



Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860)

Carolina L.S. Soares¹, Carlos D. Pérez^{1*}, Maria B.S. Maia², Rejane S. Silva², Liany F.A. Melo¹

¹Núcleo de Biologia - CAV, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil,

²Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil

Artigo

RESUMO: O presente trabalho representa a primeira análise das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. Foram realizados os testes de Writhing induzido por ácido acético (1%, 10 mL.kg⁻¹ i.p.) e da chapa quente em camundongos para avaliar o efeito analgésico; e o teste de edema de pata de rata induzido por carragenina para avaliar a atividade antiinflamatória. As análises evidenciaram atividade analgésica no teste de Writhing no grupo tratado com 200 mg.kg⁻¹ v.o. de extrato, com uma inibição de 47,22% do número de contorções abdominais (“Writhings”), revelando atividade estatisticamente significativa.

Unitermos: *Palythoa caribaeorum*, Zoantharia, Anthozoa, atividade antiinflamatória, atividade analgésica.

ABSTRACT: “Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of the crude hydroalcoholic extract of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860)”. This work represents the first pharmacological analysis on the crude hydroalcoholic extract of *Palythoa caribaeorum*. The analgesic activity was assayed in acetic acid-induced writhing test and with the hot-plate test with mice; while the anti-inflammatory activity was evaluated in carrageenan-induced hind paw edema in the rat. The analysis suggested an analgesic activity in the Writhing test on the group treated with the crude extract (200 mg.kg⁻¹ v.o.) with an abdominal contortion’s inhibition of 47,22 %.

Keywords: *Palythoa caribaeorum*, Zoantharia, Anthozoa, anti-inflammatory activity, analgesic activity

INTRODUÇÃO

Os cnidários antozoários são um grupo de organismos coloniais ou solitários, que apresentam uma grande variedade de formas, tamanhos e cores, habitando todos os mares do mundo, desde zonas costeiras até abissais (Pérez, 1999). Os zoantídeos são cnidários polípides exclusivamente marinhos e habitantes dos recifes costeiros. *Palythoa* é um gênero de zoantídeos coloniais cujas espécies se caracterizam pela incorporação de grão de sedimento nos tecidos da sua parede corporal. Na espécie *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) os pólipos estão conectados por um espesso tecido chamado cenénquima, o qual também agrega partículas na sua superfície. Estas colônias formam extensos “tapetes” localizados nas áreas submersas, mas quando estão expostos durante a maré baixa, seus pólipos produzem um muco que protege a colônia da dessecação. O muco da o nome popular de “baba-de-boi”. Este zoantídeo é o mais abundante do litoral pernambucano, ocupando extensas regiões sobre os recifes.

O estudo químico com cnidários teve grande impulso durante a década do 60 com o descobrimento das prostaglandinas em varias espécies de corais moles do Caribe (em especial a gorgónia *Plexaura homomalla*) (Weinheimer; Spraggins, 1969). A extrema diversidade dos efeitos biológicos das prostaglandinas provocou, naquele momento, a coleta indiscriminada destas espécies, pondo em perigo as populações das mesmas em varias regiões caribenhas. Felizmente o desenvolvimento de métodos de síntese em laboratório avançou rapidamente, resguardando estes corais (Correia et al., 2002). Desde então, ficou em evidencia o potencial destes organismos como produtores de compostos de interesse biológico e farmacológico. A maior quantidade de metabólitos secundários de cnidários foi isolada de octocorais (alcionáceos e gorgonáceos) e de zoantídeos (Rodríguez; Cobar, 1993; Babu et al., 1997). Existem muitos exemplos de terpenoides de corais que possuem atividade biológica ou farmacológica. Rinehart et al. (1981) estudaram a atividade antiviral, antimicrobiana e

* E-mail: cdperez@ufpe.br; Tel. + 55-81-35230670

antineoplásica dos produtos naturais extraídos de 1300 amostras de 142 espécies de cnidários; e encontraram que aproximadamente 32% dos extratos revelavam atividade antimicrobiana. Venkateswarlu et al. (1998) encontrou atividade antibacteriana de metabólitos secundários em espécies de zoantídeos; Kuramoto et al. (1998) isolaram um alcalóide com atividade inibidora da osteoporose de uma espécie do gênero *Zoanthus* e Grace e Jacobs (1998) descobriram atividade antiinflamatória e analgésica num alcalóide extraído de *Zoanthus* sp.

As pesquisas com Produtos Naturais marinhos no Brasil tiveram início na década de 60 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais na Faculdade de Farmácia da UFRJ. No entanto, ainda são poucas as informações, documentadas em artigos científicos, sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo dos 7500 km de litoral brasileiro (Pinto et al., 2002; Lhullier et al., 2006; Dresch et al., 2005). No Brasil existem alguns antecedentes de estudos químicos em cnidários, principalmente anêmonas e octocorais. Freitas e colaboradores trabalham desde a década do 80 com substâncias biativas de anêmonas-do-mar, principalmente com *Bunodosoma caissarum* e *B. cangicum*, encontrando atividade antimitótica, hemolítica, neurotóxica e antitumoral em câncer de mama humano (Freitas; Elena, 1991; Lagos et al., 2001; Malpezzi et al., 1995; Oliveira et al., 2004).

O Lapromar, Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química Marina (UFF) desenvolve investigações na área da ecologia química de organismos marinhos e química de produtos naturais marinhos. Uma das linhas de estudo mais forte do laboratório é o das defesas químicas dos octocorais, a través da análise dos metabólitos secundários, principalmente de gorgônidos e do teléstido *Carijoa riisei* (Epifanio et al., 2000; Maia et al., 2000).

Relatos populares, principalmente de pescadores, estimulam o estudo farmacológico e toxicológico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, já que o muco produzido pela “baba-de-boi” é usado como analgésico e antiinflamatório sendo aplicado diretamente sobre as feridas e/ou pancadas.

Levando em conta os antecedentes farmacológicos deste grupo de animais, o uso caseiro da comunidade que demonstra uma potencial ação local farmacológica e somado à quantidade abundante do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* no litoral pernambucano, decidiu-se avaliar a atividade antiinflamatória e analgésica dos extratos hidroalcoólicos brutos através de bioensaios em camundongos e ratos de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Material animal

Aproximadamente um quilograma da colônia de *Palythoa caribaeorum* foi coletado na praia de Porto

de Galinhas (Pernambuco, Brasil) em fevereiro de 2003, com ajuda de faca e espátula. A amostra foi acondicionada em sacos plásticos mantidos em banho de gelo e em laboratório conservados em freezer. O material foi identificado pelo zoólogo Carlos Daniel Pérez da UFPE.

Preparação do extrato bruto

O extrato utilizado nos ensaios foi preparado pelo método de percolação, segundo o processo A da Farmacopéia Brasileira 2ª ed. (1959) usando solução hidroalcoólica a 50%. O extrato foi evaporado inicialmente em rotaevaporador e posteriormente em banho Maria com temperatura inferior a 60 °C. Este extrato foi proporcionalmente diluído em solução aquosa com 2% de “tween 80” (veículo) para facilitar a administração aos animais.

Animais utilizados

Para os ensaios de toxicidade aguda e atividade analgésica foram utilizados camundongos Swiss (32 ± 5 g), e para o teste de atividade antiinflamatória foram utilizadas ratos albinos Wistar (210 ± 30 g). Os animais foram acondicionados em gaiolas com ração balanceada, água “ad libitum”, em ciclo claro-escuro de 12 horas sobre temperatura constante de 22 ± 2 °C. O uso dos animais foi autorizado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco.

Ensaio de toxicidade aguda

O primeiro ensaio realizado foi o de toxicidade aguda em camundongos. Antes do início do ensaio, as unidades experimentais foram submetidas a jejum de 18 hs e divididas aleatoriamente em cinco grupos com três machos e três fêmeas cada um tratado “per os” com o extrato nas doses 50 mg.kg⁻¹ v.o., 500 mg.kg⁻¹ v.o. e i.p., 1000 mg.kg⁻¹ i.p. e 2000 mg.kg⁻¹ v.o. para a determinação da toxicidade aguda e a dose letal média DL₅₀. Os animais foram observados durante uma hora depois da administração do extrato, e pelos 15 dias seguintes. A análise de toxicidade aguda levou a conta à observação de alterações no sistema nervoso central, sistema nervoso autônomo e atividade motora.

Avaliação da Atividade Analgésica

Ensaio de Writhing

O ensaio de “Writhing” foi realizado segundo a metodologia de Hendershot; Forsaith (1959) para detectar atividade analgésica no extrato. Foram formados cinco grupos de cinco camundongos machos cada um. Três grupos receberam o extrato (200 mg.kg⁻¹ v.o., 400 mg.kg⁻¹ v.o. e 50 mg.kg⁻¹ i.p.), um grupo recebeu veículo, servindo

Tabela 1. Análise do efeito analgésico do extrato de *Palythoa caribaeorum* na síndrome de “Writhing” induzido por ácido acético em camundongos. *Resultado significativo.

Grupos tratados	Doses e via de administração	Nº de “Writhing” em 10 min	Porcentagem de inibição (%)
Controle		36,0 ± 13,58	
Extrato	200 mg.kg ⁻¹ v.o.	19,0 ± 4,35	47,22%*
	400 mg.kg ⁻¹ v.o.	22,6 ± 3,91	37,22%
	50 mg.kg ⁻¹ i.p.	18,0 ± 9,76	50,00%
Fenilbutazona	100 mg.kg ⁻¹ v.o.	12,75 ± 4,57	64,59%*

Tabela 2. Análise do efeito analgésico do extrato de *Palythoa caribaeorum* no teste da chapa quente com camundongos. * Resultado significativo.

Grupos Tratados	Doses e via de administração	Tempo em segundos para a resposta ao estímulo depois do tratamento		
		45”	90”	120”
Controle		9,39 ± 4,34	9,47 ± 3,46	9,62 ± 2,17
Extrato	200 mg.kg ⁻¹ v.o.	14,42 ± 4,97	11,10 ± 6,90	15,21 ± 5,07
	400 mg.kg ⁻¹ v.o.	10,27 ± 3,52	11,18 ± 7,06	12,95 ± 3,71
	100 mg.kg ⁻¹ i.p.	8,90 ± 1,96	16,52 ± 8,10	13,78 ± 4,81
Morfina	10 mg.kg ⁻¹ i.p.	20,73 ± 6,47*	17,97 ± 8,27	17,75 ± 7,73

Tabela 3. Análise do efeito antiinflamatório do extrato de *Palythoa caribaeorum* no edema de pata de rato induzido por carragenina. * Resultado significativo.

Grupos Tratados	Doses e via de Administração	Variação do volume das patas nos seguintes tempos depois da aplicação da carragenina	
		3h	4h
Controle		0,96 ± 0,2	0,78 ± 0,21
Extrato	200 mg.kg ⁻¹ v.o.	1,09 ± 0,24	0,82 ± 0,16
	400 mg.kg ⁻¹ v.o.	0,89 ± 0,33	0,7 ± 0,25
Indometacina	10 mg.kg ⁻¹ v.o	0,51 ± 0,18*	0,31 ± 0,12*

como controle, e o último grupo recebeu tratamento analgésico com fenilbutazona (100 mg/Kg). Depois de 45’ da aplicação foi administrada 10 mL.kg⁻¹ de solução aquosa de ácido acético i.p.; três minutos depois da aplicação do ácido foi feita a contagem de “Writhings” (contorções abdominais). A média de “Writhings” foi determinada para cada grupo, permitindo calcular a porcentagem de inibição para cada dose.

Ensaio da chapa quente

Outro ensaio para medir o efeito analgésico foi o da chapa quente (Eddy; Leinbach, 1953). Cinco grupos de cinco camundongos fêmeas cada um foram tratados: 200 mg.kg⁻¹ v.o., 400 mg.kg⁻¹ v.o. e 100 mg.kg⁻¹ i.p. de

extrato, 100 mg.kg⁻¹ de morfina i.p. e veículo. Depois de 45, 90 e 120 minutos da aplicação foram colocados em contato com a chapa quente (Tº constante de 55 °C) e foram registrados os segundos transcorridos antes que o animal mostrasse resposta característica ao estímulo térmico (lamber as patas anteriores e/ou “sapatear” sobre a chapa). O efeito produzido pelo extrato e pela morfina foi comparado com o verificado no grupo controle.

Avaliação da Atividade Antiinflamatória

Ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina

O último teste realizado foi o de edema de pata

induzido por carragenina em ratos, segundo metodologia de Winter et al. (1962). Foram formados quatro grupos de oito ratos fêmeas cada um que receberam tratamentos de extrato (200 mg.kg⁻¹ v.o. e 400 mg.kg⁻¹ v.o.), veículo e indometacina (10 mg.kg⁻¹ v.o.). Depois de meia hora, foi aplicado um volume de 0,1 mL de carragenina na região subplantar da pata traseira direita dos animais para induzir o edema. O volume da pata foi medido pletismograficamente antes da aplicação de carragenina, 3hs y 4hs depois da aplicação.

Análises estatísticas

As medias dos dados obtidos em cada teste foram comparadas usando o teste estatístico t de Student, utilizando um nível de significância $P < 0,05$ (Sokal; Rohlf, 1996).

RESULTADOS

Toxicidade aguda

A administração do extrato nos ensaios de toxicidade aguda não revelou sinais deletérios envolvendo o sistema nervoso central, sistema nervoso autônomo e atividade motora. O DL₅₀ em camundongos evidenciou valores superiores a 2000 mg.kg⁻¹ i.p., não observando, neste nível de dose, mortes no grupo tratado com o extrato.

Ensaio de Writhing

No ensaio de “Writhing” o extrato apresentou resultado significativo na dose de 200 mg.kg⁻¹ (Tabela 1)

Ensaio da chapa quente em camundongos

O teste da chapa quente aparentemente indicou atividade analgésica para o extrato (Tabela 2). Mas, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos.

Ensaio de edema de pata de rato induzida por carragenina

O ensaio de edema de pata não indicou atividade antiinflamatória para o extrato do zoantídeo (Tabela 3).

DISCUSÃO

Toxicidade aguda

O gênero *Palythoa* se caracteriza pela presença de uma potente toxina denominada palitoxina. Esta toxina é considerada a molécula biologicamente ativa mais potente de origem marinho e a mais tóxica conhecida, sendo apenas menos venenosa que a proteína botulínica

(Kaul et al., 1974). Devido a sua elevada toxicidade (LD₅₀ de 0,033 a 0,45 µg/kg em cachorros, coelhos, macacos, hamsters e camundongos) a palitoxina tem pouca utilidade como medicamento, mais possui grande versatilidade como ferramenta bioquímica, pois afeta inúmeros processos, principalmente o transporte de íons cálcio (Wiles et al., 1974; Draijer et al., 1982).

P. caribaeorum é uma espécie potencialmente portadora de palitoxina, já que foi isolada anteriormente de exemplares caribenhos (Béress et al., 1983), por tal motivo esperava-se encontrar elevados índices de letalidade em doses muito baixas, mas isto não foi observado, ainda com valores superiores a 2000 mg.kg⁻¹. Como todo metabólito secundário muitas vezes sua biosíntese está afetada por fatores do meio ambiente podendo modificar sua estrutura em condições ambientais diferentes, alterando, talvez, a parte tóxica da molécula. Igualmente, a origem da palitoxina é incerta e motivo de muitas controvérsias, alguns autores a associam aos ovos de *Palythoa caribaeorum* (Kimura et al., 1973), outros especulam uma origem bacteriana (Moore et al., 1982) e outros que seria uma molécula sintetizada por dinoflagelados bentônicos do gênero *Ostreopsis* associados ao sedimento (Onuma et al., 1999). Os resultados do presente trabalho apoiariam a idéia de que a palitoxina não é sintetizada pelo zoantídeo e sim por organismos associados ao sedimento, como bactérias ou dinoflagelados que poderiam ser, potencialmente incorporados aos tecidos destes cnidários coloniais durante seu crescimento. Esta teoria estaria altamente apoiada pelo padrão de crescimento dos indivíduos do gênero *Palythoa* que formam uma camada subepidérmica de sedimento que atua como sustentação (Burnett et al., 1997), já que os zoantídeos não apresentam qualquer estrutura esquelética. A ausência de toxicidade nos exemplares estudados poderia justificar-se pela ausência dos microorganismos produtores da palitoxina no sedimento adjacente.

Bioensaios

O único ensaio que apresentou resultados significativos foi o de Writhing para a dose administrada por via oral de 200 mg.kg⁻¹, com uma percentagem de inibição de 47,22%, más surpreendentemente a dose administrada de 400 mg.kg⁻¹ só inibiu o 37,22%. A dose que mostrou mais percentagem de inibição foi a de 50 mg.kg⁻¹, administrada por via intraperitoneal com 50% de inibições, no entanto, estatisticamente não significativas. Estes resultados indicariam que o extrato de *Palythoa caribaeorum* é um potencial analgésico que atuaria em doses baixas, para o qual estudos futuros serão necessários para a utilização de este animal como remédio analgésico sistêmico. Muitos analgésicos têm efeito dose-dependente, o que indica que após certa concentração de administração o efeito decai ou é prejudicial; por exemplo, o Paracetamol (acetaminofeno) é um analgésico-

antipirético que em doses acima de 1000 mg pode induzir asma, urticária ou complicações hepáticas (Ribeiro et al., 2002), ou como os antiinflamatórios no esteroides (AINES) que são excelentes analgésicos e antipiréticos em baixas doses (Cerdeja; Arrau, 2002).

A ausência de toxicidade e a ação analgésica detectada nos extratos de *Palythoa caribaeorum* associado a grande abundância de estes animais na costa pernambucana (Fernandes, 2000) abrem um campo de investigação importante utilizando a este zoantídeo como alvo de futuras pesquisas farmacológicas. A chave do êxito de *P. caribaeorum* como fonte de metabolitos secundários com ação farmacológica está, justamente, em seu modo de crescimento. Este organismo colonial possui um crescimento vegetativo com altas taxas de regeneração (Karlson, 1988) o qual permitiria a extração do material para estudos farmacológicos sem impactar nas populações locais.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar seu agradecimento a Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Turismo e Meio Ambiente-SEDETMA, a Diretoria Geral de Agricultura e Meio Ambiente-DGAMA da Prefeitura Municipal de Ipojuca (Pernambuco) e a Associação dos Jangadeiros de Porto de Galinhas (AJPG) na pessoa de Junior (presidente da Associação) pelo apoio brindado nas coletas do material utilizado no presente trabalho. Agradecemos a Dra. Paula Braga Gomes (Biologia-UFRPE) pela leitura crítica do manuscrito. O trabalho contou com o financiamento da FACEPE - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Brasil) (DCR-0007-07.03/04 e MCT/CNPqCT/INFRA/FACEPE N° 006/2003).

REFERÊNCIAS

Babu UV, Bhandari SPS, Garg HS 1997. Hariamide, a novel sulfated sphingolipid from a *Zoanthus* sp. of the Indian coast. *J Nat Prod* 60: 1307-1309.

Béréss L, Zwick HJ, Kolkenbrock PN, Kaul O, Wassermann A 1983. A method for the isolation of the caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zoanthid) *Palythoa caribaeorum*. *Toxicon* 21: 285-290.

Burnett WJ, Benzie JAH, Beardmore JA, Ryland JS 1997. Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) from the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia: systematics, evolution and a key to species. *Coral Reefs* 16: 55-68.

Cerdeja HO, Arrau MP 2002. Manejo de dolor postoperatorio. *Revista Chilena de Anestesia* (on line), 31, fev. 2002. Disponível em: <http://www.socanestesia.cl/rev_anestesia/0202/manejo.asp>, acessada em abril de 2006.

Correia CRD, Costa PRR, Ferreira VF 2002. Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em química orgânica. *Quim Nova* 25: 82-89.

Draijer F, Suvanto P, Tesseraux I, Béréss L 1982. Mechanical

studies about the action of palytoxin (*Palythoa caribaeorum*) on innervated and denervated rat diaphragms. *Toxicon* 20: 65.

Dresch RR, Haeser AS, Lerner C, Mothes B, Vozári-Hampe MM, Henriques AT 2005. detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 15: 16-22.

Eddy NB, Leimbach D 1953. Synthetic analgesic. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutyl amines. *J Pharmacol Exp Ther* 107: 385-393.

Epifanio RA, Maia LF, Fenical W 2000. Chemical defenses of the endemic brazilian gorgonian *Lophogorgia violacea* Pallas (Octocorallia, Gorgonacea). *J Braz Chem Soc* 11: 584-591.

Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 1959. São Paulo: Siqueira, 2a ed.

Fernandes MLB 2000. Avaliação de dois ambientes recifais do litoral de Pernambuco, através das suas macro e megafaunas incrustantes e sedentárias. São Paulo, 179p. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo.

Freitas JC, Elena LA 1991. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Braz J Med Biol Res* 24: 1245-1249.

Grace KJS, Jacobs RS 1998. The anti-inflammatory and analgesic activities of zoanthamine, a new structural alkaloid from the toxic colonial zoanthid, *Zoanthus* sp. *FASEB J* 2: A1109.

Hendershot LC, Forsaith S 1959. Antagonism in the mouse by weak analgesics and non-analgesics. *J Pharmacol Exp Ther* 125: 237-240.

Karlson RH 1988. Size-dependent growth in two zoanthid species: A contrast in clonal strategies. *Ecology* 69: 1219-1232.

Kaul PN, Farmer MR, Ciereszko LS 1974. Pharmacology of palytoxin: The most potent marine toxin known. *Proc West Pharmacol Soc* 17: 294.

Kimura S, Hashimoto Y, Yamazato K 1973. Toxicity of the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Toxicon* 10: 611-617.

Kuramoto M, Hayashi K, Yamaguchi K, Yada M, Tsuji T, Uemura D 1998. Structure-activity relationship of norzoanthamine exhibiting significant inhibition of osteoporosis. *Bull Chem Soc Jpn* 71: 771-779.

Lagos P, Freitas JC, Duran RC, Silveira R 2001. Identification of hemolytic and neurotoxic activities in the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Braz J Med Biol Res* 34: 895-902.

Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M 2006. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 158-163.

Maia LF, Epifanio RA, Fenical W 2000. New cytotoxic glycosides from the octocoral *Carijoa (Telesto) riisei* (Telestacea, Octocorallia). *J Nat Prod* 63: 1427-1430.

Malpezzi EL, Matsui DH, Groote SC, Freitas GM, Santelli GM, Fernandes JB 1995. Antitumoral activity in an organic extract of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon* 33: 291.

Moore RE, Helfrich P, Patterson GML 1982. The deadly seaweed of Hana. *Oceanus* 25: 54.

Oliveira JS, Redaelli E, Zaharenko AJ, Casslini RR, Konno K, Pimenta DC, Freitas JC, Clare JJ, Wanke E 2004.

- Binding specificity of sea anemone toxins to nav 1.1-1.6 sodium channels unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *J Biol Chem* 279: 33323-33325.
- Onuma Y, Masayuki S, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto M, Naoki H, Yasumamoto T 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 37: 55-65.
- Pérez CD 1999. *Taxonomía, distribución y diversidad de los Pennatulacea, Gorgonacea y Alcyonacea del Mar Epicontinental Argentino y zonas de influencia*. Mar del Plata, Argentina, xiii + 254p. Tese de Doutorado - Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VD, Lopes NP, Epifanio RD 2002. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. *Quim Nova* 25: 45-61.
- Ribeiro S, Schmidt AP, Schmidt SRG 2002. O uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona. *Rev Bras Anestesiol* 52: 644-651.
- Rinehart KL, Shaw PD, Shield LS, Gloer JB, Harbour GC, Koker MES, Samain D, Schwartz RE, Tymiak AA, Weller DL, Carter GT, Munro MH, Hughes RG, Renis HE, Swynenberg EB, Stringfellow DA, Vavra JJ, Coats JH, Zurenko GE, Kuentzel SL, Li LH, Bakus GJ, Brusca RC, Craft LL, Yong DN, Conner JL 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. *Pure Appl Chem* 53: 795-817.
- Rodriguez AD, Cobar OM 1993. Structures and bioactivities of new asbestinin diterpenoids from the Caribbean gorgonian octocoral *Briareum asbestinum*. *Tetrahedron* 49: 319-328.
- Sokal RR, Rohlf FJ 1996. *Biometry*. New York: W. H. Feeman and Company.
- Venkateswarlu Y, Reddy NS, Ramesh P, Reddy PS, Jamil K 1998. Chemical reduction of zoanthamine and evaluation of antibacterial activity. *Heterocycl Commun* 4: 575-580.
- Weinheimer A, Spraggins R 1969. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. *Chemistry of Coelenterates, XV. Tetrahedron Lett* 59: 5185-5188.
- Wiles JS, Vick JA, Christensen MK 1974. Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon* 12: 427-433.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 544-547.