UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO TOXICOLÓGICO , ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DA MACROALGA MARINHA *CAULERPA TAXIFOLIA* (VAHL) AGARDH (1817) CAULERPACEAE

EVANDRO VALENTIM DA SILVA

Recife
2011

EVANDRO VALENTIM DA SILVA

Estudo toxicológico , atividade antioxidante e antitumoral da macroalga marinha *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) CAULERPACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, Um como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco

Orientadora Prof[a] Dr[a] Ivone Antônia de Souza

Co-Orientadora Prof[a] Dr[a] Falba Bernadete Ramos dos Anjos

RECIFE
2011

Silva, Evandro Valentim da

Estudo toxicológico, atividade antioxidante e antitumoral da macroalga marinha *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) CAULERPACEAE / Evandro Valentim da Silva. – Recife: O Autor, 2011.

68 folhas: il., fig. gráf.; 30 cm.

Orientador: Ivone Antônia de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Efeitos farmacológicos. *2.* Antioxidante. 3. Antitumoral. 4. Alga invasora. 5. *Caulerpa taxifolia*. . I. Souza, Ivone Antônia de. II. Título.

UFPE

615.7 CDD (20. Ed.) CCS2011-1175

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS FARMACÊUTICAS

AMARO HENRIQUE PESSOA LINS
REITOR

GILSOM EDMAR GONSALVES E SILVA
VICE-REITOR

ANISIO BRASILEIRO DE FREITAS DOURADO
PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

JOSÉ THADEU PINHEIRO
DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANTÔNIO RODOLFO DE FARIAS
VICE- DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DALCI JOSÉ BRONDANI
CHEFE DO DEPARTAMENTODE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SAMUEL DANIEL DE SOUZA FILHO
VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTODE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PEDRO JOSÉ ROLIM NETO
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BEAT SAEGESSER SANTOS
VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 28 de fevereiro,

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e APROVADA, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2011 e cuja a Banca foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof[a] Dr[a] Ivone Antônia de Souza
(Dept° de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof[a] Dr[a] Jane Sheila Higino
(Dept° de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof[a] Dr[a] Maria da Salete Horácio da Silva
(Programa de Atendimento Integral ao Alcoolista e outros Dependentes Químicos/PAIAD)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS FARMACÊUTICAS

Agradecimentos

Agradeço:

A DEUS por tudo de bom que vem acontecendo em minha vida.

À Minha mãe: Elza Valentim da Silva.

À Minha família pelo apoio

À Minha namorada: Carla Andrea de Moura

À Minha irmã: Inalda Valentim da Silva

À Profª Drª Ivone Antônia de Souza

À Profª Drª Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

À Profª Drª Rita de Cássia Xavier de Carvalho

À Profª Drª Karen Pena de Souza Cavalcanti

Ao Prof° Dr° George Chaves Jimenez

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Pedro José Rolim Neto

À Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Beat Saegesser Santos

À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Margareth, pelo apoio administrativo

Às Amigas do Laboratório de Toxicologia e Cancerologia Experimental: Flávia Rocha, Mayara Souza, e Suellen Oliveira.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS ---------- 08

LISTA DE FIGURAS ---------- 09

LISTA DE TABELAS ---------- 11

LISTA DE TABELAS ----------12

RESUMO ---------- 13

ABSTRAT ----------14

1. INTRODUÇÃO ---------- 16

2. REVISÃO DE LITERATURA ---------- 19

2.1. BOTANICO ---------- 19

2.1.1. ESTUDO DAS ALGAS ---------- 19

2.1.2 ESTUDO DA *Caulerpa taxifolia* ---------- 21

2.2.2 FITOQUÍMICA ---------- 23

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL ---------- 25

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS---------- 25

4. ARTIGO I ---------- 27

4.1. RESUMO ---------- 27

4.2. ABSTRAT ---------- 27

4.3. INTRODUÇÃO ---------- 28

4.4. MATERIAL E METODOS ---------- 30

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES ---------- 32

4.6. REFERÊNCIAS ---------- 36

5. ARTIGO II ---------- 40

5.1. RESUMO ---------- 40

5.2. ABSTRAT ---------- 40

5.3. INTRODUÇÃO ---------- 41

5.4.MATERIAL E METODOS ---------- 42

5.5.RESULTADOS E DISCUSSÕES ---------- 45

5.6. CONCLUSÕES ---------- 52

5.7. REFERÊNCIAS ---------- 52

6. ARTIGO III ----------55

6.1. RESUMO ----------55

6.2. ABSTRAT ----------55

6.3. INTRODUÇÃO ---------- 56

6.4. MATERIAL E METODOS ---------- 57

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES ---------- 58

6.6. REFERÊNCIAS ---------- 59

7. CONCLUSÕES ---------- 62

8. REFERÊNCIAS ---------- 64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

O_2	Oxigênio
CO_2	Dióxido de carbono
a.C	Antes de Cristo
HIV – 1	Vírus da imunodeficiência humana
AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana
CYN	Caulerpina
BHK 21/C13	Linhagem de fibroblastos
HPLC	Cromatografia liquida de alta performance
MDO	Modelo de defesa ótima
EACT	Extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia*
ERO	Espécie reativa do oxigênio
CEEA	Comissão de Ética de Experimentação
SNC	Sistema Nervoso Central
v.i.p.	Via intraperitoneal
v.s.c.	Via subcutânea
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
kg	Kilograma
DL_{50}	Dose letal que mata 50% da população
HE	Hematocilina-Eosina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1 *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817)..... 21

Figura 2 Estrutura química da caulerpina..... 22

Figura 3 Estrutura química da caulerpenina..... 23

Artigo I

Figura 1 Estrutura química da caulerpenina..... 29

Figura 2 Aspectos observados nos pulmões (A), baço (B) e fígado (C) dos animais tratados com *Caulerpa taxifolia*, na doses entre 500 e 750 mg/kg/ip 34

Figura 3 Aspectos observados nos estômago (A), rim (B) e alças intestinais (C) dos animais tratados com *Caulerpa taxifolia*, na dose de 1000 mg/kg/ip 35

Artigo II

Figura 1 *Caulerpa taxifolia* 43

Figura 2 Microscopia da morfologia do fígado dos animais implantados com carcinoma de Ehrlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A e B), sendo observado congestão vascular, qunado comparados com os animais controle (C). Coloração HE. Obj. 400x 48

Figura 3 Microscopia da morfologia do aparelho reprodutor masculino mostrando os testículos dos animais implantados com carcinoma de Erlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa* 49

taxifolia na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia dos tubulos seminiferos e do tecido intersticial pouco preservado, em relação ao grupo controle (B). O Epidídimo do grupo tratado (C) também apresentou alterações, quando comparados com os animais controle (D). Coloração HE. Obj. 400x .....

Figura 4 Microscopia da morfologia do aparelho renal mostrando os rins dos animais implantados com carcinoma de Ehrlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia aparentemente preservada, em relação ao grupo controle (B). Coloração HE. Obj. 400x 50

Figura 5 Microscopia da morfologia do baço mostrando os rins dos animais implantados com carcinoma de Erlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia aparentemente conservada, em relação ao grupo controle (B). Coloração HE. Obj. 400x..... 50

Figura 6 Microscopia da morfologia do pulmão dos animais implantados com carcinoma de Erlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia aparentemente preservada, em relação ao grupo controle (B). Coloração HE. Obj. 400x 51

LISTA DE TABELAS

Artigo II

Tabela 1 As médias e os desvios padrões da razão entre pesos dos animais PA (*Mus musculus*) dos Carcinomas de Ehrlich (PT) e das relações PT/PA dos grupos tratado com EACT na dose de 10 mg/kg/sc, padrão com morfina 10 mg/kg/sc e controle com solução salina, pela mesma via..... 34

Tabela 2 As médias e os desvios padrões da razão entre pesos dos órgãos vitais/peso dos animais (*Mus musculus*) dos grupos tratado com EACT na dose de 10 mg/kg/sc, padrão com morfina 10 mg/kg/sc e controle com solução salina, pela mesma via..... 35

Tabela 3 As médias e os desvios padrões da razão entre pesos dos dados bioquímicos e hematológicos dos animais (*Mus musculus*) dos grupos tratado com EACT na dose de 10 mg/kg/sc, padrão com morfina 10 mg/kg/sc e controle com solução salina, pela mesma via. 35

LISTA DE GRÁFICOS

Artigo II

Gráfico 1 Médias dos tumores dos animais dos grupos controle (1), padrão (2) e tratado com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (3)..... 47

Gráfico 2 Médias dos pesos dos órgãos dos animais dos grupos controle (1), padrão (2) e tratado com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (3)..... 48

RESUMO

As algas verdes que pertencem à família Caulerpaceae, são organismos verdes bentônicas, dotadas de um talo rastejante, formado por uma porção rizomatosa, que se expande ao longo do substrato. A *Caulerpa taxifolia* é típica de mares tropicais, introduzida acidentalmente na costa do mediterrâneo e Califórnia. Esta alga possui uma série de características que a tornam um invasor bem sucedido, e isso talvez se devam a um arsenal de produtos químicos por elas produzidos. O presente estudo objetivou avaliar as atividades toxicológicas, antioxidante e antitumoral *Caulerpa taxifolia* encontrada no mesolitoral Pernambuco. Para as analises toxicológicas e antitumoral foram utilizados camundongos albinos Swiss *Mus musculus*, e protocolos experimentais específicos para cada análise. A atividade antioxidante seguiu o me todo preconizado por Ruch (1989). De acordo com os dados obtidos o extrato aquoso de *C. taxifolia* apresentou efeito característico de uma substância estimulante do sistema nervoso central, bem como, atividade antitumoral significativa quando empregado no tratamento do carcinoma de Ehrlich. Ela se mostrou excelente agente antioxidante apresentando resultados superiores a substâncias sintéticas já utilizadas comercialmente.

PALAVRAS-CHAVE: efeitos farmacológicos, antioxidante, antitumoral, macroscopia, alga invasora, *Caulerpa taxifolia.*

ABSTRAT

The green algae that belong to the family Caulerpaceae are benthic organisms, endowed with a creeping stem, formed by a portion of Rhizome, which extends along the substrate. The *Caulerpa taxifolia* is typical of tropical seas, accidentally introduced on the Mediterranean coast and California. is algae has a host of features that make it a successful invader, and this is due to maybe an arsenal of chemical products for them gift produces. O study evaluated the toxicological activities, antioxidant and antitumor Caulerpa taxifolia mesolitoral found in Pernambuco. For the toxicological and antitumor were used Swiss albino mice Mus musculus, and experimental protocols specific's to analyze. A each antioxidant activity followed the method recommended by Ruch (1989). According to data obtained from the aqueous extract showed characteristic effects *C. taxifolia* substances stimulating the central nervous system, has significant antitumor activity when used in the treatment of carcinoma Ehrlich, and has excellent efficiency when used as an antioxidant agent presenting best result synthetic substances used commercially.

KEYWORDS: pharmacological effects, antioxidant, antitumor, macroscopic, invasive algae, *Caulerpa taxifolia*

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

As plantas apresentam uma diversidade de compostos naturais, que poderiam ser usados nas indústrias farmacêuticas e nutricionais (Sardesai, 1992, Oliveira, 1998, Matsukawa et al*.,* 2000).

Neste sentido, as algas constituem a maior parte da biomassa de produtores no mundo e com valor similar a muitos vegetais terrestres comumente consumidos, sendo empregada na produção de géis e pigmentos, emagrecedora, antioxidantes, dentre outros se tornando importante ao bom funcionamento do corpo (Sardesai, 1992, Oliveira, 1998, Matsukawa et al*.,* 1997, Oliveira, 2005).

Foram identificados nestes organismos uma variedade de metabólitos secundários incluindo terpenos, compostos aromáticos, acetoageninas, substâncias derivadas de aminoácidos e polifénois (Blunts et al., 2005, 2006), reconhecidos por possuir ação defensiva contra herbivoria (Hay e Fenical, 1988, Paul et al*.,* 2001), polissacarídeos e minerais (Oliveira, 1998).

Um dos aspectos mais interessantes das algas marinhas é o alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, que as deixam estáveis frente à oxidação durante o armazenamento (Ramarathnam et al.,1995). Elas estão sempre submetidas às rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O_2 e CO_2 ao longo da coluna de água e, assim, na sua sobrevivência depende de uma resposta eficiente ao estresse oxidativo, podendo representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais (Matsukawa et al*.,* 1997).

O O_2 é fundamental para os organismos aeróbicos, pois participa na obtenção de energia na forma de ATP, por meio da cadeia respiratória, como aceptor de elétrons, bem como, das várias reações metabólicas como na

biossíntese de prostaglandinas e esteróides e na oxidação de muitas substâncias aromáticas, etc (Flescchin et al., 2000, Rocha et al., 2007).

Neste sentido, as micro e macroalgas marinhas aparecem como uma alternativa para a obtenção de ácidos graxos utilizados, por exemplo, na alimentação de peixes, bem como, os seus efeitos tem sido amplamente estudado no coração humano. Contudo apesar de sua rica composição, elas têm sido pouco empregadas como plantas comestíveis (Zhukova et al., 1995, Vaskovsky et al., 1996, Oliveira, 1998, Matsukawa et al., 2000).

Os radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio são inevitavelmente co-produzidos nessas reações biológicas exercendo papel fisiológico importante, e presente em vários processos deletérios ao organismo humano como o câncer, aterosclerose, a *Diabetes mellitus*, artrite reumatóide, a distrofia muscular, a catarata, as desordens neurológicas e o processo de envelhecimento (Nordberg e Armér, 2001).

A necessidade da obtenção de novos fármacos para o tratamento de moléstias como o câncer, representa uma das principais causas de óbito da humanidade, tem papel de destaque na saúde pública e constitui um dos grandes desafios do século XXI (Boyk, 1996).

A fitoterapia tem desenvolvido terapias anticâncer e os mecanismos de interação entre fitocompostos e células neoplásicas vêm sendo extensivamente estudado (Mukherjee et al., 2001). Atualmente uma grande quantidade de pesquisadores se encontra engajados na tarefa de buscar novos agentes terapêuticos anticancerígenos a partir de fontes naturais (Boyd e Paull, 1995).

Sendo assim, seria interessante estudar as propriedades farmacoterapêuticas destes organismos sobre o metabolismo animal, a fim de oferecer uma alternativa viável no tratamento de patologias que acometem o ser humano.

2. Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BOTANICO

2.1.1 Estudo das algas

A vida começou nos oceanos, e as algas estão entre os organismos vivos mais antigos do mundo havendo registro por volta de 3,8 bilhões de anos no planeta sob a forma de seres unicelulares heterotróficos (Painter, 1983). Estes organismos são caracterizados como possuidores de capacidade autotrófica de sobrevivência, como também, responsáveis pela atmosfera oxidante que nos envolve até hoje (Carvalho, 2004).

Estes organismos podem ser procariontes ou eucariontes e se dividem em três diferentes reinos: Monera, Protista e Plantae. Os procariontes do reino Monera ou Bactéria são organismos unicelulares com ausência de envoltório nuclear e são autotróficos (produzem seu próprio alimento). Habitam vários ambientes desde que haja umidade e atuam como “espécie pioneira” (Vidotti e Rollemberg, 2004).

Os eucariontes se dividem entre os reinos Protista e Plantae, sendo classificados como unicelulares (embora existam formas pluricelulares de organização simples), autótrofos ou heterótrofos (dependem de outros seres para se alimentarem), e suas células apresentam envoltório nuclear e organelas membranosas (organismos eucariontes). São organismos de grande simplicidade e constituem o primeiro grupo onde ocorrem mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos; pigmentos, como as clorofilas, carotenos e xantofilas, organizados em organelas (Harper et al., 2006).

As suas paredes celulares, tal como as plantas superiores, funcionam como um sistema de duas fases, e diferem das plantas terrestres por apresentarem maior abundância de componentes da matriz quando comparados aos do esqueleto, assim como, pela prevalência de

polissacarídeos polianiônicos sobre os neutros. Além disso, paredes celulares de algas e plantas marinhas contêm polissacarídeos sulfatados (Mathews, 1975; Cássaro e Dietrich, 1977; Painter, 1983; Hussein et al, 1998; Aquino et al, 2005), sugerindo que os polissacarídeos sulfatados da matriz extracelular têm funções específicas em relação ao ambiente marinho, sendo postulado que os mesmos estão relacionados com a regulação mecânica, osmótica ou iônica (Kloareg e Quatrano, 1988).

Apesar do alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, as macroalgas marinhas são estáveis frente à oxidação durante seu armazenamento (Ramathnam et al.,1995). A ausência de danos oxidativos nos ácidos graxos poliinsaturados estruturais das membranas algais sugere que estes alimentos possuem compostos e mecanismos antioxidantes (Matsukawa et al.,1997)

Segundo Faulkner (1992), os primeiros registros do uso de organismos marinhos como fonte de produtos químicos pelo homem data de 1600 a.C., quando os fenícios utilizavam a secreção dos moluscos para produzir corantes de roupas. As algas marinhas possuem uma grande diversidade não só no litoral brasileiro como em todo mundo.

Pesquisas realizadas em alguns países da Ásia e África que consomem diariamente a Espirulina, uma alga azul, mostraram uma baixa incidência de infecção pelo vírus HIV-1(AIDS). Esses trabalhos mostraram ainda que estas algas apresentam a propriedade de estimular à resposta imunitária (Teas et al., 2004). Elas são capazes de ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes. Independente de serem uni ou pluricelulares, elas retiram todos os nutrientes que precisam do meio (solução ou umidade), no entanto são organismos fundamentalmente aquáticos (Vidotti e Rollemberg, 2004).

Foram identificados nas macroalgas uma variedade de metabólitos secundários incluindo terpenos, compostos aromáticos, acetoageninas, substâncias derivadas de aminoácidos e polifénois (Blunts et al*.,* 2005, 2006)

reconhecidos por possuir ação defensiva contra herbivoria (Hay e Fenical, 1988, Paul et al., 2001),

2.1.2 Estudo de *Caulerpa taxifolia*

As algas marinhas verdes é um diversificado grupo de organismos fotossintéticos em padrões morfológicos, estruturais e reprodutivos, e em sua maioria são espécies tropicais (Hoek et al.,1995). As representantes da ordem Caulerpales são as mais abundantes e amplamente distribuídas nos recifes de corais dos mares tropicais. Tem sido 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 e Fenical,1987).

As Caulerpaceae são conhecidas por desenvolverem estratégias eficientes de inibição de crescimento de outros organismos pela produção de metabólitos secundários. A caulerpenina foi identificada em nove espécies desta família fora do mediterrâneo, inclusive na *Caulerpa taxifolia* do mediterrâneo. Esta espécie produz epoxicaulerpenina substância de toxidade comparada à caulerpina (CYN) de atividade antibacteriana. Porém, o principal composto desta espécie é sesquiterpenóides, cuja toxicidade não havia sido determinada em camundongos, quando administrado intraperitonealmente, mas inibiu a proliferação de fibroblastos BHK 21/C13 nos rins de filhotes de hamsters (Amade e Lemée, 1998).

Este gênero é constituído por algas marinhas verdes bentônicas e seus representantes dotadas de um talo rastejante formado por uma porção rizomatosa que se expande ao longo do substrato, fixando-se através de estruturas denominadas rizóides (Joly, 1965; Sze, 1997) muitas espécies deste taxo são encontradas no litoral brasileiro (Joly, 1965) e alguns trabalhos

relatam propriedades biológicas, tais como antiviral e anticoagulante (Ghosh et al., 2004; Rodrigues e Farias, 2005)

A *Caulerpa taxifolia* é nativa de águas tropicais dos oceanos Indico, Pacifico e Atlântico, apresenta um crescimento rápido (Phillips e Price, 2002). Foi amplamente encontrada por toda extensão do Noroeste do mar Mediterrâneo, onde provavelmente foi lançada depois da lavagem do Aquário do Museu de Mônaco, e que hoje continua a provocar danos ao ecossistema local, devido a sua rápida propagação (Walters, 1996; Meinesz et al. 1997). Até o ano 2000, aproximadamente 131 km² havia sido colonizado o que abrangia a costa de seis países (Espanha, França, Mônaco, Itália, Croácia, e Tunísia). Desde então as invasões também têm ocorrido pelo oceano pacifico na Califórnia, Japão e Sul da Austrália. (Glasby et al., 2005; West e West,2007).

Várias medidas de controle têm sido usadas para reduzir a propagação desta alga como, por exemplo: processos mecânicos, tratamentos químicos e controle biológico ou ainda por sufocamento. Estes esforços não obtiveram sucesso na erradicação em larga escala da alga e também por não serem considerados seguros para todas as espécies. Durante o tempo de sua descoberta, a maior parte de sua propagação no Sul da Austrália foi através das massas d'água (Theil et al, 2007), e o estresse osmótico é um fator abiótico que pode inibir o desenvolvimento de algas marinhas (Lee, 1998; Rao e Rao,1999; Kamer e Fong, 2000; Jahnke e White, 2003; Xia et al., 2004), e ela são tolerantes a flutuações de salinidade e variações sazonais (Westphalen et al., 2004; Glasby et al., 2005;West e West, 2007).

Figura 1- *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817)
Fonte: Rudman, W.B., 2000

2.2 FITOQUÍMICO

O halimedatriol, um trialdeido diterpênico, isolado de alga verde calcárea *Halimeda opuntia,* exibe ações inotrópicas positivas, potencializando a contração muscular esquelética, da mesma forma que a alga *Bryopsis pennata.* Este composto promove a inibição da divisão celular, e é um poderoso inibidor do comportamento alimentar de insetos. Possui também, forte atividade contra bactérias, fungos, peixes, espermatozóides, ovos fertilizados e larvas de ouriços do mar, sendo considerado um dos elementos mais ativos e bem estudados do grupo (Hay e Fenical, 1988).

Organismos da ordem Caulerpales têm apresentado um quadro mais homogêneo que o esperado, exibindo sesquiterpenóides e diterpenóides bastante relacionados. Dentre os sesquiterpenóides conhecidos temos o rhipocephanal, isolado de *Rhipocephanal phoenix* (Fenical,1984).

Este gênero apresenta diterpenóides como a clhorodesmina, isolada de *C. fastigiada*, relacionada com o sesquiterpenóides e com diterpenóides observados em algas do gênero *Halimeda*, como o halimedatrial. Um alcalóide

indólico, derivado do triptofano, isolado de espécies “tóxicas” de *Caulerpa* (Aguilar-Santos, 1970; Maitti,1977). Outro composto comum a este taxo é a caulerpina (Figura 1) que não possui ação tóxica, mas apresenta atividade antitumoral e antimicrobiana importante, além disso, os extratos destas algas têm revelado a presença de hidroxi-amidas cuja mistura é denominada caulerpicina (Vidal, 1984).

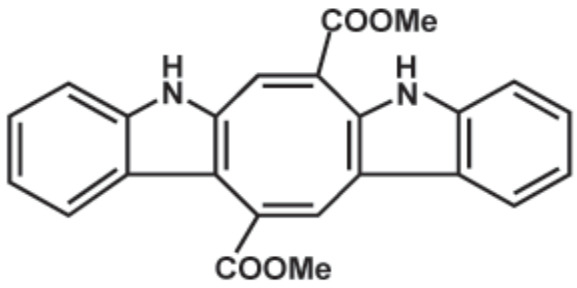

Figura 2 – Estrutura química da caulerpina
Fonte: Pereira, R.C.

A caulerpenina, metabólito secundário majoritário encontrado em *C. taxifolia* foi mensurado através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), obtendo-se como resultado uma diferença na concentração da substância entre partes eretas e estolões da espécie (Firura 2). Os níveis mais elevados foram observados na parte ereta, independente da profundidade e do período do ano onde os espécimes foram coletados. Esses resultados estão de acordo com o modelo de defesa ótima (MDO), visto que a parte ereta em relação ao estolão está mais exposta e, consequentemente, mais susceptível à ação de herbívoros (Amade e Lemée, 1998). O mesmo foi observado em *C. sertularioides*, *C. racemosa* e *C. cupressoides* (Meyer e Paul, 1992).

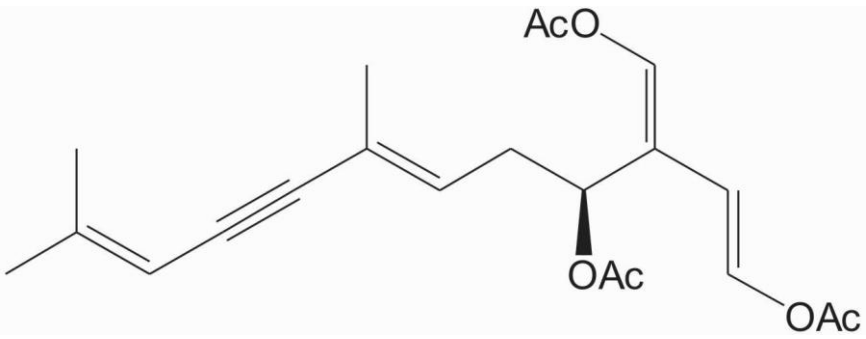

Figura 3– Estrutura química da caulerpenina
Fonte: Pereira, R.C.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial toxicológico, farmacológico do extrato aquoso bruto da macroalga *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817)

3.2. OBJETIVOS ESPECÌFICOS

- Investigar a toxicidade aguda do extrato aquoso bruto de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) e estimar o valor da DL_{50} em camundongos por via intraperitoneal;
- avaliar o efeito do extrato aquoso bruto de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) frente à inibição dos tumores malignos;
- averiguar a atividade antioxidante de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817);
- efetuar a análise morfológica do rim, fígado, baço, pulmão e testículos dos camundongos machos, por via intraperitoneal, do extrato bruto aquoso de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817).

4. Artigo1

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA POR VIA INTRAPERITONEAL E ANALISE MACROSCÓPICA DOS ORGÃOS DE ROEDORES TRATADOS COM EXTRATO AQUOSO DE *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) CAULERPACEAE

SILVA, EVANDRO VALENTIM; ROCHA, FLÁVIA SANTOS PAULINO; CAVALCANTI, KAREN PENA SOUZA; CARVALHO, RITA DE CASSIA XAVIER; ANJOS, FÁLBA BERNADETE RAMOS; *SOUZA, IVONE ANTÔNIA

*Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Av.Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. e-mail: idesouza5@gmail.com

1. RESUMO/ ABSTRACT

1.1 RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso bruto da *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817), para a obtenção da dose letal (DL_{50}). A toxicidade aguda foi realizada com camundongos (n=5) albinos machos Swiss (*Mus musculus*), do grupo tratado com doses crescentes (6,26 a 2000 mg/kg/ip) do extrato aquoso bruto (EACT) e grupo controle que recebeu solução salina. A DL_{50} encontrada foi de 1750 mg/kg. A *C. taxifolia* apresentou efeitos estimulantes do sistema nervoso central e também alguns sinais de depressão. Os animais mantiveram-se reativos durante toda experimentação (120 minutos). A macroscopia dos órgãos revelou que até a dose de 250 mg/kg/ip houve alterações na coloração dos órgãos analisados, bem como, um discreto aumento de volume no fígado, rins, baço pulmão e coração, mas este aumento de volume não foi considerado significativo. Doses superiores a 1000 mg/kg/ip apresentavam hipertrofia no estomago e na bexiga. No fígado foi observado uma intensa isquemia em sua região medular e hemorragia cortical. Os resultados demonstraram que a *Caulerpa taxifolia* possivelmente age promovendo hipertensão portal, envolvendo indiretamente o sistema renina-angiotensina-aldosterona, interferindo no controle da pressão arterial, do metabolismo hidrossalino, causando danos severos e talvez irreversíveis, no animal.

1.2 ABSTRACT

This study evaluated the acute toxicity of crude aqueous extract of *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817), to obtain a lethal dose (LD_{50}). The acute toxicity was performed on mice (n = 5) male Swiss albino (*Mus musculus*), the group

treated with increasing doses (6.26 to 2000 mg/kg/ip) of crude aqueous extract (ACTS) and control group that received saline. The LD50 was found. *C. taxifolia* showed stimulating effects of central nervous system and also some signs of depression. The animals remained responsive throughout testing (120 minutes). Macroscopic bodies revealed that up to 250 mg/kg/ip was no change in color of the organs analyzed, as well as a slight volume increase in the liver, kidneys, spleen, lung and heart, but this volume increase was not considered significant. Doses above 1000 mg/kg/ip showed hypertrophy of the esophagus, bladder. Observed a severe liver ischemia in its pith and cortical hemorrhage. The results showed that *Caulerpa taxifolia* possibly acts by promoting portal hypertension, indirectly involving the renin-angiotensin-aldosterone system, interfering with blood pressure control, the metabolism of salt intake, causing severe damage and perhaps irreversible, the animal.

2. INTRODUÇÃO

As algas constituem o maior grupo de biomassa do mundo e com valor similar a muitos vegetais terrestres comumente consumidos, sendo empregada na produção de géis e pigmentos, além de produzir altas concentrações de vitaminas e elementos importantes ao bom funcionamento do corpo (Sardesai, 1992, Oliveira, 1998, Matsukawa *et al.,* 1997, Oliveira, 2005).

Foram identificados nas macroalgas uma variedade de metabólitos secundários incluindo terpenos, compostos aromáticos, acetoageninas, substâncias derivadas de aminoácidos e polifénois (Blunts *et al.,* 2005, 2006) reconhecidos por possuir ação defensiva contra herbivoria (Hay e Fenical, 1988, Paul *et al.,* 2001), polissacarídeos e minerais (Oliveira, 1998).

As algas da ordem Caulerpales têm apresentado um quadro mais homogêneo que o esperado, exibindo sesquiterpenóide e diterpenóides

bastante relacionados. Dentre os sesquiterpenóide conhecidos temos o rhipocephanal, isolado de *Rhipocephanal phoenix* (Fenical, 1984).

O gênero *Caulerpa* apresenta diterpenóides como a clhorodesmina, isolada de *C. fastigiada*, relacionada com o sesquiterpenóides e com diterpenóides observados em exemplares de algas do gênero *Halimeda*, como o halimedatrial. Um alcalóide indólico, derivado do triptofano, foi isolado de espécies tóxicas de *Caulerpa* (Aguilar-Santos, 1970; Maiti, 1977), outro composto comum a este gênero é a caulerpina que não possui ação tóxica, mas apresenta atividade antitumoral e antimicrobiana importante, alem disso, os extratos destas algas tem revelado a presença de hidroxi-amidas cuja mistura é denominada caulerpicina (Vidal, 1984).

Caulerpa taxifolia é típica de mares tropicais, introduzida acidentalmente no mediterrâneo em 1984. Apresenta variações em tamanho e densidade das frondes influenciadas pela estação do ano. Entre os fatores que influenciam o seu rápido crescimento no mediterrâneo estão à temperatura e intensidade luminosa elevadas, além dos diversos tipos de habitat ali presentes (rochas, areia e outros substratos), permitindo grandes variações de biomassa no decorrer do ano. A *C. taxifolia* produz alterações significativas em ecossistemas próximos e na diversidade de Equinodermos e de outros organismos bentônicos (Belsher e Meinesz, 1995; Longepierre *et al*, 2005)

Esta macroalga produz metabólitos secundários como caulerpenina (Figura 1) que no meio ambiente tem papel de repelir seus predadores, diminuindo, assim, seu consumo (Pesando et al. 1996; Paul e Van Alstyne, 1988), esta espécie possui vários compostos secundários em comum com outros espécimes do mesmo gênero (Paul e Fenical, 1986).

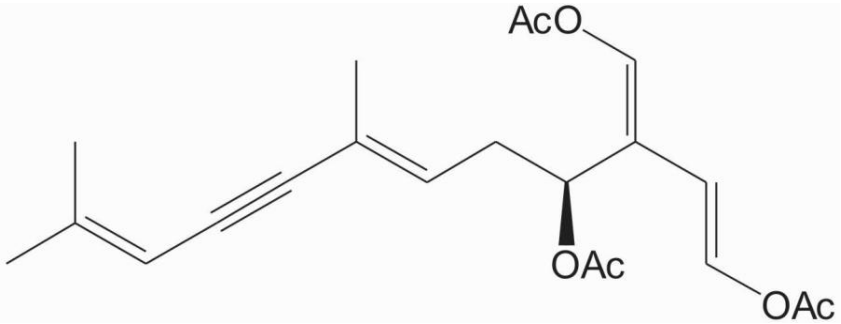

Figura 1– Estrutura química da caulerpenina

Fonte: Pereira,R.C.

Diante do que foi exposto, o presente estudo teve por objetivo investigar a toxicidade aguda do extrato aquoso bruto de *Caulerpa taxifolia* (EACT) (Vahl) Agardh (1817) Caulerpaceae, estimar o valor da DL_{50} em camundongos albinos Swiss (*Mus Musculus*) por via intraperitoneal, e analisar macroscopicamente os órgãos vitais dos animais tratados com o extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia.*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BOTÂNICO

C. taxifolia (Vahl) Agardh (1817) foi coletada nos meses de julho e outubro, que correspondem ao período de estiagem e chuvoso, de 2009, na praia de Barra de Sirinhaém, localizado no litoral Sul de Pernambuco. A coleta foi realizada no período da manhã, durante a maré baixa, na região mesolitoral, sendo em seguida identificada e fotografada para catalogação.

As amostras foram limpas, lavadas com água potável para a retirada do sal e em seguida, enxaguadas com água destilada. Posteriormente, foram colocadas em estufa, da marca FR Santer, com circulação forçada de ar a 35,0 ± 0,5 ºC (Raymundo *et al*., 2004).

3.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais utilizados nesta atividade foram os camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos com pesos entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 ^{o}C), em gaiolas de polipropileno recebendo alimentação específica e água *ad libitum*, foram divididos em grupos (n=5). O protocolo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco, com protocolo número **179/0**4.

3.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA POR VIA INTRAPERITONEAL

Os animais foram privados de alimento por 12 horas antes da realização dos ensaios e receberam água *ad libitum*. Em seguida o extrato aquoso de *C. taxifolia* (EACT) foi solubilizado em soro fisiológico (0,9%) e administrado, por via intraperitoneal (v.i.p.), mas doses de 6,25 a 2000 mg/kg. O grupo controle recebeu solução fisiológica (0,9%), pela mesma via. Após administração das respectivas doses, os animais foram confinados e submetidos observação acurada durante 120 minutos.

As alterações comportamentais foram notificadas segundo os critérios propostos por Malone (1977). Posteriormente foram realizadas observações em intervalos regulares durante 14 dias. O número de óbitos foi notificado para cada grupo e determinação da toxicidade aguda foi realizada segundo o método preconizado por Karber e Behrens (1964).

3.4. DETERMINAÇÃO DA DL_{50}

Camundongos machos dos grupos tratado receberam doses crescentes (6,25 a 2000 mg/kg/ip) do EACT e controle recebeu solução salina, pela mesma via de administração. Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas com água *ad libitum* e permaneceram livres em gaiolas para observação acurada (Malone, 1977).

3.5. ANÁLISE MACROSCÓPICA E MICROSCOPICA DOS ORGÃOS

Após o período de quarentena os animais foram sacrificados, por deslocamento da coluna cervical, para realização da necropsia, que consistiu em observações dos órgãos vitais (Dale, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA POR VIA INTRAPERITONEAL E DETERMINAÇÃO DA DL_{50}

O EACT quando administrado até a dose de 250 mg/kg (v.i.p), produziu nos 5 primeiros minutos: movimentação circular, edema de focinho e de pata, cauda em Straub, reação de fuga, movimento estereotipado, excreção fecal, postura estática, postura em garra, tremor da cauda, saltos, vasodilatação, aumento da libido, marcha esplástica, agressividade e expansão do pavilhão auricular.

Foi verificada alterações em relação a cor dos órgãos visualizados.

Em seguida foi verificado tremores, e ainda, uma acentuação do estímulo sexual (libido), levantamento do trem posterior e os saltos executados pelos animais tornaram-se mais intensos e acrobáticos.

No decorrer do experimento foi observado diurese e o comportamento de libido entre os animais. Foi evidenciado refluxo, marcha em monobloco, ptose palpebral e ainda se percebeu respostas semelhantes a aquelas visualizadas.

No decorrer do tempo de avaliação, os camundongos apresentavam-se bastantes reativos com expansão do pavilhão auricular, piloereção, executando movimento circular, saltos acrobáticos, distensão abdominal, movimento estereotipando, entretanto observou-se sonolência, que se tornava mais intensa, porém, eles mantinham comportamento tais como: aumento da libido, inversão de marcha, andar trôpego e etc. Este quadro observado se manteve até a finalização do experimento.

Nas doses de 500 a 2000 mg/kg/ip do EACT verificou-se comportamento semelhante ao grupo anterior, além da postura de ataque, lateralidade, inversão de marcha, exoftalmia, saltos, distensão abdominal.

Os efeitos tornaram-se mais intensos, e ainda houve registro de contorção abdominal e diurese. Foi visualizado aumento da libido, movimento estereotipado, distensão abdominal, tremores grosseiros e reatividade as mudanças do ambiente, destacando-se efeitos tais como: diurese, marcha em monobloco, taquipnéia, lateralidade e prostração.

Efeitos similares foram verificados nos grupos anteriores. Os animais alternavam o comportamento, ou seja, ora apresentavam agressividade com refluxo, tremores faciais, diurese, execução de saltos acrobáticos e movimentos circulares, ora demonstrava postura estática, prostração e sonolência, estes comportamentos foram mantidos. A dose de 1000 mg/kg/ip levou um animal a óbito durante o período de observação e os outros animais permaneciam reativos. Com as doses de 1500 mg/kg/ip e 1750 mg/kg/ip dois e três animais morreram respectivamente, durante os quatorzes dias em que estes permaneceram em observação. Na dose de 2000 mg/kg/ip houve morte de um animal, sendo que os outros animais morreram antes de completar 24h de experimentação. Não foi evidenciado nenhum registro de morte com a dose de 750 mg/kg/ip.

A toxicidade de uma substância pode esta atrelada a condição de exposição, ou seja, envolve a dose e a via administrada, o tempo e a freqüência de exposição (Somani et al., 1981, Klassen e Doull's, 2001).

A exposição por sua vez, esta relacionada com a dose, ou concentração, do agente químico envolvido com o organismo, e também com a sua interação no organismo, cujo efeito pode repercutir ao nível tecidual ou celular (Somani et al., 1981, ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1994, Klassen e Doull's, 2001).

As respostas observadas ao longo da experimentação, de acordo com Malone (1997) sugerem que o EACT agiu como estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), muito embora ações do tipo: sedação, ptose palpebral que são sinônimos de agentes depressores deste mesmo sistema também tenham sido visualizadas. Além de que o extrato na de 1000 mg/kg/ip causou óbito de um individuo, o que é considerado um efeito adverso após a exposição a substância estudada caracterizando-a, segundo Oga et al (2008), como potencialmente tóxica, uma vez que a morte é um efeito adverso considerado mais drástico.

Alguns dos efeitos apresentado pelo extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* é característico de substâncias derivadas do indol, como a indometacina e a fenilbutazona que apresentam como efeito adverso transtornos gastrointestinais, edemas, lesões hepáticas e asma brônquica, também podem aparecer diminuição da atenção e transtornos sensoriais. O que pode sugerir a presença do alcalóide indólico, derivado do triptofano, que é citado na literatura por Aguilar-Santos e Maiti (1970) para espécies tóxicas do gênero *Caulerpa*.

4.3 ANÁLISES MACROSCÓPICAS

Quando comparados com os animais do grupo controle os animais tratados com doses de 6,25 a 250 mg/kg/ip apresentaram alterações na coloração e um discreto aumento de volume no fígado, rins, baço pulmão e

coração, mas este aumento de volume não foi considerado significativo quando analisados estatisticamente.

Com as doses de 500 e 750 mg/kg/ip foi evidenciado dilatação vascular no mesentério, os pulmões apresentavam uma coloração vermelho púrpura e o baço encontrava-se com esplenomegalia. Foi observado que o coração de todos os animais tratados com estas doses apresentou um extravasamento sanguíneo que se acumulava na mesma região, logo abaixo do epicárdico, e que o fígado estava com um aumento significativo em seu volume e em alguns áreas com isquemia na região cortical e na região medular foi observada a presença de pontos hemorrágicos (figura 2).

Figura 2. Aspectos observados nos pulmões (A), baço (B) e fígado (C) dos animais tratados com *Caulerpa taxifolia*, na doses entre 500 e 750 mg/kg/ip.

Nestas analises foram observadas que as alças intestinais dos animais tratados com doses superiores a 1000 mg/kg/ip estavam infladas e havia sinais de hemorragia no baço, assim como, no pulmão, no coração, e nos testículos, cujos vasos estavam dilatados. Foi evidenciado hipertrofia no esôfago, apêndice e nos rins, no fígado e uma intensa isquemia em sua região mais central, com maior concentração de sangue na região periférica e hepatomegalia comparados com o grupo controle (figura 3).

Figura 3. Aspectos observados nos estômago (A), rim (B) e alças intestinais (C) dos animais tratados com *Caulerpa taxifolia*, na dose de 1000 mg/kg/ip.

A hipertensão portal esta relacionada à obstrução da veia porta principal, que causa ascite, formação de canais anastomóticos sistêmicos, esplenomegalia, encefalopatia hepática (metabólica) secundária a entrada de sangue portal na circulação sistêmica antes de sua desintoxicação no fígado.

A esplenomegalia é atribuída à prolongada congestão no baço. Uma série de alterações hematológicas pode surgir secundariamente ao aumento esplênico, inclusive anemia, leucopênia e trombocitopenia.

Com a hipertensão portal e um seqüestro de um grande volume sanguíneo, ocorre uma redução na volemia renal e o índice de filtrado glomerular. Isto, por si só, leva à retenção de sódio. Alem disso, existe uma secreção aumentada de aldosterona e hormônio antidiurético (ADH), aumentando ainda mais a retenção de sódio e água, uma fez que estes hormônios são metabolizados no fígado, seus níveis aumentam ainda mais na distribuição hepática severa (Robbins et al, 1984)

REFERÊNCIA

AGUILAR-SANTOS, G.;J .CHEM.SOC.,C,(1970),842.Chemical studies on three species of marine algal genus Caulerpa. In.Froedenthal, H.D.(ed.) Drugs from the sea. **Marine Technology Society**, p. 173-176.

BEZERRA-NETO, J.T.B., et al. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. **Revista Brasileira Engenharia de Pesca**, v.3, n.2, p.50-62, 2008

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**., v.22. p. 15-61, 2005.

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**., v.23, p. 26-78, 2006.

FENICAL, W.; PAUL,V; **Hydrobiologia**,(1984),116,135.

FLESCHIN, S., FLESCHIN, M., NITA, S., PAVEL, E., MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roum biotech Lett**. 2000, 5: 479-495.

GHOSH, P., et al. *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v.65, n.23, p.3151-3157, 2004.

MAITI, B.C.; THONSON, R.H. in Marine Natural Products Chemistry (Faulkner,
MATSUKAWA, R., DUBINSKY, Z., KISHIMOTO, E., MASAKI, K., MASUDA. Y., TAKEUCHI, T., CHIHAARA, M., YAMAMOTO, Y., NIKI, E., KARUBE, I., A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J. Appl Phycol** 1997, 9: 29-35.

NORDBERG, J., ARMÉR, S. J., Reactive oxygen species antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol Med**. 2001, 31: 1287-1312.

OLIVEIRA, E. C. The seaweed resources of Brazil. In: CRITCHLEY, A. T., OHNO, M. eds. **Seaweed Resources of the World**. Yokosuka: Japan International Cooperation Agency. 1998. p. 367-371.

PAUL, V.J.; CRUZ-RIVERA, E.; THACKER, R. W. Chemical mediation of macroalgal-herbivore interactions: ecological and evolutionary perspectives. In: MCCLINTOCK, J.B.; BAKER, B. J. (Ed). **Marine Chemical Ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 227-265.

PITTELLA, A.M.; RIBEIRO, D.; OLIVEIRA SÁ,E.; TORRES,P.R.R.; SOUZA,V.L.F. **Hipertensão portal**: figado as grandes síndromes**,** 1995, 4: 78-97.

RAMARATHNAM, N,; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plants food antioxidants to human health. **Trends Foods Sci. Technol**., v.6, p 75-82, 1995.

ROBBINS,S.L.; ANGELL,M.; KUMAR,V. 1984, **Patologia básica,** Editora da Universidade de São Paulo, 16: 577-625

SARDESAI V.M. (1992) Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. **J Nutr Biochem** 3: 154-166.

Silveira PG, Galego GN, d'Acampora AJ, Bittencourt A, Kestering D, Philippi FF, Rizzatti J. Estudo experimental comparativo da eficácia antitrombótica da heparina convencional e da heparina de baixo peso molecular. **Acta Cir Bras** [serial online] 2001 Out-Dez;16 v4.

5. Artigo2

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO AQUOSO DE *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817)

SILVA, EVANDRO VALENTIM; ROCHA, FLÁVIA SANTOS PAULINO; CAVALCANTI, KAREN PENA SOUZA; CARVALHO, RITA DE CASSIA XAVIER; ANJOS, FÁLBA BERNADETE RAMOS; *SOUZA, IVONE ANTÔNIA

*Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Av.Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. e-mail: idesouza5@gmail.com

RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas no corpo de forma anômalas das próprias células. Uma célula normal transforma-se em células cancerosas em decorrência de uma ou mais mutações do DNA, que pode ser congênita ou adquirida. As algas marinhas representam uma rica fonte de compostos bioativos, algumas delas precursoras de ferramentas farmacológicas e de substancia potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos fármacos. O presente estudo tem o objetivo de avaliar atividade antitumoral de *Caulerpa taxifolia* em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*). Os animais transplantados foram divididos em três grupos: tratado com extrato aquoso bruto de *C. taxifolia* (EACT) 10 mg/kg/sc, padrão com morfina 10 mg/kg/sc e controle que recebeu solução salina pela mesma via. O percentual de inibição tumoral encontrado foi de 74,64 % para o carcinoma de Erlich. A morfologia dos rins, pulmões, fígado, baço, epidídimo e testículo sofreram alteração que variou numa escala de leve a moderada, sugerido que O EA da *Caulerpa taxifolia* agiu possivelmente interferindo o metabolismo hepático e consequentemente atingindo órgãos-alvos dos animais, se caracterizando como uma alga tóxica presente no litoral pernambucano.

Palavras-chave: Carcinoma de Ehrlich, *Caulerpa taxifolia*, morfologia de órgãos, metabolismo.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled proliferation and spread in the body in abnormal cells themselves. A normal cell becomes cancerous cells due to one or more mutations in DNA, which may be congenital or acquired. Seaweeds are a rich source of bioactive compounds, some precursor substance and pharmacological tools potentially useful for the development of new drugs. This study aims to evaluate antitumor activity of *Caulerpa taxifolia* in Swiss albino mice (*Mus musculus*). Transplanted animals were divided into

three groups: treated with crude aqueous extract of *C. taxifolia* (ACTS) 10 mg/kg/sc, with standard morphine 10 mg/kg/sc and saline control received the same way. The percentage of tumor inhibition was found to be 74.64 % for carcinoma of Ehrlich. The morphology of the kidneys, lungs, liver, spleen, testis and epididymis were changed on a scale that ranged from mild to moderate, suggested that the EA *Caulerpa taxifolia* acted possibly interfering with hepatic metabolism and consequently reaching target organs of animals, is characterized as a toxic algae present on the coast of Pernambuco.

Keywords: Carcinoma, Ehrlich, *Caulerpa taxifolia*, organ morphology, metabolism.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas no corpo de forma anômalas das próprias células. Uma célula normal transforma-se em células cancerosas em decorrência de uma ou mais mutações do DNA, que pode ser congênita ou adquirida. As duas principais características de alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer são: desenvolvimento de proto-oncogênese em oncogênese e a inativação dos genes supressores tumorais (Rang, 2003)

As células cancerosas manifestam-se em graus variáveis, com quatro características que as distingue das células normais: proliferação descontrolada, perda de diferenciação e da função, poder de invasão e metástases (Gilman, 1996).

O crescimento do tumor maligno é resultado do desequilíbrio entre a capacidade de proliferação de suas células e a reação do organismo para detê-lo. Existe também um processo de autolimitação ao crescimento neoplásico originado entre o desproposito entre o desenvolvimento celular e mesenquimal de suporte, vasos e tecidos conectivos, que é responsável pela necrose e detenção da função reprodutora das zonas menos vascularizadas do tumor (Rossel, 1984).

As neoplasias malignas situam-se entre as principais causas de mortalidade, correspondendo à segunda causa de morte natural. De acordo

com os dados de registros de câncer no Brasil, os tumores mais freqüentes são os de próstata, pulmão, estômago, colón, reto e esôfago na população masculina. Em mulheres predomina o câncer de mama, seguido dos cânceres de colo uterino, colón e reto, pulmão e estomago (Guerra, 2005).

As algas marinhas representam uma rica fonte de compostos bioativos, algumas delas precursoras de ferramentas farmacológicas e de substância potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos fármacos (Natali, 2007). *Caulerpa taxifolia* são ricas em caulerpina, que apresenta um amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo, a atividade antioxidante e antitumoral (Hayme e Fenical,1988; Solè-Cava e Kelecom ,1988). Diante do exposto o presente estudo tem o objetivo de avaliar atividade antitumoral da macroalga marinha *C. taxifolia* em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BOTÂNICO

A macroalga foi coletada nos meses de julho e outubro, que correspondem ao período de estiagem e chuvoso, de 2009, nas praias de Barra de Sirinhaém, localizado no litoral Sul de Pernambuco. A coleta foi realizada no período da manhã, durante a maré baixa, na região mesolitoral, sendo em seguida identificada e fotografada para catalogação.

As amostras foram limpas, lavadas com água potável para a retirada do sal e em seguida, enxaguadas com água destilada. Posteriormente, foram colocadas em estufa, da marca FR Santer, com circulação forçada de ar a 35,0 ± 0,5 ºC (Raymundo *et al*., 2004).

Figura 1 – Aspecto geral de *Caulerpa taxifolia*
Fonte: Maharashtra e Karnataka

3.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais utilizados nesta atividade foram os camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos pesando entre 25 e 30g, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 ^{o}C), em gaiolas de polipropileno recebendo alimentação específica e água *ad libitum*.

3.3. ATIVIDADE ANTITUMORAL

Para o transplante dos tumores, segundo a metodologia de Stock, a massa tumoral foi retirada de um animal doador. Após este procedimento, um fragmentado de 3 mm de diâmetro do conteúdo tumoral foi introduzido na região axilar do animal receptor por via subcutânea (Stock et al., 1955; Koniyama e Funayama, 1992).

Os animais transplantados foram divididos em três grupos: controle, padrão (metadexato 10/MG/kg) e tratado com 10 mg/kg/sc). Ao grupo tratado foi administrado o extrato aquoso de *C. taxifolia* (EACT) durante oito dias. Ao grupo controle foi administrado o veículo empregado na diluição do extrato, enquanto o grupo padrão recebeu o fármaco de referência para o tratamento da linhagem tumoral.

A quimioterapia experimental teve início 48 horas após o transplante dos tumores. Após o término do tratamento, todos os animais foram pesados e sacrificados, e os tumores retirados, dissecados e pesados. A inibição tumoral foi calculada segundo a fórmula:

$$\mathbf{TWI\ (\%) = (C\text{-}T)\ /C \times 100}$$

Onde:
TWI = Percentual de inibição do peso do tumor
C = Média dos pesos dos tumores do grupo controle
T = Média dos pesos dos tumores do grupo tratado.

Os ensaios foram realizados conforme a metodologia descrita por Geran et al. (1972).

3.4. AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Após a realização da experimentação, os animais foram submetidos a toracolaparotonia para retirada dos seguintes órgãos: rins, fígado, pulmão, baço e testículos. As peças histológicas fixadas em solução de formalina a 04%, lavados, processados, incluídas em parafina e coradas pela técnica de Hematocilina-Eosina (HE), para posterior análise microscópica (Beçak e Paulete, 1976).

3.5. ANÁLISE ESTATISTICA

A média e o desvio padrão foram avaliados por análise de variância (ANOVA) mediante o teste "t" de Studant, considerando-se significativo os valores para um valor p<0,01 (Christman, 1985). A variação entre as taxas metabólicas em função da dose foi avaliada por análise de regressão do programa Excel®, versão 2007, da Microsoft®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ATIVIDADE ANTITUMORAL

Durante o período de realização da terapia experimental não foram visualizados sinais de efeitos adversos com a dose do EACT administrado. Na tabela 1 estão representadas as médias e desvios padrões do peso dos animais (PA) e dos tumores (PT), assim como a razão entre PT/PA.

Tabela 1 – As médias e os desvios padrões da razão entre pesos dos animais PA (*Mus musculus*) dos Carcinomas de Ehrlich (PT) e das relações PT/PA dos grupos tratado com EACT na dose de 10 mg/kg/sc, padrão com morfina 10 mg/kg/sc e controle com solução salina, pela mesma via.

Grupos	P A	PT	PA/PT
G1 – Controle	30,8 ± 0, 064	0, 1035 ± 0,002	0,5300 ± 0,0032
G2 – Padrão	29,38 ± 0, 039	0, 1017± 0,002	0,0568 ± 0,001
G4 - Tratado (0,10 g/kg)	32,17± 0, 050	0, 0876* ±0,002	0,0653* ± 0,001

*Diferença significativa em relação ao controle (*ANOVA seguido de Teste "t" de Student ; ** ANOVA)

A estatística dos dados revelou que houve diferença significativa entre os valores do grupo tratado com EACT em relação ao grupo controle, cujo o percentual de inibição tumoral encontrado foi de 74,64% para esta linhagem utilizada nesta experimentação (Gráfico 1).

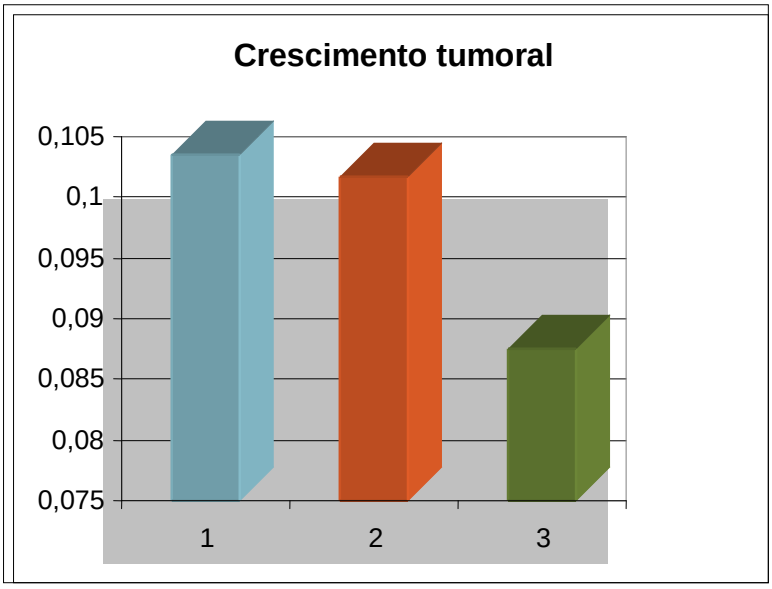

Gráfico 1. Médias dos tumores dos animais dos grupos controle (1), padrão (2) e tratado com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (3).

Na tabela 2 estão relacionados às médias e os desvios padrões do peso dos órgãos dos animais tratados, assim com, do grupo controle e do grupo padrão, para análise dos dados relacionados nesta tabela foi utilizado ANOVA seguido de Teste "t" de Student.

Tabela 2- As médias e os desvios padrões da razão entre pesos dos órgãos vitais/peso dos animais (*Mus musculus*) dos grupos tratado com EACT na dose de 10 mg/kg/sc, padrão com morfina 10 mg/kg/sc e controle com solução salina, pela mesma via.

Grupos	Fígado	Baço	Rins	Pulmão
G1 – Controle	0,0658 ± 0,0081	0,0069 ± 0,0012	0,0126 ± 0,0020	0,0078 ±0,0003
G2 – Padrão	0,0551± 0,0054	0,0038± 0,0004*	0,0132 ± 0,0015	0,0065± 0,0007
G3 - Tratado (0,10 g/kg)	0,0675 ± 0,0075	0,0071 ± 0,0015	0,0132 ± 0,0011	0,0090*±0,0036

*Diferença significativa em relação ao controle (*ANOVA seguido de Teste "t" de Student; ** ANOVA)

Não foram observadas diferenças significativas entre a relação massa dos órgãos vitais/massa corporal dos animais tratados em relação ao grupo controle, desta forma pode-se deduzir que o EACT não causou alterações significativas na morfologia dos órgãos dos organismos tratados (Gráfico 2).

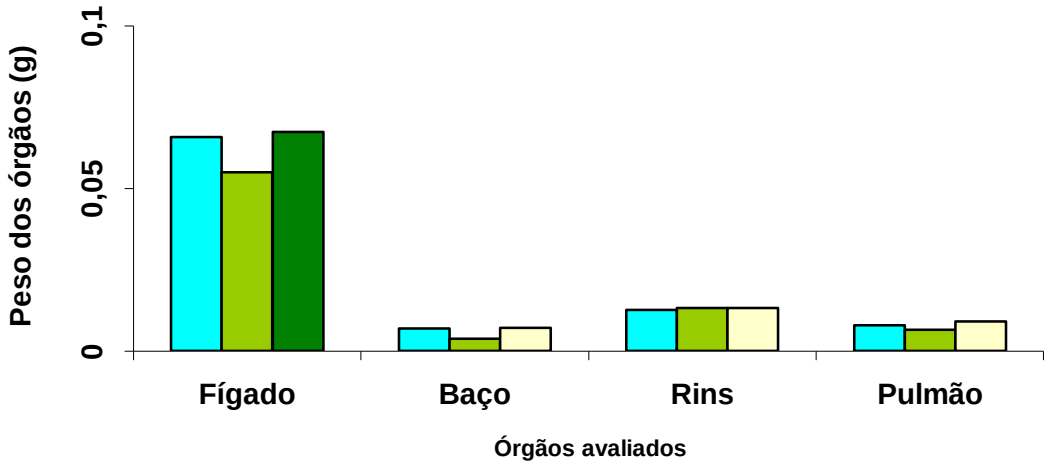

Gráfico 2. Médias dos pesos dos órgãos dos animais dos grupos controle (1), padrão (2) e tratado com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (3).

Na tabela 3 estão representados as médias e os desvios padrões dos dados bioquímicos e hematológicos do grupo tratado, assim, como os valores de referência para animais de laboratório.

Tabela 3 – As médias e os desvios padrões da razão entre pesos dos dados bioquímicos e hematológicos dos animais (*Mus musculus*) dos grupos tratado com EACT na dose de 10 mg/kg/sc, padrão com morfina 10 mg/kg/sc e controle com solução salina, pela mesma via.

Grupos	Glicose	Uréia	Creatinina	Bilirrubina	TGO	TGP
G1 – Controle	98,25 ± 4,64	67 ± 18,93	0,76 ± 0,32	1,9 ± 0,04	139 ± 25	53,5 ± 12, 47
G2 – Padrão	127,6 ± 9,39	52,4 ± 6,22	0,66 ± 0,11	1,8 ± 0, 19	127,6 ± 10,8	55,6 ± 8,02
G3 - Tratado (0,10 g/Kg)	93,5± 61,5	44 ± 1,52	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,6	45,33 ± 3,28**	180,2 ± 74,23**

*Diferença significativa em relação ao controle (*ANOVA seguido de Teste de “t” de Student; ** ANOVA)

De acordo com os valores apresentados na tabela 3 os níveis de glicose, uréia, creatina e bilirrubina nos animais pesquisados estão entre os valores de referência para animais de experimentação. Os níveis de TGO dos camundongos do grupo tratado estavam reduzidos quando comparados com o grupo controle. Este, assim com, o grupo padrão encontrava entre os níveis de referência para animais de experimentação. Os níveis de TGP dos animais

controle e padrão estavam dentro dos valores de referência para animais de laboratório, mas o grupo tratado apresentou valores muito acima dos valores de referência.

4.2 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

A histologia do fígado dos animais tratados com EACT na dose de 10 mg/kg/sc demonstrou que a veia central (1) e sinusóides hepáticos (2) encontram-se possivelmente congestos. Hepatócitos aparentemente preservados (3), porém com pontos hemorrágicos (4), principalmente na região medular (figura 2).

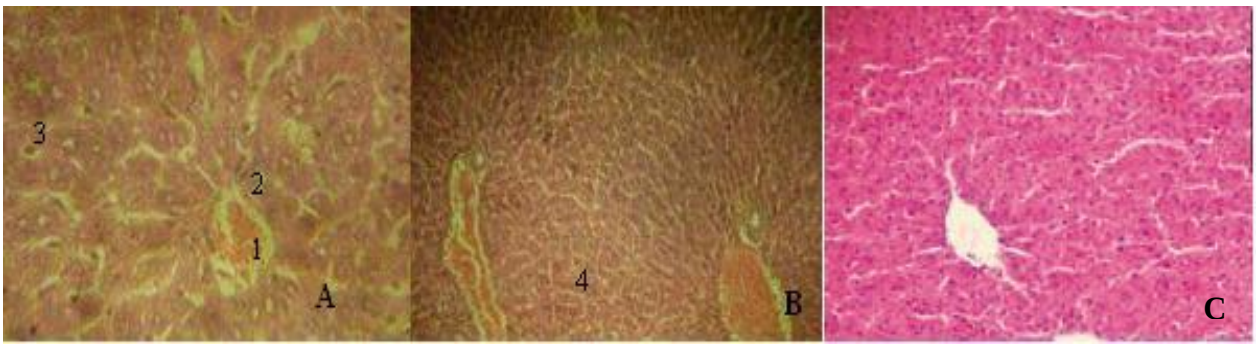

Figura 2. Microscopia da morfologia do fígado dos animais implantados com carcinoma de Ehrlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A e B), sendo observado congestão vascular, qunado comparados com os animais controle (C). Coloração HE. Obj. 400x.

A morfologia dos testículos do grupo tratado apresentou-se pouco preservada ao nível de túbulos seminíferos (1), no tecido intersticial e nas células de Leydig (2). As células germinativas primordiais diferenciadas se mostraram desordenadas, o que possivelmente atingiu as células de Sertoli (3), isto quando comparado ao grupo controle. A extensão do danos no aparelho reprodutor pode também ser vislumbrado no epidídimo, com sua morfologia pouco preservada (4), o que pareceu atingir os espermatóides situados centralmente a luz do tubo (5) , comprometendo possivelmente a sua fisiologia (Figura 3. A, B, C e D).

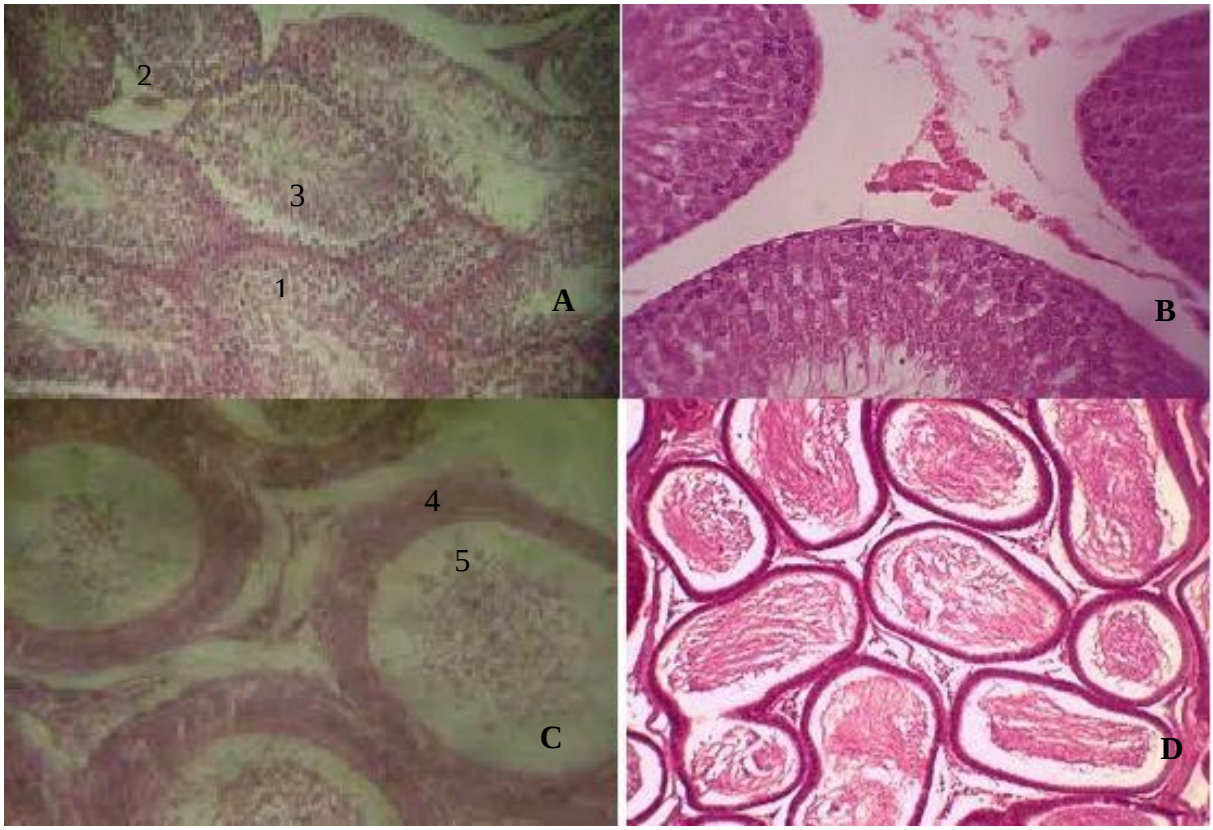

Figura 3. Microscopia da morfologia do aparelho reprodutor masculino mostrando os testículos dos animais implantados com carcinoma de Erlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia dos tubulos seminiferos e do tecido intersticial pouco preservado, em relação ao grupo controle (B). O Epidídimo do grupo tratado (C) também apresentou alterações, quando comparados com os animais controle (D). Coloração HE. Obj. 400x

Morfologia do tecido renal aparentemente conservada, tanto na região cortical quanto periférica, sendo observado nos túbulos contorcidos distais (1) e proximais (2). Glomérulos renais (3) e mácula densa (4) preservados, contudo os vasos altamente congestos (5), com discreta infiltração no tecido (6) (Figura 3).

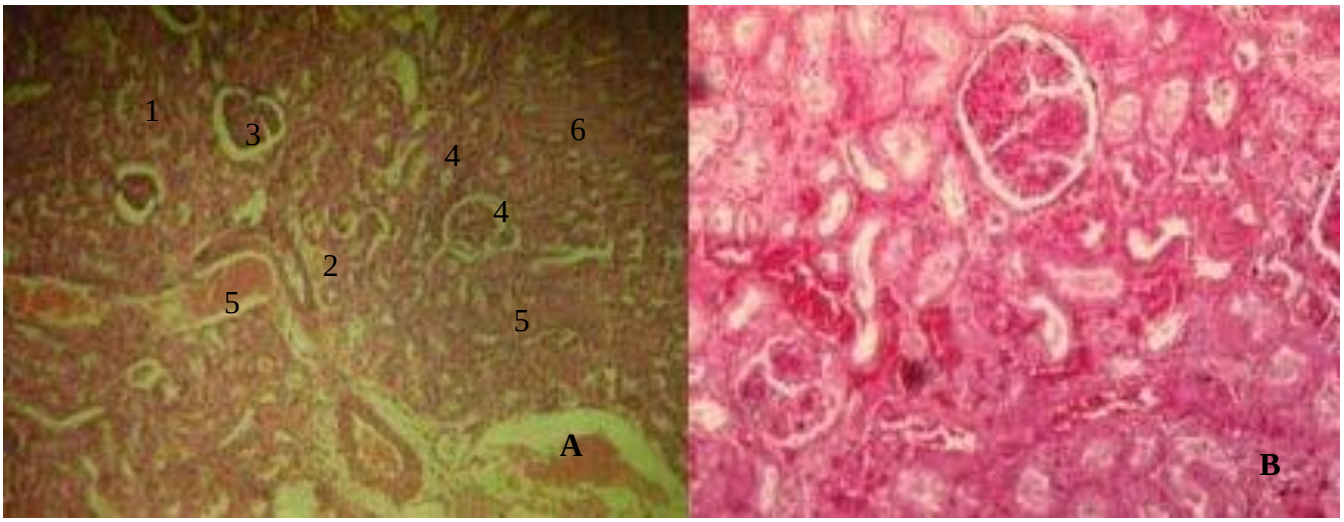

Figura 4. Microscopia da morfologia do aparelho renal mostrando os rins dos animais implantados com carcinoma de Ehrlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia aparentemente preservada, em relação ao grupo controle (B). Coloração HE. Obj. 400x

A estrutura microscópica do baço do grupo tratado com o extrato apresentou morfologia conservada nas polpas branca, com agregados linfáticos perivasculares (1) e possivelmente, sinusóides venosos e cordões celulares (2), bem como, invasão de infiltrado celular (3) presentes nesta área, em relação ao grupo controle (Figura 5).

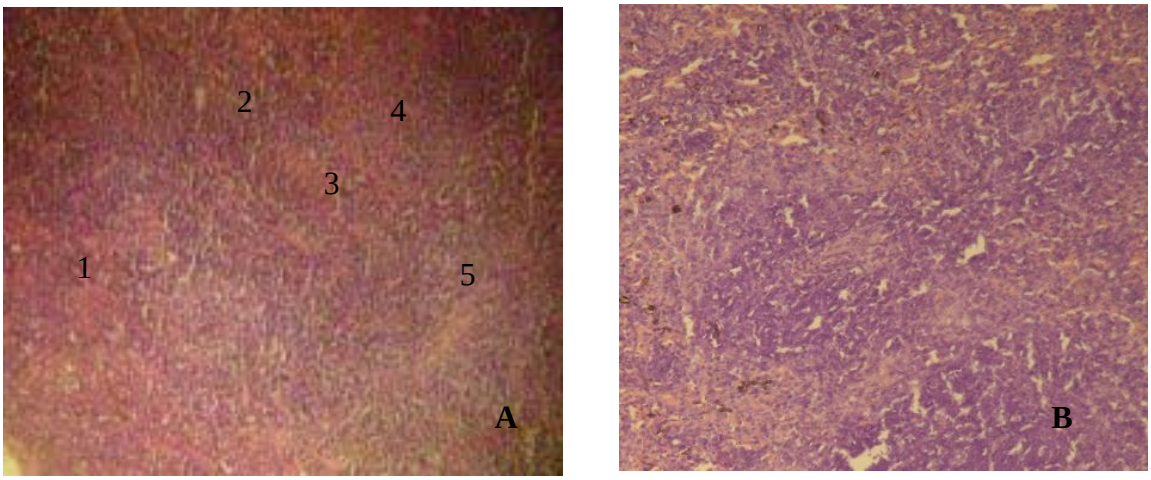

Figura 5. Microscopia da morfologia do baço mostrando os rins dos animais implantados com carcinoma de Erlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia aparentemente conservada, em relação ao grupo controle (B). Coloração HE. Obj. 400x.

A morfologia dos pulmões dos animais que receberam tratamento com a *C. taxifolia* apresentaram-se com morfologia preservada nos ductos alveolares (1), alvéolos (2), brônquios (3), porém com congestão no brônquio terminal (4), assim como infiltrado linfocitário no interstício pulmonar (5), em relação ao grupo controle (figura 6).

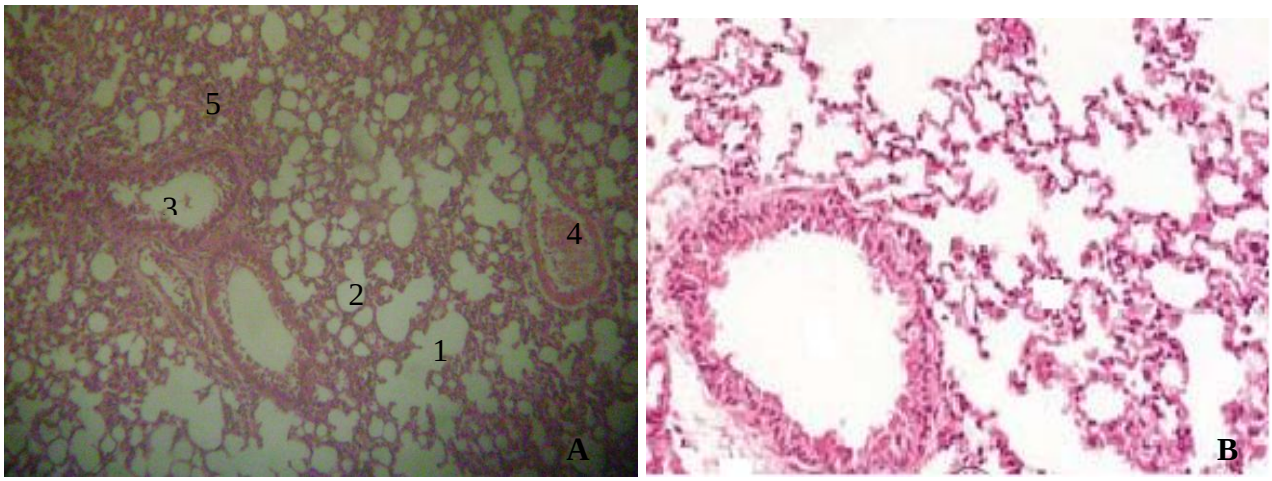

Figura 6. Microscopia da morfologia do pulmão dos animais implantados com carcinoma de Erlich, tratados com extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* na dose de 10 mg/kg/sc (A), com morfologia aparentemente preservada, em relação ao grupo controle (B). Coloração HE. Obj. 400x.

O ambiente aquático tem uma dinâmica química capaz de promover a comunicação, defesa e reprodução dos organismos marinhos (Solé-Cava e Kelocom, 1988). A toxicocinética da caulerpina e caulerpenina, talvez promova efeitos metabólicos capazes de gerar danos de diferentes intensidades como observados na morfologia dos órgãos.

A difusão de partículas no meio aquoso pode ser em solução ou em suspensão (Pinto, 2002). Um ponto relevante observado no ecossistema do nosso litoral revela que esta alga invasora está se propagando, em detrimento do comportamento de esquivar dos organismos marinhos associados nas locas. Talvez estes “dois” principais componentes presentes no EACT, ao ser ingerido animais provoque sinais de intoxicação. Estas respostas são difundidas pelas águas e assim eles não se alimentam.

Segundo Campàs et al. (2007), as correntes oceânicas superficiais favorecem o transporte de contaminantes, devido a densidade da água pode sofrer interferência da diminuição da temperatura ou do aumento da concentração do sal. Comenta ainda os autores que as substâncias hidrofílicas se dissolvem no meio e se distribui na superfície.

Sob condições experimentais foi possível evidenciar quais seriam as respostas nos órgãos dos animais que delas se alimentassem. Ao atingir o fígado, que um órgão responsável pelo metabolismo a caulerpina e caulerpenina exerceria sua ação logo no mecanismo de primeira passagem. Estes dados demonstram que as toxinas presentes na *C. taxifolia* estariam alterando a regulação metabólica dos animais.

O EACT promoveu alterações na morfologia hepática. De acordo com Lieber e Guengerich (2005) e Navarro e Senior (2006), o fígado é um órgão capaz de metabolizar os fármacos circulantes, antes deles alcançarem a circulação sistêmica, contudo a *Caulerpa taxifolia* foi capaz de suplantar esta habilidade e atingiu órgãos-alvo, como visualizado em nossos trabalhos, provavelmente se caracterizando como uma alga tóxica presente no litoral pernambucano.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados neste estudo foi possível observar que o EACT apresentou redução significativa dos tumores, quando comparados com os tumores dos animais do grupo controle, porém causou lesão, talvez irreversíveis nos tecidos avaliados.

6. REFERÊNCIAS

CAMPÀS, M., PREITO-SIMON, B., MARTY, J. L. Biosensors to detect marine toxins: assessing seafood safety. **Talanta**. v. 2. 2007. p. 884-895.

CRISTMAN R.V. 1985. **Estatística aplicada**, 2 ed, Ed.Edgard Blücher, Rio de Janeiro, p:118-123.

GILMAN, A.G. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9° Ed. Rio de Janeiro , 1996.

LIEBERBLERT, D.C., GUENGERICH, F.P. Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. Nat **Rev Drug Disc**. 2005. 4. p. 410-420.

KONIYAMA K, FUNAYAMA S, 1992. **Antitumor agents**. In: the search for bioactive compouds from microorganisms. Ed. Satoshi Omura, Spriger-Verlag, New York.cap. 5, p: 79-97.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2° Ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

NAVARRO, V.J., SENIOR, J.R., Drug-related hepatotoxicity. N Engl **J Med**. 2006. 354. p. 731-739.

RANG H.P.; DALA M.M.; RITTER J.M.; MOORE P.K., Farmacologia, 5° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2003.

SOLÉ-CAVA, A. M., KELOCOM, A. Diálogo químico nos mares. **Ciência Hoje**. 1988. 8 (46). p.18-29.

STOCK, C.C, CLARKE D.A, PHILIPS F.S, BARCLAY R.K.1955. Sarcoma 180 inhibition screening data. **Cancer Research Sup**. N° 2. p. 179-331.

TAYLOR C.R, SCHMIDT-NIELSEN K.RAAB, J.L.1970. Scaling of the energetic costof running body size in mammals. Am.J. Physiol 219:1104-1107.

6. Artigo 3

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817)

SILVA, EVANDRO VALENTIM; ROCHA, FLÁVIA SANTOS PAULINO; SILVA-NETO, JOSÉ FERREIRA; CAVALCANTI, KAREN PENA SOUZA; CARVALHO, RITA DE CASSIA XAVIER; JIMENEZ, GEORGE CHAVES; ANJOS, FÁLBA BERNADETE RAMOS; *SOUZA, IVONE ANTÔNIA

*Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Av.Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. E-mail: idesouza5@gmail.com

RESUMO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (ERO). Muitas doenças e processos degenerativos podem ser associados com a superprodução de EROs, incluindo inflamações, isquemia cerebral, mutagenecidade, câncer,demência e envelhecimento. As macroalgas marinhas representam uma rica fonte de compostos bioativos, e a *Caulerpa taxifolia* é rica em caulerpina, substância química com amplo espectro de atividades biológicas. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de *C. taxifolia*. A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método de Ruch et al. (1989). A concentração testada do extrato da alga superou a eficiência do padrão da amostra apresentando 94,00 % de atividade antioxidante. Esta ação evidenciada em fontes naturais é atribuída, aos compostos fenólicos comumente encontrados nestes organismos, que estão sempre submetidos a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O_2 e CO_2 comprometendo a sua sobrevivência.

Palavras chaves: antioxidante; algas; *Caulerpa taxifolia*; fenóis

ABSTRACT

Oxidative stress is characterized by a significant increase in intracellular concentration of oxidizing species such as reactive oxygen species (ROS) It attacks the cellular

constituents such as proteins, lipids and nucleic acids leading to formation of toxic compounds. Many diseases and degenerative processes may be associated with the overproduction of ROS, including inflammation, cerebral ischemia, mutagenicity, cancer, dementia and aging. Seaweeds are a rich source of bioactive compounds, and the *Caulerpa taxifolia* algae are rich in caulerpina, chemical substance which has a wide spectrum of biological activities such as antioxidant and antitumor activities. This study aimed to evaluate the antioxidant activity of aqueous extract of *C. taxifolia*. The antioxidant activity was determined according to the method of Ruch et al. (1989). The tested concentration of the extract of *Caulerpa taxifolia* has exceeded the efficiency of the pattern, with 94.00% of antioxidant activity. The antioxidant activity of natural sources is attributed by many authors, the phenolic compounds commonly found in higher plants and algae. seaweed are always subject to rapid change in light intensity and concentrations of O_2 and CO_2 along the water column and thus their survival depends on an efficient response to oxidantive stress.

Keywords: antioxidant; algae; *Caulerpa taxifolia*; phenols

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e acompanhada, simultaneamente, pela perda das defesas antioxidantes (Arteel and Sies, 2001). As EROs provocam severas mudanças ao nível celular levando à morte da célula devido a sua extrema reatividade.

Elas atacam os constituintes celulares, como proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos levando a formação de compostos tóxicos (Kaharaman et al., 2003). Muitas doenças e processos degenerativos podem ser associados com a superprodução de EROs, incluindo inflamações, isquemia cerebral, mutagenecidade, câncer, demência e envelhecimento (Ren et al., 2001).

Estudos epidemiológicos e experimentais realizados nas últimas décadas comprovaram a atividade antioxidante de produtos de origem vegetal,

fontes de compostos fenólicos (Natella et al.,2002; Okamura et al., 2005). As algas marinhas representam uma rica fonte de compostos bioativos, algumas delas precursoras de ferramentas farmacológicas e de substância potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos fármacos (Natali, 2007).

Apesar do alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, as algas marinhas são estáveis frente à oxidação durante seu armazenamento (Ramarathnam et al.,1995) A ausência de danos oxidativos, nos ácidos graxos poliinsaturados estruturais das membranas das algas sugere que estes alimentos possuem compostos e mecanismos antioxidantes (Matsukawa et al.,1997).

Foram identificados nas macroalgas uma variedade de metabólitos secundários incluindo terpenos, compostos aromáticos, acetoageninas, substâncias derivadas de aminoácidos e polifénois (Blunts *et al.,* 2005, 2006) reconhecidos por possuir ação defensiva contra herbivoria (Hay e Fenical, 1988, Paul *et al.,* 2001), polissacarídeos e minerais (Oliveira, 1998).

C. taxifolia são algas ricas em caulerpina, um diterpenóide, substância química que apresenta um amplo espectro de atividades biológicas (Hayme e Fenical, 1988; Solè-Cava e Kelecom, 1988). O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A habilidade dos extratos em sequestrar peróxidos de hidrogênio foi determinada de acordo com o método de Ruch et al. (1989). Uma solução (4 mM) de peróxido de hidrogênio foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4). A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada espectofotrometricamente no comprimento de onda de 230 nm, usando ab

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração testada do extrato de *C. taxifolia* superou a eficiência do padrão, apresentando 94,00 % de atividade antioxidante. Comparando os resultados obtidos neste estudo com resultados obtidos por Raymundo (2004) fazendo uso de mesma metodologia, pode-se constatar que o desempenho apresentado por ela diante de peróxidos de hidrogênio é maior que a de antioxidantes sintéticos de uso comercial, já que o de melhor desempenho destes apresentou 92,45 %.

A efetividade antioxidante de fontes naturais foi atribuída, por diversos autores, aos compostos fenólicos, que ocorrem naturalmente em plantas terrestres e aquáticas (Hayase e Kato, 1984). Seriam esses compostos os principais responsáveis pela atividade antioxidante de plantas, desempenhando papel fundamental na inibição da autoxidação em óleos (Ramarathnam *et al*., 1986).

A ocorrência natural de fenóis substituídos e polifenóis em algas vêm sendo cientificamente divulgada e ampliada ao longo dos anos (Pedersen, 1978). Embora essa classe de compostos inclua antioxidantes efetivos (Denisov, 1987)

As algas verdes possuem diversos compostos de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos. E adição de antioxidantes confere proteção não somente aos alimentos, mas também aos organismos animais, uma vez que, quando os antioxidantes são ingeridos, combatem radicais livres e suas repercussões, contribuindo para redução do risco de patologias (Vulcain et al., 2005).

As macroalgas estão sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O_2 e CO_2 ao longo da coluna de água e, assim, sua sobrevivência depende de uma resposta eficiente ao estresse oxidativo. Por essa razão, esses organismos podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais tanto para as Indústrias Alimentícias como para as Farmacêuticas (Matsukawa et al., 1997).

REFERÊNCIAS

Arteel, G.E., Sies, H., 2001. The biochemistry of selenium and glutathione system. **Environ Toxicol Pharmacol**. 10: 153–8.

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**., v.22, p. 15-61, 2005.

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**., v.23, p. 26-78, 2006.

MATSUKAWA,R.; DUBINSKY,Z.; KISHIMOTO,E.; MASAKKI,K.; MASUDA,Y.; TAKEUCHI,T.A. Comparison of screening methods for antioxidants activity in seaweeds. **J. appl.Phycol**.,v.9, p.29-35,1997.

OLIVEIRA, E.C. The seaweed resources of Brazil. In: CRITCHLEY,A.T.; OHNO,M.,eds. **Seaweed resources of the world**. Yokosuka: Japan Iternational Cooperation Agency, 1998.p.367-371.

Kaharaman, A., Erkasap, N., Koken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanolinduced gastric lesions. **Toxicology** 183, 133–142.

RAMARATHNAM, N. OSAWA, T.; NAMIKI, M.; TASHIRO,T. Studies on the relaionship between antioxidative activity of Rice hull and germination ability of rice seeds. **J. Sci. Food Agric**., v.37, p.719-726, 1986.

RAMARATHNAM, N. OSAWA, T. OCHI, H. KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci.Technol**., v.6, p.75-82,1995.

MAITI, B.C., THAMSON, R.H., MAHENDRAN M.1978.The structure of caulerpina, a pigment from *Caulerpa* algae. **J..Chem.Res**. (S) 1978: 126-127.

SCHWEDE, J.G, CARDELLINA, II J.H., GRODE, S.H, JAMES Jr., T.R, BLACKMAN, A. J. 1987. Distribuition of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. **Phytochem**. 26: 155-158.

VEST, S.E, DAWES, C.J, AND ROMEO, J.T. 1983. Distribuition of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green algae Caulerpa (Caulerpales). **Bot. Mar.** 26:313-316.

HAYM.E & FENICAL.W,1988; Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense, *Ann. Ver. Ecol. Syst.,*n° 19, pp. 111-145.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, p. 495-503, 2004.

REN, X, YANG, L, LIU, J, SU, D, YOU, D, LIU, C., 2001. A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. **Arch Biochem Biophys**., 25: 250.

SOLÈ-CAVA.A.M. & KELECOM.A ,1988, Dialogo quimico dos mares , Ciência Hoje , n° 46, vol. 8, pp.18-29.

XUE, C-H, YU G, HIRATA, T, TERAO, J, LIN, H. 1998. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solventes. **Biosci Biotech Bioch** *62*: 206-209.

XUE, C-H, FANG, Y, LIN, H, CHEN, L, LI, Z-J, DENG, D, LU, C-X. 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. **J Appl Phycol** *13*: 67-70.

7. Conclusões

CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados apresentados com as metodologias utilizadas, foi possível concluir que:

- *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) apresentou efeito estimulante do sistema nervoso central e quando administrada em doses superiores a 1000 mg/kg (v.i.p) podendo causar morte dos animais e apresenta DL_{50} de 1750 mg/kg.

- *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) apresentam atividade antitumoral quando utilizada no tratamento de carcinoma de Ehrlich.

- *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) alterou a morfologia micro e macroscopia dos rins, pulmões, fígado, baço e testículos dos animais quando administrada em doses elevadas.

- *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) apresentou atividade antioxidante de 94% caracterizada como excelente, já que a atividade antioxidanbte apresentada é superior ao melhor antioxidante sintético existente no mercado, podendo ser utilizada pela Indústria Farmacêutica, para a formulação de produtos com finalidade de reduzir os danos oxidativos.

8. Referências

Referências

AMADE P, LEMÉE R (1998) Chemical defence of the mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production. **Aquatic Toxicology** 43: 287-300.

AQUINO , R.S. LANDEIRA-FERDANDEZ,A.M., VALENTE,A.P.,ANDRADE,L.R. & MOURÃO, P.A.S. (2005). Occurence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiol**. 15(1): 11-20.

Bellan-Santini, D., Arnaud, P. M., Bellan, G. & Verlaque, M. 1996. The influence of the introduced tropical alga *Caulerpa taxifolia,* on the biodiversity of the Mediterranean marina biota. **J. Mar. Biol. Assoc***.* U. K. *76:* 235-237.

BEZERRA-NETO, J.T.B., et al. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. ***Revista Brasileira Engenharia de Pesca***, v.3, n.2, p.50-62, 2008

BOUDOURESQUE, C. F., 1999. Introduced species in the Mediterranean: routes, Kinetics and consequences*. In:* **Proceedings of the Workshop on Invasive** *Caulerpa* **in the Mediterranean**, Heraklion, Creta, Greece, p. 51-72.

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**., v.22, p. 15-61, 2005.

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**., v.23, p. 26-78, 2006.

CARVALHO, I. S. **Paleontologia**. 2 ed. Interciência, Rio de Janeiro, p. 12-32, 2004.

CASSARO, C.M.F., DIETRICH, C.P. (1977). Distribuition of sulfated mucopolysaccharides in vertebrates, Bethesda. **Jour. Biol. Chem**. 252(7): 2254-2261.

CHESHIRE, A., WESTPHALEN, G., BOXALL,V., MARSH,R., GILLILAND,J., COLLINGS,G., SEDDON, S., LOO, M., 2002*. Caulerpa taxifolia* In: West Lakes and the Port River, South Australia: distribution, eradication opitions and consequences. SARDI Aquatic Sciences Publication Number RD02/0161. AReport to the PIRSA Fisheries Marine Habitat Program, p.64.

CECCHERELLI, G., CINELLI, F. 1997. Short-term effects of nutrient enrichment of the sediment and interactions between the seagrass *Cymodea nodosa* and the introduced green alga *Caulerpa taxifolia* in a Mediterranean bay. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol***., 217:* 165-177.

DIETRICH,C.P.,FARIAS,G.G.M.,ABREU,L.R.D.,LEITE,E.L.,SILVA,L.F.&NADE R,H.B.(1995). Anew approach for characterization of polysaccharides from

algae: Presence of four main acidie polysaccharides in three species of the class Phaeophycea. **Plan Scien**. 108 (2): 143-153.

FENICAL, W., PAUL, V; **Hydrobiologia**, (1984),116,135.

FLESCHIN, S., FLESCHIN, M., NITA, S., PAVEL, E., MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roum biotech Lett**. 2000, 5: 479-495.

GILMAN, A.G. et al. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 9° Ed. Rio de Janeiro, 1996.

GLASBY, T.M., CREESE, R.G., GIBSON, P.T., 2005. Experimental use of salt to control the invasive marine alga *Caulerpa taxifolia* in New South Wales, Australia. **Biol. Conserv**. 122, 573-580.

GHOSH, P.,ADHIKARI,U., GHOSH,P.K, PUJOL,C.A., CARLUCCI,M.J., DEMONT, E.B.(2004). *in vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from Caulerpa racemosa. **Phytochem**. 65(23): 3151-3157.

HART, D.J.; SCOTT, K.J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, Oxford, v.54, n.1, p.101-111, 1995.

HOEK, C.V.D., MANN, D.G., JAHNS, H.M. (1995). **Algae an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press.

HOROUN-BOUHECJA, F., MOSTAFA, E., SINQUIN, C., BOISSON-VIDAL, C. (2000). Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb. Resear** 100 (5): 453-459.

HUSSEIN, M.M.D., HELMY, W.A., SALEM, H.M. (1998). Biological activities of some galectomannans and their sulfated derivatives. **Phytochm**, 48(3): 479-484.

JAHNKE, LS., WHITE, A.L.,2003. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga Dunaliella tertiolecta. **J. Plant Physiol.160, 1193-1202.**

JOLY, A.B. (1965). **Flora marinha do litoral Norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**. São Paulo.

Lee, T., 1998.Investigations of some intertidal green macroalgae to hyposaline stress: detrimental role of putrescine under extreme hyposaline conditions. **Plant Sci**.138,1-8.

LITTLER, DS, LITTLER, MM. 2000. Caribbean reef plants. OffShore Graphics, Inc. Washington D.C.

KAMER, K., FONG, P. 2000. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine macroalga, Enteromorpha intestinalis (L.) link. **J.Exp.Mar.Biol.Ecol**.254, 53-69.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.,** v. 26, p. 259-315, 1988.

KONINGS, E.J.M.; ROOMANS, H.H.S. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit. **Food Chemistry**, Oxford, v.59, n.4, p.599-603, Aug 1997.

MAITI, B.C., THAMSON, R.H.AND MAHENDRAN M. 1978. The structure of caulerpina, a pigment from Caulerpa algae. **J..Chem.Res**. (S) 1978: 126-127.

MATHEWS, M.B. (1975). Polyanionic proteoglycans: Strutures and interactions. **Ann.Rev.Biochem**.60: 443-475.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKKI, K.; MASUDA,Y.; TAKEUCHI, T.A. Comparison of screening methods for antioxidants activity in seaweeds. **J. appl.Phycol**., v.9, p.29-35,1997.

MEINESZ, A., COTTALORDA, J. M., CHIAVERINI, D., BRAUN, M., CARVALHO, N., FEBVRE, M., IERARDI, S., MANGIALAJO, L., PASSERON-SEITRE, G., THIBAUT, T., DE VAUGELAS, J. 1997. **Survi de l' invasion de l' algue tropicale *Caulerpa taxifolia* devant lês cotes françaises de la Méditerranée**. Situation au 31 décembre 1996. Lab. Environ. Mar. Lit., Université de Nice-Sophia Antipolis, France.

Meyer KD, Paul VJ (1992) Intraplant variation in secondary metabolite concentration in 3 species of *Caulerpa* (Chlorophyta, Caulerpales) and its effects on herbivorous fishes. **Marine Ecology Progress Series.** 82: 249-257.

NORDBERG, J., ARMÉR, S. J., Reactive oxygen species antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol Med**. 2001, 31: 1287-1312.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2° Ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

OLIVEIRA, E.C. The seaweed resources of Brazil. In: CRITCHLEY,A.T.; OHNO,M.,eds. **Seaweed resources of the world**. Yokosuka: Japan Iternational Cooperation Agency, 1998.p.367-371.

PAINTER, T.J. (1983). Algal polysaccharides. In: T.J. Painter (Ed). **The polysaccharides** (pp 195).

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: Aspinall, G.O. (Ed.). **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983

PAUL, V.J.; CRUZ-RIVERA, E.; THACKER, R. W. Chemical mediation of macroalgal-herbivore interactions: ecological and evolutionary perspectives. In: MCCLINTOCK, J.B.; BAKER, B. J. (Ed). **Marine Chemical Ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 227-265.

PAUL, V. J. 1992. In: **Ecological roles of marine natural products.** Eisner, T. & Meinwald, J. (eds.), Cornell University Press, London, 245p.

PAUL VJ, FENICAL W (1986) Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. **Marine Ecology Progress Series** 34: 157-169.

PIRES, K.M.S. **Avaliação sazonal de carotenóides provitamina A (α e β-caroteno) e vitamina E(α-tocoferol) em macroalgas marinhas pertencentes a familia Caulerpaceae (Divisão Chrorophyta).** Dissertação Mestrado (Pós-graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

PITTELLA, A.M.; RIBEIRO, D.; OLIVEIRA SÁ, E.; TORRES, P.R.R.; SOUZA, V.L.F. **Hipertensão portal:** fígado as grandes síndromes**,** 1995, 4: 78-97.

RAMARATHNAM, N. OSAWA, T.; NAMIKI, M.; TASHIRO, T. Studies on the relaionship between antioxidative activity of Rice hull and germination ability of rice seeds. **J. Sci. Food Agric**., v.37, p.719-726, 1986.

RAMARATHNAM, N. OSAWA, T. OCHI, H. KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci.Technol**., v. 6, p.75-82, 1995.

RANG, H.P.; DALA, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K., **Farmacologia**, 5° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RAO, A.S., RAO, M.U.,1999. Interaction of salinity and photon flux density on the growth of six marine ajgae. **Seaweed Resour**. Util. 21, 41-47.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, p. 495-503, 2004.

ROBBINS, S.L.; ANGELL, M.; KUMAR,V. 1984, **Patologia básica,** Editora da Universidade de São Paulo, 16: 577-625

RODRIGUES, J.A.G. & FARIAS, W.R.L. (2005). **Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde** *Caulerpa racemosa* **(Caulerpales, Chlorophyta).** In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca (PP.1693-1701). Fortaleza: CD-Room do CONBEP,14.

SARDESAI, V.M. (1992) Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. **J Nutr Biochem** 3: 154-166.

SILVEIRA, P.G, GALEGO, G.N, D'ACAMPORA, A.J, BITTENCOURT, A, KESTERING, D., PHILIPPI, F.F, RIZZATTI, J. Estudo experimental comparativo da eficácia antitrombótica da heparina convencional e da heparina de baixo peso molecular. **Acta Cir Bras** [serial online] 2001 Out-Dez;16, v.4.

SOUSA, M.B. **Efeitos da macroalga marinha verde** *Ulva fasciata* **sobre a composição corporal, os níveis de colesterol plasmático total e o ganho de peso de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e gordura saturada**. 29f. – Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, 2000.

SOUSA, M.B. **Extração e quantificação de α-caroteno, β-caroteno e α-tocoferol em macroalgas marinhas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa**. Dissertação Mestrado. Pós-Graduação – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

SZE,P. 1997. **A biology to the algae**. New York: McGraw-Hil, p.278

THEIL, M., WESTPHALEN, G., COLLINGS, G., CHESHIRE, A.,2007*. Caulerpa taxifolia* responses to hyposalinity stress. **Aquat. Bot**. 87,221-228.

VEST, S.E, DAWES, C.J, ROMEO, J.T. 1983. Distribuition of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green algae *Caulerpa* (Caulerpales). **Bot. Mar**. 26:313-316.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n.1, p.139-145, jan-fev, 2004.

XIA, J.R., LI, Y.J., ZOU, D.H. 2004. Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. **Aquat. Bot**. 80, 129-137.

WEST, E.J.WEST, R.J. 2007.Growth and survival of the invasive alga, *Caulerpa taxifolia*, in different salinities and temperatures: implications for coastal lake management. **Hydrobiologia** 577, 87-94.

WESTPHALEN, G., COLLINGS, G., ROWLING, K., THEIL, M., CHESHIRE, A., 2004. Port river and Barker Inlet Caulerpa taxifolia (Vahl) C.Agardh distribution and eradication. Milestone report to PIRSA Biosecurity. SARDI. **Aquatic Sciences Publication** RD02/0161