Andréa Lucia Campos Natali

**“Ação Inotrópica Positiva do Extrato Metanólico
da alga Clorofícea *Bryopsis pennata*
(CHLOROPHYTA, CAULERPALES)”**

São Paulo

2007

Andréa Lucia Campos Natali

**“Ação Inotrópica Positiva do Extrato Metanólico
da alga Clorofícea *Bryopsis pennata*
(CHLOROPHYTA, CAULERPALES)”**

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

Orientador: Prof. José Carlos de Freitas

São Paulo

2007

Natali, Andrea

**“Ação Inotrópica Positiva do Extrato
Metanólico da alga Clorofícea *Bryopsis
pennata* (CHLOROPHYTA,
CAULERPALES)”**

63p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. *Bryopsis pennata* 2. Cardiotônico Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr. José Carlos de Freitas

Orientador(a)

Aos meus pais, Marinho e Regina, e à minha irmã,

Adriana,

que nunca permitiram que eu fraquejasse e me incentivam

incansavelmente a progredir.

Amo vocês, obrigada por tudo!

*Ao meu noivo Leonardo,
por sua luz e seu jeito maravilhoso de ser, me
impulsionando e direcionando todos os caminhos de
minha vida.*

*E aos seus pais,
por toda ajuda, paciência e compreensão que
me proporcionaram.*

Com todo o meu amor e carinho!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que auxiliaram e/ou participaram da realização deste projeto:

Ao Prof. Dr. José Carlos de Freitas, pela orientação e amizade durante esses anos de convivência, e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, e seu chefe Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier, pelas facilidades concedidas.

A Profa. Dra. Nair S. Yokoya do Instituto de Botânica - SP, Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marino” - Seção de Ficologia, pelas facilidades concedidas durante a permanência no laboratório e pela orientação quanto ao preparo e cultivo desta alga, pelos valiosos ensinamentos e atenção especial dedicada à minha pessoa.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Professores ao Ensino Superior, pelo financiamento deste projeto e pela concessão de bolsa de estudo.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento junto ao Instituto de Botânica, bolsa de produtividade em pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eurico Cabral de Oliveira Filho do Departamento de Botânica do Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, pela identificação dos exemplares coletados da alga estudada.

A Profa. Dra. Regina Pekelmann Markus por seus ensinamentos dentro e fora de sala de aula, pelo seu incansável incentivo e por sua atenção sempre dispensada quando solicitada.

À Prof. Dra. Silvia Cristina Ribeiro de Souza do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, por ter permitido o uso de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Marcio Reis Custódio por sua contribuição e ensinamentos dispensados ao longo desses anos de convivência no laboratório.

Ao pós-doutorando Enrique Rozas Sanches pela inestimável ajuda na realização dos experimentos de extração do extrato metanólico, preparação e orientação nos procedimentos bioquímicos, e pelo seu companheirismo e amizade.

À doutoranda Jeanete Lopes Naves por seu imensurável conhecimento nas práticas no laboratório e pela sua enorme paciência e companheirismo nos momentos em que “tudo parecia dar errado”, ensinando e incentivando diariamente à conclusão deste trabalho. Por sua valiosa amizade.

À doutoranda Cynthia Grazielle Martins Delboni por sua apreciável ajuda na elaboração deste trabalho, pelo seu apoio, companheirismo e por sua valiosa amizade.

Em especial, às minhas tias Stela Nikobin e Sílvia Gambôa, que carinhosamente me ajudaram de forma direta e indireta para que eu conseguisse cursar e finalizar meu trabalho

À minha amiga Cássia Bulhões pelo carinho e amizade nos momentos dentro e fora do laboratório, por seus conselhos e companheirismo.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e do Instituto de Biociências que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Ao técnico Vagner Alberto de nosso laboratório, que em muito me ajudou.

Aos técnicos do Instituto de Botânica - USP, pelos auxílios prestados durante a realização do cultivo da alga.

A todos os meus colegas de pós-graduação.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho: André Junqueira Zaharenko, Bruno César, Bruno Strangheti, Evelyn Zanini, Joacir Stolarz Oliveira, Renata Aoki, Wilson Alves Ferreira Junior, que muito me ajudaram e ensinaram na convivência diária e no desenvolvimento deste trabalho.

Aos animais que na maneira mais pura de ser, doaram suas vidas para que muitos experimentos tivessem validade e contribuíssem diretamente para o progresso da ciência, permitindo novas descobertas fisiológicas e farmacológicas, tornando possível a realização do nosso trabalho.

Aqueles que não citei, mas que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Agradeço ontem, hoje e sempre à Deus por me proporcionar essa força interna que costumamos chamar de fé e me manter caminhando para o objetivo desejado mesmo quando as dificuldades impostas pela vida, me foram testadas.

A todos, muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Macroalgas em geral	6
1.2 Metabólitos secundários - Farmacologia.....	8
1.3. Ordem Caulerpales, Bryopsidales, Clorofícea – <i>Bryopsis pennata</i>	15
2. OBJETIVO.....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Coleta	23
4.2 Cultivo	23
4.3. Preparação do extrato metanólico	24
5. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	26
5.1 Teste Hemolítico	26
5.2 Teste Citotóxico	28
5.3 Efeito Cardiotônico	30
5.3.1. Ensaio Cardiotônico com Propranolol	31
5.4 Diálise do Extrato Metanólico	32
5.5 Análise química do extrato – Teste com Tripsina e Quimiotripsina	32
5.6 Troca Iônica	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Cultivo	34
6.2 Teste Hemolítico	35

6.3 Teste Citotóxico	37
6.4 Efeito Cardiotônico da alga <i>Bryopsis pennata</i>	38
6.4.1. <i>Bryopsis pennata</i> coletada	38
6.4.2. <i>Bryopsis pennata</i> cultivada	39
6.4.3. Avaliação da natureza protéica do extrato metanólico – Teste com Tripsina e Quimiotripsina	40
a) Efeito do EMBp tratado com tripsina durante 120 minutos à temperatura de 37°C	40
b) Efeito do EMBp tratado com quimiotripsina durante 120 minutos à temperatura de 37°C	40
6.4.4. Atividade Farmacológica	41
a) Utilização do Propranolol <i>in vitro</i>	41
6.4.5. Avaliação da natureza protéica do extrato metanólico – Caráter ácido e básico	43
a) Atividade da fração polar básica do extrato metanólico da alga	43
b) Atividade da fração polar ácida do extrato metanólico da alga	44
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÕES	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	61

RESUMO

As algas marinhas representam uma rica fonte de compostos bioativos, algumas delas precursoras de ferramentas farmacológicas e de substâncias potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos fármacos. A macroalga *Bryopsis pennata*, Cloroficea pertencente à ordem Caulerpales, sin. Bryopsidales é uma espécie tropical encontrada em diversos oceanos.

É uma pequena alga de cor verde-musgo, plumosa, que geralmente forma agrupamentos homogêneos e vive fixada em superfícies sólidas como corais. Essa espécie produz uma defesa química tóxica para organismos herbívoros, além de promover alelopatia e se reproduzir facilmente a partir de pequenos fragmentos. Possui um potencial de se tornar invasiva e dominante em condições ambientais favoráveis como águas ricas em nutrientes. A ausência aparente de predadores conhecidos, indicaram a presença de possível defesa química nesta espécie.

Por ser uma espécie que possui aparentemente pouco ou nenhum predador, uma vez que esta se encontra, na maioria das vezes, intacta no ambiente, o presente da continuidade a um trabalho anteriormente realizado que versa sobre a investigação de um efeito farmacológico cardiotônico, inotrópico positivo, da fração polar do extrato metanólico oriundo dessa alga marinha.

Inicialmente foi feito um breve estudo farmacológico da atividade citotóxica e hemolítica do extrato polar. Posteriormente evidenciamos o efeito cardiotônico da fração polar de algas cultivadas e coletadas em tiras ventriculares de anuro, comparamos com a resposta cardiotônica quando submetido a ação do propranolol e finalmente evidenciamos algumas características bioquímicas das frações ativas.

Nas atividades citotóxicas o extrato metanólico da alga coletada provocou deformações na morfologia dos ovos e não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos de camundongo.

O efeito cardiotônico em tiras ventriculares de anuros ficou fortemente evidenciado nos testes com extratos polares de algas coletadas e cultivadas. Estudos comparativos realizados com extratos de algas coletadas e de algas cultivadas em laboratório, demonstraram efeitos farmacológicos similares entre os extratos, demonstrando não haver influencia dos contaminantes, tais como cianobacterias, nas respostas cardiotônicas. O propranolol antagonizou o efeito da fração polar dessa alga e enzimas endopeptidases não reagiram com o extrato metanólico de *Bryopsis pennata*. Testes bioquímicos demonstraram que a fração polar de peso molecular menor que 10.000 daltons de caráter iônico ácido foi a fração que manteve os efeitos inotrópicos cardíacos.

ABSTRACT

Marine algae are a rich source of bioactive compounds and some of them have shown to be useful for the development of new pharmacological tools and medicines. *Bryopsis pennata*, (Clorofícea, Caulerpales, sin. Bryopsidales) is a marine algae that can be found in the Southeastern Brazilian coast and some other oceans.

It's a small green moss algae, feathery, generally forming homogeneous groups fixed upon solid surface as corals. The species produces a toxic chemical defense to the herbivorous organism, besides promoting allelopathy and easily reproducing itself from tiny fragments. They possess a potential to become invasive and dominant in favorable environmental conditions like waters with rich nutrients. The absence of true epibionts and known predators indicated the presence of chemical defense mechanisms in this species.

As it is a species that apparently has little or none predator, since usually it is found intact in its environment, the present is a complement of a previously study and it is about the investigation of the cardiotoxic pharmacological effect, positive inotropic effect, of the metanolic extract from this marine algae.

Initially it was done a brief pharmacological study of the cytotoxic and hemolytic activity of the polar extract, then we showed the cardiotoxic effect of the polar fraction from the cultivated and collected algae, the cardiotoxic results

of the explosive of a propranolol and finally some evidences from a biochemistry character of theses fractions.

In the cytotoxic activities, the metanolic extract of the collected algae, promoted disfiguration in the egg's morphology and did not show hemolytic activity in the erythrocytes mouse.

The cardiotonic effect in the anurou's ventricular strips was strongly unequivocal when it was tested with the polar extracts from the collected and cultivated algae. Comparative studies realized with the collected extracts algae and the ones cultivated in laboratory showed similar effects between them appearing not having cardiotonic influences by the contaminants. The propranolol antagonized polar effects of these algae and the endopeptidase enzyme did not reactive with the metanolic extracts of *Bryopsis pennata*. Biochemistry tests showed that the polar fraction of weight less than 10.000 Daltons and with acid character is the one that kept the inotropic cardiac activity.

Bryopsis pennata

Herbário do Instituto de Botânica

Foto: Arquivo pessoal – Andrea Natali

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Macroalgas em geral

A possibilidade da descoberta de novos tipos de moléculas e diferentes mecanismos de ação que o intelecto e a capacidade humana, mesmo com o uso de computadores, ainda não são capazes de construir é a grande vantagem e, ainda, um grande desafio no trabalho com organismos marinhos.

Os fitoplânctons e as macroalgas constituem a flora mais abundante dos oceanos, que cobrem cerca de 75% da área do planeta. As macroalgas são de primordial importância, uma vez que representam uma grande fonte de alimentos, remédios, forragens e fertilizantes (BOOTH, 1965; JENSEN, 1971; PAREKH, 1977).

Os estudos feitos com intuito de reconhecer gêneros representantes de algas marinhas com substâncias bioativas tem sido muito explorados pela comunidade científica, RAGAN (1984) encontrou cerca de 160 gêneros representantes de algas marinhas na região canadense do Oceano Atlântico, onde constatou a presença de vários metabólitos ativos de interesse terapêutico. Os estudos desenvolvidos por Oliveira Filho & Ugadim (1974;1976) resultaram em uma listagem de 93 taxa sendo 53 rodofíceas, 18 feofíceas e 22 clorofíceas. Destas espécies, foram relacionadas 20 novas ocorrências para o Brasil, sendo 9 rodofíceas, 3 feofíceas e 8 clorofíceas (Oliveira Filho & Ugadim 1976). Mais recentemente VILLAÇA *et al.* (2006) em um estudo feito nas regiões do Atol das

Rocas, Fernando de Noronha, Arquipélago São Pedro São Paulo, Complexo Insular de Trindade e Martim Vaz e Abrolhos, relacionou a presença de 131 táxons para estes recifes, incluindo também 4 táxons de coralináceas incrustantes da ordem Corallinales.

Em uma listagem feita em 1976 por OLIVEIRA e mais atualmente, em 2002 por VILLAÇA, constatou-se a presença das macroalgas *Bryopsis pennata*, *Valonia macrophysa*, *Dictyota menstrualis* e calcárias incrustantes, como sendo as mais representativas, entre as clorofíceas, no litoral norte do Brasil. Corroborando com esse trabalho, AMADO FILHO e BAHIA publicaram on line (www.algaebase.org), uma tabela (anexo 1) relacionando a presença da alga *B. pennata*, entre outras, em mais de 20 praias do litoral do Rio de Janeiro.

Os primeiros registros do uso terapêutico, indicador empírico da presença de substâncias bioativas em algas, estão documentados num compêndio médico chinês de 2700 anos a.C entre os povos do leste da Ásia. A medicina popular oriental utiliza amplamente as algas como tratamentos para várias enfermidades tais como verminoses, gota, nefrite e outras (RANG, 2003). Com a tecnologia, o avanço nas técnicas químicas proporcionou uma melhora e uma crescente identificação de substâncias bioativas na área farmacológica.

A natureza tem sido versátil na produção de compostos com atividade biológica. Uma simples manipulação biossintética resulta em moléculas complexas com potência notável. Assim, a química de produtos naturais tem nos proporcionado muitas estruturas diferentes e desafiadoras, muitas das quais são hoje a base da indústria farmacêutica. Porém, na área marinha, o interesse só

aumentou nos últimos 50 anos, em contraste a atenção dispensada aos microrganismos e plantas terrestres. Vários fatores contribuíram para esse lento começo: a facilidade e a disponibilidade em lidar com produtos naturais de microrganismos e plantas terrestres e a dificuldade em localizar, identificar e purificar os compostos provenientes de espécies marinhas (AMADO, *et al.* 1997; ARAGÃO, 2003; BARBOSA, *et al.* 2003).

Muitos metabólitos secundários são instáveis e de difícil isolamento, segundo PAUL & FENICAL (1987) este é o fator que contribuiu, desde o início, para a lentidão dos estudos químicos com as algas verdes (principalmente as caulerpales). Os autores alertam para que logo após a coleta das algas, essas sejam congeladas ou estocadas em solventes, para reduzir os riscos de decomposição. Ressaltam, ainda, a necessidade de que o extrato de algas frescas seja imediatamente purificados, isolados os compostos e posteriormente, investigadas as atividades química e biológica dos metabólitos.

Atualmente o interesse pelos organismos marinhos está voltado para três áreas básicas de pesquisa: farmacologia marinha, ecologia marinha e taxonomia e filogenética (ARAGÃO, 2003) .

1.2 – Metabólitos secundários – Farmacologia

Quanto à Farmacologia marinha moderna, esta teve como origem os trabalhos com as substâncias bioativas de caravelas e anêmonas, no começo desse século por Portier, reportado por RICHET (1902, 1903), que levaram à descoberta da anafilaxia. Depois sobreveio o sucesso do programa de

"screening" para novos antibióticos que culminou com a descoberta tanto em esponjas quanto em algas, de substâncias com atividades antibacterianas e antivirais (RANGEL, M. 1999).

Os recentes avanços científicos na farmacologia marinha têm revelado diversos compostos bioativos, ampliando as possibilidades de aplicação das algas como fonte direta de medicamentos ou inspirando a síntese de novas substâncias a partir das estruturas moleculares descobertas.

Além dos produtos como o ágar-ágar, a carragenina, e os alginatos, as macroalgas têm numerosos constituintes que atraem progressiva atenção em muitos campos, principalmente para a finalidade farmacológica (HOPPE, 1982).

Os constituintes das algas incluem ácidos, alcalóides, aminas, substâncias com propriedades antibacterianas, antibióticas, anti-fúngicas, antivirais e substâncias de alta toxicidade como a saxitoxina, a tetrodotoxina, guanidinas e derivados (KOTAKI *et al.*, 1983; SCHEUER, 1983; FREITAS *et al.*, 1988, FREITAS *et al.* 1994)). As macroalgas são similares às plantas terrestres no que concerne à produção de terpenos, compostos aromáticos, acetogeninas, derivados de aminoácidos e polifenóis; tais substâncias são genericamente denominadas de metabólitos secundários ou compostos secundários.

As vias metabólicas secundárias das plantas conduzem à formação de substâncias específicas e, muitas vezes, são estas que levam à caracterização de algumas famílias, gêneros e espécies entre as plantas. Com o desenvolvimento da ecologia bioquímica, grande enfoque tem sido dirigido aos

metabólitos secundários nas funções vitais, como a preservação da espécie e da sua integridade contra os ataques de seus predadores naturais, sejam eles fungos, bactérias, moluscos ou animais superiores (BARBOSA *et al*, 2003). Assim, também no ambiente marinho tem sido reconhecida a importância das interações químicas entre as espécies e dos compostos presentes nas macroalgas, que devem desempenhar diversas funções nas relações entre algas e outros organismos marinhos.

O desenvolvimento atual das várias linhas de pesquisa sobre ecossistema marinho em estudos sobre a quimiorrecepção, simbiose, nutrição, competição, predação e reprodução dos organismos, tem despertado e orientado importantes trabalhos a respeito de produtos naturais do mar. Nesse sentido, a herbivoria tem um profundo efeito sobre as algas, tanto em ambientes temperados como em tropicais; em certos locais, 60 a 97% da produção total das algas podem ser removidas por herbívoros (ARAGAO, 2003; MARQUES, 2003). Investigações recentes sugerem que a função primária dos metabólitos secundários das algas é deter a herbivoria, porém não se exclui a possibilidade de outras funções e atividades detectadas em ensaios laboratoriais.

Os compostos mais conhecidos que inibem a herbivoria, agindo na defesa química das algas, são os polifenólicos encontrados nas feofíceas (RAGAN & GLOMBITZA, 1986; STEINBERG, 1988), e tanto os das algas pardas como os de plantas terrestres, agem como inibidores da predação pelos herbívoros marinhos: *Tegula funebris* e *T. brunea* (moluscos) e *Strongylocentrotus purpuratus* (ouriço do mar).

Ainda em relação às interações químicas que ocorrem na natureza, podemos citar a observação de alguns autores, que, mediante análise do conteúdo estomacal de alguns crustáceos decápodes braquiúros (que podem regurgitar, durante situações de defesa as secreções digestivas com atividade neurotóxica), fazem notar a presença preponderante de algas (FREITAS, 1979, 1980, FREITAS & JACOBS 1983 e FREITAS *et al.* 1994), da mesma forma afirma ARAGÃO, 2003 em análise feita sobre o conteúdo estomacal de uma espécie de peixe. Assim, especulou-se sobre a possibilidade de que nos crustáceos poderia estar havendo o seqüestro de toxinas de algas da dieta com finalidade defensiva, um paralelo aos insetos e plantas terrestres. ALCALA & HALSTEAD (1970) já haviam indicado as algas da dieta dos crustáceos como a possível fonte de toxinas paralisantes. Mais tarde, uma espécie não identificada da alga rodofícea, do gênero *Jania*, foi indicada como a fonte de neurotoxinas em crustáceos e moluscos do Pacífico (KOTAKI *et al.*, 1983; YASUMOTO *et al.*, 1983). A análise química realizada por estes autores indicou, nas algas, a presença de goniatoxinas I, II e III (derivados da saxitoxina) em quantidade máxima durante o período da primavera. YASUMOTO *et al.* 1985 encontraram também tetrodotoxina no mesmo gênero de alga vermelha (*Jania sp.*). No Brasil, FREITAS *et al.* (1988) foram os primeiros a identificar saxitoxina, goniatoxinas e tetrodotoxina nas algas rodofíceas *Jania rubens* e *Arthrocardia gardneri*. Posteriormente, essas mesmas neurotoxinas foram também encontradas em secreções digestivas dos crustáceos dos oceanos Atlântico e Pacífico (FREITAS *et al.*, 1991).

A presença de toxinas em diversas algas tem interesse para a saúde pública, pois as mesmas podem provocar envenenamentos em populações que utilizam algas em sua dieta. Outras espécies, porém, aparentemente não tóxicas, funcionam como complemento nutricional há algum tempo em países consumidores de algas, devido ao seu alto teor de vitaminas e iodo. O problema do bócio endêmico, que atinge determinadas populações no mundo, poderia ser grandemente diminuído pela exploração das algas, as quais são portadoras de alto teor de iodo, da ordem de 100 a 40.000 vezes maior que a quantidade existente na água do mar (SUN & TSENG, 1983). Se considerarmos o fato de que nos países do Primeiro Mundo muitos indivíduos morrem de distúrbios circulatórios, mais do que de qualquer outro tipo de doença, essa seria uma forte razão para que se aumentem substancialmente as pesquisas farmacológicas a respeito de substâncias de algas marinhas, com vistas a fomentar a produção de drogas antiateroscleróticas.

Já está bem estabelecida, em termos farmacológicos, a ação antibiótica de muitos extratos de algas, inclusive a atividade contra vírus, bactérias, leveduras, fungos e microalgas. Além de outras atividades tais como: anticoagulante, antilipêmica, antitumoral, hipocolesterolêmica, hipotensiva, hemostática, vermífuga, hemaglutinante e antiulcerogênica (FREITAS & MARSIGLIO, 1986; BAKER, 1984). A laminina, isolada da alga *Laminaria angustula* previne a hipertensão em ratos e provoca a redução na força dos batimentos cardíacos, efeito inotrópico negativo segundo FREITAS e MARSIGLIO (1986). Todavia não provoca efeito cronotrópico algum,

contrapondo-se ao efeito da alga *Bryopsis pennata* estudada neste trabalho; induz, ainda, ao relaxamento da musculatura lisa do intestino, dos vasos capilares e da traquéia.

O halimedatriol, um trialdeído diterpênico, isolado da alga verde calcárea *Halimeda opuntia*, exibe ações inotrópicas positivas, potencializando a contração muscular esquelética, da mesma forma que a alga *Bryopsis pennata*. O halimedatriol promove a inibição da divisão celular, é um poderoso inibidor do comportamento alimentar em insetos, além de mostrar, também, forte atividade contra bactérias, fungos, peixes, espermatozóides, ovos fertilizados e larvas de ouriço do mar, é um dos compostos mais ativos e bem estudados do grupo (HAY & FENICAL, 1988).

Nos Estados Unidos, a equipe do Dr. Robert S. Jacobs da Universidade da Califórnia verificaram o sítio e o mecanismo de ação de substâncias isoladas de organismos marinhos. Algumas têm origem em algas e apresentam grande interesse *farmacológico*, por exemplo: a *Estipoldiona*, isolada da alga parda *Stypopodium zonale*, que impede a citocinese (inibe a polimerização de microtúbulos), aumenta a sobrevivência de camundongos leucêmicos e é um poderoso agente espermatostático (O'BRIEN *et al.*, 1989).

HORTA (2000) e outros autores afirmam que estudos sobre o ciclo de vida de macroalgas e a competição entre espécies dominantes são necessários para caracterizar as oscilações naturais nas populações. O monitoramento das comunidades é fundamental para distinguir mudanças naturais de possíveis ameaças, como a proliferação ou o extermínio de macroalgas, aparecimento de

doenças, branqueamento e contaminação por metais e óleos. Concordando com o trabalho, VILLAÇA, R. (2006) alerta que ao lado da continuidade dos levantamentos florísticos deve ser dada ênfase também à outras pesquisas tais como aquelas sobre a estrutura das comunidades e extração de produtos naturais em gêneros promissores como *Laurencia*, *Digenea*, *Dictyota*, *Bryopsis* e *Codium*, que podem sofrer influencias ecológicas, potencializando ou inibindo (alterando), as sínteses de metabólitos secundários.

No Brasil o programa de pesquisas sobre produtos naturais de origem vegetal, com finalidade terapêutica, desenvolve-se em duas linhas: a primeira, que consta de um "screening" farmacológico de substâncias puras ou extratos, previamente obtidos por químicos, de plantas que não possuem usos conhecidos na medicina popular; a segunda que segue orientação oposta, isto é, sabendo-se previamente do uso empírico de determinada planta na medicina folclórica, procura-se estudar o seu extrato bruto para comprovação de suas possíveis propriedades medicinais. Nesse trabalho, abordamos a temática empregando a primeira linha de pesquisa, não havendo de antemão qualquer indicação empírica sobre o uso terapêutico da alga *Bryopsis pennata*, porém levando-se em conta as observações ecológicas de serem pouco predadas.

1.3 – Ordem Caulerpales, Bryopsidales, Clorofícea – *Bryopsis pennata*

A macroalga *Bryopsis pennata*, clorofícea pertencente à ordem Caulerpales, sin. Bryopsidales (Figuras 1 e 2) é uma espécie tropical encontrada em diversos oceanos. É uma pequena alga verde musgo, plumosa, geralmente formando agrupamentos homogêneos, que cresce fixada em superfícies sólidas como corais. Essa espécie produz uma defesa química tóxica para organismos herbívoros, além de promover alelopatia e se reproduzir facilmente a partir de pequenos fragmentos. Possuem um potencial de se tornar invasiva e dominante em condições ambientais favoráveis como águas ricas em nutrientes (SAKAMOTO *et al.*, 2000; LAMOUROUX, 2000; OLIVEIRA, 2002).

Figura 1 – “Arquipélago de São Pedro São Paulo

Foto: J. C. Freitas

Figura 2 – *Bryopsis pennata*

Fonte: <http://hawaii.edu>

A maior parte das espécies de algas verdes é tropical. As algas da ordem caulerpales são as mais abundantes e largamente distribuídas nos recifes de corais dos mares tropicais. Esse grupo de algas verdes marinhas tem sido mais bem investigado tanto quimicamente como biologicamente. A ordem Caulerpales é subdividida em duas famílias Caulerpaceae e Udoteaceae. Muitas espécies da família Udoteaceae têm a capacidade de adquirir depósitos de carbonato de cálcio e algumas são altamente calcificadas (entre 50 a 90% do peso úmido) (PAUL & FENICAL, 1987). Essa calcificação tem sido aceita por muitos pesquisadores atualmente como defesa física efetiva contra herbívoros, porém mais do que esse fator, tem sido reconhecido o papel dos metabólitos secundários atuando também na defesa contra a herbivoria. Nesse sentido verificamos que apesar da alga verde *B. pennata* apresentar forma e aspecto

palatável em sua constituição esta não sofre a ação predatória dos herbívoros marinhos, pois encontra-se sempre intacta (SAKAMOTO, 1993).

Frente a esses dados, impôs-se a investigação das substâncias responsáveis por sua proteção, bem como fornecer subsídios para o esclarecimento da possível defesa química frente a animais predadores e competição com outras algas em sua comunidade. A iniciativa do estudo de novas substâncias oriundas do ambiente marinho vem sendo manifestada pela equipe do Laboratório de Produtos Naturais de Origem Marinha do Instituto de Biociências onde abordam de maneira multidisciplinar os desafios da investigação e o desenvolvimento da farmacologia marinha. Biólogos, veterinários, químicos, bioquímicos e farmacologistas, reunidos em torno desse tema, estão tentando equacionar esforços distintos em cada fase da pesquisa. A observação dos aspectos ecológicos, as coletas, a extração, a análise *in vitro* do extrato e sua posterior purificação para identificação da substância ativa vêm dependendo desses esforços multidisciplinares.

SAKAMOTO (1993) em sua tese de doutoramento observou que o extrato da *Bryopsis pennata*, em diferentes épocas do ano, provocou o aumento no tônus muscular com ação inotrópica e cronotrópica positiva em coração de anuro. Relatou-se também a presença de 2 componentes ativos no extrato da alga coletada, não identificados, nas frações do extrato bruto da *B. pennata*, os quais possuem efeitos neurotóxicos reversíveis em nervo sensorial isolado de crustáceo e inotrópico e cronotrópico positivos em coração de anuros (*Rana Catesbeiana*).

Nesse trabalho, estudou-se a alga verde *Bryopsis pennata*, visto que anteriormente havia sido demonstrado que extratos dessa alga apresentam uma ação inotrópica positiva e uma ação bloqueadora do potencial de ação no nervo crustáceo. Portanto dando seqüência a esse estudo, no presente trabalho, demos início à investigação da ação farmacológica do extrato bruto dessa clorofícea, empregando preparações biológicas e determinando, até onde nos foi possível, o efeito comparativo da alga cultivada com a alga coletada no coração de anuros, testes bioquímicos no intuito de elucidar o princípio ativo, além da resposta farmacológica diante de ensaio cardiotônico com propranolol.

2. OBJETIVO

Estudar as atividades cardiotônica, citotóxica e hemolítica do extrato polar da alga *Bryopsis pennata*, comparando entre amostras de alga coletada e cultivada em laboratório e caracterizar bioquimicamente o princípio ativo com atividade cardiotônica do extrato.

Para atingir o objetivo proposto, a pesquisa foi desenvolvida nas seguintes etapas:

- i - Coleta
- ii – Cultivo e manutenção da *Bryopsis pennata* e obtenção de biomassa.
- iii – Preparação de extratos polares em quantidades adequadas para a realização das análises propostas.
- iv – Teste de atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos.
- v – Teste de atividade citotóxica em ovos de ouriço-do-mar.
- vi – Teste de atividade cardiotônica em preparação de tira ventricular de anuro.
- vii – Estudos comparativos da atividade cardiotônica de extratos da alga coletada e da cultivada e com propranolol
- viii - Dialisar o extrato metanólico com um tubo de ultra-filtração de 10.000 daltons e testar as frações ativas.
- ix – Realizar ensaio bioquímico do extrato exposto a ação de enzimas tripsina e quimiotripsina
- x – Realizar separação das frações através de coluna de troca iônica e testar a fração ativa.

3. JUSTIFICATIVA

Este estudo dá continuidade a um trabalho anterior realizado em nosso laboratório, onde foi demonstrado o efeito cardiotônico do extrato polar da alga *Bryopsis pennata* (SAKAMOTO, 1993). Com intuito de confirmar resultados já obtidos por outros autores e sabendo que condições ambientais, climáticas e situações controladas podem alterar a produção de substâncias e metabólitos secundários, esse trabalho foi realizado de forma comparativa com algas coletadas e cultivadas. Damos início a investigação de seu mecanismo de ação, utilizando duas endopeptidases (tripsina e quimiotripsina), diálise do material e separação em coluna de troca iônica a fim de determinar a origem bioquímica do composto ativo e também avaliar seus efeitos na preparação de banda ventricular de anuro em ensaios utilizando um beta-bloqueador não específico (propranolol).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

A coleta foi realizada de forma manual, durante a maré vazante na região entre marés na praia do Tombo no município do Guarujá, litoral do Estado de São Paulo.

Foram realizadas duas coletas, em setembro de 2005 e 2006, época em que essa espécie se apresentou escassa, com talo reduzido, chegando a atingir apenas 2 ou 3 cm.

Locais de procura pela alga (Figuras 3 e 4): Peruíbe (praia do Arpoador), Praia Grande (Boqueirão), Bertioga (Praia de Itaguapé), Guarujá (Praia do Tombo) e São Sebastião nas praias (Tabela 2 em anexo): Praia preta, praia grande norte, enseadinha, praia grande sul, saco grande, barequeçaba, pedra montada, itaçuca, beluga, casa amarela, curral sul, curral norte, pedra solta, parcel, ponta do urubu e paredão.

As algas foram lavadas em água do mar e em seguida congeladas a 20°C negativos. Para o cultivo, as algas foram transportadas em frascos com pouca quantidade de água do mar, do local de coleta até o Instituto de Botânica, em São Paulo.

Figura 3 - Localização do litoral norte

Figura 4 - Localização das praias (loais de coleta)

4.2 - Cultivo

O cultivo de *B. pennata* foi realizado no Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marino” da Seção de Ficologia, Instituto de Botânica, nas seguintes condições: água do mar enriquecida com meio Von Stosch, salinidade 30-32µps, temperatura 21 ± 2 °C, irradiância 40,0 – 60,0 µmol fótons. m⁻². s⁻¹, fotoperíodo 14h luz, 10h escuro (Figura 5).

Inicialmente as algas foram lavadas em água do mar esterilizada, em dióxido de germânio (GeO₂, 1 mg/l), substância que inibe o crescimento das diatomáceas. Retiramos os ápices dos talos das mesmas, replicamos na primeira semana uma pequena haste que se desenvolve desse talo e trocamos o meio de cultura 1/100 diluído em água do mar esterilizado.

Figura 5: Cultivo da alga *B. pennata* - Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marino” - Seção de Ficologia, Instituto de Botânica – SP (Arquivo pessoal – Andréa Natali)

O meio de cultura foi semanalmente trocado e, conforme o seu crescimento, as algas foram transferidas para frascos maiores. Semeamos, inicialmente 20 placas e obtivemos, após 1 ano, cerca de 20 g de peso úmido em algas. Essa quantidade foi suficiente para o rendimento de 70 mg de extrato metanólico. Com este procedimento obtivemos uma quantidade de biomassa suficiente para a preparação de um extrato orgânico e para estudo farmacológico.

Preparamos extratos metanólicos separados de algas cultivadas e de algas coletadas separadamente.

4.3 - Preparação do extrato

Para a obtenção do extrato orgânico com as algas cultivadas e coletadas, elas foram pesadas (peso úmido) e então homogeneizadas, com metanol absoluto na proporção 1:10 (peso:volume), durante 30 minutos. Esse material foi filtrado para remoção de partículas de celulose e de outros resíduos. A seguir o homogenizado foi submetido a evaporação a vácuo em evaporador rotativo Buchi, em temperatura entre 50 e 60°C. Essa etapa de evaporação permitiu separar o metanol do material por ele extraído.

Obtivemos, assim, uma suspensão aquosa contendo clorofila que foi filtrada em papel filtro. Esse material foi centrifugado a 5000 rpm/10 minutos para remoção de partículas insolúveis em água. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi novamente submetido à evaporação a vácuo para obtenção de novo resíduo. O resíduo final foi diluído em um volume conhecido de água

destilada e foi mantido a 20°C negativos, em concentrações entre 50 a 600 mg/mL até o momento de uso, conforme esquema ilustrado abaixo (Figura 6).

O restante de material que ficou no frasco foi novamente ressuspensado com uma porção de água e outra de diclorometano, obtivemos duas frações, o material diluído pelo diclorometano foi a fração apolar, a qual mantivemos em freezer a temperatura 20°C negativos.

Figura 6: esquematização do preparo do extrato metanólico e obtenção das frações polares e apolares

Para o ensaio citotóxico e hemolítico utilizamos o extrato polar da alga coletada e para os ensaios cardiotônico utilizamos o extrato polar da alga cultivada e coletada.

5. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

5.1 - Teste Hemolítico

O teste hemolítico foi feito seguindo a técnica de MALPEZZI & FREITAS, 1991. O sangue foi obtido de camundongos (*Mus musculus*) sacrificados por deslocamento cervical seguido de decapitação, e colocado num béquer com um volume aproximadamente 30 vezes maior de solução de NaCl 0,85% contendo 10mM de CaCl₂, mantida sob agitação constante por 15 minutos. A mistura foi centrifugada três vezes para lavar os eritrócitos, após o qual foi preparada uma suspensão de eritrócitos (SE) a 0,5% (V/V) em solução fisiológica de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 113; KH₂PO₄ 1,2; KCl 4; MgSO₄.7H₂O 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; C₆H₁₂O₆ 11,1) para os testes em tubos de ensaio.

Em cada tubo foi colocado o extrato diluído em solução fisiológica de mg/ml de SE a 0,5%. Em seguida foi adicionado 1 mL de SE a 0,5%. O controle negativo foi feito usando a solução fisiológica. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente sob agitação constante e nova centrifugação (3000 rpm/5min), a atividade hemolítica foi medida pela absorbância do sobrenadante a 540nm. A hemólise total foi obtida pela adição de 100µL do detergente Triton X-100 a 1% e a porcentagem de hemólise foi calculada relativa a esse valor.

Foto: (Arquivo pessoal – Andréa Natali)

Figura 7: Aparelhagem para teste de hemólise – Leitura por absorbância. A - Leitor de Elisa; B - Placa de Hemólise. Instituto de Biociência, USP

5.2 – Teste Citotóxico

O teste foi realizado na Fundamar – São Sebastião, SP. Utilizamos ovos de ouriços-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus*, coletados no canal de São Sebastião, SP, Litoral Norte do Estado de São Paulo, pela facilidade de sua obtenção e por apresentarem ovos menos pigmentados quando comparados com os de outras espécies.

Para induzir a eliminação de gametas no ouriço, foi injetado KCl 0,5 M, cujo volume pôde variar de 3 mL até no máximo 5 mL, na cavidade celômica (perivisceral), (figura 8). Os óvulos foram coletados num bquer com água do mar filtrada que entra em contato com os poros genitais do ouriço posicionado com a Lanterna de Aristóteles voltada para cima, (figura 9). Os espermatozoides foram coletados da superfície aboral do ouriço com pipeta e mantidos sem diluir a baixa temperatura até seu uso. Os óvulos foram fecundados através da adição de 10µL de espermatozoides concentrados.

Os extratos diluídos testados foram adicionados a placa com cavidades e utilizamos 24 destas, em concentração crescente e água do mar filtrada foi acrescentada para completar um volume de 500µL em cada cavidade. Por último foram adicionados 500µL de uma solução de óvulos recém fecundados, atingindo volume final de 1 mL.

Em seguida os zigotos foram incubados até que as células do controle atingissem a primeira divisão (período de aproximadamente 45 minutos). Então, uma alíquota foi retirada de cada cavidade e fixada em formol diluído em água

do mar a 10%, numa proporção de 1:1. Para a obtenção da porcentagem de inibição, cem células de cada amostra foram contadas.

Figura 8: Cavidade perivisceral *Lytechinus variegatus*

Foto: J. C. Freitas

Figura 9: coleta de óvulos

Foto: J. C. Freitas

5.3 – Efeito Cardiotônico

Utilizamos rãs da espécie *Rana Catesbeiana*, cujo Sistema Nervoso Central foi destruído por espinhalação. A cavidade abdominal foi aberta e o coração removido por secção da parede do pericárdio e dos vasos. Separamos os átrios do ventrículo, seccionando-se a junção átrio-ventricular. O ventrículo isolado foi seccionado através de seu eixo longitudinal, produzindo duas preparações ou tiras ventriculares isoladas. O ápice da tira foi conectado a um transdutor isométrico (Narco Biosystems, F-50) (figura 10). A parte basal foi fixada a um gancho de vidro entre dois eletrodos de prata cloretada lateralmente dispostos, em uma cuba contendo 10 ml de solução de Ringer de anfíbio especialmente preparada, acoplada a uma unidade isoladora de estímulo da marca GRASSTM e um Estimulador (GRASSTM modelo S8800. A solução de Ringer tem a seguinte composição (mM): NaCl 111,2; KCl 1,4; CaCl₂ 1,0; NaH₂PO₄ 0,1; NaHCO₃ 2,4 e C₆H₁₂O₆ 11,1. Administramos pulsos com as seguintes características: 0,2 ms de duração, 0,2 Hz de frequência em voltagem supramáxima de 100 v (monofásico). As respostas musculares foram isometricamente registradas em um fisiógrafo da marca Narco Biosystem, MK-II SER. A tensão utilizada foi de 0,5g. Foram testadas 4 diferentes concentrações do extrato metanólico da alga *Bryopsis pennata* coletada e cultivada (25µg/mL, 50µg/mL, 0,1mg/mL e 0,2mg/mL).

Figura 10: Fisiógrafo Narco Biosystem - Montagem do aparelho medidor do efeito cardiotônico. 1, Fisiógrafo Narco Biosystem registrador do efeito cardiotônico; 2, transdutor isométrico (Narco Biosystems, F-60); 3, eletrodos de prata inseridos em uma cuba com solução de ringer; 4, unidade isoladora de estímulo (GRASS) e 5, estimulador (GRASS S 8800).

5.3.1 – Ensaio Cardiotônico com Propranolol:

Os antagonistas dos receptores β -adrenérgicos constituem um importante grupo de fármacos. O propranolol é um bloqueador não seletivo dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 muito potente. Utilizamos a concentração de $0,2\mu\text{M}$ de propranolol na cuba de 10mL contendo extrato polar da alga *B. pennata* na concentração de $0,2\text{mg/ml}$.

5.4 – Diálise do Extrato Metanólico

O extrato foi dialisado em um tubo de ultra-filtração de 10.000 daltons e as frações foram testadas na tira ventricular de anuro.

5.5 – Análise química do extrato – Teste com tripsina e quimiotripsina.

A fração polar do EMBp foi incubada com tripsina e quimiotripsina (1mg/mL) durante 15, 60, 90 e 120 min a 37°C e, a seguir, testada na tira ventricular de anuro. Utilizamos 20µl de tripsina e da quimiotripsina na concentração de 1mg/ml para um volume de 980µl do EMBp. Empregamos sempre volumes de 0,2ml da solução-teste na cuba de 10 ml para as preparações da tira ventricular de anuro. Obtendo então, uma concentração final de 0,2 mg/ml do extrato polar tratado com tripsina e com quimiotripsina.

5.6 – Troca iônica

Uma solução de 10mg/ml de extrato metanólico foi submetida a troca iônica numa coluna (3,4 x 1,5 cm) de Amberlite IRA – 400 AR fortemente básica (Rohm and Haas co, USA). Foi adicionado 200mg diluído em 1 ml na coluna, posteriormente foi lavada com 80 mL de água Milli-Q, para retirar todas as substâncias a ela ligadas, e o retido pela coluna foi recuperado com 80 mL de ácido acético 2 N. após este procedimento, estas frações foram liofilizadas e estocadas a -20°.c para serem posteriormente testadas.

6. RESULTADOS

6.1 – Cultivo

As culturas unialgáceas foram iniciadas a partir do isolamento de segmentos apicais (Figuras 11, 12 e 13), e a média da taxa de crescimento foi de 33mg/dia.

Figura 11: Segmentos apicais

Figuras 12 e 13: Segmentos apicais

Foto: Arquivo pessoal – Instituto de Botânica

O cultivo em laboratório da alga *B. pennata* teve como objetivo isolamento da alga de possíveis contaminantes epifíticos que ocorrem nas algas obtidas na natureza, principalmente diatomáceas, as quais poderiam ser a fonte primária de substâncias ativas detectadas nas algas em estudo. Essa hipótese pôde ser descartada uma vez que o extrato de *B. pennata* cultivada, destituída de diatomáceas pelo tratamento com dióxido de germânio, manteve o efeito farmacológico quando comparado ao obtido com as algas sem o tratamento para retirada dessas epífitas.

6.2 – Teste Hemolítico

Os testes realizados com o extrato metanólico tiveram resultado negativo para atividade hemolítica (n=4). Podemos observar na tabela 1 abaixo que nas concentrações de 10 e 40 mg/mL houve, respectivamente, de 6% a 17% de hemólise. Esses valores foram considerados insignificantes diante da concentração de extrato a que foram expostos os eritrócitos, caracterizando o extrato como não hemolítico.

Fração Polar Concentração (mg/mL)	Média Hemólise (%)	N
10,0	6,0	4
20,0	8,0	4
30,0	12,0	4
40,0	17,0	4

Tabela 1: Hemólise

O gráfico abaixo demonstra que a Fração Polar da alga *Bryopsis pennata* não possui atividade hemolítica, mesmo quando submetida a altas concentrações.

Atividade Hemolítica em eritrócitos de camundongos da FpBp

6.3 – Teste Citotóxico

O extrato foi testado antes e depois da fecundação dos ovos de ouriço-do-mar, e exibiu efeito sobre as divisões celulares (Figura 14 na dose de 1,0mg/ml; 5,0mg/ml e 10mg/ml da fração polar de *Bryopsis pennata* (FPBp)

Figura 14: Resultados do teste citotóxico com Fração polar de Bp.

6.4 – Efeito Cardiotônico da alga *Bryopsis pennata*

6.4.1 – *Bryopsis pennata* Coletada

Os resultados mostram (Figura 15) que substâncias presentes em *B. pennata* apresentam um efeito inotrópico positivo no coração de anuro corroborando um estudo anterior realizado com a mesma espécie coletada em São Sebastião (SP) (SAKAMOTO, 1993), e contrastando com a espécie *Ulva pertusa* que tem efeito inotrópico negativo (YAMADA *et al.*; 1983).

Figura 15: Resultado do teste cardiotônico com alga coletada - Efeito cardiotônico inotrópico positivo em tira ventricular de anuro do extrato metanólico da alga *Bryopsis pennata* coletada.

O gráfico abaixo mostra a curva dose-resposta dos testes realizados com a alga coletada, apresentando uma EC50 de 1,118.

Foram feitos um total de n=6 para cada concentração da fração polar durante vários experimentos, obtivemos uma curva dose-resposta mensurando a

resposta inotrópica positiva da fração polar da alga *B. pennata* (%) em relação ao efeito cardiotônico sem adição do extrato.

Curva Dose-resposta do efeito inotrópico positivo da fração polar da alga *Bryopsis pennata*

6.4.2 – *Bryopsis pennata* Cultivada:

Figura 16: Resultado do teste cardiotônico com alga cultivada - Efeito inotrópico positivo da fração polar da *B. pennata* cultivada na concentração de 0,2 mg/mL

Os resultados mostram que substâncias presentes no EMBp cultivada não alteraram seu efeito inotrópico na ausência de contaminantes.

6.4.3 - Avaliação da natureza protéica do extrato metanólico – teste com Tripsina e Quimiotripsina (Figuras 17 e 18)

a) Efeito do EMBp tratado com tripsina durante 120 min, à temperatura de 37°C:

Figura 17: Resultado do teste com tripsina - Efeito inotrópico positivo da fração polar da *B. pennata* coletada na concentração de 0,2 mg/mL, , após 120 min na presença da enzima tripsina.

b) Efeito da FPBp tratado com quimiotripsina durante 120 min, à temperatura de 37°C:

Figura 18: Resultado do teste com quimiotripsina - Efeito inotrópico positivo da fração polar da *B. pennata* coletada na concentração de 0,2 mg/mL, , após 120 min na presença da enzima quimiotripsina.

Os resultados obtidos pelo tratamento com tripsina e quimiotripsina (Figuras 17 e 18) durante 15, 30, 60, 90 e 120 minutos indicaram que as frações ativas no músculo, mesmo após tratamento prévio com essas enzimas, mantiveram a ação miocontrátil. A quimiotripsina é uma endopeptidase, que quebra diversas ligações peptídicas entre resíduos do lado C terminal dos aminoácidos fenilalanina, triptofano e tirosina e, portanto, se o substrato em estudo (substância miocontrátil) não foi sensível ou degradado por essas enzimas, indica fortemente que ela não é de natureza protéica, podendo sugerir que seja um peptídeo ativo com poucas ligações, ou uma substância de natureza química não peptídica.

6.4.4 Atividade farmacológica

a) Utilização de Propranolol *in vitro*:

Figura 19: Teste com propranolol - Efeito bloqueador do PRO sob a ação da fração polar da alga *B. pennata* na concentração de 0,2 mg/ml

O gráfico abaixo mostra o efeito do Propranolol adicionado aos 170 segundos após a adição da fração polar da *B. pennata* em tira ventricular de anuro, antagonizando completamente o efeito inotrópico em 40 segundos.

Também observamos a ação antagônica do PRO (0,2 μ M) administrado após tratamento com EMBp na concentração de 0,2 mg/ml (Figura 19). O intuito da associação entre a Fração Polar da *Bryopsis pennata* e PRO foi o de tentar elucidar seu provável mecanismo de ação, já que o Propranolol é um β -bloqueador específico, que bloqueia receptores β 1 e β 2 adrenérgico e impede a ação da noradrenalina nesses receptores (RANG, 2003).

A adição in vitro de PRO antagonizou o efeito inotrópico positivo da fração polar. Dessa maneira, o aumento de inotropismo induzido pelo extrato verificado na tira ventricular de anuro estimulada eletricamente, poderia ser explicado por uma ação despolarizante nas terminações nervosas que chegam ao coração.

6.4.5 - Avaliação da natureza iônica do extrato metanólico – Caráter ácido e básico

A solução de extrato metanólico que foi submetida a troca iônica numa coluna de Amberlite fortemente básica foi separada em frações distintas pelo caráter ácido e básico. Após testes com ambas as frações (Figuras 20 e 21) observamos a presença da atividade inotrópica positiva apenas com a fração de caráter ácido.

a) Atividade da fração polar básica do extrato metanólico da alga:

Figura 20: Fração básica - Efeito da fração polar dialisada (0,2mg/ml) de caráter básico.

Observamos que a fração dialisada, de peso molecular menor que 10.000 daltons, submetida a coluna de troca iônica de caráter básico, não apresentou efeito inotrópico positivo em tira ventricular de anuro.

b) Atividade da fração polar ácida do extrato metanólico da alga:

Figura 21: Fração ácida - Efeito inotrópico positivo da fração polar dialisada (0,2 mg/ml) de caráter ácido e após alguns minutos o efeito antagônico do PRO (0,2µM)

Observamos que a fração dialisada, de peso molecular menor que 10.000 dáltons, submetida a coluna de troca iônica, manteve seu efeito inotrópico positivo na tira ventricular foi a de caráter ácido. O efeito antagônico do Propranolol foi mantido.

7. DISCUSSÃO

Estudos anteriores empregando diversos métodos para o preparo de extrato bruto de 80 espécies de algas (25 clorofíceas) para a pesquisa de atividade antibiótica, registrou-se que os princípios ativos podem estar tanto nas frações polares quanto nas apolares dos extratos BASLOW (1969). Assim, BAKER (1984), testando atividades biológicas de extratos de algas, encontrou respostas diferentes nas duas frações; o extrato da clorofícea *Codium adherens* apresentou atividade inotrópica apenas na fração apolar enquanto o extrato apolar e o polar da rodofícea *Chondria dasyphylla* exibiram a mesma atividade inotrópica.

A alga *Bryopsis pennata* empregada nesse estudo foi escolhida por observarmos que na natureza era pouco predada por herbívoros marinhos. Foi demonstrado por alguns autores que principalmente as algas verdes desenvolvem a produção de metabólitos secundários, que as protegem contra a forte predação por herbívoros. Essas algas, mesmo tendo aspecto palatável, são desprezadas pelos predadores (FENICAL & SUN, 1979). Esse tipo de adaptação química tem sido claramente demonstrado em muitos organismos marinhos.

SAKAMOTO (1993) obteve resultados que comprovam que o extrato da alga cultivada em laboratório apresenta potência farmacológica significativamente maior do que o extrato de algas coletadas na natureza, quando esses extratos foram testados em nervo sensorial de crustáceo. Além

disso, com as algas coletadas na natureza, apresentaram o efeito da sazonalidade, isto é, extratos preparados com as algas coletadas no verão possuem maior potência farmacológica do que extratos de algas coletadas no inverno.

Porém, essa interferência da sazonalidade não foi observada em todas as preparações utilizadas pela autora. Em testes realizados com tiras isoladas de jejuno de cobaia, esse fenômeno não ocorreu, provavelmente porque o composto presente na fração ativa no músculo não tem sua produção alterada pela sazonalidade. A concentração de proteínas presentes na alga pode variar entre os períodos de verão e inverno, o que poderia ter influenciado, neste caso, somente nas frações neurotóxicas.

As investigações sobre a variação de potência biológica e a sazonalidade se iniciaram com o autor HASS (1950), quando isolou peptídeos de algas marinhas e verificou alterações sazonais nessas algas. Concluí que essas alterações eram decorrentes de quebra de ligações peptídicas, acarretando redução da quantidade de proteínas, efeito provocado pela baixa intensidade de luz disponível em ambientes marinhos durante o inverno, e por alguns períodos de exposição ao ar durante a maré baixa.

Realmente, consta da literatura a observação da presença marcante de metabólitos secundários em tecidos mais jovens de algas (HAY & FENICAL, 1988). Os autores observaram que tais compostos secundários não estão igualmente distribuídos por toda a planta, geralmente aparecendo em maiores concentrações em tecidos de crescimento ativo e em tecidos reprodutivos. Além

disso, foi constatado que essas mesmas estruturas se desenvolvem mais aceleradamente à noite, produzindo metabólitos secundários importantes na defesa química contra os peixes herbívoros notívagos (HAY & FENICAL, 1996).

Diante desses dados, decidimos submeter a fração polar do extrato metanólico da alga *Bryopsis pennata* ao teste de digestão por tripsina e quimiotripsina, a fim de verificar a natureza química do composto ativo da fração polar do EMBp em tiras ventriculares de anuro. Primeiramente dialisamos o EMBp e constatamos que a fração ativa tem peso molecular menor que 10.000 dáltons. A fração dialisada foi submetida ao tratamento com as enzimas supra citadas e após esse tratamento verificamos que não produziram nenhuma alteração na ação miocontrátil. A quimiotripsina é uma endopeptidase, que quebra diversas ligações peptídicas entre resíduos do lado C terminal de fenilalanina, triptofano e tirosina e, portanto, se o substrato em estudo (substância miocontrátil) não foi sensível ou degradado por essas enzimas, indica fortemente que ela não é de natureza protéica, podendo sugerir que seja um peptídeo ativo ou qualquer outra substância não peptídica.

O teste realizado para se obter a característica bioquímica quanto ao caráter ácido e básico do extrato, demonstra que a atividade farmacológica do extrato bruto só é evidenciada quando submetida a fração ácida da amostra, caracterizando dessa forma um caráter ácido para a fração peptídica potencialmente ativa.

A eliminação de organismos contaminantes (epifíticos) nas algas tem sido motivo de preocupação para muitos pesquisadores e tornou-se rotina em

laboratório de cultivo. Em muitos casos, esse procedimento torna-se inviável pela constatação do crescimento de diatomáceas não só na superfície dos talos das algas, como também entre os conceptáculos das mesmas.

O cultivo em laboratório da alga *B. pennata* teve como objetivo isolamento da alga de possíveis contaminantes epifíticos que ocorrem nas algas obtidas na natureza, principalmente diatomáceas, as quais poderiam ser a fonte primária de substâncias ativas detectadas nas algas em estudo. Essa hipótese pôde ser descartada uma vez que durante o cultivo da *B. pennata*, destituída de diatomáceas, pelo tratamento com dióxido de germânio, o extrato não exibiu alteração no efeito farmacológico quando comparado ao obtido com as algas sem o tratamento para retirada dessas epífitas, corroborando dessa forma com estudos prévios.

As algas cultivadas que não foram totalmente destituídas de diatomáceas e apresentaram crescimento de outros contaminantes que não aqueles vistos na alga coletada, demonstraram efeitos adversos nos testes realizados. HELLIO *et al.* 2000 e NAN *et al.* 2003 já haviam sugerido novos comportamentos de atividades de extrato de algas quando submetidos a presença de bactérias, dessa forma, sugerimos a necessidade da realização de novos estudos com a identificação desses contaminantes e possível isolamento para que seja elucidada a interferência na atividade cardiotônica, contribuindo para a avaliação em termos da presença de toxinas ou de seqüestradores de metabólitos secundários das algas interferindo nas respostas de defesa a herbivoria.

O acompanhamento *in vitro* do desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar é considerado um bom modelo experimental preliminar para o estudo de substâncias citotóxicas. Trata-se de um método seletivo e específico para determinação de substâncias que atuam na inibição da divisão celular, podendo, em condições especiais e com ferramentas farmacológicas adequadas detectar agentes, como inibidores da síntese de DNA e/ou RNA, causadores da inibição da síntese de proteínas e da inibição da polimerização dos microtúbulos (FRASER & NORA, 1988, THOMPSON, 2002). Segundo PEDROTTI & LEMÉE (1999) o desenvolvimento de ovos de ouriço do mar, após a fecundação, apresenta etapas sincrônicas de divisão, não exige condições rigorosas de meio de cultura e seu desenvolvimento em laboratório pode ser seguido em água do mar filtrada.

O desenvolvimento dos ovos de ouriço do mar possibilitam a identificação de atrasos nos ciclos celulares e o acompanhamento fácil sob pequeno aumento no microscópio . Muitas substâncias isoladas de algas de diferentes espécies têm sido relatadas como agentes antimitóticos, afirmam PEDROTTI & LEMÉE (1999) em um estudo feito com microalgas e com a toxina da macroalga *Caulerpa toxifolia* uma vez que são portadoras de substâncias inibidoras do crescimento ou citotóxicas para outros organismos na comunidade marinha. Em laboratório, o emprego de ovos de ouriço do mar, como um dos modelos experimentais para detecção de atividade citotóxica, teratogênica ou mesmo antineoplásica de produtos naturais, vem sendo feito por vários autores

(MALPEZZI & FREITAS *et al.*, 1994; PEDROTTI & LEMÉE 1999; NAVES *et al.* 2006)

A fertilização dos ovos de ouriço do mar inicia-se quando o acrossoma do espermatozóide penetra na camada vitelínica do óvulo e funde-se com sua membrana plasmática. Em aproximadamente 3 s segue-se um influxo de Na^+ e Ca^{++} resultando em despolarização da membrana espermática do ovo e no estabelecimento de um rápido bloqueio da poliespermia (JORDE *et al.*, 2000, RANG, 2003). A despolarização da membrana por aplicação de corrente até a inversão da polaridade, impede a fecundação pelos espermatozoides (PEDROTTI & LEMÉE 1999). Assim, como um dos componentes da EMBp é despolarizante, segundo dados da tese de doutorado da SAKAMOTO (1993) obtidos no nervo sensorial de crustáceo, esse fator poderia contribuir na inibição da fecundação e na conseqüente ausência da ativação da célula para iniciar as mitoses.

O ciclo celular dos ovos de ouriço do mar de uma maneira geral pode ser dividido em dois períodos : A) o primeiro evento, que ocorre até 20s após a fusão dos gametas, é a exocitose dos grânulos corticais, que é mediada pelo íon Ca^{++} . Esse processo exocitótico libera material coloidal e peroxidases no espaço perivitelínico. As enzimas liberadas pelos grânulos corticais agem sobre membrana vitelínica contribuindo para o seu endurecimento. Essa eleva-se e separa-se da membrana plasmática, transformando-se em membrana de fertilização (membrana que cobre completamente o zigoto impedindo a poliespermia; B) a esses eventos iniciais segue-se o aumento da síntese

protéica, singamia, S1, G2 e mitose. As drogas que inibem seletivamente a ADN polimerase e consequentemente a síntese de DNA, como o diterpeno, afidicolina, não afetam as divisões celulares durante a maturação do oócito, porém o zigoto consegue dividir oito ou nove vezes e depois morre (PEDROTTI & LEMÉE 1999, JORDE et al, 2000, RANG, 2003) . Assim, também inibidores da síntese de RNA, quando adicionados aos ovos fertilizados de ouriço, apresentam desenvolvimento celular até o estágio de mórula. Portanto, as drogas que bloqueiam a primeira divisão celular não podem estar atuando na síntese de RNA, como atuam drogas quimioterápicas como a vinblastina.

Em sua tese de doutorado a autora SAKAMOTO (1993) realizou testes com extratos da *B. pennata* para verificar o efeito anti-mitótico e constatou que este efeito pode ser visualizado com os extratos de *B. pennata* que provocam crescente inibição no desenvolvimento dos embriões de maneira dependente de dose. Esse fenômeno foi caracterizado pela ausência da elevação da membrana de fecundação (vitelínica), quando o extrato foi adicionado antes da fertilização, e pela ação inibidora do processo de divisão, situação verificada com a adição do extrato após a fecundação.

Realizamos testes com adição da fração polar da *B. pennata* após a fecundação e observamos um efeito citotóxico próximo daquele outrora apresentado, as divisões mitóticas não foram inibidas, todavia houve algum efeito de deformação na membrana plasmática promovendo mudanças na conformação dos ovos. O efeito pode ter sido inespecífico em membrana, causando a despolarização da membrana e poderíamos sugerir que esse efeito

pode estar influenciando o efeito inotrópico positivo em cardiócitos, porém o estudo com ovos de ouriço-do-mar não foi devidamente aprofundado uma vez que preferimos dar ênfase, até esse momento do trabalho, na atividade cardiotônica, mas sugerindo uma investigação mais detalhada do processo de despolarização da membrana que poderia ser a chave para a elucidação do mecanismo de ação do efeito inotrópico positivo.

Nos ensaios com eritrócitos de camundongos a fração polar da alga não apresentou atividade hemolítica nas concentrações entre 10 e 40mg/mL. No começo da década de 80 (HASHIMOTO *et al.* 1972), e pesquisadores já haviam elucidado o fato de que algas verdes do gênero *Caulerpa*, provenientes das ilhas Amami (sul do Japão), taxonomicamente relacionada com o gênero da *Bryopsis* não apresentaram nenhum efeito tóxico ou hemolítico quando testadas em células sanguíneas de coelho e camundongos, em 1993 SAKAMOTO confirmou a afirmação feita pelos autores supra citados realizando testes hemolíticos quantitativos e qualitativos em eritrócitos de camundongos.

Pela ação do extrato bruto, podemos deduzir que o princípio cardioestimulante predominante é neuroativo, uma vez que a adição *in vitro* de Propranolol antagonizou os efeitos do extrato. Dessa maneira, o aumento de inotropismo verificado na tira ventricular de anuro estimulada eletricamente, poderia ser explicado por uma ação despolarizante nas junções nervosas que chegam ao coração podendo sugerir que o efeito inotropico positivo ocorre via terminais noradrenérgicos. Todavia se faz necessário a utilização de outros ensaios farmacológicos para se evidenciar mais fortemente essa afirmação.

A partir dos resultados obtidos com os estudos farmacológicos e químicos da alga *B. pennata*, sugerimos a necessidade da realização desses estudos com outras espécies do litoral brasileiro, ampliando a linha de pesquisa de produtos naturais de organismos marinhos, que contribuirão tanto na avaliação dos frutos do mar em termos da presença de toxinas, como na descoberta de novos fármacos.

8. CONCLUSÕES

O extrato de *Bryopsis pennata* não apresenta atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos na concentração de 10 a 40mg/ml

A fração polar de *Bryopsis pennata* apresenta atividade citotóxica em ovos de ouriço-do-mar quando administrado após fecundação, sugerindo atividade despolarizante de membrana.

O extrato de *B. pennata* exibe ação inotrópica positiva reversível em tiras ventriculares de anuro, ação essa bloqueável pelo tratamento in vitro com propranolol, podendo indicar uma ação indireta do extrato, ou seja, atuando via terminais noradrenérgicos.

A alga *Bryopsis pennata* quando colocada em situação nula de herbivoria (cultivo) produz ação farmacológica similar à situação de herbivoria.

A fração polar de peso molecular menor que 10.000 daltons, quando submetida ao teste bioquímico com as enzimas quimiotripsina e tripsina, não foi sensível ou degradada por essas enzimas, indicando fortemente que ela não é de natureza protéica, podendo sugerir que seja um peptídeo ativo com poucas ligações ou substâncias de outra natureza química.

A fração ativa do extrato metanólico da alga *Bryopsis pennata* pode ser uma fração peptídica de caráter ácido que age indiretamente em tiras ventriculares, provavelmente atuando em terminais noradrenérgicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALA, A.C.& HALSTEAD, B.W. Human Fatality due to Ingestion of the Crab *Demania* sp. in the Phillippines. **Clin. Toxicol.**, **3**: 609-611, 1970.
- AMADO FILHO, G. M. & Bahia, R. G. (Espécie, gênero ou família consultada) *in* Algas Marinhas Bentônicas do Estado do Rio de Janeiro. <http://www.jbrj.gov.br/jabot/mapa/algasrj.php> (15/04/2007)
- AMADO, G.M.; ANDRADE, L.R., REIS; R.P., BASTOS, W. & PFEIFFER, W.C., 1997. Heavy metal concentrations in a seaweed species from the Abrolhos reef region, Brazil. In: **Proceedings 8th International Coral Reef Symposium**, Panamá, 2: 1843-1846.
- ARAGÃO, V. 2003. Métodos de análise de conteúdo estomacal. Estudo de caso: *Acanthurus coeruleus* (Bloch & Schneider, 1801) – Teleostei, Acanthuridae – na Reserva Biológica do Atol das Rocas. **Dissertação de Mestrado em Biologia Marinha**, Universidade Federal Fluminense.
- BARBOSA, J.P.; TEIXEIRA, V.L; VILLAÇA, R.; PEREIRA, R.C.; ABRANTES, J.L. & FRUGULHETTI, I.C.P.P. 2003. A dolabellane diterpene from the brazilian brown alga *Dictyota pfaaffii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **31**: 1451-1453.
- BASLOW, M.H. 1969 A study of toxins and other biological active substances of marine origin. _Baltimore, Williams & Wilkins Co. **Marine Pharmacology**. 286p
- BAKER, J.T. Seaweeds in pharmaceutical studies and applications **Hydrobiologia**, 116/117: 29-40, 1984.
- BOOTH, E. Some properties of seaweed marines. **SEAWEED Symp. Halifax**, 5., Canada, 1965, p.349-57.
- FENICAL, W., SUN, H. H. 1979. Rhipocephalin and rhipocephanal. Toxic feeding from the tropical marine alga **Rhipocephalus phoenix**. **Tetrahedron Lett.** 00: 685-88.

- FRASER, FC; NORA, JJ. **Citogenética Humana**. Ed. Guanabara Koogan, 1988, 262 p.: 2ª edição.
- FREITAS, J.C. Aspectos Farmacológicos e Químicos da Secreção Digestiva de Crustáceos Decápodes Braquiúros. São Paulo, 1979. 114 p. **Tese de Doutorado**. Univ. de São Paulo.
- FREITAS, J.C. & MARSIGLIO, A.F. Pharmacological activity of extracts of some marine algae from the Brazilian coast. **Bol.Fisiol. Anim. São Paulo**, 10: 61-8, 1986.
- FREITAS, J.C., OGATA, T., SATO, S.; KODAMA, M. The occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in macroalgae from the Brazilian coast. **Proc.Japan.Assoc.Mycotoxicol. (Suppl.1)**: 29-30, 1988.
- FREITAS, J. C. 1980. Evidências de um possível comportamento de defesa química em crustáceos braquiúros. **Bol. Fisiol. Anim.**, 4:153-61.
- FREITAS, J. C., JACOBS, R. S. 1983. Antagonism of the neurotoxic action of the beta-bungarotoxin on the rat phrenic-nerve hemidiaphragm by the marine natural product, manoalide. **Fed. Proc.** 42:364.
- FREITAS, J. C., SATO, S.; OGATA, T.; KODAMA, M. 1994. Guanidine neurotoxins are released with the digestive fluid of crabs (crustacean, brachyura). **Toxicon v.33 n. 2** 201-208.
- FREITAS, J.C . 2000 Efeitos Comportamentais de Neurotoxinas Guanidínicas em Meio Aquático. **Revista de Etologia**, 1(2): 117-126
- GLOMBITZA, K.W. Antibiotics from algae. In: **MARINE algae in Pharmaceutical Sciences**. Ed. H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka, New York, Walter de Gruyter, 1979. p. 303-42.
- HAY, M.E. & FENICAL, W. Marine plant-herbivore interactions: The ecology of Chemical defense. **Annu. Rev. Ecol. System.**, 19:111-45,1988.
- HASHIMOTO, Y., FUSEYANI, N.; NOZAWA, K. Screening of the toxic algae on coral reefs. **Proc. Intl. Seaweed Symp.** 7: 569-572, 1972.
- HELLIO, C., DE LA BROISE, D., DUFOSSÉ L., LE GAL, Y., BOURGOUGNON, N., 2000. Inhibition of marine bacteria by extracts of

- macroalgae: potencial use of enviromentally friendly antifouling paints. **Marine Enviromental Research**. (2001) 231-247.
- HOPPE, H. A. Marine algae and their products and constituents in pharmacy
In: **MARINE algae in pharmaceutical sciences**. Ed. H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka, New York, Walter de Gruyter, 1982. p 25-120.
- HAAS, P. Certain peptides occurring in marine algae. In: *Biochem. J.* 46: 503-505, 1950.
- HAY, M. E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 103-134.
- HAY, M. E., FENICAL, W. 1988. Marine plante-herbivore interactions: The ecology of chemical defense. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 19: 11-45.
- HORTA, P.A. 2000. Macroalgas do infralitoral do sul do Brasil: taxonomia e biogeografia. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- JENSEN, A. The nutritive value of seaweed meal for domestic animals. In: **International seaweed symposium**, 7., Sapporo, Proceedings 1971. p.8-12.
- JACOBS, R.S. & WILSON. Fertilized Sea Urchin Eggs as a Model for Detecting Cell Division Inhibitors. In: **Modern Analysis of Antibiotics**. Adorjan Aszalos, New York, Basel, 1986. p.481-93.
- JORDE, LB; CAREY, JC; BAMSHAD, MJ; WHITE, RL. **Genética Médica**. Ed. Guanabara Koogan, 2000, 297 p., 2ª edição.
- KOTAKI, Y., TAJIRI, M., OSHIMA, Y., YASUMOTO, T. 1983. Identification of calcareous red algae as the primary source of paralytic shellfish toxins in corral ref. Crabs and gastropods. **Bull Japan. Soc. Sci. Fish.**, 49:283-6.
- LAMOUREUX, J. V. 2000 Marine algae of Hawaii. University of Hawaii, Botany department, **Virtual Herbarium**.
- MALPEZZI, E. L. A. & FREITAS. J. C. 1991. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 24:1245-1250.

- MALPEZZI, E. L. A.; FREITAS J. C.; COSTA, L. V.; GIESBRECHT, A. M.; ROQUE, N. F.; 1994. Antimitotic action of extracts of *Petiveria alliacea* on sea urchin egg development. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 27: 749-754.
- MARQUES, L.V. 2003. Influência de peixes herbívoros na palatabilidade de macroalgas do Atol das Rocas. **Dissertação de Mestrado em Biologia Marinha**, Universidade Federal Fluminense.
- NAN, C., ZHANG, H., ZHAO, G., 2003. Allelopathic interaction between the macroalga *Ulva pertusa* and eight microalgal species. **Journal of sea research** (2004) 259-268.
- NAVES J. L.; PRADO M. P.; RANGEL M.; SANCTIS B.; SANTELLI M. G.; FREITAS J. C. Citotoxicity in the marine dinoflagellate *Prorocentrum mexicanum* from Brazil. In: **Comparative Biochemistry and Physiology part C 143** (2006) 73-77.
- OLIVEIRA, E. C. 2002. Macroalgas marinhas da costa brasileira, estado do conhecimento, usos e conservação biológica. **Congresso Brasileiro de Botânica**, Recife.
- O'BRIEN, E.T.; ASAI, D.J.; JACOBS, R.S.; WILSON, L. Selective inhibition of cytokinesis in sea urchin embryos by low concentrations of stypoldine, a marine natural product that reacts with sulfhydryl groups. **Mol. Pharmacol.**, 35:635-42, 1989.
- OLIVEIRA-FILHO, E.C., 1977. Algas marinhas bentônicas do Brasil. 1977. **Tese (Livre-Docência)** - Universidade de São Paulo. São Paulo. P.409
- OLIVEIRA Filho, E.C. & UGADIM,Y., 1974. New References of Benthic Marine Algae To Brazilian Flora. **Boletim de Botanica da Universidade de São Paulo**, 2: 71-91.
- PAREKH, R.G., MARU, L.V.; DAVE, M.J. Chemical Composition of green seaweeds of Saurashtra coast. **Bot. Mar.**, 20:359-62, 1977.
- PAUL, V. J. & FENICAL, W. Chemical defense in tropical algae of the order. Caulerpales (Chlorophyta). In: **MARINE biorganic chemistry**. Ed. SCHEUER, P. S. 1987, Springer-Verlag, Heidelberg,

- PEDROTTI M. L.; LEMÉE R. Effect of microalgae treated with natural toxins with the nutrition and development of filter-feeding sea-urchin larvae. In: **Marine environmental research** **48** (1999) 177 - 192
- RAGAN, M.A. Bioactivities in marine genera of Atlantic Canada: The unexplored potential. **Proc. N. S. Inst. Sci.** **34**: 83-132, 1984.
- RAGAN, M.A. & GLOMBITZA, K.W., Phlorotannins, brown algal polyphenols. **Prog Phycol.Res**, **4**: 245-258, 1986.
- RANG, H. P.; DALE M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K.; **Farmacologia**. Ed. Elsevier, 5ª. Ed. 2003
- RANGEL, M. Estudos farmacológicos do extrato da esponja marinha *Geodia corticostylifera* (Porifera, Desmospongiae), 1999. **Tese de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 98p
- RICHET, C. - Des poisons contenus dans les tentacules des actinies (congestine et thalassine). **Compt. rend. soe. Biol.**, **55**: 246, 1903.
- SAKAMOTO, M. M. 1993. Ações farmacológicas do extrato de alga marinha *Bryopsis pennata* (Chlorophyta, Caulerpales). **Tese de Doutorado**, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 124p.
- SAKAMOTO, B., HOKAMA, Y., HORGAN, F. D., SCHEUER, P. J., KAN, Y., NAGAI, H. 2000. Isolation of a sulfoquinovosyl monoacylglycerol from *Bryopsis* sp. (Chlorophyta): identification of a factor causing a possible species-specific ecdysis response in *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). **J. Phycol.** **36**, 924-931.
- SCHEUER, P. In: MARINE natural products: chemical and biological perspectives. New York, **Acad. Press**, .1983. v.1-5.
- STEINBERG, P.D. Effects of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol**, **20**: 221-237, 1988.
- SUN, S. & TSENG, C.K. Pharmacological Studies on Chinese seaweeds in people's Republic of China. In: **International Seaweed Symposium**, **11.**, 1983.

- THOMPSON, JS; THOMPSON, MW. **Genética Médica**. Ed. Guanabara Koogan, 2002, 387 p., 6ª edição.
- VILLAÇA, R., PEDRINI,A.G., PEREIRA,S.M.B. e FIGUEIREDO, M.A. de O. Flora marinha bentônica das ilhas oceânicas brasileiras. 2006.
- YAMADA K.; SHIZURI Y.; ISHIDA Y.; SHIBATA S.; Cardiac inhibitory action of constituents of the marine green alga *Ulva pertusa*. **Journal of pharmaceutical sciences** 8:1912 – 1995. V72; issue 8. 1983.
- YASUMOTO, T., OSHIMA, Y., KOTAKI, Y. 1983. Analyses of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and gastropods with the identifications of the primary source or the toxins. **Toxicon**, (Suppl.3): 513-6.
- YASUMOTO, T.;YASUMURA, D.; NAGAI, H.; MICHISHITA, T.; YOTSU, M. Distribution and Possible Source of Tetrodotoxin in Marine Organisms. In: **Symposium on Toxins**, 32., Tokyo, 1985., p.147.

ANEXOS

1 – Tabela online (www.algaebase.org) retirada do site no dia 12/02/07
Informações

Local	Município	Latitude	Longitude	Coleta			
				Família	Especie	Ano	Referência
Saco de Piraquara de Fora (Angra dos Reis)	Angra dos Reis	-23°00'38"	-44°26'41"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Mitchell et al. (1979)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Pedrini et al. (1994)
Saco de Piraquara de Fora 2	Angra dos Reis	-23°00'38"	-44°26'41"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Mitchell et al. (1979)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Pedrini et al. (1994)
Saco de Piraquara de Fora 3 (Angra dos Reis)	Angra dos Reis	-23°00'38"	-44°26'41"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Mitchell et al. (1979)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Pedrini et al. (1994)
Enseada da Ilha Longa	Angra dos Reis	-23°08'12"	-44°19'24"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	98	Horta (2000)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	99	Brito et al. (2002)
Costão da Foca	Angra dos Reis	-23°03'13"	-44°14'38"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	00	Brito et al. (2002)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	00	Brito et al. (2002)
Costão da Enseada	Angra dos Reis	-23°03'12"	-44°13'57"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	99	Brito et al. (2002)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	00	Brito et al. (2002)
Praia da Júlia (Ilha Grande)	Angra dos Reis	-23°08'06"	-44°09'27"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Falcão et al. (1992)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	85	Nassar (1987))
Praia da Crena (Ilha Grande)	Angra dos Reis	-23°08'01"	-44°09'16"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Falcão et al. (1992)
Praia de Lopes Mendes	Angra dos Reis	-23°10'03"	-44°08'23"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	79	Nassar (1987))
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	84	Nassar (1987))
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	?	Falcão et al. (1992)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	85	Nassar (1987))
Ilha de Cotiataçu	Mangaratiba	-23°02'11"	-44°07'32"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	01	Széchy et al. (2005)
Ponta do Cação	Mangaratiba	-22°56'57"	-44°03'59"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V.	79	Pedrini (1980)

					Lamour.		
Ilha Gualba	Mangaratiba	-23°00'30"	-44°02'31"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	01	Széchy et al (2005)
Praia da Casa Redonda	Mangaratiba	-22°57'47"	-44°01'28"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	78	Pedrini (1980)
Praia de Ibicuí	Mangaratiba	-22°57'48"	-44°01'26"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	92	Széchy (1996)
Praia do Saí	Mangaratiba	-22°56'31"	-43°59'47"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	79	Pedrini (1980)
Praia Grande (Muriqui)	Mangaratiba	-22°55'55"	-43°58'40"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	77	Pedrini (1980)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	76	Pedrini (1980)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	99	Pedrini (1980)
Ilha Duas Irmãs	Mangaratiba	-22°56'33"	-43°57'56"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	99	Amado Filho et al. (2003)
Ilha Duas Irmãs 2	Mangaratiba	-22°56'33"	-43°57'56"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	99	Amado Filho et al. (2003)
Ilha Duas Irmãs	Mangaratiba	-22°56'33"	-43°57'56"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	99	Amado Filho et al. (2003)
Ilha Duas Irmãs 2	Mangaratiba	-22°56'33"	-43°57'56"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	99	Amado Filho et al. (2003)
Praia Suja	Mangaratiba	-23°02'34"	-43°57'45"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	77	Pedrini (1980)
				Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	69	Pedrini (1980)
Praia dos Calháus	Mangaratiba	-23°00'48"	-43°56'13"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	76	Pedrini (1980)
Ilha do Jardim	Mangaratiba	-22°56'30"	-43°55'20"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	78	Pedrini (1980)
Praia Grande (Itacuruçá)	Mangaratiba	-22°57'05"	-43°54'28"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	01	Széchy et al (2005)
Prainha (Itacuruçá)	Mangaratiba	-22°57'13"	-43°54'25"	Bryopsidaceae	Bryopsis pennata J.V. Lamour.	79	Pedrini (1980)

www.algaebase.org

Tabela 2:

Pontos de coleta (São Sebastião 06/03/06)

Ponto	Coordenadas Geográficas
1 - Praia Preta	S 23°49'454'' W 45°24'701''
2 - Enseadinha	S 23°49'749'' W 45°24'744''
3 - Praia Grande Norte	S 23°49'462'' W 45°24'834''
4 - Praia Grande Sul	S 23°49'445'' W 45°25'044''
5 - Saco Grande	S 23°49'743'' W 45°25'513''
6 - Barequeçaba	S 23°49'994'' W 45°25'926''
7 - Pedra Montada	S 23°42'711'' W 45°26'349''
8 - Itaçucê	S 23°49'871'' W 45°26'599''
9 - Beluga	S 23°53'054'' W 45°27'085''
10 - Casa Amarela	S 23°52'618'' W 45°26'678''
11 - Curral Sul	S 23°52'189'' W 45°26'183''
12 - Curral Norte	S 23°51'800'' W 45°25'935''
13 - Pedra Solta	S 23°51'513'' W 45°25'584''
14 - Parcel	S 23°51'181'' W 45°25'046''
15 - Ponta do Urubu	S 23°50'53'' W 45°24'46''
16 - Paredão	S 23°50'35'' W 45°24'28''