeanete Lopes
N 323e Estudos sobre dinoflagelados isolados do litoral Norte
do estado de São Paulo: monitoramento, aspectos
moleculares,
biológicos e químicos / Jeanete Lopes Naves . -- São Paulo :
J. L. N., 2008.
p. 120: il.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia,
2008.

1. Dinoflagelados - Monitoramento 2. Biologia
molecular 3. Atividade antiproliferativa 4. HPLC
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Fisiologia. II. Título.

LC QK 569.D56

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. José Carlos de Freitas

Orientador

*Aos meus pais e minha querida avó
com muito carinho*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Carlos de Freitas pela confiança e orientação.

À Prof. Dra. Maria Célia Villac pela amizade e boa companhia durante as viagens a campo; por ceder as cepas de *Ostreopsis*, pelas análises morfológicas e discussões essenciais para a finalização deste trabalho.

Ao Dr. Santiago Fraga por ceder gentilmente as fotos de *Ostreopsis* e colaborar com as análises morfológicas.

À Prof. Dra Mariana Cabral de Oliveira pela colaboração nos trabalhos de biologia molecular.

À Prof. Dra Gláucia Machado-Santelli pela colaboração nos trabalhos com células tumorais.

Ao Prof. Dr. Marcio Custódio pelas dicas durante os trabalhos.

Ao Dr. Katsuhiro Konno e Clécio F. Klitzke pelas análises de espectrometria de massa.

À Prof. Dra. Célia Sant'Anna do Instituto de Botânica pela colaboração na organização do workshop.

À Dra Luciana Retz pela amizade e dicas sobre os ensaios analíticos.

À Dra. Marisa Rangel pela amizade, compreensão, colaboração e valiosas dicas em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier pelas facilidades concedidas.

À Dra. Marisa Paula Prado pela amizade e ajuda na realização dos experimentos.

À Claudia Lamparelli da CETESB e Thatiana Pinto pelas análises das amostras de água e fitoplâncton da maricultura.

Ao Prof. Dr. Joacir Stolarz de Oliveira e Dr. André Junqueira Zaharenko pela amizade e colaboração no uso do HPLC.

Aos colegas do Instituto de Ciências Biológicas e do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo pela amizade e ajuda na realização dos experimentos.

Aos colegas e amigos de laboratório pela amizade, apoio e colaboração em vários momentos e pela companhia: Bruno Stranghetti, Bruno Ramos, Cíntia Ila, Enrique Rozas Sanchez, Evelyn Zanini, Lucilia Miranda, Renata Aoki, Wilson Ferreira Junior.

Aos técnicos Vagner Alberto, Enio Matos, Manoel Ferreira Brito e Roberto (ICB) pela ajuda com os animais e microscopia.

Ao pessoal da secretaria de Pós-graduação do IB Vera Lúcia Barboza, Helder Rossi Santos Souza, Érika Takamoto de Camargo pela constante atenção e apoio durante este período.

À Secretária do departamento de Fisiologia do IB nas pessoas Roseli Silva Santos e Gisele Ortolí pela eficiência e ajuda em todos os momentos.

Ao Eduardo Kishimoto da Seção de Tesouraria pela amizade e pelas facilidades concedidas.

Ao Centro de Toxinologia Aplicada (CAT/CEPID)

Ao Instituto de Pesca de Santos e à Dra Naoyo e Ana Ligia Mantovani pela colaboração e manutenção dos cultivos.

A todos da 'Associação de Maricultores da Praia da Cocanha' com especial atenção ao José Luiz Alves que participou, ajudou e colaborou muitíssimo de todas as coletas do monitoramento.

A CAPES, PROAP e Pró-reitoria de Pós-graduação pelo apoio financeiro.

À Wilson Mota pelo companheirismo na etapa final disso tudo...

À amiga Andréa Natali pela linda e carinhosa amizade

À amiga Cynthia Delboni pela super amizade de TODAS as horas, por fazer parte da história antiga e da que está começando a ser escrita, pela companhia nos trópicos e na Antártica e pelo empréstimo do seu ombro amigo durante todas as etapas desse trabalho!

Aos amigos que encontrei e desencontrei por terem compartilhado momentos inesquecíveis.

Aos meus pais, minha avozinha linda, meus irmãos e minha lindíssima sobrinha, meus agradecimentos especiais pela compreensão nas horas mais difíceis, pela confiança e companheirismo e por toda a força e apoio que me foram dados. Agradeço pelo carinho que sempre me receberam nas 'voltas para casa' e pela compreensão pela minha ausência durante momentos tão importantes!

MUITO OBRIGADA A TODOS!!!!

Í N D I C E

Introdução	_____	01
Capítulo 1.	Ação antiproliferativa dos extratos de dinoflagelados em células tumorais de mama humana T47D. _____	14
Capítulo 2.	Biologia Molecular como ferramenta para identificação de uma espécie de dinoflagelado do gênero <i>Ostreopsis</i> _____	36
Capítulo 3.	Compostos com atividade hemolítica _____	67
Capítulo 4.	Monitoramento piloto de mexilhões e fitoplâncton da fazenda de maricultura da Praia da Cocanha, Caraguatatuba _____	91
Conclusão	_____	115
Resumo	_____	118
Abstract	_____	120

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 diarreicas (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 ($\mu g \text{ toxin kg}^{-1}$) 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., KRASTEV, 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 Ca^{2+} 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: recents 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 diarrheic shellfish toxins. Anal Biochem 258:
258-264.

WALKER, L.M. 1984. Life histories, dispersal, and survival in mrine, 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.

AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DOS EXTRATOS DE DINOFLAGELADOS EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA HUMANA T47D

ABSTRACT

The ability of natural products to manipulate actin filament structure may provide a valuable strategy to compensate, or partially reverse, some of the changes to the cytoskeleton in tumor cells. The malfunctioning caused by abnormal actin regulatory protein levels or activities, may help to control the cancer cell proliferation.

The search for substances able to alter the tumor cells proliferation or to affect the actin cytoskeleton was achieved also with marine natural products. In this case, toxins or secondary metabolites produced by microalgae are considered promising candidates for cancer chemotherapy.

To further contribute with these studies, we analyzed the antiproliferative activity in *A. fraterculus*, *P. gracile* *P. mexicanum* extracts, and their mechanism of action (cytoskeleton alterations and cell DNA quantification), using bioassay with T47D human breast cancer cells in culture.

Our results indicated the presence of compounds in the dinoflagellates extracts that are able to inhibit cell proliferation and to induce changes on the cytoskeleton of T47D cells. We suggest a genotoxic potential for the compounds in the polar extracts of *A. fraterculus* e *P. gracile* , as describe in other studies with dinoflagellate toxins.

RESUMO

Alguns produtos naturais apresentam capacidade de agirem sobre os filamentos de actina, o que pode fornecer uma valiosa estratégia para reverter/compensar algumas mudanças do citoesqueleto em células tumorais. A desregulação das atividades ou dos níveis de proteínas regulatórias dessas células promove o controle da proliferação do câncer.

A busca por substâncias que possam alterar de alguma forma a proliferação celular (células tumorais) ou que atuem de alguma forma no citoesqueleto, tem sido realizada também entre os produtos naturais marinhos. Nesse caso, toxinas ou metabólitos secundários produzidos por microalgas têm tido seu potencial reconhecido para o tratamento de câncer.

Com o objetivo de contribuir para tais estudos, esse trabalho avaliou a presença de substâncias com atividade antiproliferativa nos extratos de *A. fraterculus*, *P. gracile* *P. mexicanum* e seu mecanismo de ação no citoesqueleto e quantificação celular, utilizando células de tumor de mama humano.

Observamos nos extratos a presença de compostos capazes de inibir a proliferação celular e de alterar de alguma forma o citoesqueleto das células T47D. Sugerimos ainda um potencial genotóxico das substâncias presentes nos extratos polares de *A. fraterculus* e *P. gracile*.

INTRODUÇÃO

Estudos têm observado a biologia de células de câncer e como os microfilamentos de actina e componentes do citoesqueleto influenciam nos mecanismos celulares, locomoção e transformação neoplásica. Mostram ainda como mudanças no citoesqueleto, induzidas por drogas anti-câncer, podem influenciar significativamente no mecanismo celular e no estado da doença (Suresh, 2007). Evidências têm mostrado que o citoesqueleto de actina tem uma função fundamental nas propriedades de células tumorais. Como no caso da alteração da organização do citoesqueleto como resultado do aumento da quantidade ou atividade de proteínas reguladoras (Janmey e Chaponnier, 1995; Lambrechts *et al.*, 2004)

Além das proteínas reguladoras, pequenas moléculas de produtos naturais também apresentam capacidade de alterar o estado polimérico dos filamentos de actina (Spector *et al.*, 1999; Fenteany e Zhu, 2003). Esses compostos têm alta afinidade e efeito na dinâmica e na motilidade celular e estão sendo considerados como promissores candidatos para o tratamento de câncer. (Spector *et al.*, 1999; Giganti e Friederich, 2003; Fenteany e Zhu, 2003).

Dessa forma, a capacidade de alguns produtos naturais agirem sobre os filamentos de actina, pode fornecer uma valiosa estratégia para compensar ou reverter parcialmente, algumas das mudanças do citoesqueleto em células malignas, criadas pela desregulação das atividades ou níveis de proteínas regulatórias, promovendo o controle da proliferação do câncer (Allingham *et al.*, 2006).

Com esse conhecimento, a busca por substâncias que possam alterar de alguma forma a proliferação celular (células tumorais) ou que atuem no citoesqueleto, tem sido realizada também entre os produtos naturais marinhos (Gala *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007). Nos últimos anos, o aumento de pesquisas com

substâncias marinhas relacionadas à atividade antitumoral cresceu de tal forma que Mayer e Gustafson (2006) fizeram uma revisão onde mostram 150 produtos naturais marinhos com propriedades citotóxicas ou antitumorais, e com estrutura química estabelecida.

Microalgas envolvidas em florações tóxicas produzem uma variedade de toxinas como as ciguatoxinas, maitotoxina, ácido ocadáico, palitoxina entre outras. A capacidade destas toxinas em interferir na dinâmica do citoesqueleto permitiu a elas ter uma importante função como ferramentas para estudos bioquímicos, e mais recentemente tiveram reconhecido seu potencial no tratamento de câncer (Berven *et al.*, 2001, Leira *et al.*, 2002; Giganti e Friederich, 2003; Ares *et al.*, 2005)

Algumas ficotoxinas estão envolvidas em envenenamentos que provocam distúrbios gastrointestinais. Segundo Fasano (2002), toxicidade gastrointestinal está associada a diferentes mecanismos de ação dos agentes tóxicos como o bloqueio da síntese protéica ou modificação da dinâmica no citoesqueleto. Essas informações levaram a estudos como os de Ares *et al.* (2005), que verificaram que toxinas como a maitotoxina, palitoxina e ostreotoxina-D (envolvidas em envenenamento diarréico) são potentes compostos naturais despolimerizadores de actina em células intestinais isoladas de coelho.

Estudos para determinar o modo de ação do Azaspiracídeo (AZA), poliéter sintetizado pelo dinoflagelado *Protoperidinium crassipes* (James *et al.*, 2003) mostraram que AZA-1 reduz quantidade celular de actina-F de forma não apoptótica seguido de elevação de cálcio e do nível de AMPc em uma combinação de células de neuroblastoma e linfócitos humanos (Roman *et al.*, 2002).

As pectenotoxinas, poliéteres encontrados em dinoflagelados do gênero *Dinophysis*, apresentam potente citotoxicidade causando apoptose e uma variedade

de outras respostas como efeitos em microtúbulos e actina (Aune *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1994. Essas atividades têm levado a estudos sobre os efeitos de PTXs em tumores e linhagem de células de câncer (Jung *et al.*, 1995, Chae *et al.*, 2005).

OBJETIVO

Avaliar a presença de substâncias com atividade anti-proliferativa nos extratos de *Prorocentrum mexicanum*, *Prorocentrum gracile*, *Alexandrium fraterculus* contra células de tumores de mama humana, avaliando também aspectos de seu mecanismo de ação, como atuação sobre proteínas do citoesqueleto e quantificação do DNA nuclear.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Preparação do extrato

As células de dinoflagelados foram concentradas por filtração em filtro de fibra de vidro (GF/C) e homogeneizadas em metanol 80%, seguido de sonicação para a ruptura das células (80% da potência x 15 minutos). Após esse processo, o material foi centrifugado (5000rpm x 15 minutos), e o sobrenadante filtrado em filtro Millipore 0,45 µm para garantir que nenhuma fibra ou teca contaminasse o extrato. Uma segunda extração foi realizada para assegurar melhor rendimento. O metanol destas duas extrações foi seco em rotaevaporador (60°C) e em seguida foi efetuada partição diclorometano/água (3:1), para separar as frações polares e apolares (modificado de Grzebyk *et al.*, 1997). O diclorometano foi seco por evaporação espontânea em baixa temperatura (-20°C), enquanto que a fração aquosa foi liofilizada.

2. Testes de viabilidade celular com células tumorais da linhagem T47D

Para a realização deste teste, células de tumor de mama humano da linhagem T47D foram semeadas com meio normal (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino (Cultilab) em placas para cultura celular com 96 poços, a uma densidade inicial de 5×10^4 células por poço, e incubadas em estufa a 37 °C com alta umidade relativa e 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, o meio foi removido e foram adicionados 100 µl de meio com os extratos diluídos em concentrações de 1,97 até 0,039 mg/mL. Foram realizados triplicatas de cada concentração de extrato e de seus respectivos controles.

Após 48 horas de incubação, o meio com o extrato foi retirado, cada poço foi lavado com PBS e substituído por meio normal e os controles por água. Adicionamos 20 µl do kit MTS (método colorimétrico que determina o numero de células viáveis, que pode ser mensurada no espectrofotômetro) e após uma hora realizamos a leitura em leitor de ELISA a 570 nm.

3. Imunofluorescência para tubulina e coloração para actina e núcleo

As células foram semeadas com meio normal (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino em placas de 35 mm de diâmetro, contendo uma lamínula. A densidade inicial foi de 5×10^4 células por placa e foram incubadas em estufa a 37°C com alta umidade relativa e 5 % de CO₂ por 24 horas. Após esse período, o meio normal foi substituído por meio contendo os extratos com concentrações entre 1,0 e 0,1 mg/ mL e as células foram incubadas por 48 horas. Ao final do tratamento, as preparações em lamínulas foram lavadas em PBS e fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos. Após 3 lavagens em PBS, as células foram submetidas à permeabilização em Triton X-100 a 0,5% por 20 minutos. Após lavar novamente as

lamínulas com PBS (3x, 5 min), foram adicionados 5 µl de um mix de anticorpos primários para α e β-tubulina (Sigma) e as lamínulas foram cobertas com Parafilm® e incubadas em câmara úmida e escura por 24 horas.

Em seguida, as células foram lavadas (3x, 5 min) em PBS, foram adicionados 7 µl de anticorpo secundário Cy-5 e as lamínulas foram com cobertas com Parafilm® e incubadas em câmara úmida e escura por 1h30min. Mais uma vez as lamínulas foram lavadas e acrescentados 8 µl de falodina-FICT, para a coloração dos filamentos de actina. Após incubação de 30 min em câmara escura úmida, as lamínulas foram lavadas (3x, 5 min) e tratadas com RNAase (10mg/mL) por 15 min. Mais uma vez as lamínulas foram lavadas e as células coradas com iodeto de propídeo na concentração de 5 µg/mL por 15 minutos, para a coloração do núcleo. As lamínulas foram então lavadas novamente (3x, 5 min), montadas em lâminas com 'anti-fading' (Vecta-Shield - Vector) e lacradas com esmalte. Este material foi analisado em microscópio confocal de varredura laser.

4. Quantificação de DNA

As células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro, com densidade inicial de 1×10^4 células/placa. Após 48 horas foram tratadas com extrato polar de *A. fraterculus* e *P. gracile* durante 24 horas e recuperadas em meio livre durante 24 horas. A fixação foi efetuada com imersão das células em etanol:ácido acético (3:1) por 15 min. Depois de fixadas, as lamínulas foram deixadas em temperatura ambiente para secagem e posteriormente foram submetidas à reação de Feulgen (Machado-Santelli *et al.*, 1994). A quantificação de DNA nuclear foi realizada por análise da imagem no sistema CIREs-Kontron. Foram analisadas 350 células de cada tratamento e cada concentração (0,1 e 1,0 mg/mL).

A partir dos valores de ploidia foram construídos histogramas da distribuição do conteúdo do DNA.

5. Avaliação da formação de micronúcleos

Os micronúcleos foram visualizados em microscópio óptico comum, com objetiva de 100x e oculares de 10x em lâminas identificadas, e a determinação de micronúcleos foram mediante a contagem manual de micronúcleos em 1000 células por lâmina submetidas à reação de Feulgen.

Foi aplicado teste do Qui² para avaliar a significância dos resultados.

RESULTADOS

1. Testes de viabilidade celular com células tumorais da linhagem T47D

As figuras 1 e 3 mostram que os extratos polares de *Prorocentrum gracile* e *Prorocentrum mexicanum* inibiram de maneira dose-dependente a proliferação de células de tumor de mama humano T47D. A CE₅₀ foi de 0,52 mg/mL com intervalo de confiança 95% entre 0,51 e 0,53 mg/mL, quando as células foram tratadas com extrato polar de *P. gracile*. No tratamento com extrato polar de *P. mexicanum* encontramos CE₅₀ de 0,45 mg/mL com intervalo de confiança 95% entre 0,34 e 0,58 mg/mL. Extrato polar de *A. fraterculus* provocou 42% de inibição da proliferação celular na concentração de 1,25 mg/mL e menos de 10% quando testada em concentração igual a 0,63 mg/mL.

Após 48 horas de incubação observamos mudanças morfológicas nessa linhagem de células quando tratadas com diferentes concentrações de extrato polar de *P. gracile* e *P. mexicanum*, com aspectos semelhantes (Figuras 2 e 4).

Ambos os tratamentos provocaram arredondamento das células e diminuição da densidade de células. Nas concentrações intermediárias o tratamento com

extrato de *P. gracile* provocou alongamento das células e prolongamento do citoplasma (Figura 2B) enquanto em *P. mexicanum* observamos além da diminuição da densidade celular, um rearranjo das células assemelhando-se a pequenos colares (Figura 4B). Nas concentrações mais altas as células perderam sua aderência ao substrato (Figura 2D e 4D).

2. Imunofluorescência para tubulina e coloração de actina e núcleo

O tratamento das células T47D com extratos polares de *P. mexicanum*, provocaram uma aparente desorganização dos microtúbulos deslocando o núcleo para a periferia das células, ao invés de ocupar a posição central (Figura 6), como em células não tratadas (Figura 5).

Os tratamentos realizados com extrato polar de *P. gracile* e *A. fraterculus* mostraram re-organização dos microfilamentos, formando pontos de agregação de actina e prolongamentos alterando a morfologia celular (Figuras 7 e 8).

FIGURA 1. Curva de concentração dose-resposta da inibição da proliferação de células de tumor de mama humano T47D pelo extrato de *P. gracile*.

FIGURA 2. Atividade antiproliferativa do extrato polar de *P. gracile*. **A.** Controle **B.** 0,13 mg/mL **C.** 0,65 mg/mL **D.** 1,31 mg/mL. Barra=15µm.

FIGURA 3. Curva de concentração dose-resposta da inibição da proliferação de células de tumor de mama humano T47D pelo extrato de *P. mexicanum*.

FIGURA 4. Atividade antiproliferativa do extrato polar de *P. mexicanum*. **A.** Controle **B.** 0,43 mg/mL **C.** 0,86 mg/mL **D.** 1,44 mg/mL. Barra=15 μ m.

Figura 5. Imagens ao microscópio confocal de varredura a laser de células da linhagem T47D submetidas à reação de imunofluorescência. Controle mostrando os padrões morfológicos dessa linhagem celular. Actina em verde, tubulina em azul e núcleo em vermelho. **A, B e C.** canais separados e **D.** os três juntos

Figura 6. Imagens de células da linhagem T47D submetidas à reação de imunofluorescência para tubulina (em azul), actina e coloração nuclear com iodeto de propídeo (vermelho). As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura laser. Células tratadas com extrato polar de *Prorocentrum mexicanum* na concentração de 0,04mg/mL.

Figura 7. Imagens de células da linhagem T47D submetidas à reação de imunofluorescência para tubulina (em vermelho), actina (em verde) e coloração nuclear com ToPro3 (em azul). As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura laser. Células tratadas com extrato polar de *Alexandrium fraterculus* na concentração de 1 mg/mL. **A.** evidenciando a actina e em **B.** o núcleo.

Figura 8. Imagens de células da linhagem T47D submetidas à reação de imunofluorescência para tubulina (em vermelho), actina (em verde) e coloração nuclear com ToPro3 (em azul). As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura laser. Células tratadas com extrato polar de *Prorocentrum gracile* na concentração de 1 mg/mL.

3. Quantificação de DNA

A quantificação do conteúdo de DNA foi realizada por análise de imagem no sistema CIREs-Kontron. Nessa análise foram utilizadas preparações citológicas submetidas à reação de Feulgen, de células T47D, controles e tratadas com extrato polar de *P. gracile* e *A. fraterculus* nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg/mL. A quantificação do conteúdo de DNA nuclear foi realizada com 350 células para o controle e cada tratamento.

O histograma 9A representa o conteúdo de DNA nuclear das células controle onde observamos em destaque uma população de células ao redor de 2C e uma discreta população (7,53%) de células com desvio de valores normais de ploidia (células >5C). Essa população quase desaparece quando as células são tratadas

com extrato polar de *A. fraterculus* (Figura 9B e C) e *P. gracile* (Figura 9D e E) atingindo valores de 0,29 % no tratamento com *P. gracile*.

Os tratamentos também provocam a diminuição ou quase desaparecimento da população com 4C e o aumento de células hipodiplóides.

5. Avaliação da formação de micronúcleos

Os resultados foram obtidos através da contagem dos micronúcleos visualizados em microscópio óptico comum, com objetiva de 100x e oculares de 10x em lâminas identificadas. A determinação de micronúcleos foi mediante a contagem manual de micronúcleos em 1000 células por lâmina submetidas à reação de Feulgen.

A frequência de células com micronúcleos encontradas foi calculada por meio do teste qui quadrado e grau de liberdade igual a 1. Para células tratadas com 1,0 mg/mL de extrato polar de *A. fraterculus* obtivemos $X^2 = 22,84$ e para *P. gracile*, na mesma concentração $X^2 = 6,14$. Para $X^2_{\text{crítico}} = 3,841$, nossos resultados são significativos, indicando potencial genotóxico dos extratos.

Figura 9. Histogramas de distribuição dos valores de ploidia de DNA na linhagem T47D, obtidos por análise de imagem. **A.** Células controle, **B. e C.** Células tratadas com extrato polar de *A. fraterculus* nas concentrações 1 mg/mL e 0,1 mg/mL respectivamente. **D. e E.** Células tratadas com extrato polar de *P. gracile* nas concentrações 1 mg/mL e 0,1 mg/mL respectivamente. O eixo X representa a ploidia (C) e o eixo Y, o número de eventos.

DISCUSSÃO

Um grande número de novas estruturas com atividade biológicas únicas tem sido encontrado em invertebrados marinhos, muitos com potencial terapêutico. Existem evidências que alguns desses compostos são produzidos por microalgas como os dinoflagelados (Shimizu, 1996).

O resultado positivo para testes de viabilidade celular utilizando extratos polares dos dinoflagelados *P. gracile*, *P. mexicanum* e *A. fraterculus*, mostram a presença de substâncias capazes de inibir a proliferação de células tumorais T47D, de maneira dose-dependente. Nas concentrações superiores a CE_{50} o tratamento com os extratos afetou a aderência das células à placa.

Com o objetivo de entender os mecanismos de ação dos compostos presentes no extrato polar dos dinoflagelados estudados, realizamos teste de imunofluorescência para tubulina e coloração de actina e núcleo. Utilizando microscopia confocal observamos pequena desorganização dos microtúbulos, deslocando o núcleo para a periferia provocada por *P. mexicanum*, enquanto pontos de agregação de actina foram observados nas células tratadas com *P. gracile* e *A. fraterculus*.

A dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos envolve centenas de proteínas (Giganti e Friederich, 2003), portanto a formação de agregados de actina e a desorganização dos microtúbulos podem estar ocorrendo através de várias formas. Possíveis explicações seriam a ligação de substâncias diretamente com as proteínas do citoesqueleto ou com proteínas motoras associadas, alteração de algum mediador da polimerização ou inibição de proteínas fosfatases que estão envolvidas na regulação da estrutura geral do citoesqueleto (Eriksson e Goldman, 1993; Toivola *et al.*, 1998). Em dinoflagelados, o ácido ocadáico e outras substâncias

já foram estudadas quanto a sua capacidade de alterar citoesqueleto (Diógene *et al.*, 1995, Fiorentine *et al.* 1996, Naves *et al.*, 2005), indicando que o citoesqueleto é alvo de grande número de substâncias de origem marinha (Leira *et al.*, 2002).

Extratos polares de *P. gracile* e *A. fraterculus* provocaram aumento de células hipodiplóides, sugerindo processo de morte celular. A diminuição da ocorrência de células não diplóides (>5C) nos tratamentos foi observada. Isso pode ocorrer em função da não duplicação completa do DNA durante a divisão mitótica levando ao processo de morte celular.

A presença de micronúcleos observada nos tratamentos com *P. gracile* e *A. fraterculus*, foi estatisticamente significativa. Considerando que a frequência de micronúcleo é biomarcador de danos cromossômicos, instabilidade genômica (Iarmarcovai *et al.*, 2008), nossos resultados indicam que ambos os extratos apresentam compostos genotóxicos para a linhagem de células estudada. Estudos recentes reportam toxinas de dinoflagelados, o ácido ocadáico e brevetoxina como substâncias genotóxicas que provocam aberrações cromossômicas em certas linhagens celulares (Huynh-Delerme e Puiseux-Dao, 1998; Sayer *et al.*, 2005; Sayer *et al.*, 2006;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLINGHAM, J. S., KLENCHIN, V. A., RAYMENT, I. 2006. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2119–2134.
- ARES, I. R., LOUZAO, M. C., VIEYTES, M. R. YASUMOTO, T., BOTANA, L. M. 2005. Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *The Journal of Experimental Biology* 208: 4345-4354.
- AUNE, T., YASUMOTO, T., ENGELAND, E. 1991. Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 34: 1–9.
- BERVEN, G., SAETRE, F., HALVORSEN, K., SEGLEN, P.O. 2001. Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells. *Toxicon* 39: 349-362.
- 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: 4813–4819.
- ERIKSSON J. E., GOLDMAN R. D. 1993. Protein phosphatase inhibitors alter cytoskeletal structure and cellular morphology. *Advances in Protein Phosphatases* 7: 335-357.
- FASANO, A. 2002. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut* 50: 1119- 1114.
- FENTEANY, G., ZHU, S. 2003. Small-molecule inhibitors of actin dynamics and cell motility. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 593–616.

- GALA, F., D'AURIA, M.V., DE MARINO, S., ZOLLO, F., SMITH, C.D., COPPER, J.E., ZAMPELLA, A. 2007. New jaspamide derivatives with antimicrofilament activity from the sponge *Jaspis splendans*. *Tetrahedron* 63: 5212–5219.
- GIGANTI, A., FRIEDERICH, E. 2003. The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions. *Prog. Cell Cycle Res.* 5: 511–525.
- GRZEBYK, D., DENARBOU, A., BERLAND, B., POUCHUS, Y.F. 1997. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J Plankton Reserch*, 19 (8): 1111-1124.
- HUYNH-DELERME, C., PUISEUX-DAO, S. 1998. Algal toxins, inhibitors of serine/threonine phosphatases. *CR Seances Soc Biol Fil* 192 (3): 387-408.
- IARMARCOVAI, G., CEPPI, M., BOTTA, A., ORSIÈRE, T., BONASSI, S. 2008. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659 (3): 274-283.
- JAMES, K.J., FUREY, A., LEHANE, M., RAMSTAD, H., AUNE, T., HOVGGAARD, P., MORRIS, S., HIGMAN, W., SATAKE, M., YASUMOTO, T., 2002. First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* 40 (7): 909–915.
- JANMEY, P. A., CHAPONNIER, C. 1995. Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 111–117.
- JORDAN, M. A., WILSON, L. 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 123–130.
- JUNG, J. H., SIM, C. J., LEE, C-O. 1995. Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J. Nat. Prod.* 58: 1722–1726.

- LAMBRECHTS, A., VAN TROYS, M., AMPE, C. 2004. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 1890–1909.
- LEIRA, F., CABADO, A. G., VIEYTES, M. R., ROMAN, Y., ALFONSO, A., BOTANA, L. M. 2002. Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 63: 1979–1988.
- LU, P., CHUEH, S., FAN-LU KUNG, F., PAN, S., SHEN, Y. GUH, J. 2007. Ilimaquinone, a marine sponge metabolite, displays anticancer activity via GADD153-mediated pathway. *European Journal of Pharmacology* 556: 45–54.
- MACHADO-SANTELLI, G.M., MORI, L., PEREIRA, C.A. de B. 1994. Prediction of relapse inpatients with breast câncer by DNA cytometry. *Anal Cell Pathol* 7: 321-334.
- MAYER, A. M.S., GUSTAFSON, K. R. 2006. Marine pharmacology in 2003–2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds *European Journal of Cancer* 42: 2241–2270.
- NAVES, J.L., PRADO, M.P., RANGEL, M., DE SANCTIS, B., MACHADO-SANTELLI, G., FREITAS, J.C. 2005. Cytotoxicity in the marine dinoflagellate *Prorocentrum mexicanum* from Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143: 73–77.
- ROMAN, Y., ALFONSO, A., LOUZAO, M.C., DE LA ROSA, L.A., LEIRA, F., VIEITES, J.M., VIEYTES, M.R., OFUJI, K., SATAKE, M., YASUMOTO, T., BOTANA, L.M., 2002. Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cellular Signalling* 14 (8): 703–716.

- SAYER, A., H.U, Q., BOURDELAIS, A.J., BADEN, D.G., GIBSON, J.E. 2005. The effect of brevenal on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes. *Arch Toxicol* 79 (11): 683-688.
- SAYER, A., H.U, Q., BOURDELAIS, A.J., BADEN, D.G., GIBSON, J.E. 2006. The inhibition of CHO-K1-BH4 cell proliferation and induction of chromosomal aberrations by brevetoxins in vitro. *Food Chem Toxicol* 44 (7): 1082-1091.
- SHIMIZU, Y. (1996). Microalgal metabolites: a new perspective. *Annu Rev Microbiol* 50:431-465.
- SPECTOR, I., BRAET, F., SHOCHET, N. R., BUBB, M. R. 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* 47: 18–37.
- SURESH, S. 2007. Biomechanics and biophysics of cancer cells *Acta Biomaterialia* 3 (4): 413-438.
- ZHOU, Z. H., KOMIYAMA, M., TERAOKA, K., SHIMADA, Y. 1994. Effects of pectenotoxin-1 on liver cells in vitro. *Nat. Toxins* 2: 132–135.
- TOIVOLA D. M., OMARY M. B., KU N-O., PELTOLA O., BARIBAULT H., ERIKSSON J. E. 1998. Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly- incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate laments in preserving hepatocyte integrity. *Hepatology* 28: 116-128.
- FIORENTINI, C., MATARRESE, A.F., DONELLI, G. 1996. Okadaic acid induces changes in the organization of F-actin in intestinal cells. *Toxicon* 31 (8): 937-945.

BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA IDENTIFICAÇÃO DE UMA ESPÉCIE DE DINOFLAGELADO DO GÊNERO *OSTREOPSIS*

ABSTRACT

This study presents the morphological and molecular characterization of two strains of the epiphytic dinoflagellate *Ostreopsis* (IPSPBR-1 e IPSPBR3) isolated from the coast of the State of São Paulo. The preliminary identification, based on cell symmetry and plate pattern observed with light microscopy, indicated that both strains were of *Ostreopsis* cf. *ovata*. The final identification will require the study of the fine structure of cell surface with electron microscopy and the detailed study of the possible plasticity of some characters, for example, plate 2' which does not correspond to the original description for the species. Analyses of the 5.8S subunit and internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2 of the ribosomal nuclear RNA gene sequence of these two strains were compared with *Ostreopsis* spp. sequences obtained from GenBank NCBI and phylogeny was inferred using neighbor-joining, maximum likelihood and Bayesian inference (*Coolia monotis* or *Ostreopsis siamensis* as outgroups). The strains from São Paulo had 432 bp and 100% identity with *O. ovata* isolated from the Mediterranean Sea and Rio de Janeiro, but 85-88% identity with *O. ovata* from Asian waters. The genus *Ostreopsis* formed a monophyletic group, but relative genetic variation was found within *O. ovata* specimens. The isolates from the State of São Paulo will remain as *O. cf. ovata* until other species of the genus, and *O. ovata* as well, from diverse geographical regions are investigated. This will allow a better understanding of genetic diversity and the recognition of more reliable (stable) morphological characters.

RESUMO

Duas cepas do dinoflagelado epífita *Ostreopsis cf ovata* isolados do litoral do Estado de São Paulo foram caracterizados sob seus aspectos morfológicos e filogenéticos. O seqüenciamento da região interna transcrita dos genes ribossomais nucleares (ITS1, 5.8S e ITS2) obtido das duas cepas (IPSPBR-1 e IPSPBR3) foram comparadas com seqüências de outras espécies de *Ostreopsis* spp depositadas no GenBank NCBI e analisadas utilizando-se os métodos de inferência filogenética de distância, máxima parcimônia e máxima verossimilhança.

A caracterização morfológica dos espécimes analisados apresentou variação da forma/tamanho da placa 2', desde uma pequena prolongação dorsal que não chega a tocar a placa 4'', até uma separação completa entre as placas 3' e 3''. Em relação aos estudos moleculares, a região do ITS de IPSPBR-1 e IPSPBR-3 apresentaram 432 pb e porcentagem de identidade igual a 100% para seqüências de *O. ovata* isoladas do Mediterrâneo e Brasil e entre 85 e 88% para as espécies asiáticas.

As análises morfológicas e filogenéticas mostram que os espécimes isolados do litoral Norte de São Paulo são geneticamente idênticos àqueles isolados do Rio de Janeiro e Mediterrâneo. Entretanto, manteremos a condição de *O. cf. ovata* até que informações adicionais permitam uma definição mais concreta de seu status taxonômico.

INTRODUÇÃO

1. O gênero *Ostreopsis*: distribuição, taxonomia e toxicidade

Ostreopsis (Ostreopsidaceae, Gonyaulacales, Dinophyceae) é um dinoflagelado tecado de hábito bentônico, freqüentemente epífita de algumas macroalgas, mas que também pode ser encontrado próximo ao fundo arenoso e/ou na coluna d'água (Faust *et al.*, 1996). Apresenta distribuição geográfica ampla em regiões tropicais e subtropicais, especialmente em ambientes de recifes de corais, e são freqüentemente encontrados em associação a populações de outros dinoflagelados de hábito bentônico como *Coolia* spp. e *Gambierdiscus toxicus* (Adachi e Fukuyo, 1979; Vila *et al.*, 2001).

A primeira menção a presença de *Ostreopsis* na costa brasileira esteve associada à mortandade de ouriços (*Echinometra lucunter*) em 1998 na região de Arraial do Cabo e Búzios, no Rio de Janeiro (com. pes. CEL Ferreira *in* Odebrecht *et al.*, 2002, na época identificado como *Prorocentrum* sp.). Material isolado em cultivo desta mesma região e do norte fluminense, identificado como *O. ovata* foi utilizado em estudos sobre aspectos toxicológicos (Granéli *et al.*, 2002), taxonômicos (Penna *et al.*, 2005) e ecofisiológicos (Nascimento, 2006; Correa *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2007).

Há 9 espécies formalmente descritas na literatura: *O. siamensis* (Schmidt, 1901), *O. lenticularis* (Fukuyo, 1981), *O. ovata* (Fukuyo, 1981), *O. heptagona* (Norris *et al.*, 1985), *O. mascarensis* (Quod, 1994), *O. lavens* (Faust e Morton, 1995), *O. marinus* (Faust, 1999), *O. belizeanus* (Faust, 1999) e *O. caribbeanus* (Faust, 1999). A distinção entre as espécies é feita a partir de caracteres morfológicos como simetria geral da célula, tamanho e formato das placas, assim como a presença de ornamentações na superfície como poros (Taylor *et al.*, 2003).

O gênero é descrito como célula clorofilada com simetria geral em forma de gota em vista apical (mais estreita na porção ventral), comprimida no sentido ântero-posterior, com dimensões da epiteca e hipoteca praticamente iguais e número/disposição das placas conforme a seguinte tabulação: Po (poro apical), 3', 7'', 6c, 6s?, Vp, 5''', 1p, 2''' (Steidinger e Tangen, 1997) (Figura 1). Além de formato e dimensão, as características que recebem mais atenção como diagnósticas entre espécies são a primeira placa apical (1') e o tipo de ornamentação na superfície das tecas (p.e., Faust e Gulledge, 2002).

Figura 1. Ilustrações do gênero *Ostreopsis*. (a) Célula viva, observada por microscopia óptica (contraste de fase), evidenciando formato em gota e inúmeros cloroplastos (espécime de São Sebastião, SP). (b) Célula fixada, observada com microscopia de epifluorescência, evidenciando compressão no sentido ântero-posterior (espécime de São Sebastião, SP). (c, d) Diagrama destacando a tabulação das placas que compõem as tecas em (c) vista apical e (d) vista antapical, segundo descrição original de *Ostreopsis ovata* (modificado de Fukuyo, 1981).

Há consenso na literatura sobre a necessidade de maior aprofundamento no estudo taxonômico deste gênero de modo a determinar caracteres diacríticos que possam melhor delinear a distinção entre os morfotipos (Rhodes *et al.*, 2000; Vila *et al.*, 2001; Penna *et al.*, 2005), especialmente quando tratamos de espécies produtoras ou potencialmente produtoras de toxinas. Este é o caso de algumas espécies do gênero *Ostreopsis* que podem produzir palitoxina e seus análogos. Cinco espécies já foram associadas à produção de toxina: *O. heptagona*, *O. lenticularis*, *O. mascarensis*, *O. ovata* e *O. siamensis* (Faust e Gualledge, 2002). Essas toxinas causam intoxicação em humanos pela ingestão de peixes ou caranguejos contaminados, provocando cólicas abdominais, náusea, diarreia, espasmos musculares e dificuldade respiratória (Alcalá *et al.*, 1988, Kodama *et al.*, 1989, Onuma *et al.*, 1999). Em outros casos, podem provocar sintomas como hemorragia nasal, tosse, febre e problemas respiratórios em humanos após inalação de aerossol e contato com água do mar, como ocorreu durante uma proliferação de *Ostreopsis ovata* no Mediterrâneo (Ciminiello *et al.*, 2006).

A taxonomia do gênero *Ostreopsis* certamente pode ser aprimorada com o uso de ferramentas da biologia molecular. A identificação precisa de organismos potencialmente tóxicos é fundamental para a proteção da atividade pesqueira e da saúde humana.

2. Biologia molecular e o gênero *Ostreopsis*

A identificação de espécies de dinoflagelados é tradicionalmente estabelecida usando características morfológicas, entretanto, estas características podem mudar devido a condições ambientais e fases do ciclo de vida (Steidinger, 1990). Nos últimos anos, muitos ficólogos têm utilizado técnicas moleculares para resolver

diferentes problemas nos estudos de algas (Oliveira, 2001) que, quando usadas em conjunto com outras características, podem solucionar problemas taxonômicos (Scholin *et al.*, 1994; Daugbjerg *et al.*, 2000).

A caracterização molecular vem sendo usada em complemento aos aspectos morfológicos para diferentes grupos de organismos. Há técnicas moleculares disponíveis para detecção de variabilidade genética ao nível da seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um grande número de marcadores moleculares cobrindo diferentes regiões do genoma do organismo. Genes que apresentam funções bioquímicas conservadas em todas as espécies podem ser usados para o estudo filogenético em níveis taxonômicos acima de espécie. Outras regiões do genoma podem ser utilizadas para analisar as relações existentes entre espécies morfologicamente indistinguíveis e até mesmo de populações (Hillis e Dixon, 1991; Mindell e Honeycutt, 1990; Pace *et al.*, 1986). Essas aplicações, que podem abranger desde processos evolutivos próximos a origem da vida até eventos evolutivos relativamente recentes, são possíveis com estudo dos genes ribossomais e suas regiões espaçadoras (Hillis e Dixon, 1991).

O DNA ribossomal nuclear de eucariotos consiste de regiões codificantes para os genes do RNA ribossomal 18S, 5.8S e 28S e dois espaçadores internos transcritos, ITS1 e ITS2, mas não codificantes, separam essa região (Figura 2). As regiões 18S e 28S são muito conservadas e normalmente são utilizadas para análises filogenéticas em níveis taxonômicos acima de espécie e gênero. Por outro lado, as regiões ITS acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies e linhagens da mesma espécie, e vêm sendo utilizadas

em estudos taxonômicos para a caracterização de diversos organismos (Turmel *et al.*, 1991; Larsen e Medlin 1997; Connell 2000).

Em investigações sobre sistemática de dinoflagelados, encontramos estudos utilizando marcadores moleculares para demonstrar variação molecular entre populações de *Gymnodinium catenatum* (Bolch *et al.* 1998) e diferenciação de espécies de *Alexandrium* utilizando as regiões ITS1, ITS 2 e 5.8S do DNA ribossomal (Adachi *et al.*, 1994). Para o gênero *Ostreopsis*, Pin *et al.* (2001) estudaram a diversidade genética de populações de *Ostreopsis ovata* da Malásia, utilizando os mesmos marcadores genéticos. Em 2005, Penna *et al.* utilizaram a região ITS e 5.8S do DNA ribossômico nuclear para a caracterização de diferentes espécies de *Ostreopsis* em relação à *Coolia monotis*, os dois gêneros que compõem a família Ostreopsidaceae.

Nesse trabalho, utilizamos os mesmos marcadores moleculares para caracterizar uma espécie de *Ostreopsis* coletada no litoral Norte do Estado de São Paulo e analisar suas relações filogenéticas com populações de outras regiões.

Figura 2. Organização dos genes ribossomais cuja unidade de transcrição se repete em tandem (em cinza) e é composta por: SSU ou 18S corresponde ao gene que codifica para o RNA da subunidade pequena do ribossomo; LSU ou 28S corresponde ao gene que codifica para o RNA da subunidade grande do ribossomo; 5.8S codifica para uma pequena molécula de RNA que também é incorporada na subunidade grande do ribossomo. ITS1 e ITS2 são os espaçadores internos transcritos.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização morfológica e molecular de uma espécie de *Ostreopsis* coletada no litoral Norte do Estado de São Paulo e analisar as relações filogenéticas existentes com espécies de *Ostreopsis* isoladas em outras regiões.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Isolamento e identificação preliminar

Duas culturas do dinoflagelado *Ostreopsis* sp. foram estabelecidas a partir do isolamento de células epífitas da feofícea *Sargassum filipendula* coletadas em São Sebastião, SP, em outubro de 2007. O isolamento deste gênero em particular foi possível em função de seu conhecido hábito epífita e devido à geometria particular em forma de gota. Cada cultura foi iniciada a partir de uma única célula isolada e estabelecida pelo crescimento vegetativo subsequente. As condições de isolamento e manutenção no banco de culturas, etapas executadas pelo Instituto de Pesca de Santos, foram: Guillard f/2 (Guillard, 1975), salinidade 32, temperatura de 21 ± 1 °C, fotoperíodo 12:12h claro:escuro.

A identificação preliminar, baseada em caracteres morfológicos, foi realizada em microscopia óptica (MO) através da visualização das placas com auxílio do pigmento Calcofluor white M2R e epifluorescência com excitação em UV (Fritz e Triemer, 1985).

2. Extração de DNA

Um volume de 100 mL de cultivo, fase lag de crescimento, de duas cepas de *Ostreopsis* (IPSPBR -1 e IPSPBR -3) foram centrifugados por 20 min a 15000 rpm. O

sobrenadante foi descartado e o pellet utilizado para extração. O material foi macerado e utilizamos nitrogênio líquido para o completo rompimento das células (verificado por microscopia óptica).

A extração de DNA foi realizada utilizando o 'kit' de extração "Dneasy Plant Mini Kit" (Qiagen, EUA). Após a extração, o DNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo (Sambrook *et al.*, 1989) para averiguação da qualidade e quantidade de DNA extraído.

3. Eletroforese em Gel de Agarose

O gel foi preparado com tampão tris-borato-EDTA (TBE: tris-HCl 50 mM; borato 50 mM; EDTA 2 mM) e corado com brometo de etídio. O gel foi carregado com amostras de DNA e tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, EDTA 50 mM e glicerol 30%) na proporção de 4:1. Utilizamos marcador de tamanho '1 Kb DNA Ladder' (Invitrogen, CA). O gel de agarose também foi utilizado para analisar e quantificar produtos de PCR. A quantificação de DNA amplificado por PCR é realizada através de estimativa visual, comparando-se a concentração de DNA que foi amplificado com a concentração da banda de 1,6 kb do marcador, conforme especificado no protocolo do fornecedor.

4. Amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação da região ITS utilizando-se a técnica de PCR – Reação de cadeia de polimerase. Os "prímers" (iniciadores) hibridam com o DNA molde, previamente desnaturado, em uma região conservada. A sua amplificação ocorre através da extensão do "primer" por incorporação de nucleotídeos, com auxílio da enzima *Taq* polimerase. Essa reação ocorre em cadeia,

amplificando exponencialmente a região que se deseja obter em grande quantidade. Os “primers” utilizados nas PCR e reações de seqüenciamento foram 1800F (5’–GAGAAGTCGTAACAAGG -3’) e 28S5R (5’–ATATGCTTAARTTCABDBGGT–3’).

Para as reações de PCR, para um volume final de 50 µl, as condições de amplificação foram: utilização de 32,75 µl água bi-destilada e deionizada (ddH₂O), 10,0 µl tampão de PCR, 3,0 µl MgCl₂, 1,0 µl de cada “primer”, 1,0 µl dNTP (2’ desoxinucleosídeos 5’ trifosfato), 1,0 µl de DNA e 0,25 µl de *Taq* DNA polymerase (PROMEGA).

As reações de PCR foram realizadas na termocicladora GeneAMP PCR System 2400 (Applied Biosystems, EUA) e os ciclos para amplificação da região ITS foram: 94 °C por 4 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg; 55 °C por 1 min; 72 °C por 2 min; e a extensão final a 72 °C por 7 min.

Após a reação, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.*, 1989) para verificação do tamanho e quantidade de DNA amplificado. Para minimizar eventuais erros de incorporação de bases durante a PCR, no mínimo três reações independentes foram reunidas antes de o material ser seqüenciado (Baldwin *et al.*, 1995).

Os produtos da PCR foram purificados utilizando a coluna MicroSpinTM (DNA e Gel Band Purification kit-GE Helatchcare). Após a purificação, o produto de PCR foi quantificado em gel de agarose, conforme procedimento já descrito acima.

5. Seqüenciamento dos produtos amplificados

As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit de seqüenciamento Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied

Biosystems, EUA). O “kit” é composto por uma mistura de reagentes que contém: dideoxinucleosídeos (ddNTP) com marcadores fluorescentes, tampão, cloreto de magnésio e a enzima *Taq* polimerase. Os “primers” usados foram os mesmos da amplificação. Utilizamos a termocicladora MiniCycler (MJ Research), com 40 ciclos a 96 °C por 10 seg, 55 °C por 20 seg e 60 °C por 4 min.

Os produtos de PCR contendo os ddNTPs marcados foram precipitados em isoprapanol 65% e lavados em etanol 60% para a remoção de resíduos não incorporados que podem afetar a qualidade das seqüências.

As amostras foram seqüenciadas nos seqüenciadores automáticos ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

6. Alinhamento das seqüências geradas

As seqüências foram alinhadas manualmente usando o programa Bioedit (Íbis Biosciences, CA). O alinhamento foi realizado pelo posicionamento de bases homólogas entre as seqüências geradas. Quando determinado que sítios da seqüência apresentavam ambigüidades, isto é, mais de um nucleotídeo representando um único sítio, foi realizada análise nos cromatogramas (gerados pelo programa Bioedit) a fim de confirmar qual o nucleotídeo correto em determinada posição.

Foi gerada uma matriz a partir de 32 seqüências de *Ostreopsis* e *Coolia monotis* depositadas do GenBank mais as duas geradas a partir das cepas IPSPBR-1 e IPSPBR-3 deste trabalho. Seqüências correspondentes aos “primers” de amplificação 1800F e 28S5R foram removidas dos alinhamentos. Para a construção da matriz retiramos as seqüências idênticas que foram representadas por apenas um indivíduo (Tabela 1) gerando uma matriz de 14 táxons (ANEXO 1).

Tabela 1. Seqüências das regiões ITS do gênero *Ostreopsis* e do grupo externo *Coolia monotis* importadas do GenBank e as duas culturas utilizadas neste estudo.

Espécie	Nº de Acesso GenBank	Local de Coleta	Referência	Táxon representativo do grupo
<i>C. monotis</i>	AJ532583	Mediterrâneo	Penna, <i>et. al.</i> , 2005	AJ532583
<i>C. monotis</i>	AJ514919	Mediterrâneo Ocidental	Penna, <i>et. al.</i> , 2005	AJ514919
<i>C. monotis</i>	AJ515260	Mediterrâneo Ocidental	Penna, <i>et. al.</i> , 2005	AJ515260
<i>O. cf siamensis</i>	AJ491335 AJ491334 AJ491333 AJ491332 AJ491313 AJ319871 AJ301643 AJ301644 ^a	Mediterrâneo, Itália Mediterrâneo, Espanha Mediterrâneo, Espanha Mediterrâneo, Espanha Mediterrâneo, Espanha Mediterrâneo, Espanha Mediterrâneo, Itália Mediterrâneo, Espanha	Penna, <i>et. al.</i> , 2005	AJ491335
<i>O. ovata</i>	AF076218 ^b	Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF076218
<i>O. ovata</i>	AF076217 ^c	Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF076217
<i>O. ovata</i>	AF218456 AF218455	Malásia, Ásia Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF218456
<i>O. ovata</i>	AF218459 AF218458 AF218457	Malásia, Ásia Malásia, Ásia Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF218459
<i>O. ovata</i>	AF218464	Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF218464
<i>O. ovata</i>	AF218463	Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF218463
<i>O. ovata</i>	AF218462	Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF218462
<i>O. ovata</i>	AF218461	Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF218461
<i>O. ovata</i>	AF218460	Malásia, Ásia	Pin <i>et al.</i> , 2001	AF218460
<i>O. cf ovata</i>	AJ320179 ^d AJ311520 ^d AJ420005 ^d AJ420006 ^d AJ491311 ^d AJ491312 ^d AJ318461 ^d AJ318462 ^d IPSPBR-1 ^e IPSPBR-3 ^e	Mediterrâneo, Itália Mediterrâneo, Itália Mediterrâneo, Espanha Rio de Janeiro, Brasil Rio de Janeiro Brasil Rio de Janeiro Brasil Rio de Janeiro Brasil Rio de Janeiro, Brasil São Paulo, Brasil São Paulo, Brasil	Penna <i>et al.</i> , 2005 Este trabalho Este trabalho	IPSPBR-1

^a No GenBank consta como *Ostreopsis* sp.

^b No GenBank consta como *O. siamensis*, mas é *O. ovata* como na publicação (com. pes. L.C. Pin)

^c No GenBank consta como *O. lenticularis*, mas é *O. ovata* como na publicação (com. pes. L.C. Pin)

^d Em Penna *et al.*, 2005 consta como *Ostreopsis ovata*.

^e Ainda não publicado no GenBank, referente a este trabalho.

7. Construção de árvores filogenéticas

Para a análise filogenética, seqüências idênticas foram representadas por apenas um indivíduo (Tabela 1), gerando uma matriz de 14 táxons, a partir da qual as árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de distância (neighbor-joining – NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (likelihood - MV). O programa PAUP 4.0b10 foi utilizado para gerar as árvores e o cálculo de valores

de “bootstrap”. Para as análises de máxima parcimônia e de distância foram realizadas 2000 replicatas e para máxima verossimilhança 100 replicatas. Realizamos dois grupos de análise, uma utilizando como grupo externo seqüências de *Coolia monotis* e outra utilizando *Ostreopsis siamensis*.

RESULTADOS

1. Caracterização morfológica

Os espécimes de campo e de cultivo apresentam simetria em forma de gota (Figura 1a), são comprimidos no sentido ântero-posterior (Figura 1b) sem uma diferença notável entre as dimensões da epiteca e hipoteca (47,5 x 35µm). A dimensão das células e a disposição das placas em vista apical determinam que a identificação preliminar refere-se à *Ostreopsis* cf. *ovata* (Figura 3 em comparação a Figura 1c). A superfície das placas é coberta por poros (Figura 3c), aparentemente com apenas um tamanho de diâmetro como em *O. ovata*, mas a visualização de poros mais diminutos exige microscopia eletrônica para verificação.

A principal dúvida quanto à identificação reside na variação da forma/tamanho da placa 2'. Na descrição original (Fukuyo, 1981), não há detalhamento sobre a disposição das placas, mas o esquema apresentado indica que as placas 3' e 3'' se tocam (Figura 1c,d). Os espécimes analisados no presente estudo têm uma variação com relação a este caráter. A placa 2' varia desde uma pequena prolongação dorsal que não chega a tocar a placa 4'', até uma separação completa entre as placas 3' e 3'' (Figura 4). É necessário verificar, também, possíveis detalhes da superfície das placas (diferentes tamanhos de poros) com microscopia eletrônica de varredura.

Figura 3. *Ostreopsis* cf. *ovata* de São Sebastião, SP, observado em microscopia de epifluorescência. Vista apical detalhando as placas e o poro apical (Po). Destaque para (a) a dificuldade ou mesmo (b) impossibilidade de observar as placas 2' e 3''. (c) Detalhe da região do poro apical (Po), evidenciando a presença de poros na superfície das placas (também visíveis na Figura 4).

Figura 4. *Ostreopsis* cf. *ovata* de São Sebastião, SP, observado em microscopia de epifluorescência. Variação da geometria e tamanho da placa 2', a qual pode ser (a) curta de modo que as placas 3' e 3'' se tocam como na descrição original (Figura 1c,d); ou (b) ter um tamanho intermediário e tocar levemente a placa 4'; ou ainda (c) ser longa e isolar totalmente as placas 3' e 3''.

2. Seqüenciamento e alinhamento

A região ITS do DNA ribossomal das duas cepas de *Ostreopsis* (IPSPBR-1 e IPSPBR-3) apresentou 432 pb (A 26,10%, C 19,32%, G 19,94%, T 34,60%). As seqüências consenso obtidas para ambas as cepas foram idênticas (Figura 5). Estas seqüências foram alinhadas e comparadas com seqüências de outras espécies disponíveis no GenBank apresentando tamanho similar para a região ITS seqüenciada.

IPSPBR-1 e IPSPBR-3 isolados do litoral de São Paulo apresentaram porcentagem de identidade genética igual a 100% para seqüências de *O. ovata* isoladas para o Rio de Janeiro (Figura 5) que, por sua vez, são idênticas aos espécimes provenientes do Mediterrâneo. Todo esse grupo (Mediterrâneo e Brasil – SP e RJ) apresenta identidade de seqüência dessa região entre 85 e 88% com os espécimes asiáticos. Quando comparados com espécimes de *O. siamensis* e de *C. monotis*, apresentam valores de identidade de 88% e 48 a 50%, respectivamente.

3. Análise filogenética

Foram realizados dois grupos de análises, um utilizando como grupo externo *C. monotis* e o outro utilizando *O. siamensis*. As figuras 6 e 7 apresentam filogramas das análises realizadas com cada um dos dois grupos externos, mostrando a distância genética entre os organismos estudados. As árvores obtidas foram semelhantes nas análises realizadas, portanto somente a árvore de verossimilhança (MV) é mostrada, com os valores de “bootstrap” da análise de distância (NJ) e máxima parcimônia (MP) plotados nos ramos.

Figura 5. Alinhamento das seqüências da região ITS do DNA ribossomal das espécies de *Ostreopsis cf ovata* isoladas do Brasil (Rio de Janeiro- seqüências disponíveis no GenBank) e São Paulo (este trabalho).

Nas análises realizadas utilizando *C. monotis* como grupo externo, o gênero *Ostreopsis* formou um grupo monofilético com alto suporte. Verificamos ainda que dentro do gênero *Ostreopsis*, os espécimes de *O. cf. siamensis* formaram um grupo distinto da espécie *O. ovata* (Figura 6). No ramo de *O. ovata* encontramos uniformidade com alto suporte (NJ100, MV100, MP100) dentre os espécimes que ocorrem no Brasil (SP e RJ) e Mediterrâneo. Os espécimes asiáticos de *O. ovata* apresentam maior diversidade entre si e com os demais *O. ovata*, melhor evidenciada quando a análise é realizada com *O. siamensis* como grupo externo (Figura 7), chegando a formar um grupo totalmente em separado com três espécimes – AF076217, AF218465 e AF218455, com sustentação de 72% para a análise de verossimilhança (NJ100, MP98).

Figura 6. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (MV) baseada nas seqüências da região ITS do DNA ribossômico nuclear de *Ostreopsis*, utilizando *C. monotis* como grupo externo. Os valores de “bootstrap” estão representados nos ramos: análise distância (NJ) efetuados para 2000 replicatas (em preto); máxima verossimilhança (MV) para 100 replicatas (em vermelho); máxima parcimônia (MP), para 2000 replicatas (em azul). As flechas indicam a posição dos valores de “bootstrap”, quando não couberam nos ramos. Os locais de origem estão identificados da seguinte forma: MI: Mediterrâneo, Itália; ME: Mediterrâneo, Espanha; MA: Malásia, Ásia; RJB: Rio de Janeiro, Brasil; SPB: São Paulo, Brasil. A legenda completa das espécies está na tabela 1.

Figura 7. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (MV) baseada nas seqüências da região ITS do DNA ribossômico nuclear de *Ostreopsis*, utilizando *O. siamensis* como grupo externo. Os valores de “bootstrap” representados nos ramos: análise distância (NJ) efetuados para 200 replicatas (em preto); máxima verossimilhança (MV) para 100 replicatas (em vermelho); máxima parcimônia (MP), para 2000 replicatas (em azul). As flechas indicam a posição dos valores de “bootstrap”, quando não couberam nos ramos. Os locais de origem estão identificados da seguinte forma: MI: Mediterrâneo, Itália; ME: Mediterrâneo, Espanha; MA: Malásia, Ásia; RJB: Rio de Janeiro, Brasil; SPB: São Paulo, Brasil. A legenda completa das espécies está na tabela 1.

DISCUSSÃO

Análises moleculares baseadas na sequência da região ITS do DNA ribossomal mostraram que espécimes de *O. ovata* isoladas do Brasil (Rio de Janeiro e São Paulo) e Mediterrâneo formam um grupo separado dos espécimes asiáticos, corroborando o trabalho de Penna *et al.* (2005) e acrescentando os espécimes de São Paulo.

Entre os espécimes asiáticos observamos uma separação formando dois grupos corroborando o trabalho de Pin *et al.* (2001). Esses autores verificaram através de estudo sobre diversidade genética, que os espécimes de *O. ovata* asiáticos formam dois grupos, um isolado de Port Dickson (grupo Malaca) e outro de Kota Kinabalu-Regand (grupo Mar do Sul da China), mostrando que a separação é genética e também em relação a áreas geográficas.

Das nove espécies conhecidas do gênero *Ostreopsis*, somente duas foram estudadas a partir de análises moleculares, com estudos concentrados em espécies de *Ostreopsis ovata*. As cepas estudadas são de cultivos provenientes do Mediterrâneo, Ásia e Brasil (Rio de Janeiro) que geraram apenas dois trabalhos (Penna *et al.*, 2005; Pin *et al.*, 2001).

Usando marcadores genéticos combinados com análises morfológicas e de toxicidade, Penna *et al.* (2005) estudou a taxonomia e a filogenia de Ostreopsidaceae de áreas temperadas. Para este estudo, foram utilizadas cepas de *Coolia monotis* e espécies de *Ostreopsis*. O segundo trabalho, Pin *et al.* (2001), utilizou sequências do RNA ribossomal para analisar a diversidade genética inter e intra-populacional de espécies de *Ostreopsis* da Malásia.

Estudos dessa natureza são realizados com outros grupos de dinoflagelados como Guillou *et al.* (2002), que estudaram a diversidade genética e molecular dos

gêneros *Alexandrium*, *Dinophysis*, e *Karenia* da costa da França. Lilly *et al.* (2007), utilizou seqüências de DNA para reconstruir a biogeografia do gênero *Alexandrium* e a origem de suas populações, utilizando também critérios biológicos e morfológicos. Esse gênero é estudado há muito tempo e ainda existem discussões a respeito da sua diversidade genética. Isso mostra que estamos apenas começando a conhecer a diversidade do gênero *Ostreopsis*.

A simetria geral e morfologia das placas do gênero *Ostreopsis* são relativamente simples em comparação à de outros dinoflagelados como *Alexandrium* e *Protoperidinium*, o que torna a determinação de caracteres diacríticos uma tarefa especialmente difícil. A célula também é bastante delicada e requer preparações específicas (desidratação e ponto crítico) para observação em microscopia eletrônica e, mesmo assim, nem sempre as suturas entre as placas são totalmente evidentes, fato observado inclusive em ilustrações já publicadas. Sem excluir a importância do uso de microscopia eletrônica, um bom tratamento ao microscópio óptico pode, muitas vezes, fornecer informações com maior detalhe, como foi o caso do estudo da região do poro apical apresentado com os espécimes isolados no litoral de São Paulo. A plasticidade observada na placa 2' sugere uma questão importante para debate: se por um lado este parece não ser um bom caracter taxonômico para *O. ovata* devido à sua plasticidade, por outro lado, tornou evidente que este e outros detalhes da morfologia das espécies de *Ostreopsis* requerem uma verificação aprofundada. Por exemplo, com exceção feita a *O. heptagona* (ver Norris *et al.*, 1985 e Faust *et al.*, 1996), os estudos das demais espécies não descrevem a forma/posição das fronteiras da placa 2' ou, como ocorre para *O. lenticularis* e *O. marinus*, a descrição apresentada não confere com a respectiva ilustração (ver Faust e Gullledge, 2002; Faust, 1999). Certamente este é o caso de *O. ovata*, cuja

descrição não apresenta este detalhe, mas o esquema apresentado claramente indica uma placa 2' pequena e curta (ver descrição original em Fukuyo, 1981 e redescrição em Faust *et al.* 1996).

Estudos como o de Faust *et al.* (1996) e de Penna *et al.* (2005), apresentam informações morfológicas adicionais às descrições originais de algumas espécies, como detalhes da superfície das placas e estruturas do cingulo, especialmente a localização do poro ventral. Entretanto, há que se intensificar esforços em verificar a plasticidade morfológica destes e de outros caracteres com material de campo e também em cultivo com uma maior abrangência biogeográfica. A biologia molecular indica que este estudo parece especialmente importante para *O. ovata*, visto a variabilidade genética encontrada dentre as populações asiáticas e entre estas e o grupo formado pelas populações do Mediterrâneo e Atlântico Sul Ocidental (Brasil).

Seria prematuro discutir o real estatus taxonômico dos dois espécimes de *O. ovata* utilizados neste estudo, apesar da biologia molecular indicar que estes são exatamente iguais ao que foi identificado por outros autores como *O. ovata* (Pin *et al.*, 2001 e Penna *et al.*, 2005). Com o avanço de investigações sobre a biologia molecular e morfologia de espécimes de diferentes regiões geográficas, o correto seria redescrever *O. ovata* com material do local de origem da espécie tipo (Ilha Ryukyu, Japão) e, a partir desta análise, determinar o estatus taxonômico dos espécimes das demais localidades, com base no grau de similaridade encontrado. Esta abordagem se tornará cada vez mais robusta ao se conhecer a assinatura genética de outras espécies, além de *O. siamensis* e *O. ovata*. Assim sendo, o espécime encontrado no litoral de São Paulo permanece na condição de *O. cf. ovata* até que informações adicionais permitam uma definição mais concreta de seu estatus taxonômico.

A produção de toxinas por dinoflagelados bentônicos, como o gênero *Ostreopsis*, pode afetar o homem através do consumo de peixes e moluscos contaminados. Análogos de palitoxina já foram encontrados em cepas de *O. mascarensis* (Lenoir *et al.*, 2004), *O. siamensis* (Usami *et al.*, 1995, Ukena *et al.*, 2001, 2002, Rhodes *et al.*, 2002) e *O. ovata* isoladas do Mediterrâneo e litoral fluminense brasileiro (Penna *et al.*, 2005) e da Costa da Itália (Ciminiello *et al.*, 2006, 2008). No Brasil, florações de *Ostreopsis ovata* já foram reportadas na região de Arraial do Cabo e foram associadas à morte de ouriços marinhos (*Echinometra lucunter*) por intoxicação com análogos da palitoxina (Granéli *et al.*, 2002).

A presença de uma espécie produtora de toxinas em uma área de cultivo ou coleta bancos naturais torna-se um risco a saúde humana. Nesse caso, o estudo da biogeografia e correta identificação de espécies do gênero *Ostreopsis* é uma ferramenta que pode ser usada em programas de monitoramento e gestão que busquem prevenir possíveis intoxicações ou até morte pela ingestão de organismos contaminados.

Os resultados aqui discutidos, apesar de pontuais, contribuem para a compreensão da taxonomia, biogeografia e filogenia de um gênero de microalga ainda pouco estudado. De fato, o estudo de dinoflagelados bentônicos, em geral, e uma área que vem crescendo e recebendo especial destaque devido ao potencial de produção de toxina de inúmeras espécies. E, mais uma vez, o uso da biologia molecular se mostrou uma ferramenta essencial para aprimorar nossa percepção de biodiversidade e redirecionar pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, M. SAKO, Y. ISHIDA, Y. 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). J Phycol 30: 857-863.
- ADACHI, R., FUKUYO, Y. 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45: 67-71.
- ALCALA, A.C., ALCALA, L.C., GARTH, J.S. YASUMURA, D., YASUMOTO, T. 1988. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. Toxicon 26:105-107.
- BOLCH, C.J.S., BLACKBURN, S.I., HALLEGRAEFF, G.M., VAILLANCOURT, R.E. 1998. Molecular genetic variation among different global populations of *Gymnodinium catenatum* revealed by RAPD-PCR. In: Harmful algae, edited by B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández and T. Wyatt. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- CIMINIELLO, P., DELL'AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., MAGNO, S.G., TARTAGLIONE, L., GRILLO, C., MELCHIORRE, N. 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. Analytical Chemistry 78: 6153–6159.
- CIMINIELLO, P., DELL'AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., TARTAGLIONE, L., GRILLO, C., MELCHIORRE, N. 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. J Am Soc Mass Spectrom. 19(1): 111-20.

- CONNELL, L.B. 2000. Nuclear ITS region of the alga *Hetersigma akashiwo* (Chromophyta: Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlanta and Pacific basins. *Mar Biol* 36: 953-60.
- CORREA, E.V., SILVA, C.S., NASCIMENTO, S.M. 2007. Autoecologia de cepas de *Amphidinium* sp., *Coolia* cf. *monotis* e *Ostreopsis ovata* isoladas da costa leste fluminense. In: Resumos do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu, Brasil.
- DAUGBJERG, N., HANSEN, G., LARSEN, J., MOESTRUP, O. 2000. Phylogeny of some major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of 3 new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39: 302-317.
- FAUST, M. 1999. Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov. *Phycologia* 38(2): 92-99.
- FAUST, M.A., GULLEDGE, R.A. 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. Contributions from the United States National Herbarium, Smithsonian Institution 42: 1-144.
- FAUST, M.A., MORTON, S.L. 1995. Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). *J Phycol* 31: 456-463.
- FAUST, M.A., MORTON, S.L., QUOD, J.P. 1996. Further SEM study of marine dinoflagellates: The genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *J Phycol* 32: 1053-1065
- FRITZ, L., TRIEMER, R.E. 1985. A rapid simple technique utilizing Calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.* 21(4): 662-664.

- FUKUYO, Y. 1981. Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47(8): 967-987.
- GRANÉLI, E., FERREIRA, C.E.L., YASUMOTO, T., GONZALEZ RODRIGUEZ, E., BAETA NEVES, M.H.C. 2002. Sea urchins poisoning by the benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on the Brazilian coast. In: Abstracts of the X International Conference on Harmful Algae, 2002, Florida, USA.
- GUILLARD, R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of Marine Invertebrate Animals edited by W.L. Smith, M.H. Chanley. Plenum Publishing, New York. pp. 29-60.
- GUILLOUA, L., NÉZAN, E., CUEFF, V., DENN, E. E., CAMBON-BONAVITA, M., GENTIEN, P., BARBIER, G. 2002. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French Coasts Protist 153: 223–238.
- HILLIS, D.M., DIXON, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol 66: 411-453.
- KODAMA, M., HOKAMA, Y., YASUMOTO, T., FUKUI, M., MANEA, S.J., SUTHERLAND, N. 1989. Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as a cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macromosa* (mackerel). Toxicon 27: 1051-1053.
- LARSEN, A., MEDLIN, K.L. 1997. Inter- and intraspecific genetic variation in Twelve *Prymaesium* (Haptophyceae) clones J. Phycol. 33:1007-1015.
- LENOIR, S., TEN-HAGE, L., TURQUET, J., QUOD, J.P., BERNARD, C., HENNION, M.C. 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. J. Phycol. 40: 1042-1051.

- LILLY, E.L. HALANYCH, K.M., ANDERSON, D.M. 2007. Species boundaries and global biogeography of the alexandrium tamarense complex (Dinophyceae). J Phycol 43: 1329–1338.
- MANGIALAJO, L., BERTOLOTTO, R., CATTANEO-VIETTI, M., CHIANTORE, M., GRILLO, C., LEMEE, R., MELCHIORRE, N., MORETTO, P., POVERO P, RUGGIERI, N. 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. Marine Mindell, D. P. Pollution Bulletin 56: 1209–1214
- MINDELL, D. P., HONEYCUTT, R. L. 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic implications. Annu Rev Ecol Syst 21: 541-566, 1990.
- NASCIMENTO, S.M. 2006. Epiphytic dinoflagellates from the Brazilian coastline. In: Abstracts of the 12th International Conference on Harmful Algae, 2006, Copenhagen, Denmark.
- NASCIMENTO, S.M., MONTEIRO, P.O., CORREA, E.V., FERREIRA, C. E. L., Gonzalez-Rodriguez, E. 2007. Abundância de *Prorocentrum lima* e *Ostreopsis ovata* (Dinophyta) na costa leste do Rio de Janeiro. In: Resumos do XII Congresso Latino Americano de Ciências do Mar, 2007, Florianópolis, Brasil.
- NORRIS, D.R., BOMBER, J.W., BALECH, E. 1985. Benthic dinoflagellate associated with ciguatera from the Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov. In: Toxic Dinoflagellates edited by D.M. Anderson, A.W. White, D.G. Baden. Elsevier Scientific, New York. pp. 39-44.
- ODEBRECHT, C., AZEVEDO, S.M.F., GARCIA, V.L.M., HUSZAR, V.L.M., PROENÇA, L.A.O., RÖRIG, L.R., TENENBAUM, D.R., VILLAC, M.C., YUNES, J.S. 2002. Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso. In: Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur

- Americano editado por E. Sar, M. Ferrario, B. Reguera. Editora del Instituto Español de Oceanografía. pp. 219-233.
- 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.
- ONUMA, Y., SATAKE, M., UKENA, T., ROUX, J., CHANTEAU, S., RASOLOFONIRINA, N., RATSIMALOTO, M., NAOKI, H., YASUMOTO, T. 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 37: 55-65.
- PACE, N. R., OLSEN, G. J., WOESE, C. R. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45: 325-326.
- PENNA, A., VILA, M., FRAGA, S., GIACOBBE, M.G., ANDREANI, F., RIOBÓ, P., VERNESI, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *Journal of Phycology* 41: 212–225.
- PIN, L.C., TEEN, L.P., AHMAD, A., USUP, G. 2001. Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Mar Biotechnol* 3: 246-255.
- QUOD, J.P. 1994. *Ostreopsis mascarensis* sp. nov. (Dinophyceae), dinoflagelle toxiques associe a la ciguatera dans l’Ocean Indien. *Cryptogamie Algol.* 15(4): 243-251.

- RHODES, L., TOWERS, N., BRIGGS, L., MUNDAY, R., ADAMSON, J. 2002. Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). N. Z. J. Mar. Fresh water. Res. 36: 631–636.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. 3 vol. Cold Spring Harbour Laboratories press, New York.
- SCHMIDT, J. 1901. Preliminary report of the botanical results of the Danish Expedition to Siam (1899-1900). IV, Peridiniales. Bot. Tidsskrift. 24: 212-221.
- SCHOLIN, C.A., D.M. ANDERSON. 1994. Identification of species and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSU rRNA genes. Journal of Phycology 30: 744-754.
- STEIDINGER, D.A. 1990. Species of the *tamarensis/catenella* group of *Gonyaulax* and the fucoxanthin derivative-containing gymnodinioids. In: Toxic Marine Phytoplankton: Proceedings of the 4th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, edited by E. Graneli, B. Sundström, L. Edler, D.M. Anderson. Elsevier, New York. pp 11-16.
- STEIDINGER, K.A., TANGEN, K., 1997. Dinoflagellates. In: Identifying Marine Phytoplankton edited by C.R. Thomas. Academic Press, New York. pp. 387-584.
- TAYLOR, F.J.R., FUKUYO, Y., LARSEN, J., HALLEGRAEFF, G.M. 2003. Taxonomy of harmful dinoflagellates. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Edited by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella, A.D. UNESCO, Paris. pp. 389-432.
- TURMEL, M., BOULANGER, J., SCHNARE, M.N., GRAY, M.W., LEMIEUX, C. 1991. Six group I introns and three internal transcribed spacers in the chloroplast

- large subunit ribosomal RNA gene of the green alga *Chlamydomonas eugametos* Journal of Molecular Biology. 218(2): 293-311.
- UKENA, T., SATAKE, M., USAMI, M., OSHIMA, Y., NOAKI, H., FUJITA, T., KAN, Y. 2002. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analogue isolated from dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. Biosci Biotech Biochem 65: 2585-2588.
- UKENA, T., SATAKE, M., USAMI, M., OSHIMA, Y., FUJITA, T., NOAKI, H. YASUMOTO, T. 2002. Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision induced dissociation tandem mass spectrometric methods. Rapid Commun. Mass Spectrom. 16: 1387–1393.
- USAMI, M., SATAKE, M., ISHIDA, S. 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. J AmChem Soc 117: 5389-5390.
- VILA, M., GARCÉS, E., MASÒ, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. Aquat. Microbiol. Ecol. 26: 51–60.

ANEXO 1 - Matriz construída a partir de 32 seqüências, onde aquelas que são idênticas estão representadas por apenas um táxon (tabela 1). *C. monotis* não está incluso por ter apenas 20% de identidade com o gênero *Ostreopsis*.

		10	20	30	40	50	60	70	80
AJ491335	Ocfsiam	TTTGTGAATGTTACCATGCTGAGTTTGTGTGTGACATGCATGTAAACAGCTTCACTATAAGTTTGCATATCTGATCTG							
AF076218	Osiam (?)	TTTGTGAATAATGTGCGTGTAAATGATGCTTGGTGACATGCACCTT	----	GTGTAGCATGACCTTATGATACTGATCTG					
AF076217	Olent (?)	TTTGTGAACAATGCTCGTGTAAATGATGCTTGGTGCCACACACTT	----	GTGTAGCATGATCTTATGATACTGATCTG					
AF218456	Ova	TTTGTGAACAATGCTCGTGTAAATGATGCTTGGTGCCACACACTT	----	GTGTAGCATGATCTTATGATACTGATCTG					
AF218459	Ova	TTTGTGAATAATGTGCGTGTAAATGATGCTTGGTGACATGCACCTT	----	GTGTAGCATGACCTTATGATACTGATCTG					
AF218464	Ova	TTTGTGAATAATGTGCGTGTAAATGATGCTTGGTGACATGCACCTT	----	GTGTAGCATGACCTTATGATACTGATCTG					
AF218463	Ova	TTTGTGAATAATGTGCGTGTAAATGATGCTTGGTGACATGCACCTT	----	GTGTAGCATGACCTTATGATACTGATCTG					
AF218462	Ova	TTTGTGAATAATGTGCGTGTAAATGATGCTTGGTGACATGCACCTT	----	GTGTAGCATGACCTTATGATACTGATCTG					
AF218461	Ova	TTTGTGAATAATGTGCGTGTAAATGATGCTTGGTGACATGCACCTT	----	GTGTAGCATGACCTTATGATACTGATCTG					
AF218460	Ova	TTTGTGAATAATGTGCGTGTAAATGATGCTTGGTGACATGCACCTT	----	GTGTAGCATGACCTTATGATACTGATCTG					
IPSPBR-1	Ocfova	TTTGTGAACAATGCTCATGTCAATGATGCTTGGTGCCATGCACCTTGTAGTTGTAGCATGACAGCTTGATACCTTACTA							
		90	100	110	120	130	140	150	160
AJ491335	Ocfsiam	TGCTTCCCTTGACTTCATTTTGTAGTTGCGCAATGAATGCATCAATTCAAAACGATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATTAA							
AF076218	Osiam (?)	AACTCACCTAATCGACTGTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF076217	Olent (?)	TGCTTAC--A-CATCATTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF218456	Ova	TGCTTAC--A-CATCATTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF218459	Ova	AACTCACCTAATCGACTGTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF218464	Ova	AACTCACCTAATCGACTGTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF218463	Ova	AACTCGCTAATCGACTGTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF218462	Ova	AACTCACCTAATCGACTGTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF218461	Ova	AACTCACCTAATCGACTGTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
AF218460	Ova	AACTCACCTAATCGACTGTGATCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
IPSPBR-1	Ocfova	AACGCTTTTCATCAACTGCTTCTGACAGCAATGAATGCATCAATTCAAAACAATATGAAGAGTGCAGCCAAATGCAATAA							
		170	180	190	200	210	220	230	240
AJ491335	Ocfsiam	TTATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATACCTCTGGGCCATTCCCTGAGAGCATTTATT							
AF076218	Osiam (?)	TCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF076217	Olent (?)	TCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF218456	Ova	TCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF218459	Ova	TCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF218464	Ova	CCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF218463	Ova	TCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF218462	Ova	CCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF218461	Ova	CCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
AF218460	Ova	CCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
IPSPBR-1	Ocfova	TCATTGCAAAATGCAGAAATCCGTGAGTCATTTTTCTTGAATGTAGGCATGTTCTTGGGCCACCCCTAAGGACATCATTT							
		250	260	270	280	290	300	310	320
AJ491335	Ocfsiam	GTTTCAGTG--TTTCATTGCTATATATATGATGTACATCATTGGTGTGATGTATAT--GTAA--ATGTCAATTGCATTATGCTGA							
AF076218	Osiam (?)	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF076217	Olent (?)	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF218456	Ova	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF218459	Ova	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF218464	Ova	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF218463	Ova	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF218462	Ova	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF218461	Ova	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
AF218460	Ova	ACTCAGTGCTTCTTAGTTAATGTTGTGCTCCACATCATGCATTATATGTGTGTTGTGGTGATCCTTCTTTTTGCATTGA							
IPSPBR-1	Ocfova	ACTCAGTGCTCCTTTGTTAATGGTGTGCTCCACATCATGCATTATGTGTGTGTTGTGGTATACCTCTTTT--GCAGTTA							
		330							
AJ491335	Ocfsiam	CACCTTGCCAGCGGCATTTC							
AF076218	Osiam (?)	TGCAATACACTTGATGTG							
AF076217	Olent (?)	TGCA--TATTATTGCGT--TG							
AF218456	Ova	TGCAGTATGCGTGTACTTG							
AF218459	Ova	TGCAATACACTGGAATGTG							
AF218464	Ova	TGCAATACACTTGATGTG							
AF218463	Ova	TGCAATACACTTGATGTG							
AF218462	Ova	TGCAATACACTGGTATGGG							
AF218461	Ova	TGCAATACACTGGTATGGG							
AF218460	Ova	TGCAATACACTGGTATGGG							
IPSPBR-1	Ocfova	TGCAATACACTTCGTTTG							

COMPOSTOS COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA

ABSTRACT

Marine dinoflagellates produce numerous forms of toxins (phycotoxins) involved in red tide blooms, fish mortality and human intoxication events. Some of them were characterized towards their biological activity and chemical structure, like okadaic acid, saxitoxin, maitotoxin, yessotoxin and palitoxin. Benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* and several species produce phycotoxins that include palytoxin and analogues.

This study reports on two strains of *Ostreopsis* cf *ovata* isolate from samples collected on North Coast of São Paulo State were studied by hemolytic activity. Through by mouse erythrocytes assay we verified that synthesize hemolytic compounds doesn't inhibited by ouabain. However, mass spectrometry of polar extract shows compounds with similar molecular mass of palytoxin. These compounds were characterized through hemolytic tests and structural analysis by mass spectrometry techniques that did not show palytoxin presence in the extracts studied.

RESUMO

Dinoflagelados marinhos produzem metabólitos secundários conhecidos como ficotoxinas, envolvidas em florações, mortandade de peixes e intoxicações de seres humanos, devido ao consumo de mariscos contaminados. Várias dessas substâncias já estão caracterizadas quanto a sua função biológica e estrutura química, como o ácido ocadáico, a saxitoxina, a maitotoxina, a iessotoxina, a palitoxina entre outros. A produção de palitoxina está associada ao gênero *Ostreopsis*, dinoflagelado presente em regiões tropicais e subtropicais.

Duas cepas de *O. cf ovata*, isoladas do litoral Norte de São Paulo, foram estudadas quanto a sua produção de substâncias com atividade hemolítica. Através de bioensaios com eritrócitos de camundongo verificamos a presença de compostos hemolíticos que não tiveram sua atividade inibida pela ouabaína. No entanto, foram caracterizados através de técnicas de espectrometria de massa e mostrou compostos com massas muito próximas daquelas apresentadas para palitoxina, entretanto não confirmaram sua presença.

Nossos dados comprovam a presença de compostos hemolíticos nas cepas estudadas, mas não as relaciona conclusivamente com palitoxina e seus análogos.

INTRODUÇÃO

Um número expressivo de microalgas marinhas produz metabólitos secundários tóxicos, (ficotoxinas), que têm atraído a atenção dos pesquisadores devido ao seu envolvimento com intoxicações humanas e como potenciais fonte de novas drogas (Shimizu, 2003). As condições que desencadeiam a produção dessas toxinas e a ocorrência de espécies tóxicas não são totalmente conhecidas.

Muitos desses metabólitos têm estruturas químicas sem precedentes em organismos terrestres e exibem interessantes atividades biológicas. Entre as microalgas, os dinoflagelados apresentam um interesse particular pela diversidade de compostos que produzem, incluindo heterociclos, macrolídeos, cadeias carbônicas altamente oxigenadas, além de muitos outros. Grande parte deles apresenta atividades farmacológicas altamente específicas (Yasumoto e Murata, 1993; Satake, 2006).

Dentre os compostos conhecidos e estudados, produzidos por dinoflagelados, estão o ácido ocadáico, a saxitoxina, a maitotoxina, a iessotoxina e a palitoxina, que possuem estrutura química e função fisiológica muito diversificada (Daranas *et al.*, 2001).

A palitoxina ($C_{129}H_{223}N_3O_{54}$), das mais potentes toxinas marinhas conhecidas (Moore e Scheuer, 1971; Lenoir *et al.*, 2004) e capaz também de promover tumores de pele (Wattenberg, 2007) é um complexo poliéter que, juntamente com seus análogos, são sintetizados por algumas espécies de dinoflagelados bentônicos do gênero *Ostreopsis* (Mercado *et al.*, 1994; Meunier *et al.*, 1997, Aligizaki *et al.*, 2008).

Análogos de palitoxina já foram encontrados em cepas de *O. mascarensis* (Lenoir *et al.*, 2004), *O. siamensis* (Usami *et al.*, 1995, Ukena *et al.*, 2001, 2002, Rhodes *et al.*, 2002) e *O. ovata* isoladas do Mediterrâneo e litoral fluminense

brasileiro (Penna *et al.*, 2005) e da Costa da Itália (Ciminiello *et al.*, 2006). No Brasil, florações de *Ostreopsis ovata* ocorridas na região de Arraial do Cabo e produtoras desses compostos, foram associadas à morte de ouriços marinhos (*Echinometra lucunter*) (Granéli, *et al.*, 2002).

A palitoxina que provoca uma potente ação hemolítica aumentando a permeabilidade da membrana de células de vertebrados (Herbermann *et al.*, 1981), é inibida especificamente pelo glicosídeo ouabaína que se liga à bomba de sódio, no mesmo sítio que a palitoxina (Habermann e Chhatwal, 1982). Baseando-se nesses efeitos, Bignami (1993) criou um protocolo avançado para a detecção da atividade hemolítica da palitoxina, em eritrócitos de mamíferos, o qual vem sendo utilizado para a identificação indireta de palitoxina em extratos de invertebrados e vertebrados (Gleibs e Mebs, 1999; Taniyama *et al.*, 2001, 2002, 2003).

O Laboratório de Produtos Naturais Marinhos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo utiliza, entre outros testes, o ensaio hemolítico para a varredura de atividade biológica de organismos marinhos. As cepas do dinoflagelado *O. ovata* isoladas de amostras coletadas no litoral Norte do Estado de São Paulo, foram submetidas à extração de compostos ativos e seus extratos foram testados quanto à atividade hemolítica. Este ensaio é uma excelente ferramenta para estimar a toxicidade de amostras, entretanto não descarta a necessidade do emprego de técnicas químicas para definir o perfil da toxina. Para esse fim, ou seja, para caracterizar o composto hemolítico, utilizamos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance liquid chromatography – HPLC) e a espectrometria de massas.

OBJETIVO

Isolar e identificar compostos com atividade hemolítica presentes em extratos de amostras do dinoflagelado *Ostreopsis* cf. *ovata* coletadas no litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultivo e preparação do extrato

Duas culturas do dinoflagelado *Ostreopsis* sp. foram estabelecidas a partir do isolamento de células epífitas da feofíceia *Sargassum filipendula* coletadas em São Sebastião, SP, em outubro de 2007. Cada cultura foi iniciada a partir de uma única célula isolada e estabelecida pelo crescimento vegetativo subsequente. As condições de isolamento e manutenção no banco de culturas, etapas executadas pelo Instituto de Pesca de Santos, foram: Guillard f/2 (Guillard, 1975), salinidade 32, temperatura de 21 ± 1 °C, fotoperíodo 12:12h claro:escuro.

Para a preparação dos extratos, as biomassas resultantes do cultivo de *O. cf. ovata* IPSPBR-1 e IPSPBR-3 foram concentradas por filtração em filtro de fibra de vidro (GF/C), suspendidas em metanol 80%, submetidas à sonicação (80% da potência x 15 minutos). Após esse processo, o material foi centrifugado (5.000 rpm x 15 minutos), e o sobrenadante filtrado em filtro Millipore 0,45 µm, para eliminar fibras ou tecas dos extratos. O processo de extração foi repetido e os extratos obtidos foram combinados e concentrados em rotoevaporador à 60°C. O concentrado foi submetido à partição em diclorometano/água (3:1, v/v) (modificado de Grzebyk et al. 1997). A fração em diclorometano foi seca por evaporação espontânea em baixa temperatura (-20°C) e armazenada. a fração aquosa foi liofilizada para ser utilizada nos ensaios deste trabalho.

Os métodos de extração foram os mesmos para as análises hemolíticas e para a os ensaios de busca por palitoxina.

2. Testes de atividade hemolítica

O sangue foi obtido de camundongos (Biotério de camundongos do Instituto de Biociências - USP) sacrificados por deslocamento cervical seguido de decapitação. A suspensão de eritrócitos (SE) a 0,5% (V/V) foi preparada em solução fisiológica de Krebs-Henseleit (NaCl 113mM; KH_2PO_4 1,2mM; KCl 4mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2mM; CaCl_2 2,5mM; NaHCO_3 25mM; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11,1mM) (Rangel *et al.*, 1997). Foram utilizadas, para os testes hemolíticos, multiplacas (CorningTM) de 96 cavidades, com volume total foi de 200 μL dos quais 20 μL eram constituídos pela amostra a ser testada e 180 μL correspondiam à solução de eritrócitos. Para a obtenção de hemólise total (controle positivo), foi utilizado Triton X-100 a 1% e, como controle negativo, solução fisiológica de Krebs-Henseleit. Após incubação das placas por duas horas, à temperatura ambiente, a quantificação da hemólise foi feita em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 540nm.

O teste hemolítico foi repetido com as frações obtidas no HPLC, utilizando uma solução de ouabaína (10^{-6}M) diluída em solução fisiológica. A SE foi preparada a partir de solução de ouabaína 50%, incubada à temperatura ambiente por 30 min., antes da realização do ensaio hemolítico, que teve duração de quatro a seis horas (modificado de Riobó *et al.*, 2008) .

3. Fracionamento e isolamento de compostos hemolíticos

Para o fracionamento e isolamento dos compostos hemolíticos, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) da marca Shimadzu, modelo SCL-

10A VP, constituído de duas bombas LC-10ADVP e coluna C₁₈ (ODS 4,6 x 150 mm, 5 µm, USA) monitorando a absorbância (fase reversa) com detector UV, em comprimentos de onda de 214 e 233 nm. As condições cromatográficas foram: gradiente linear de 0 a 80% de B por 50 minutos, fluxo de 1.0 1,0 mL/minuto. (Fase A, água; Fase B, acetonitrila).

Os extratos polares secos das cepas IPSPBR-1 e IPSPBR-3 foram pesados; 3 mg de cada um deles foram ressuspensos em água Milli-Q e submetidos à cromatografia no sistema acima descrito.

As frações eluídas foram coletadas a cada cinco minutos, totalizando 10 frações (Fr 1 – 10) por cromatograma. Para cada amostra, ou seja, para cada cepa, o procedimento foi repetido por 5 vezes; as frações correspondentes foram reunidas e concentradas até a eliminação do solvente e o concentrado foi ressuspendido em água Milli-Q, para os ensaios de atividade hemolítica. Algumas das frações ativas foram submetidas a novo fracionamento, gerando novas amostras que foram analisadas quanto a sua massa molecular.

5. Espectrometria de massa

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no CAT-CEPID do Instituto Butantan, com a colaboração de Clécio F. Klitzke. A técnica utilizada foi a UPLC, combinada à espectrometria de massas (UPLC-MS). A UPLC - cromatografia líquida de ultra-alta pressão (“ultra-high pressure liquid chromatography”) é uma tecnologia recente, que possibilita diminuição significativa do tempo de análise em comparação com a CLAE convencional. Esta é uma importante vantagem para a análise de extratos vegetais em programas de triagem de substâncias bioativas em extratos vegetais (Yariwake, *et al.*, 2006)

Foi utilizado um nanoACQUITY UPLC® (Waters, USA) acoplado a um Q-TOF Ultima API (Micromass, UK) com fonte nanoelectrospray e coluna capilar C18 1,7µm 100µm x100 mm (Waters, USA). As condições cromatográficas foram: gradiente linear de 0 a 80% de B por 40 minutos, fluxo de 1.1 µL/min (Fase A, água 0.1% ácido fórmico; Fase B, acetonitrila com 0.1% de ácido fórmico). Condições do espectrômetro de massas: capilar 3.1kV, cone 50V, MS scan de 1s entre 300-2000 *m/z*. Calibração na faixa de 80-2000*m/z* com ácido fosfórico 0,1% em água-acetonitrila 1:1.

RESULTADOS

1. Extração e fracionamento compostos hemolíticos

Os extratos polares do dinoflagelado *O. cf ovata*, cepas IPSPBR-1 e IPSPBR-3 foram fracionados em sistema HPLC de fase reversa, mostrando os perfis cromatográficos representados nas figuras 1 e 2, respectivamente. Os picos não se apresentaram bem definidos, portanto foram analisadas as frações cromatográficas indicados pelas linhas pontilhadas. As frações indicadas pelas setas (frações 6 e 7 de IPSPBR-1 e IPSPBR-3) foram submetidas a novas etapas de cromatografia gerando mais dez novas frações nomeadas de A a J.

2. Atividade hemolítica

Os extratos polares de *O. cf ovata* foram analisados quanto à sua atividade hemolítica. O extrato polar de da cepa IPSPBR-1 agiu de maneira dose-dependente (Figura 1) e a CE₅₀ foi de 0,761 mg/mL de solução de eritrócitos (SE) a 0,5%, com intervalo de confiança de 95% entre 0,731 a 0,789 mg/mL. A cepa IPSPBR-3 também

agiu de maneira dose dependente (Figura 2) com CE_{50} 0,043 mg/mL de SE a 0,5%, com intervalo de confiança de 95% entre 0,038 a 0,049 mg/mL.

Todas as amostras geradas pelo fracionamento foram testadas quanto à inibição da atividade hemolítica com ouabaína. A inibição não foi significativa a ponto de sugerir a presença de palitoxina e análogos (Tabelas 3 e 4).

As frações 6 e 7 de cada extrato foram fracionadas segundo a mesma metodologia descrita e oito amostras foram analisadas por espectrometria de massa. Foram apresentados apenas os cromatogramas de Ova1-6E e Ova1-7F, que apresentaram atividade hemolítica > 40% (Figuras 6 e 7). As demais amostras (Ova1-6F, Ova1-7E, Ova3-6E, Ova3-6F, Ova3-7E, Ova3-7F) tiveram suas massas e tempos de retenção compilados na Tabela 5.

Figura 1. Curva concentração-resposta da atividade hemolítica do extrato polar de *Ostreopsis cf ovata* cepa IPSPBR-1 em eritrócitos de camundongo. Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média dos experimentos (n=4).

Figura 2. Curva concentração-resposta da atividade hemolítica do extrato polar de *Ostreopsis cf ovata* cepa IPSPBR-3 em eritrócitos de camundongo. Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média dos experimentos (n=4).

Figura 3. Cromatograma do extrato polar de *Ostreopsis cf ovata* IPSPBR-1. As linhas pontilhadas mostram onde foram separadas as frações 1-10 e as setas indicam as frações que foram 'recromatografadas'. 214 nm (azul), 233 nm (vermelho).

Figura 4. Cromatograma do extrato polar de *Ostreopsis cf ovata* IPSPBR-3. As linhas pontilhadas mostram onde foram separadas as frações 1-10 e as setas indicam as frações que foram 'recromatografadas'. 214 nm (azul), 233 nm (vermelho).

Tabela 1. Atividade hemolítica e concentração de cada fração da cepa IPSPBR-1 de *O. ovata*, fracionada em cromatografia líquida de alta eficiência. NT – frações não testadas.

Frações IPSPBR-1	Concentração (mg/mL)	% hemólise
1	3,6	NT
2	0,13	NT
3	0,14	NT
4	0,15	NT
5	0,14	NT
6	0,15	97,98
7	0,15	100,0
8	0,10	100,0
9	0,13	42,65
10	0,10	49,0

Tabela 2. Atividade hemolítica e concentração de cada fração da cepa IPSPBR-3 de *O. ovata*, fracionada em cromatografia líquida de alta eficiência.

Frações IPSPBR-3	Concentração (mg/mL)	% hemólise
1	2,25	46,64
2	0,3	57,95
3	0,4	14,84
4	0,2	100,0
5	0,3	100,0
6	0,3	100,0
7	0,3	100,0
8	0,4	100,0
9	0,15	71,38
10	0,15	86,92

Tabela 3. Inibição da atividade hemolítica utilizando ouabaína para as frações da cepa IPSPBR-3 de *O. ovata*. Apresentamos somente as frações que obtiveram atividade hemolítica > 10%.

Frações IPSPBR-1	% hemólise sem ouabaina	% hemólise com ouabaina	% inibição
4	94,68	96,11	0
5	64,37	72,57	3,0
6	94,09	91,24	3,0
7	95,47	92,80	0
8	51,38	62,06	0

Tabela 4. Inibição da atividade hemolítica utilizando ouabaína para as frações cepa IPSPBR-3 de *O. ovata*. Apresentamos somente as frações que obtiveram atividade hemolítica > 10%.

Frações IPSPBR-3	% hemólise sem ouabaina	% hemólise com ouabaina	% inibição
4	36,63	31,27	15,0
5	100	91,76	8,0
6	100	92,88	7,0
7	100	92,70	7,0
8	100	89,14	11,0

Tabela 5. Amostras geradas depois de cada fracionamento, mostrando que as frações 6 e 7 de cada extrato foram escolhidas para novo fracionamento, gerando as amostras de A a J, das quais E e F foram utilizadas para análise de espectrometria de massa.

IPSPBR-1					
Frações geradas	1 a 7	Fração 6	Frações geradas	ABCDEFGH IJ	Ova1- 6E Ova1- 6F
		Fração 7		ABCDEFGH IJ	Ova1- 7E Ova1- 7F
IPSPBR-3					
Frações geradas	1 a 7	Fração 6	Frações geradas	ABCDEFGH IJ	Ova3- 6E Ova3- 6F
		Fração 7		ABCDEFGH IJ	Ova3- 7E Ova3- 7F

3. Espectrometria de massa

O espectro de massas obtido por UPLC-MS do composto existente no extrato polar de *O. cf ovata* IPSPBR-1 está apresentado na figura 5, enquanto que os cromatogramas e os espectros de massas obtidos das frações dos extratos polares IPSPBR-1 e IPSPBR-3 estão mostrados nas figuras 6 e 7. Os tempos de retenção e as massas relativas aos cromatogramas e respectivos espectros das demais frações foram compilados na Tabela 6.

A figura 5, espectro de massas de IPSPBR-1, mostra uma seqüência de íons duplamente carregados $[M+2H]^{+2}$ com massas m/z 987,61; 996,13; 1005,12; 1337,88; 1346,87; 1354,36; e 1362,37.

O cromatograma da amostra Ova1-6E apresenta dois picos (eluídos a 15,52 e 17,89 minutos), obtidos por UPLC acoplado a Q-TOF (Figura 6). O primeiro (15,52 min) está relacionado ao íon monocarregado de massa m/z 716,47 e o segundo (17,89 minutos), ao íon m/z 758,36, triplamente carregado ($[M+3H]^{+3} = 2273,10$).

Figura 5. Espectro de massa do extrato polar de *O. cf ovata* IPSPBR-1 mostrando íons duplamente carregados $[M+2H]^{+2}$

Figura 6. A. Cromatograma da amostra Ova1-6E. **B.** Espectro associado ao pico eluido a 15,52 min. **C.** Espectro associado ao pico eluido a 17,89 min.

Figura 7. A. Cromatograma da amostra Ova1-7F. **B.** Espectro associado ao pico eluído a 23,66 min. **C.** Espectro associado ao pico eluído a 24,66 min.

Tabela 4. Tempos de retenção e respectivas massas moleculares dos picos mais proeminentes do perfil cromatográfico das amostras 'recromatografadas'.

Amostra	Tempo de retenção (min)	Massa molecular m/z
Ova1-6E	15,5	758,36 (2+)
	18,0	716,47
Ova1-6F	13,0	652,40
	24,2	732,55
Ova1-7E	17,0	716,47
Ova1-7F	22,8	674,61
	24,3	534,33
	24,3	846,58
Ova3-6E	21,6	616,56
	23,8	674,46
Ova3-6F	22,8	674,62
	23,4	600,41
Ova3-7E	22,6	674,57
	23,8	674,44
Ova3-7F	12,8	862,55
	12,8	864,58

DISCUSSÃO

O extrato polar obtido das duas cepas de *O. cf ovata* IPSPBR-1 e IPSPBR-3 isolados de amostras coletadas no litoral Norte do Estado de São Paulo apresentou atividade hemolítica (Figuras 3 e 4). O estudo por espectrometria de massas dos compostos que compõem essas amostras mostrou uma seqüência de íons duplamente carregados - m/z 987,61; 996,13; 1005,12; 1337,88; 1346,87; 1354,36; e 1362,37 (Figura 5) com massas próximas às das seqüências de íons duplamente carregados, característicos dos espectros de massas da palitoxina e da ovatoxina-a, e que foram selecionadas para monitorar a presença dessas duas toxinas, em amostras planctônicas, por Ciminiello *et al.*, (2008). Esse dado sugere que o composto em estudo possa ter massa próxima à da palitoxina (aproximadamente 2600 daltons, Uemura *et al.*, 1981) e ser um seu análogo, o que poderia ser confirmado pela presença do íon de massa m/z 327,1 e também do grupo dos íons triplamente carregados, todos característicos dessas substâncias. Entretanto, o espectro não mostra a região entre m/z 300 e 900, tornando a análise espectrográfica inconclusiva.

Como demonstrado no Capítulo 2 deste trabalho, ambos os espécimes são geneticamente idênticos. Entretanto, IPSPBR-1 apresentou atividade hemolítica (CE_{50} 0,76 mg/mL) dezessete vezes maior do que o valor da atividade de IPSPBR-3. Apesar disso, esses valores são menores dos que os obtidos para o extrato metanólico de *O. mascarenensis*, que foi de 25 mg/mL (Lenoir *et al.*, 2004).

Segundo Skulberg (2000), o nível da produção de certas substâncias ativas será influenciado pela disponibilidade de precursores e atividade de enzimas específicas. A variação na biossíntese de metabolitos secundários é influenciada pela origem e tipo de clone da qual a espécie é iniciada, assim como as condições

de cultivo. Conhecendo que nossos cultivos foram estabelecidos separadamente a partir de uma única célula com condições de cultivo similares, podemos dizer que todos esses fatores influenciaram de alguma forma na produção dos compostos hemolíticos.

Habermann e Chhatwal (1982) mostram que o efeito da inibição da palitoxina, depende da concentração da e duração do contato da ouabaína com os eritrócitos. Apesar de utilizar concentrações e tempos de incubação descritos na literatura, a atividade hemolítica das frações ativas dos extratos polares não foi inibida pela ouabaína, antagonista da palitoxina (Tabelas 3 e 4).

As frações 6 e 7 de cada extrato (hemólise > 90%), quando repurificadas, geraram amostras formadas ainda por vários compostos e apresentando atividade hemolítica (Figura 6 e 7). Nesse caso, as massas dessas substâncias estão ao redor de 700 daltons, bastante distintas das massas atribuídas à palitoxina e aos seus análogos.

Na literatura, todos os *Ostreopsis* são apontados como potencialmente tóxicos, entretanto poucos têm sido identificados, realmente, como produtores de toxinas. Esse trabalho mostra cepas de *O. cf ovata* isoladas de amostras coletadas no litoral de São Paulo como fonte de compostos hemolíticos. Entretanto, não foi possível associar esses compostos à palitoxina e análogos, devido ao resultado negativo dos testes com ouabaína e à falta de dados sobre a sua estrutura química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIGIZAKI, K., KATIKOU, P., NIKOLAIDIS, G., PANOU, A. 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon*. 51(3): 418-27.
- ANDERSON, W.G., ALI, M.F., EINARSDOTTIR, I.E., SCHAFFER, L., HAZON, N., CONLON, J.M., 2002. Purification, characterization and biological activity of insulin from the spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula*, and the hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126: 113- 122.
- BIGNAMI, G.S. 1993. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 31: 817-820.
- CIMINIELLO, P., DELL'AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., MAGNO, G.S., TARTAGLIONE, L., GRILLO, C., MELCHIORRE, N. 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal Chem* 78(17): 6153-9.
- DARANAS, A.H., NORTE, M. AND FERNANDEZ, J.J. 2001. Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101-1132.
- GLEIBS, S., MEBS, D. 1999. Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* 37: 1521-1527.
- GRANÉLI, E., FERREIRA, C.E.L., YASUMOTO, T., GONZALEZ RODRIGUEZ, E., BAETA NEVES, M.H.C. 2002. Sea urchins poisoning by the benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on the Brazilian coast. In: Abstracts of the X International Conference on Harmful Algae, 2002, Florida, USA.
- GRZEBYK, D., DENARBOU, A., BERLAND, B., POUCHUS, Y.F. 1997. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J Plankton Research* 19 (8): 1111-1124.

- GUILLARD, R.R.L 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of marine invertebrate animals, edited by W.L. Smith and M.H. Chanley. Plenum Press, New York. pp. 29-60.
- HABERMANN, E., AHNET-HILGER, G., CHHATWAL, G.S., BERESS, L., 1981. Delayed hemolytic action of palytoxin. General characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* 649: 481–486.
- HABERMANN, E., CHHATWAL, G.S. 1982. Ouabain inhibits the increase due to Palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 319: 101-107.
- LENOIR, S., TEN-HAGE, L., TURQUET, J., QUOD, J.P., BERNARD, C., HENNION, M.C. 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. *J. Phycol.* 40: 1042-1051.
- MERCADO, J.A., VIERA, M., ECALONA DE MOTTA, G., TOSTESON, T.R., GONZALEZ, I., SILVA, W. 1994. An extraction procedure modification changes the toxicity, chromatographic profile and pharmacologic action of *Ostreopsis lenticularis* extracts. *Toxicon* 32(3): 256.
- MEUNIER, F.A., MERCADO, J.A., MOLGO, J., TOSTESON, R.R., ESCALONA DE MOTTA, G., 1997. Selective depolarization of the muscle membrane in frog nerve-muscle preparation by a chromatographically purified extract of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Br J Pharmacol* 121: 1224-1230.
- MOORE, R. E., SCHEUER, P. J. 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 172: 495–8.
- PENNA, A., VILA, M., FRAGA, S., GIACOBBE, M.G., ANDREANI, F., RIOBÓ, P., VERNESI, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae)

- isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *Journal of Phycology* 41: 212–225.
- RANGEL, M., MALPEZZI, E.L.A., SUSINI, S.M.M., FREITAS, J.C. 1997. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* 35: 305-309.
- RAO, P.V., GUPTA, N., BHASKAR, A.S., JAYARAJ, R., 2002. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *J. Environ. Biol.* 23: 215-224.
- RHODES, L., TOWERS, N., BRIGGS, L., MUNDAY, R., ADAMSON, J. 2002. Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 36: 631–6.
- RIOBÓ, P., PAZ, B., FRANCO, J.M., VÁZQUEZ, J.A., MURADO, M.A. 2008. Proposal for a simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin: Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability. *Harmful Algae* 7(4): 415-429.
- SATAKE, M. 2006. Marine polyether compounds. *Top Heterocycl Chem* 5: 21–51.
- SHIMIZU, Y. 2003. Micoralgal metabolites. *Curr Op Microb* 6: 236-243.
- SKULBERG, O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *J Appl Phycol* 12: 341-348.
- TANIYAMA, S., MAHMUD, Y., TANU, M.B., TAKATANI, T., ARAKAWA, O., NOGUCHI, T. 2001. Delayed hemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon sp.* toxin. *Toxicon* 39: 725-727.
- TANIYAMA, S., MAHMUD, Y., TERADA, M., TAKATANI, T., 2002. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus sp.* in Japan. *J. Nat. Toxins* 11: 277–282.

- TANIYAMA, S., OSAMU, A., MASAMITSU, T., SACHIO, N., TOMOHIRO, T., YAHIA, M., TAMAO, N. 2003. *Ostreopsis* sp., a Possible Origin of Palytoxin (PTX) in Parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 42: 29–33.
- UEMURA, D., NEDA, K., HIRATA, Y. 1981. Further studies on palytoxin. *Tetrahedron Lett* 22: 2781-2784.
- UKENA, T., SATAKE, M., USAMI, M., OSHIMA, Y., FUJITA, T., NOAKI, H. YASUMOTO, T. 2002. Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision induced dissociation tandem mass spectrometric methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16:1387–1393.
- UKENA, T., SATAKE, M., USAMI, M., OSHIMA, Y., NOAKI, H., FUJITA, T., KAN, Y. 2001. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analogue isolated from dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci Biotech Biochem* 65: 2585-2588.
- USAMI, M., SATAKE, M., ISHIDA, S. 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J AmChem Soc* 117: 5389-5390.
- WATTENBERG E.V. 2007 Palytoxin: exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292: C24-C32.
- WILES, J.S., VICK, J.A., CHRISTENSEN, M.K., 1974. Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon* 12: 427–433.
- YARIWAKE, J.H., PEREIRA, C. A. M., MCCULLAGH, M. 2006. Análise de extratos de *Passiflora* por UPLC (cromatografia líquida de ultra-alta pressão). In: 29^a Reunião Anual da SBQ, 2006, Águas de Lindóia, SP.
- YASUMOTO, T., MURATA, M. 1993. Marine toxins. *Chem Rev* 93: 1897-1909.

MONITORAMENTO PILOTO DE MEXILHÕES E FITOPLÂNCTON DA FAZENDA DE MARICULTURA DA PRAIA DA COCANHA, CARAGUATATUBA

ABSTRACT

The presence of phycotoxins in edible marine organisms poses serious sanitary and economic risks that may affect both developed and developing countries. The accumulation and transfer of such toxins, produced by microalgae such as dinoflagellates and diatoms, may reach humans by the consumption of contaminated fish or shellfish. The need to protect human health and the fisheries industry led to the establishment of monitoring programs to detect phytotoxins and toxic microalgae in mariculture farms worldwide. The detection and quantification of toxins are key-elements to prevent intoxication events and, therefore, bioassays and analytical methods have been developed to meet this goal.

Aiming at the establishment of a long-term monitoring program at the mussel farm at the Cocanha Beach, Caraguatatuba, a pilot study was carried out in the area from May 2005 to June 2006, period during which five sampling sites were visited once a month. Mouse bioassays for paralytic poisoning (PSP) in the mussel *Perna perna* during the whole study period showed that concentrations were below regulatory levels for consumption; negative results for the presence of saxitoxin were also confirmed by mass spectrometry. However, the presence of potentially toxic species was detected and the basis for a long-term monitoring program is proposed and highly recommended.

The activities of the pilot study also included raising awareness for the issue by fostering both community and scientific events, as well as training those directly

involved in the mariculture farm on sampling techniques. Partnership is the best way to guarantee the success of this initiative.

RESUMO

A presença de ficotoxinas em alimentos de origem marinha representa um grave problema sanitário e econômico que afeta tanto países industrializados como países em desenvolvimento. A transferência e acúmulo destas toxinas, produzidas por espécies de dinoflagelados e diatomáceas, acontece através da cadeia alimentar e algumas estão associadas à intoxicação humana através do consumo de mariscos ou peixes contaminados.

O risco à saúde pública e aos recursos pesqueiros resultou na necessidade de estabelecer programas de monitoramento de ficotoxinas e microalgas tóxicas. A detecção e quantificação de toxinas são elementos chave para a prevenção de episódios tóxicos e diagnósticos das intoxicações e para isso métodos de detecção de ficotoxinas envolvendo bioensaios e/ou métodos analíticos foram desenvolvidos.

Pensando na criação de um futuro plano de monitoramento, realizamos um plano piloto para monitorar a presença de toxinas paralisantes em mexilhões em uma área de maricultura em associação a presença de microalgas potencialmente tóxicas.

Apesar das análises de toxinas paralisantes (PSP) em bioensaios com camundongos e espectrometria de massa não terem detectado toxinas nos mexilhões em concentrações que poderiam provocar intoxicação ao homem, confirmamos o alerta quanto à presença de espécies potencialmente tóxicas no ambiente durante o período de estudo.

INTRODUÇÃO

O impacto que as florações tóxicas podem causar sobre os recursos pesqueiros e à saúde pública (Hallegraeff, 1993, Freitas 1995, Richardson, 1997) tem alcançado lugar de destaque dentro das prioridades científicas e tem recebido maior atenção dos meios de comunicação. O incremento dos estudos nessa área levou ao aumento/crescimento progressivo dos controles impostos por agências internacionais para a detecção de toxinas em mariscos. Isso resultou na necessidade de estabelecer programas de monitoramento de ficotoxinas e microalgas tóxicas (GEOHAB, 2001).

As ficotoxinas, metabólitos secundários de microalgas, compreendem uma grande diversidade de substâncias de estrutura molecular, mecanismo de ação e atividade biológica. Algumas estão associadas à intoxicação humana através do consumo de mariscos ou peixes contaminados. A presença de ficotoxinas em alimentos de origem marinha representa um grave problema sanitário e econômico que afeta tanto países industrializados como países em desenvolvimento. A transferência e acúmulo destas toxinas, produzidas por espécies de dinoflagelados e diatomáceas, acontece através da cadeia alimentar.

Baseando-se na sintomatologia das intoxicações, estas são classificadas da seguinte forma: envenenamento diarréico de marisco (DSP, “Diarrhetic shellfish poisoning”), envenenamento neurológico de marisco (NSP, “Neurotoxic shellfish poisoning”), envenenamento paralisante de marisco (PSP, “Paralytic shellfish poisoning”), envenenamento amnésico de marisco (ASP, “Amnesic shellfish poisoning”) e envenenamento por azaspirácido (AZP, “Azaspiracid poisoning”) (Tabela 1). Quanto aos organismos responsáveis por estas síndromes, o levantamento geral mais recente indicou que das ca. 5.000 espécies de microalgas marinhas descritas

na literatura mundial, 300 podem formar florações e 40 são potencialmente produtoras de ficotoxinas (Hallegraeff, 2003).

Diferentes métodos de detecção de ficotoxinas envolvem bioensaios e/ou métodos analíticos (Sullivan, 1993). Estes são freqüentemente utilizados por agências reguladoras para confirmar análise de componentes de uma toxina e, em alguns casos, certificar métodos para monitoramento de rotina. São métodos que necessitam de equipamentos específicos (HPLC, espectrometria de massa) e de alto investimento (Lee *et al.*, 1987; Quilliam, 2003; Dell'Aversano *et al.*, 2005). Já o bioensaio com camundongo é utilizado para avaliar toxicidade de amostras desconhecidas. Esse ensaio mede a resposta biológica do animal e, portanto, pode ser associado com os efeitos da toxicidade em humanos (Fernández *et al.*, 2003).

A detecção e quantificação de toxinas são elementos chave para a prevenção de episódios tóxicos e diagnósticos das intoxicações. A escolha do método a ser utilizado vai depender do objetivo a ser alcançado, mas também está sujeito aos recursos humanos e materiais disponíveis para a análise.

Tabela 1. Envenenamentos causados pelo consumo de frutos do mar contaminados, espécies potencialmente produtoras de tóxicos, toxinas envolvidas e sintomas. Adaptado de Hallegraeff (2003).

	Sintomas	Toxinas envolvidas	Organismos responsáveis
Envenenamento Paralisante por mexilhões (PSP)	Dentro de 30 min: Sensação de formigamento ou dormência ao redor dos lábios, espalhando gradualmente para a face e o pescoço; formigamento ponta dos dedos e pés; dor de cabeça, tontura, náusea, vômito e diarreia. Casos extremos: Paralisia muscular: dificuldade respiratória, sensação sufocamento, morte por paralisia respiratória pode ocorrer dentro de 2-24 horas após ingestão.	- Saxitoxina e cerca de 21 de seus derivados; alcalóide hidrossolúvel.	dinoflagelados <i>Alexandrium catenella</i> , <i>A. minutum</i> , <i>A. tamarense</i> , dentre outros <i>Alexandrium</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressa</i> .
Envenenamento Amnésico por mexilhões (ASP)	Após 3-5 horas: Náusea, vômito, diarreia, cólicas abdominais. Casos extremos: Diminuição da reação a dor profunda, tontura, alucinações, confusão, perda de memória recente.	- Ácido domóico e cerca de 8 isômeros; aminoácido hidrossolúvel.	diatomáceas <i>Pseudo-nitzschia australis</i> , <i>P. calliantha</i> , <i>P. multiseriata</i> , <i>P. multistriata</i> , <i>P. pungens</i> dentre outras <i>Pseudo-nitzschia</i> ; <i>Nitzschia navis-varingica</i>
Envenenamento Diarréico por mexilhões (DSP)	Após 30 min a poucas horas (raramente mais que 12 horas): diarreia, náusea, vômito, dor abdominal. Casos extremos: Exposição crônica pode desenvolver formação de tumor no sistema digestório	- Ácido okadaico e 2 análogos principais; poliéteres lipossolúveis.	dinoflagelados <i>Dynophysis acuminata</i> , <i>D. caudata</i> , <i>D. rotundata</i> , dentre outros <i>Dynophysis</i> ; <i>Prorocentrum lima</i> , <i>P. maculosum</i> dentre outros <i>Prorocentrum</i> .
Envenenamento Neurotóxico por mexilhões (NSP)	Após 3-6 horas: Calafrios, dor de cabeça, diarreia, fraqueza muscular, dor muscular e nas juntas, náusea e vômito. Casos extremos: Parestesia, percepção alterada de frio e calor, dificuldade respiratória, visão dupla, dificuldade para falar e engolir.	- Brevetoxinas (cerca de 23 variações); poliéteres lipossolúveis. - Concentração em aerosol do "spray" aquático.	dinoflagelados <i>Karenia brevis</i> , <i>K. papilioaëcea</i> , <i>K. selliformis</i> , <i>K. bigititata</i> cianobactéria <i>Trichodesmium</i> spp.
Envenenamento Azaspiracéico (AZP)	Similar ao DSP causa vômito, diarreia severa e cólicas estomacais.	Azaspirácido, 2 homólogos e 2 análogos; lipossolúvel.	dinoflagelado <i>Prorocentrum crassipes</i>

1. Maricultura

Maricultura é o cultivo de organismos marinhos, geralmente com fins comerciais. Visando o consumo humano, esta atividade é direcionada para espécies de algas, crustáceos, moluscos e peixes e vem anualmente crescendo em todo o mundo. O crescimento desta atividade deve-se, em parte, à queda no rendimento da atividade pesqueira artesanal, associada à necessidade de expansão na produção de alimentos. Para a população litorânea e pescadores artesanais que sofrem com o declínio dos estoques pesqueiros, principalmente em decorrência da poluição e da pesca predatória, a maricultura é uma alternativa de renda além de uma importante fonte de alimentação.

No Brasil, a produção da maricultura cresceu entre 2001 e 2005, período no qual o cultivo de mexilhão (mitilicultura) se destacou nos Estados de Santa Catarina, Espírito Santo e São Paulo (Tabela 2). Em 2005, a produção brasileira de mexilhões gerou uma renda de 11,5 milhões de dólares (FAO, 2007). O termo mexilhão engloba diversas espécies de moluscos bivalves da família Mytilidae, popularmente conhecidos como mariscos. Uma das características da mitilicultura é a rapidez do desenvolvimento dos organismos e baixos custos de investimento, pois estes moluscos bivalves se alimentam por filtração de matéria orgânica e de microalgas do próprio ambiente, sem nenhum custo adicional; podem filtrar cerca de 19 a 50 l/h com alguma ou nenhuma seletividade de partículas (Espinola *et al.*, 1980).

No litoral do Estado de São Paulo, a mitilicultura teve sua implantação mais efetiva na década de 1990 e, desde então, vem crescendo de forma planejada com o aumento de 9 a 90 produtores nos últimos 8 anos; a quase totalidade das fazendas de maricultura no litoral norte do Estado se dedica ao cultivo do mexilhão *Perna perna* através do sistema de espinhel, também conhecido como “long-line” (Gelli, 2007). Trata-se de uma

atividade ainda modesta no panorama nacional que, em 2006, foi responsável pela produção de 100 toneladas de mexilhão, o que corresponde a 0,9% da produção total de mexilhões cultivados em Santa Catarina neste período (Gelli, 2007 em comparação com EPAGRI, 2008).

Tabela 2. Produção da aquicultura marinha no Brasil entre 2001 e 2005 (IBAMA 2003, 2004a, 2004b, 2005, 2007), expressa em tonelada (t), com informações para todo o território brasileiro (total) e para os estados que apresentaram maior produção na mitilicultura no período (SC – Santa Catarina; ES – Espírito Santo; SP – São Paulo).

	Peixe/Crustáceo/Molusco*	Moluscos*	Mexilhão			
	Total (t)	Total (t)	Total (t)	SC	ES	SP
2001	52.846	12.813	11.080	10.667	300	100
2002	71.114	10.829	9.067	8.641	300	100
2003	101.003	10.807	8.609	8.133	349	101
2004	88.967	13.063	10.380	9.801	400	150
2005	78.034	14.900	12.775	12.234	370	151

* A categoria “molusco” inclui coquile, mexilhão, ostra e vieira, sem indicar os nomes científicos das espécies.

A fazenda de maricultura da Praia da Cocanha, formada por pescadores artesanais reunidos numa associação que conta hoje com 40 integrantes, é responsável pela maior produção de mexilhões do Estado de São Paulo, segunda maior do Brasil, com produção anual de cerca de 60 toneladas (Prefeitura Municipal de Caraguatatuba, 2008). O incremento ordenado da maricultura no Estado é uma realidade em andamento, com destaque para a região de Ubatuba que conta com recurso federal e apoio do Instituto de Pesca da Agência Paulista Tecnológica dos Agronegócios da Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento, dentre outras entidades (Litoral News, 2007). Nesta fase de incentivo à atividade, o monitoramento da qualidade das águas das fazendas de maricultura e a certificação sanitária do mexilhão a ser comercializado tornam-se essenciais, especialmente devido à necessidade de escoamento do produto para novos mercados que garantam que o aumento da oferta, e possível redução de preços, não inviabilizem a atividade.

3. Monitoramento

Os mexilhões são organismos filtradores e sua capacidade de bioacumulação de metais pesados entre outras substâncias é bem conhecida e descrita na literatura (Ravera e Riccardi, 1997), razão pela qual eles são freqüentemente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental. Em analogia, se espécies de microalgas produtoras de toxinas estiverem presentes, pode ocorrer um acúmulo de toxinas no tecido de bivalves cultivados, os quais poderiam servir como vetor para os demais níveis tróficos, inclusive o ser humano.

O monitoramento das microalgas em área de mitilicultura trata, portanto, de uma ferramenta fundamental para a gestão do desenvolvimento desta atividade produtiva, servindo como um alerta precoce de eventos de toxicidade. A presença da espécie-alvo, entretanto, por si só não implica em toxicidade no mexilhão. O risco de contaminação do mexilhão existe quando a densidade celular absoluta (total de células por litro) de uma espécie produtora de toxina for alta, como no caso de uma floração. Entretanto, mesmo quando não houver uma floração, existe risco de contaminação do mexilhão se a densidade celular relativa (percentual do total de células) de uma espécie produtora de toxina for dominante (Andersen e Throndsen, 2003). Em alguns países a intensificação do monitoramento (estado de alerta) deve acontecer quando o número de células de uma espécie-alvo atinge um determinado patamar, o que varia de espécie para espécie (exemplos em Anderson *et al.*, 2001).

O termo monitoramento pode ser definido como a observação sistemática de parâmetros relacionados a um problema específico. Monitorar significa: a) informar acerca do comportamento desses parâmetros ao longo do tempo, fornecendo subsídios para a solução do problema; e b) avaliar a dinâmica do sistema em questão em um dado

momento (diagnostico), atuando como um alarme com relacao a situacoes criticas. (MIT, 1970).

A estrutura de um programa de monitoramento deve ser simples para facilitar o rápido fluxo de informações. Os elementos básicos deste programa incluem observações ambientais (plâncton, morte peixes e comportamento animal), amostragem de plâncton, mariscos ou peixes, análise das amostras (identificação e quantificação das microalgas, verificação/quantificação da toxicidade no marisco ou peixe), avaliação dos resultados, disseminação de informações e implementação de ação regulatória e planos de ação (Figura 1).

A partir dessas informações realizamos um levantamento de dados sobre a presença de toxinas e fitoplâncton potencialmente tóxico em uma maricultura. Esse trabalho teve o apoio do CAT CEPID – Butantan/FAPESP, Universidade de Taubaté, CETESB, Prefeitura de Caraguatatuba, Instituto de Pesca e Ministério da Agricultura. A meta foi alertar os produtores e consumidores sobre uma possível contaminação do mexilhão, como proceder caso isso aconteça e a importância de se estabelecer um monitoramento de rotina.

Figura 1. Modelo dos elementos básicos para realização de monitoramento (Adaptado de Andersen, 1996).

OBJETIVO

Monitorar a presença de toxinas paralisantes em mexilhões em uma área de maricultura em associação a presença de microalgas potencialmente tóxicas para subsidiar a criação de um futuro plano de monitoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Área de estudo

As balsas de maricultura localizam-se próximas à Ilha da Cocanha e Ilha da Cocanha de Fora (Figura 2) com profundidade local por volta de 5m, onde o mexilhão *Perna perna* é cultivado pela técnica de “long-line” (Figura 3). As redes mexilhoneiras se estendem da superfície até cerca de 3 m de profundidade.

O trabalho de campo foi realizado no período entre junho de 2005 e maio de 2006. Nesta fase de estudo piloto, optamos por intensificar a amostragem espacial e manter a frequência de coleta mensal. Uma vez determinada a maior ou menor

homogeneidade espacial, poderemos diminuir (ou não) o número de pontos de coleta e intensificar a periodicidade de coleta.

2. Coleta, preparação das amostras de mexilhões e bioensaio

A partir de amostras mensais de mexilhões retirados da maricultura, realizamos análise de Veneno Paralisante de Moluscos (PSP). A extração e preparação da amostra são baseadas no método de Sommers, padronizado pelo AOAC (1990).

Em cada dia de amostragem, cerca de 15-20 mexilhões de tamanho médio (135gr, peso bruto) foram manualmente coletados das cordas dos pontos Careca, Alemão e ZéluiZ para análise de toxinas PSP em laboratório. Os mexilhões foram lavados em água corrente para a retirada de sedimentos e seccionamos os músculos adutores para abrí-los. Foram lavados novamente e, com auxílio de um bisturi ou faca, toda a carne foi retirada e drenada em uma peneira; o procedimento foi repetido com outros indivíduos até a obtenção de 150g de material. O material foi homogeneizado até obter-se uma pasta.

A extração de toxinas paralisantes (PSP) foi realizada a partir de 100 g do material homogeneizado em um becker de 250 mL. Adicionamos 100 mL de HCl 0,1N e, quando necessário, o pH foi corrigido com HCl 5N para ficar entre 2,5 e 4. A mistura foi aquecida até ferver por 5 min e resfriada em temperatura ambiente. O pH foi verificado e ajustado entre 2,5 – 4, quando necessário e o volume foi ajustado para 200 mL com água ácida (pH 4,0). O extrato foi centrifugado a 3000 rpm por 3 min e 5 mL do sobrenadante foi separado para a realização dos bioensaios

Figura 2. Localização da área de estudo. Os pontos de coleta estão indicados em vermelho: Alemão, Careca, ZeluizA, ZeluizB e ZeluizC (em homenagem a alguns dos maricultores responsáveis pelos cultivos). Linha pontilhada: limite aproximado do polígono onde as balsas estão localizadas.

Selecionamos camundongos machos (tipo Suíço) com peso entre 18 e 22g, provenientes do biotério do IB USP. Os animais foram mantidos em gaiolas separadas, a uma temperatura de 25° C, com comida e água a disposição por um período de 24 horas. Em cada animal, foi injetado, intraperitonalmente, 1 ml de cada um dos diferentes extratos e observamos o surgimento ou não de sinais clínicos correspondentes ao envenenamento paralisante: falta de coordenação do corpo, saltos, respiração profunda, paralisia e morte, durante cinco a sete minutos. Após esse período o animal foi colocado de volta nas gaiolas com comida e água e observados por 24 horas. O experimento foi repetido três vezes.

Segundo o método original, os resultados podem ser expressos em unidades camundongo UM (mice unity) determinadas pela tabela de Sommers.

Figura 3. Cultivo tipo espinhel, ou “long-line”, do mexilhão *Perna perna* na praia da Cocanha, Caraguatatuba: (a) flutuadores na superfície; (b) rede mexilhoneira presa ao flutuador sendo retirada da água; (c) mexilhão *Perna perna*.

3. Fitoplâncton e parâmetros ambientais

Dois tipos de amostragem foram realizados mensalmente nos 5 pontos de coleta: 1) coluna d’água integrada (mangueira de 3 m) e 2) arrasto vertical entre 3m e a superfície (rede de fitoplâncton com malha de 20 μ m). As amostras de mangueira foram imediatamente fixadas com formaldeído neutralizado com bórax (concentração final de 2%) e as de rede com glutaraldeído (concentração final de 2%).

A análise quali e quantitativa absoluta (expressa em células por litro) das amostras coletadas com mangueira foi realizada pelo método de sedimentação (Utermöhl, 1958), utilizando-se cubetas de 50-100ml e microscópio invertido com aumento final de 200X. A rede, apesar de ser um coletor seletivo, concentra o material e permite a detecção de espécies raras que não são encontradas nas amostras de mangueira. Cerca de 1-2ml das amostras de rede foram analisadas em cubetas do tipo de sedimentação em microscópio invertido com aumento final de 200X.

A análise da composição do fitoplâncton foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade de Taubaté por Thatiana de Oliveira Pinto, sob orientação Maria Célia Villac (Apoio: Biota FAPESP Proc. 02/13725-9) e os resultados estão parcialmente disponíveis em Pinto (2006), Pinto *et al.* (2006) e Pinto *et al.* (2008).

Em todos os pontos de coleta, foram retiradas amostras de água com balde na superfície, assim como com garrafa de Van Dorn a 2m e 4m de profundidade, para a medição *in situ* da temperatura por um termômetro de coluna de mercúrio e da salinidade por meio de um refratômetro óptico ATAGO. Concomitantemente, a CETESB realizou subamostragem da garrafa de Van Dorn para estudo bacteriológico, a saber: *Escherichia coli* termotolerante e enterococos, utilizando o método de análise de membrana filtrante (APHA, 1999).

RESULTADOS

1. Análise dos bioensaios com extrato de mexilhões

Durante o período de teste, além da morte, os animais foram observados em relação aos seguintes sintomas: alterações na pele, pêlo, olhos e respiração,

ocorrência de diarreias, salivação, convulsão, letargia. Não foi observada a morte e nenhum dos sintomas mencionados nos animais inoculados.

Tanto nos bioensaios, como nas análises por espectrometria de massa, não foram detectadas toxinas em concentrações que poderiam provocar intoxicação ao homem. Boletins mensais com os resultados e comentários sucintos foram emitidos e encaminhados para todos os participantes do projeto (exemplo no Anexo 1).

2. Análise do fitoplâncton e parâmetros ambientais

A temperatura do ar nos dias de coleta variou de 18°C a 28°C e a pluviosidade no período de estudo acompanhou os padrões climatológicos típicos da região, ou seja, menores valores de precipitação nos meses de outono e inverno (30-150mm) e valores máximos no período de primavera e verão (por volta de 300mm) - com base em informações da estação climatológica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) mais próxima à área de estudo - Ubatuba (www.inmet.gov.br).

As condições hidrológicas no período de estudo demonstraram que a fazenda de maricultura da Praia da Cocanha está localizada em uma área espacialmente homogênea com relação à temperatura da água do mar e à salinidade. Não houve diferença entre os pontos de coleta, nem entre superfície e fundo, os valores medidos foram exatamente os mesmos. A temperatura da água variou entre 23°C e 29°C e a salinidade variou entre 34 e 36, seguindo a sazonalidade da região de verão quente e chuvoso e inverno mais frio e menos úmido.

A análise da composição dos organismos do fitoplâncton também refletiu esta homogeneidade espacial e revelou a presença de 123 táxons dentre diatomáceas (85), dinoflagelados (33), silicoflagelados (2), eibriideas (2) e 1 cianobactéria. As

espécies potencialmente produtoras de ficotoxinas (comparar com Tabela 2) foram: *Pseudo-nitzschia* spp. (*Pseudo-nitzschia pungens*, *Pseudo-nitzschia* cf. *fraudulenta*, *Pseudo-nitzschia* cf. *delicatissima*, dentre outras não identificadas), *Dinophysis caudata*, *Dinophysis rotundata* e *Gymnodinium* cf. *catenatum*. As concentrações celulares mais altas de *D. rotundata* e de *D. caudata* detectadas durante o período de estudo foram inferiores a 10^3 células/L e *Gymnodinium* cf. *catenatum* foi detectado apenas em amostras de rede. Já as concentrações de *Pseudo-nitzschia* atingiram 10^5 células por litro (e acima de 50% da densidade celular total) em novembro e dezembro.

DISCUSSÃO

As águas da Praia da Cocanha apresentaram boa qualidade para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, como determinado pelas análises realizadas pela CETESB que acompanharam este estudo. As análises de coliformes termotolerantes e de enterococos realizadas no período de estudo indicaram que as concentrações detectadas não excederam o padrão exigido pelo CONAMA, Resolução 357/2005, transcrita abaixo:

“Art.18. Águas Salinas de Classe I observarão as seguintes condições e padrões:

I- Condições de qualidade de água: (...)

G) Coliformes Termotolerantes: (...) Para o cultivo de moluscos bivalves destinadas a alimentação humana; a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros.”

A comercialização do produto, entretanto, será mais garantida quando da implantação de um programa de monitoramento de ficotoxinas. A frequência e as variáveis a serem monitorados variam de acordo com a região. O plano de monitoramento pode ser elaborado com um número de pontos e frequência variável, de acordo com a detecção da presença de espécies tóxicas na água ou de ficotoxinas em mexilhões (Anderson, 2004).

Apesar das análises de toxinas paralisantes (PSP) em bioensaios com camundongos e espectrometria de massa não terem detectado toxinas nos mexilhões em concentrações que poderiam provocar intoxicação ao homem, confirmamos o alerta quanto à presença de espécies potencialmente tóxicas no ambiente durante o período de estudo. Como mencionado anteriormente, o risco de contaminação do mexilhão existe quando a densidade celular absoluta (total de células por litro) de uma espécie produtora de toxina for alta, ou mesmo quando a densidade celular relativa (percentual do total de células) de uma espécie-alvo for dominante (Andersen e Throndsen, 2003).

Segundo as recomendações de programas de monitoramento realizados em diferentes partes do mundo (Anderson *et al.*, 2001), as concentrações celulares mais altas de espécies responsáveis pela síndrome diarréica, *D. rotundata* e *D. caudata*, detectadas durante o período de estudo ($<10^3$ células/L) foram consideradas baixas para o fechamento da maricultura ou mesmo para a intensificação do monitoramento. Já as concentrações de *Pseudo-nitzschia*, espécies causadoras da síndrome amnésica, atingiram 10^5 células por litro (e acima de 50% da densidade celular total) em novembro e dezembro, quando se justificaria a intensificação do monitoramento da maricultura.

Gymnodinium cf. *catenatum*, espécie produtora de toxinas paralisantes (Oshima *et al.*, 1987; Proença, 2001), foi detectada apenas em amostras de rede, indicando a vantagem de utilizar este amostrador para a detecção precoce de espécies que ocorrem em densidades celulares abaixo do nível de detecção do outro amostrador. De fato, o número de táxons encontrados por meio de mangueira (91 táxons) foi inferior ao encontrado na coleta com a rede (116 táxons) (Pinto, 2006).

O principal objetivo do monitoramento em área de maricultura é a proteção à saúde pública e permitir o desenvolvimento da maricultura em áreas onde há microalgas potencialmente tóxicas. Portanto, torna-se uma ferramenta fundamental para a gestão do desenvolvimento desta atividade produtiva. Os resultados levam a um alerta precoce de eventos de toxicidade evitando riscos à saúde e minimizando perdas econômicas.

O estabelecimento de um programa de monitoramento deve ser baseado em dados que mostram a capacidade espaço-temporal de ocorrência de florações e níveis de toxina que contaminam o marisco num período de um ano. A maricultura da Praia da Cocanha se mostrou livre de florações no período de estudo, apesar de uma tendência ao aumento da abundância de diatomáceas potencialmente tóxicas no final da primavera e início do verão, uma tendência já observada em regiões adjacentes do litoral paulista e sul fluminense (Pinto, 2006). Esta época do ano é exatamente o pico de produção e de consumo de mexilhões na região. Em realidade, a ausência de eventos tóxicos por anos consecutivos não significa que este seja um ambiente livre deles. As florações são fenômenos recorrentes e somente um monitoramento efetivo protege a saúde pública e os recursos pesqueiros.

Nesse trabalho, a disseminação dos resultados foi realizada de forma contínua durante todo o período de trabalho. O uso dos boletins, reuniões e palestras com os

maricultores foram realizadas periodicamente para esclarecimento de dúvidas e apresentação dos resultados deste trabalho. Um workshop foi realizado no CAT CEPID para discutir a importância do monitoramento de toxinas em ambientes marinhos e dulciaquícolas.

Um futuro programa de monitoramento nessa área, deve ter uma boa coordenação entre os pesquisadores envolvidos, instituições acadêmicas, órgãos públicos e maricultores. A Universidade, como geradora de conhecimento, o produtor e suas famílias que serão diretamente afetados em uma eventual detecção de ficotoxinas, a prefeitura que realiza os planos de ação e o consumidor que terá um produto seguro.

Em geral os programas de maricultura são de responsabilidade de órgão públicos com o apoio e/ou colaboração das instituições acadêmicas. No Brasil, o panorama não é exatamente esse, e a iniciativa acaba sendo das Universidades através de projetos de pesquisa como esse. Mais uma vez a Universidade colocando o conhecimento a serviço da sociedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, P. 1996. Design and Implementation of Some Harmful Algal Monitoring Systems. IOC Technical Series 44. Paris, UNESCO. 102 p.
- ANDERSEN, P., THRONDSSEN, J. 2003. Estimating cell numbers. In: Manual on Harmful Marine Microalgae edited by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella. Paris, UNESCO. pp. 99-129.
- ANDERSON, D.M., ANDERSEN, P., BRICELJ, V.M., CULLEN, J.J., RENSEL, J.E. 2001. Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters, APEC # 2001-MR-01.1, Paris, Ásia Pacific Economic

Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series Nº 59.

ANDERSON, M.D. 2004. Prevention, control and mitigation of harmful algal blooms: multiple approaches to hab management. In: Harmful Algae Management and Mitigation edited by S. Hall, S. Etheridge, D. Anderson, J. Kleindinst, M. Zhu, Y. Zou. Asia-Pacific Economic Cooperation (Singapore): APEC Publication # 204-MR-04.2: 123-130.

AOAC, 1990. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. In: Official Methods of Analysis, edited by K. Hellrich. 15th ed., Sec. 959.08. Arlington, V Association of Official Analytical Chemists. pp. 881-2.

APHA (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, the American Water Works Association and the Water Environment Federation. 1220 p.

BRANDINI, F.P. 1985. Seasonal succession of the phytoplankton in the Bay of Paranaguá (Paraná State , Brazil). Rev. Brasil. Biol. 45(4): 687-694.

DELL'AVERSANO, C., HESS, P., QUILLIAM, M. 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass espectrometry for the analyses of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. J of Chromat A 1081: 190-201.

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (2008). [http:// www.epagri.sc.gov.br](http://www.epagri.sc.gov.br), acesso em janeiro de 2008.

ESPINOLA, O., DIAS, R.R.C. 1980. O mexilhão como matéria prima alimentar. ABIA/SAPRO 47:10-30.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION 2007. World fisheries production. <http://www.fao.org/fishery/aquaculture>, acesso em Janeiro de 2007.

- FERNÁNDEZ, M.L., RICHARD, D.J.A., CEMBELLA, A.D. 2003. In vivo assays for phycotoxins. In: Manual on Harmful Marine Microalgae edited by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella. Unesco, Paris. pp. 347-388.
- GELLI, V.C. 2007. Avaliação dos Impactos Econômicos do Potencial de Desenvolvimento da Mtilicultura no Município de Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado, Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”. 60 p.
- 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.
- GRANÉLI, E., HANSEN, P.J. 2006. Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources? In: Ecology of Harmful Algae edited by E. Granéli, J.T. Turner. Springer-Verlag, Berlin. pp. 189-201.
- HALLEGRAEFF, G.M. 2003. Harmful algal blooms – a global overview. In: Manual on Harmful Marine Microalgae edited by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella. Paris, UNESCO. pp. 25-49
- LEE, J.S., YANAGI, T., KENMA, R., YASUMOTO, T. 1987. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. Agric Biol Chem 51 (3): 877-881.
- LITORAL NEWS 2007. <http://guiadolitoral.uol.com.br/litoralnews> de 1/10/2007.
- MIT – Massachussetts Institute of Technology. Man's impact on the global environment. Cambridge, 1970. 319 p.
- OSHIMA, Y., HASEGAWA, M., YASUMOTO, T., HALLEGRAEFF, G., BLACKBURN, S. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. Toxicon 25: 1105-1111.

- PINTO, T.O, VILLAC, M.C., NAVES, J.L. 2008. Proposta de monitoramento da maricultura da praia da Cocanha (Caraguatatuba, SP) com base na composição e abundância de microalgas. XII Congresso Brasileiro de Ficologia.
- PINTO, T.O. 2006. Composição e abundância do fitoplâncton de área de maricultura da Praia da Cocanha, Caraguatatuba, São Paulo. Trabalho de conclusão de curso, Departamento de Biologia, Universidade de Taubaté.
- PINTO, T.O., VILLAC, M.C. 2006. O fitoplâncton em área de maricultura da praia da Cocanha, Caraguatatuba, SP: resultados preliminares. In: XII Congresso Brasileiro de Ficologia /Simpósio Latino Americano sobre Algas Nocivas. Itajaí.
- Prefeitura Municipal de Caraguatatuba 2008. <http://www.caraguatatuba.sp.gov.br/noticias>, acesso em 30 de janeiro de 2008.
- PROENÇA, L.A.O. 2001. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. *Revista Atlântica* 23:59-65.
- QUILLIAM, M.A. 2003. The role of chromatography in the Hunt for red tide toxins. *J of Chromat A* 1000: 527-548.
- RAVERA, O., RICCARDI, N. 1997. Biological monitoring with organisms accumulator of pollutants. *Mar. Chem.* 58: 313-318.
- SULLIVAN, J.J. 1993. Methods of analyses for algal toxins: dinoflagellate and diatom toxins. In: *Algal toxins in seafood and drinking water* edited by I.R. Falconer. Academic Press, London. pp. 29-48.
- UTERMÖHL, H. 1958. Perfeccionamento del metodo cuantitativo de fitoplancton. *Michigan, Comun. Assoc. Int. Limnol. Teor. Apl.* 9:1-89.

ANEXO 1. Modelo de relatório apresentado aos maricultores após cada coleta e análise das amostras.

Centro de Toxinologia aplicada

INST. BUTANTAN – USP – UNESP – COINFAR - CRISTALIA

Av. Vital Brasil, 1500 – CEP 05503-900 – São Paulo, SP

Fone/Fax (11) 3726 1024

e-mail: catcepid@butantan.gov.br

Relatório sobre análise em mexilhões e fitoplâncton da Maricultura da 'Associação de Pescadores e Maricultores da Praia da Cocanha'

Objetivo

A apresentação dos resultados obtidos na análise das espécies fitoplanctônicas e ensaios realizados em amostras mexilhões da Maricultura da Praia da Cocanha consistem em um levantamento de dados para um futuro 'Programa de monitoramento de toxinas presentes em organismos marinhos filtradores utilizados para alimentação humana'.

Esse trabalho é coordenado e financiado pelo Centro de Toxinologia Aplicada, CAT CEPID FAPESP, com o apoio da Universidade de São Paulo e Universidade de Taubaté, Prefeitura de Caraguatatuba, Instituto de Pesca Ministério da Agricultura, e tem por objetivos:

- A. Testar e adequar metodologias de coleta e análise;
- B. Detectar a presença de toxinas acumuladas pelo mexilhão nesta maricultura;
- C. Conhecer / estudar espécies de microalgas potencialmente tóxicas presentes no fitoplâncton;
- D. Prover dados para um programa permanente de monitoramento de toxinas presentes em organismos marinhos filtradores utilizados para alimentação humana.

Deve ser destacado que as análises não têm caráter de fiscalização, e que esses ensaios não se destinam a aprovar produtos. O fato das amostras analisadas estarem ou não de acordo com as normas presentes em outros países, colocara em evidência a necessidade de o Brasil possuir uma legislação própria para este tipo de análise. As análises terão caráter pontual, e apenas retratarão a situação do momento da coleta, não se adequando necessariamente aos protocolos fornecidos por órgãos destinados a vigilância.

Ensaio Realizados

Extratos dos mexilhões foram preparados baseados no método padronizado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990) e injetados intraperitonealmente em três camundongos com peso entre 18 e 22g (Mouse Bioassay). Os resultados são expressos em unidades camundongo (MU), a partir da tabela de Sommer. O cálculo considera a mediana dos tempos de morte dos camundongos. Para a quantificação da toxicidade, o tempo de morte deve estar entre 5 e 7 minutos.

Centro de Toxinologia aplicada

INST. BUTANTAN – USP – UNESP – COINFAR - CRISTALIA

Av. Vital Brasil, 1500 – CEP 05503-900 – São Paulo, SP

Fone/Fax (11) 3726 1024

e-mail: catcepid@butantan.gov.br**Resultados Obtidos e Conclusões**

Os resultados obtidos a partir da amostragem do dia **27 de outubro de 2005** revelaram ausência de toxinas paralisantes (PSPs) em concentrações que poderiam provocar intoxicação no homem.

A análise microscópica de microalgas coletadas em arrasto vertical com rede de 20 micrômetros de malha não apresentou espécie potencialmente tóxica em concentração que recomendasse intensificação da análise de toxinas nos mexilhões.

Ainda neste sentido, é importante que o consumidor, ao comprar o mexilhão verifique a procedência. Depois de consumi-lo, ao observar qualquer sintoma de intoxicação, procurar o serviço de saúde da região.

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.

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.