



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

**Atividade anti-inflamatória e anti-viral de bromoditerpenos
isolados da alga *Sphaerococcus coronopifolius***

Erick Alejandro Villegas Pérez

2024



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

**Atividade anti-inflamatória e anti-viral de bromoditerpenos
isolados da alga *Sphaerococcus coronopifolius***

Erick Alejandro Villegas Pérez

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Celso Alves, da Doutora Joana Silva e da Doutora Márcia I. Goettert

2024

Título: Atividade anti-inflamatória e anti-viral de bromoditerpenos isolados da alga
Sphaerococcus coronopifolius

Copyright © Erick Alejandro Villegas Pérez

Escola superior de Turismo e Tecnologias do mar– Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2024

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito geográfico perpétuo e ilimitado de arquivar e publicar este relatório de dissertação por meio de cópias impressas reproduzidas em papel ou digitalmente, ou por qualquer outro meio conhecido ou inventado, e divulgá-lo por meio de repositórios científicos, permitindo sua cópia e distribuição para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A conclusão, com sucesso, deste projeto de dissertação só foi possível graças ao apoio, dedicação, paciência e esforço de diversas pessoas que o tornaram possível e me acompanharam em todos os momentos, sendo fundamentais em cada etapa.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, Doutor Celso Alves e Doutora Joana Silva, que me ensinaram, apoiaram e orientaram nas partes mais decisivas deste projeto, contribuindo sempre para a minha formação como profissional e para a aquisição de novas competências na área científica. Muito obrigado sempre pela compreensão, paciência, disponibilidade e boa energia ao longo de todo este tempo.

Um agradecimento especial à Doutora Alice Martins que, desde o início, sempre acompanhou de perto este trabalho e me ofereceu a sua ajuda no isolamento e identificação dos compostos. Muito obrigado pela sua constante motivação e pelos seus ensinamentos na parte da química, que foram a base de todo o trabalho.

À minha namorada, Mika, simplesmente uma pessoa única e incondicional, que sempre me ajudou a seguir em frente nos momentos mais difíceis, obrigado por sempre acreditar e confiar em mim, provando que os sonhos se tornam realidade.

À minha família, que é o pilar de tudo o que eu faço, aos meus avós, tios e primos que sempre foram a minha inspiração, em especial à minha irmã Sami.

Às pessoas que tornaram tudo isso possível, que me incentivaram sempre a sonhar e nunca desistir, os meus pais Santiago e Viviana. Obrigado pelo seu amor e carinho tão únicos e especiais para mim, e, mesmo estando longe, sempre os senti no meu coração, vocês me ensinaram que com esforço e trabalho se pode ir longe, isso é sempre por vocês e para vocês.

Por último, quero agradecer a Portugal e ao Instituto Politécnico de Leiria por me abrirem as portas dum novo mundo e me darem a oportunidade de me formar como profissional, muito obrigado por me acolherem e se tornarem a minha segunda casa.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento através dos projetos estratégicos concedidos ao MARE – Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (UIDP/04292/2020 e UIDB/04292/2020), Laboratório Associado ARNET (LA/P/0069/2020), e projeto de investigação “NEURONS4 – New edge in the therapeutics of Parkinson’s disease from Seaweeds” (2022.09196.PTDC; <https://doi.org/10.54499/2022.09196.PTDC>). Ao projeto “BEAP – MAR – Blue Bioeconomy in the atlantic Area: New Products from Marine Organims (EAPA_0032/2022)” financiado pelo programa Europeu INTERREG Espaço Atlântico.

Resumo

Resumo

A inflamação é uma resposta inata para manter a homeostasia do organismo, atuando como mecanismo de defesa contra diversos fatores, incluindo patógenos, células danificadas e compostos tóxicos. Contudo, quando essa reação é demasiado prolongada, pode causar problemas ao nível dos tecidos e órgãos, inclusive conduzir à morte.

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, do grupo dos coronavírus, que, frequentemente, se manifesta com sintomas de infecção respiratória aguda, com grande impacto na saúde e nas economias globais. O desenvolvimento de medicamentos neste contexto é complexo e vai desde a compreensão do mecanismo de ação até à avaliação da sua eficácia e toxicidade. Como tal, o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra o vírus SARS-CoV-2, que mitiguem alguns efeitos da doença como a inflamação severa, é uma necessidade, já que a terapia convencional tem limitações, incluindo a possível redução da eficácia das vacinas contra as variantes com mutações em genes-chave. Neste contexto, os organismos marinhos constituem fontes excepcionais de novas moléculas com potencial terapêutico, como os bromoditerpenos presentes na alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius*, os quais já demonstraram atividades anticancerígenas, *antifouling* e antimicrobianas. Contudo a sua capacidade anti-inflamatória ainda permanece desconhecida.

Utilizando técnicas de cromatografia em coluna preparativa (CC) e semipreparativa (HPLC) foi possível isolar quatro compostos desta alga. Através de análise por ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN) foi possível identificar o sesquiterpeno Aloaromadendreno, e três bromoditerpenos, Sphaerococcenol A, Bromosphaerol e 12R-hidroxi-bromosphaerol.

Para avaliar o potencial anti-inflamatório destes compostos, foi previamente realizado um teste de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 (0,01 – 10 μM ; 24 h) para definição das concentrações sub-tóxicas. Nenhum dos compostos estimulou a produção de óxido nítrico (NO). Nos macrófagos RAW 264.7 tratados com lipopolissacarídeos (LPS), o Aloaromadendreno (1 μM) reduziu significativamente a produção de NO de $171,5 \pm 8,9\%$ para $111,0 \pm 4,8\%$. Por sua vez, o Bromosphaerol (10 μM) foi o composto que exibiu a maior redução da concentração do fator de necrose tumoral (TNF- α) ($637,5 \pm 192$ pg/mL) comparado com o tratamento com LPS ($1209,0 \pm 84,6$ pg/mL). No que diz respeito, à

interleucina-6 (IL-6), o Sphaerococcenol A (0,1 μ M) reduziu significativamente os seus níveis ($129,3 \pm 31,3$ pg/mL), quando comparado com o tratamento com LPS ($862,7 \pm 39,9$ pg/mL). Finalmente, o composto 12*R*-hidroxi-bromosphaerol (1 μ M) foi o único que demonstrou estimular significativamente a produção da citocina anti-inflamatória interleucina-10 ($1301.0 \pm 381,1$ pg/mL).

No que diz respeito à atividade antiviral, foi realizado um ensaio dinâmico *in-silico*, com recurso à ferramenta informática DockThor, utilizando as estruturas (PDB:6LU7) da Mpro, proteína essencial no processo de replicação do SARS-COV-2, (PDB: 6M0J) da Spike, e (PDB:1O9K), proteína essencial na entrada do vírus na células hospedeira, e da pRb, proteína essencial na eliminação da propagação de células cancerígenas. O composto 12*R*-hidroxi-bromosphaerol demonstrou a maior afinidade, assim como estabilidade nas ligações com a proteína Mpro, com uma energia de afinidade de -8.1 (kcal/mol) e uma interação hidrofóbica com Cys145 (distância 5,35 Å). Por sua vez, o Bromosphaerol exibiu interação com a proteína Spike, apresentando uma energia de afinidade de -7.9 (kcal/mol). Relativamente à proteína pRb, o composto 12*R*-hidroxi-bromosphaerol foi o que exibiu uma maior interação com uma energia de -8.4 (kcal/mol). No entanto o Sphaerococcenol A foi o único composto que interagiu com o sítio ativo da pRb, mediante uma ponte de hidrogénio com Arg467 (distância 2,58 Å).

Em suma, os compostos da alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius*, demonstram capacidade de mediar efeitos em diferentes biomarcadores relacionados com o processo inflamatório, assim como interagir com diferentes proteínas relevantes no processo de infeção do SARS-CoV2. Como tal, estes compostos poderão contribuir para inspirar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para tratamento de doenças virais, com SARS-CoV2.

Palavras-chave: Anti-inflamatório, Anti-viral, *Sphaerococcus coronopifolius*, bromoditerpenos, SARS-CoV2.

Abstract

Abstract

Inflammation is an innate response to maintain the body's homeostasis, acting as a defense mechanism against various factors, including pathogens, damaged cells, and toxic compounds. However, when this reaction is too prolonged, it can cause problems at the level of tissues and organs, including leading to death.

COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus, from the coronavirus group, which often manifests itself with symptoms of acute respiratory infection, with a major impact on health and global economies. The development of medicines in this context is complex and ranges from understanding the mechanism of action to evaluating their efficacy and toxicity. Therefore, the development of therapeutic agents against the SARS-CoV-2 virus, which mitigate some effects of the disease such as severe inflammation, is mandatory since conventional therapy has limitations, including the possible reduction in the effectiveness of vaccines against the SARS-CoV-2 virus variants with mutations in key genes. In this context, marine organisms constitute exceptional sources of new molecules with therapeutic potential, such as the bromoditerpenes present in the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*, which have already demonstrated anticancer, antifouling, and antimicrobial activities. However, its anti-inflammatory capacity remains unknown.

Using preparative (CC) and semi-preparative (HPLC) column chromatography techniques, it was possible to isolate four compounds from this alga. Through analysis by proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) it was possible to identify the sesquiterpene Alloaromadendrene, and three bromoditerpenes, Sphaerococcenol A, Bromosphaerol and 12*R*-hydroxy-bromosphaerol.

To evaluate the anti-inflammatory potential of these compounds, a cytotoxicity test was previously carried out on RAW 264.7 macrophages (0.01 – 10 μM ; 24 h) to define sub-toxic concentrations. None of the compounds stimulated the production of nitric oxide (NO). In RAW 264.7 macrophages treated with lipopolysaccharides (LPS), Alloaromadendrene (1 μM) significantly reduced NO production from $171.5 \pm 8.9\%$ to $111.0 \pm 4.8\%$. In turn, Bromosphaerol (10 μM) was the compound that exhibited the greatest reduction in the concentration of tumor necrosis factor (TNF- α) (637.5 ± 192 pg/mL) compared to treatment with LPS (1209.0 ± 84.6 pg/mL). Regarding interleukin-6 (IL-6), Sphaerococcenol A (0.1 μM) significantly reduced its levels (129.3 ± 31.3 pg/mL) when compared to treatment with LPS

(862.7±39.9 pg/mL). Finally, the compound 12*R*-hydroxy-bromosphaerol (1µM) was the only one that was shown to significantly stimulate the production of the anti-inflammatory cytokine interleukin -10 (1301.0 ± 381.1 pg/mL).

Concerning the antiviral activity, an *in-silico* dynamic assay was carried out through the DockThor computer tool, using the structures (PDB:6LU7) of Mpro, an essential protein in the SARS-COV-2 replication process (PDB : 6M0J) of Spike, and (PDB:1O9K), an essential protein in the entry of the virus into host cells, and of pRb, an essential protein in eliminating the spread of cancer cells. The compound 12*R*-hydroxy-bromosphaerol demonstrated the highest affinity, as well as stability in bonds with the Mpro protein, with an affinity energy of -8.1 (kcal/mol) and a hydrophobic interaction with Cys145 (distance 5.35 Å). In turn, Bromosphaerol exhibited interaction with the Spike protein, presenting an affinity energy of -7.9 (kcal/mol). Regarding the pRb protein, the compound 12*R*-hydroxy-bromosphaerol exhibited the greatest interaction with an energy of -8.4 (kcal/mol). However, Sphaerococcenol A was the only compound that interacted with the active site of pRb, through a hydrogen bond with Arg467 (distance 2.58 Å).

In short, compounds from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius* demonstrate the ability to mediate effects on different biomarkers related to the inflammatory process, as well as to interact with different proteins relevant to the SARS-CoV2 infection process. Therefore, these compounds could help to inspire the development of new therapeutic agents for the treatment of viral diseases, such as SARS-CoV2.

Keywords: Anti-inflammatory, Anti-viral, *Sphaerococcus coronopifolius*, Bromoditerpenes, SARS-COV-2

Índice

1.Introdução	2
1.1 Uma visão geral do processo inflamatório.	2
1.2 SARS-CoV-2 (COVID-19) e o seu efeito na resposta inflamatória.....	6
1.3 Produtos naturais marinhos como fonte de novos fármacos	9
1.4 Pipeline clínico dos fármacos de origem marinha.....	11
1.5 Evidências pré-clínicas e clínicas de atividades anti-inflamatórias e antivirais de compostos de origem marinho.....	14
1.5.1 Anti-inflamatório	14
1.5.2 Anti-viral.....	17
1.6 Atividades biológicas da macroalga vermelha <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> e seus terpenos.....	20
2.Objetivo Geral	23
2.1 Objetivos específicos.....	23
3.Materiais e métodos	25
3.1 Solventes e Reagentes.	25
3.2 Extração e purificação dos compostos	25
3.2.1 Identificação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	27
3.3 Avaliação inflamatória e anti-inflamatória no modelo celular RAW 264.7.....	27
3.3.1 Manutenção da cultura celular.....	28
3.3.2 Avaliação da atividade citotóxica nas células RAW 264.7	28
3.3.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo celular RAW 264.7.....	29
3.3.3.1 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) nas células RAW 264.7.....	29
3.3.3.2 Efeitos dos compostos nos níveis de citocinas mediadoras do processo inflamatório.....	29
3.4 <i>Docking</i> molecular.....	30
3.5 Tratamento de dados e análise estatística.....	31
4.Resultados	33

4.1 Identificação dos compostos isolados	33
4.2 Atividades biológicas realizadas em modelos celulares <i>in vitro</i>	35
4.2.1 Avaliação da atividade citotóxica nas células RAW 264.7	35
4.2.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos compostos nas RAW 264.7.....	36
4.2.3 Produção de oxido nítrico nas células RAW 264.7	36
4.2.4 Efeitos dos compostos nos níveis de citocinas	37
4.2.4.1 Citocina TNF- α	37
4.2.4.2 Citocina IL-6	38
4.2.4.3 Citocina IL-10	39
4.3 Avaliação da interação com as proteínas Mpro, Spike e pRb	41
4.3.1 Interações com a proteína Mpro	42
4.3.2 Interações com a proteína Spike	43
4.3.3 Interações com a proteína pRb.....	44
5. Discussão e Conclusões	48
6. Perspetivas futuras	57
7. Referência bibliográficas	60

Índice de Figuras

Figura 1 Principais fases de desenvolvimento do processo de inflamação aguda	2
Figura 2 Principais fases do desenvolvimento da reação inflamatória crônica	4
Figura 3 Mecanismo de entrada do SARS-CoV2 na célula hospedeira.....	6
Figura 4 Fisiopatologia duma hipercitocinemia.....	7
Figura 5 Fisiopatologia duma hipercitocinemia.....	8
Figura 6 Número total de (MNP) reportados por cada ano entre 2017 e 2022.....	10
Figura 7 Fármacos de origem marinha aprovados e em fases de ensaios clínicos.	12
Figura 8 Etapas do processo de isolamento dos compostos	25
Figura 9 Espectros de Ressonância magnética nuclear de próton.....	33
Figura 10 Estruturas químicas dos compostos isolado da <i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	34
Figura 11 Viabilidade celular das células RAW 264.7 após 24 h de incubação.....	35
Figura 12 Efeito dos bromoditerpenos na produção de NO das células RAW 264.7.....	36
Figura 13 Efeito dos terpenos na produção de TNF- α das células RAW 264.7	38
Figura 14 Efeito dos terpenos na produção de IL-6 das células RAW 264.7	39
Figura 15 Efeito dos terpenos na produção de IL-10 das células RAW 264.7	40
Figura 16 Interações intermoleculares entre os terpenos e a proteína Mpro.....	42
Figura 17 Interações intermoleculares entre os terpenos e a proteína Spike	44
Figura 18 Interações intermoleculares entre os terpenos e a proteína pRb.....	45

Índice de Tabelas

Tabela I Compostos isolados derivados da alga vermelha <i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	34
Tabela II Energia total de afinidade com as proteínas Mpro, Spike e pRb.....	41
Tabela III Capacidade anti-inflamatória e anti-viral dos bromoditerpenos	46

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

A549 – Linha celular do cancro de pulmão humano

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ACE2 - Enzima conversora de angiotensina 2

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroides

ARN - Ácido ribonucleico

Arg -Arginina

Asn- Asparagina

ATCC – Coleção de Cultura Americana do inglês *American Type Culture Collection*

BVDV - Diarréia Viral Bovina do inglês *Bovine Viral Diarrhea*

CC – Cromatografia em coluna

COVID-19 - Doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2

COX - Ciclooxigenase

COX-2 - Prostaglandina-endoperóxido sintase 2

CS – Tempestade de citocinas do inglês *Cytokines Storm*

Cys - Cisteína

DEX – Dexametasona

DMSO – Dimetilsulfóxido

E2F - Fator de transcrição da família E2F

ELISA – Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima

FDA - Agência para os medicamentos e alimentos dos Estados Unidos do inglês *Food and Drug Administration*

G-CSF - Fator estimulador de colónias de granulócitos

GenBank – Banco de dados de sequência genética

Gln -Glutamina

Glu - Ácido glutâmico

Gly - Glicina

GM-CSF - Fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HAV - Vírus da hepatite A

HBV - Vírus da hepatite B

HCMV – Citomegalovírus humano

Hep2G - Linha celular do cancro de fígado humano.

His - Histidina

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HPV - Vírus do papiloma humano

HSV – Vírus herpes simplex

IAV – Vírus da gripe A

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 - Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

IL-1 β - Interleucina-1 beta

ILs – Interleucinas

iNOS - Óxido nítrico sintase

IP-10 - Ligante de quimiocina 10

Leu - Leucina

LoVo - Linha celular do cancro de cólon humano

LPS – Lipopolissacarídeos

LTR - Repetição de grandes sequências de nucleotídeos

Lys -Lisina

MCP-1 - Proteína quimioatraente de monócitos - 1

MeOH - Metanol

MERS-CoV - Coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente

Met - Metionina

MIP 1- α - Proteína inflamatória de macrófagos 1- alfa

MNP - Produtos Naturais Marinhos do inglês *Marine Natural Products*

Mpro - Principal protease do SARs-CoV-2

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio, do inglês *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear do inglês *Nuclear transcription factor*

NIH - Instituto Nacional de Saúde

NO – Óxido nítrico, do inglês *Nitric Oxide*

Nsp12 (RdRp) - ARN polimerase dependente

Nsp15 (NendoU) - Endoribonuclease do SARs-CoV-2

Nsp5 (3CLpro) - Cisteína proteasa homodimérica do SARs-CoV-2

OE21 - Linha celular do cancro de esófago humano

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

PB2 - Subunidade da polimerase do vírus influenza

PC-3 - Linha celular do cancro de próstata humano

PDB – Base de dados de proteínas do inglês *Protein Data Bank*

Phe - Fenilalanina

PRb – Proteína do retinoblastoma

PS - Polissacarídeo

RAW 264.7 - Linha celular de macrófagos murinos

RBD - Domínio de ligação ao recetor (Proteína Spike) do inglês *Receiver binding domain*

RBL- Leucemia basofílica de rato do inglês *Rat Basophilic Leukemia*

RBM – Região de motivação de ligação do recetor (Proteína Spike) do inglês *Receptor Binding Motivation Region*

RMN – Ressonância magnética nuclear

SARS-CoV-1 - Coronavírus tipo - 1 causa síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV-2 - Coronavírus tipo - 2 causa síndrome respiratória aguda grave

SKMEL-28 – Linha celular do cancro de pele humana

T. amb. – Temperatura ambiente

TGF- β - Fator de Crescimento Transformante-beta do inglês *Transforming Growth Factor- β*

TH1 - Linfócito T auxiliar

TH2 - Linfócito T auxiliar 2 (Helmintos)

TLR – Recetores tipo Toll, proteínas transmembrana tipo I

TNFR - Recetores do fator de necrose tumoral do inglês *Tumor necrosis factor receptors*

TNF α – Fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor necrosis factor*

Tyr - Tirosina

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

U373 – Linha celular de astrocitoma de glioblastoma humano

UV- Ultravioleta

Val -Valina

VIH - Vírus da imunodeficiência humano

VLC - Cromatografia líquida a vácuo do inglês *Vacuum liquid chromatography*

WSV - Vírus do Nilo Ocidental

Introdução

1. Introdução

1.1 Uma visão geral do processo inflamatório.

A inflamação é uma resposta biológica do sistema imunológico que pode ser desencadeada por uma variedade de fatores, incluindo patógenos, células danificadas e compostos tóxicos. As células do sistema imunológico, como macrófagos e células dendríticas, produzem citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina-1 (IL-1) e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que estimulam a quimiotaxia e a diapedese dos leucócitos (Figura 1). Além disso, essas células também removem antígenos por fagocitose e atuam como células apresentadoras de antígenos para os linfócitos (Du *et al.*, 2015).

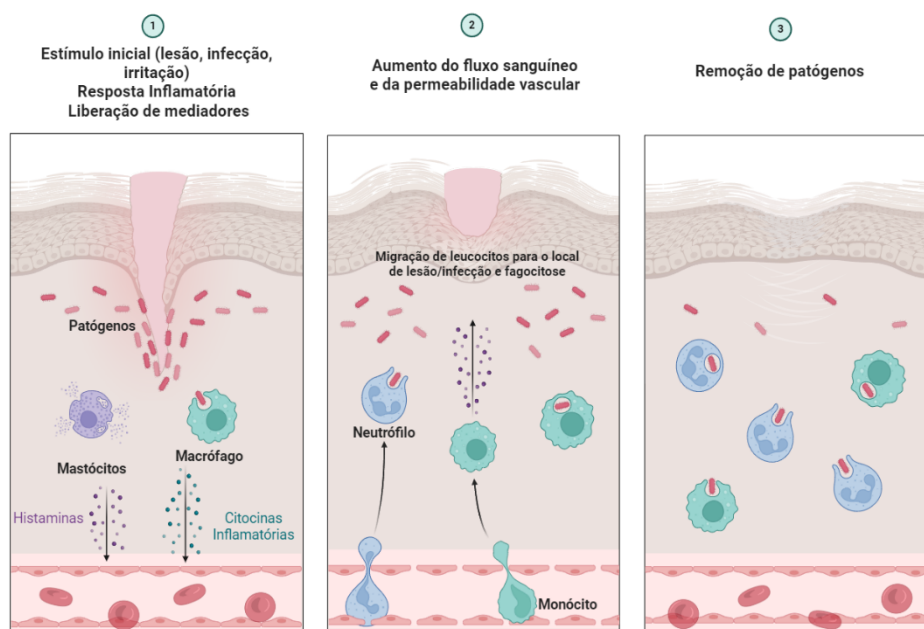


Figura 1 Principais fases de desenvolvimento do processo de inflamação aguda, adaptado de Murphy e colaboradores (2017)

O processo de inflamação pode ser caracterizado como agudo ou crônico. A inflamação aguda desencadeia uma resposta imunológica rápida e específica para combater a lesão ou infecção, caracterizada por sintomas temporários como vermelhidão, inchaço, calor, dor e redução da função na região afetada. Durante este processo, o corpo produz mediadores químicos como histaminas, prostaglandinas e citocinas, as quais aumentam o fluxo sanguíneo na região afetada e recrutam células do sistema imunológico, tais como células dendríticas, plaquetas, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos T.

Quando os leucócitos chegam à região da lesão, são ativados por citocinas e quimiocinas produzidas pelos macrófagos e pelas células dendríticas, desencadeando a liberação de mais mediadores do processo inflamatório. Os neutrófilos, predominantes na fase aguda, libertam grânulos ricos em enzimas como lisozima e mieloperoxidase de forma a destruir os antígenos pela ação dos fagócitos, além de produzirem espécies reativas de oxigênio e citocinas como IL-1, Interleucina-6 (IL-6) e TNF- α . Os linfócitos, incluindo células T e células B, são cruciais na inflamação, produzindo citocinas, estimulando outros linfócitos e produzindo anticorpos e complexos imunes (Duque *et al.*, 2014). Uma vez neutralizada a ameaça, inicia-se o processo de cicatrização

A inflamação sub-aguda ocorre entre os estágios agudo e crônico, durando cerca de 2 a 6 semanas. No entanto, essa resposta pode evoluir para uma inflamação crônica, caracterizada por uma duração prolongada, variando entre meses e anos. A extensão e os efeitos da inflamação crônica dependem da origem da lesão e da capacidade do organismo de reparar os danos (Michels da Silva *et al.*, 2019). Diversos fatores podem conduzir ao desenvolvimento de uma condição de inflamação crônica, incluindo eliminação incompleta do agente causador da inflamação aguda, exposição prolongada a alérgenos ou doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (Chen *et al.*, 2017).

Adicionalmente, fatores como indutores inflamatórios e bioquímicos, podem desencadear *stress* oxidativo e disfunção mitocondrial, resultando numa maior produção de radicais livres e substâncias como cristais de ácido úrico, lipoproteínas oxidadas e homocisteína. Esta ocorrência pode prolongar a resposta inflamatória do sistema imunológico, devido a episódios recorrentes de inflamação aguda (Sanada *et al.*, 2018).

Na inflamação crônica, muitas características da condição aguda persistem, como vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e migração de neutrófilos. No entanto, a composição celular muda gradualmente, com os macrófagos e os linfócitos a substituir os neutrófilos. As características distintivas incluem a infiltração de células inflamatórias primárias, como macrófagos e linfócitos, que produzem citocinas inflamatórias e enzimas específicas, contribuindo para o dano tecidual e reparo secundário, como fibrose e formação de granuloma (Furman *et al.*, 2019).

A inflamação crônica, que ocorre mesmo na ausência de lesão, pode danificar os tecidos celulares, afetando ao ácido desoxirribonucleico (ADN) e promovendo o desenvolvimento de

diversas condições patológicas como cancro, originando a formação de tumores e a estimulação da angiogênese (Figura 2). Essa relação pode envolver diversos fatores, incluindo a inativação da proteína do retinoblastoma por fosforilação, que desencadeia a proliferação celular descontrolada (Carlini *et al.*, 2023). A fosfoproteína do retinoblastoma (pRb) desempenha um papel crucial na regulação do crescimento e da proliferação celular, controlando a entrada no ciclo celular ao ligar-se à família de fatores de transcrição (E2F). A hiperfosforilação do pRb liberta E2F, resultando na transcrição de genes associados ao crescimento celular. A exposição a radicais livres, como o óxido nítrico e outras espécies inflamatórias, pode alterar a fosforilação do pRb, influenciando assim diretamente a regulação do ciclo celular (Cicchillitti *et al.*, 2003; Radisavljevic *et al.*, 2004; Rizzolio *et al.*, 2012)

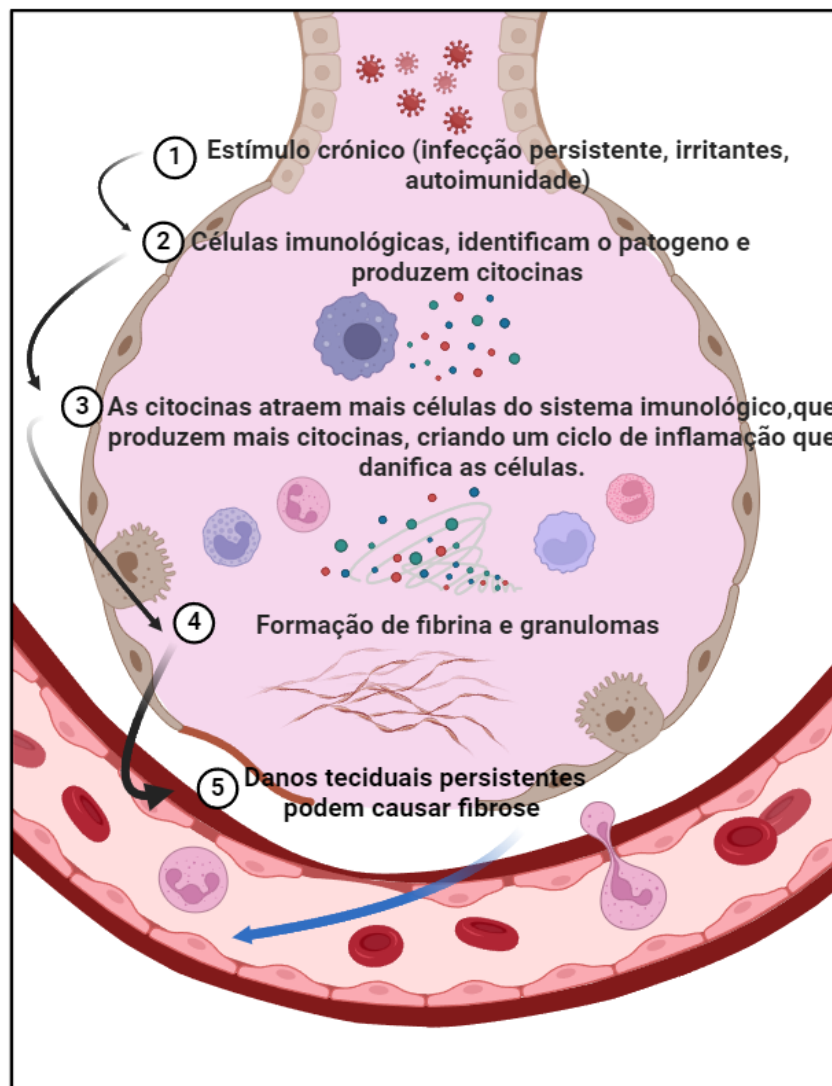


Figura 2 Principais fases do desenvolvimento da reação inflamatória crônica, adaptado de Ryan e Caplice (2020).

Entre os mediadores inflamatórios, as citocinas desempenham um papel crucial na inflamação, ativando respostas contra antígenos e regulando a resposta imune. O seu tempo de vida curto limita a sua comunicação, principalmente a tecidos linfoides e locais inflamatórios. Em infecções sistêmicas, altos níveis de citocinas afetam diversos processos fisiológicos, como alteração da função plaquetária e da coagulação sanguínea, podendo aumentar o risco de trombose e eventos tromboembólicos, como coágulos sanguíneos e acidentes vasculares cerebrais.

De igual forma, algumas citocinas, como IL-6 e TNF- α , podem afetar a regulação do metabolismo energético e a regulação do apetite, conduzindo ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como resistência à insulina e obesidade. O aumento excessivo de citocinas, conhecida como hipercitocinemia ou síndrome de libertação de citocinas, pode levar a falhas em sistemas vitais como o cardíaco, nervoso e respiratório, levando à morte do indivíduo (Zhang *et al.*, 2007; Kany *et al.*, 2019).

Por exemplo, a inflamação crónica causada pelo Vírus da imunodeficiência humano (VIH) leva ao desenvolvimento de uma variedade de doenças não infecciosas, com as citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α a desempenharem um papel significativo nos efeitos patológicos da hiperativação imune. Além de condições como aterosclerose e doenças cardiovasculares, os portadores de VIH enfrentam riscos acrescidos de complicações associadas à imunossenescência, incluindo resistência à insulina, síndrome metabólica, distúrbios cognitivos, hepatite não alcoólica, osteoporose, insuficiência renal e doenças autoimunes (Kedzierska *et al.*, 2001; Catalfamo *et al.*, 2012)

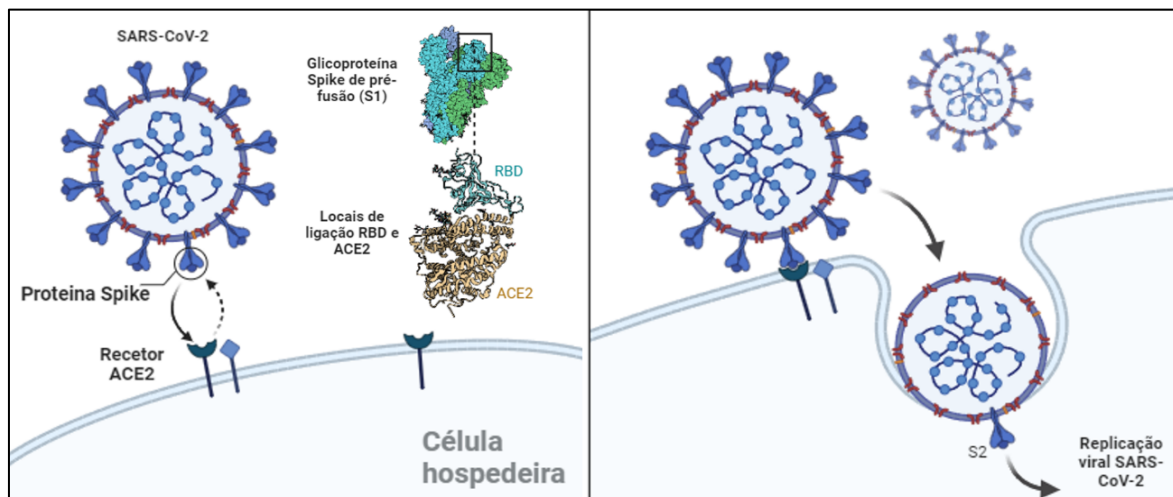
Existem diversos medicamentos convencionais para combater a inflamação crónica. A metformina, usada em pacientes diabéticos tipo II, reduz diversos mediadores inflamatórios tais como TNF- α , IL-1, e fibrinogénio. Por sua vez, as estatinas também reduzem mediadores inflamatórios, contribuindo para a redução de eventos cardiovasculares. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como o naproxeno e o ibuprofeno, inibem a enzima ciclo-oxigenase (COX) para alívio da dor em condições inflamatórias como artrite.

Os corticosteroides, como os glicocorticoides, são prescritos para várias condições inflamatórias, como artrite, lúpus e asma. Todos os fármacos para o tratamento da inflamação, incluindo os AINEs e os corticosteroides, apresentam efeitos colaterais. Os AINEs podem causar problemas estomacais, como sangramento e úlceras, além de problemas renais, cardíacos

e reações alérgicas. Por sua vez, os corticosteroides podem promover o ganho de peso, acne, pressão alta e fragilidade óssea devido à interferência na hormona cortisol, afetando o funcionamento normal de várias células, através da indução de apoptose de eosinófilos e linfócitos T, no organismo (Harirforoosh *et al.*, 2013; Sostres *et al.*, 2013; Barkin, 2015; Jahnavi *et al.*, 2019; Akkus *et al.*, 2020)

1.2 SARS-CoV-2 (COVID-19) e o seu efeito na resposta inflamatória

A COVID-19, causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, desencadeou uma pandemia a nível mundial desde o início de 2020, resultando em mais de 1,5 milhões de mortes até 2023 (Orús,2024). O SARS-CoV-2 pode causar uma ampla gama de sintomas, desde leves, como febre e tosse, até formas mais graves, como pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). O vírus entra na célula hospedeira por meio da ligação da proteína Spike ao recetor ACE2 (Figura 3). Após a entrada, o ácido ribonucleico (ARN) viral é libertado, seguindo-se a tradução de poliproteínas que são clivadas para formar proteínas não estruturais,



essenciais, como a protease principal Mpro.

Figura 3. Mecanismo de entrada do SARS-CoV2 na célula hospedeira através da ligação da proteína Spike ao recetor ACE2, adaptado de Ryan e Caplice (2020)

A maior parte dos agentes terapêuticos utilizados no tratamento da COVID-19 centra-se principalmente na ação antiviral, mas nenhuma abordagem se mostrou 100% eficaz, sujeitando os tecidos infetados a uma resposta inflamatória prolongada, e conseqüente colapso sistémico. A ação do vírus resulta na falência destes tecidos devido ao processo inflamatório crónico, causado pela produção descontrolada de citocinas. Elevados níveis de citocinas séricas, como Interferon- γ , IL-6 e o fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), têm sido associadas à presença dos coronavírus SARs-CoV-1 e o coronavírus da

síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV) (Channappanava *et al.*, 2017). Esta alteração promove o desenvolvimento de complicações como apoptose das células epiteliais dos pulmões e das células epiteliais alveolares e vazamento vascular, onde a acumulação de macrófagos ativados e a homeostase tecidual alterada, leva a deposição de fibrina e colapso alveolar. Esta sequência de eventos desencadeia a síndrome do desconforto respiratório agudo, sendo uma causa primária de morte em pacientes que superaram a infecção viral (Lew *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007; Herold *et al.*, 2008; Zornetzer *et al.*, 2010; Högner *et al.*, 2013)

A forma grave da infecção COVID-19 é caracterizada por uma resposta inflamatória imunológica intensa, evidenciada pela presença de neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos (Chen *et al.*, 2020). Necropsias minimamente invasivas revelam dano alveolar difuso, formação de membrana hialina e inflamação intersticial mononuclear, com trombose em microcirculação. Foram relatados nos pacientes níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) no sangue, uma condição denominada “tempestade de citocinas”. Níveis circulantes elevados destes mediadores pró-inflamatórios podem causar morte celular e danos nos tecidos, enquanto a sua capacidade de ativar os macrófagos pode causar eritro-fagocitose e anemia, levando à falência de múltiplos órgãos (Zhang *et al.*, 2020).

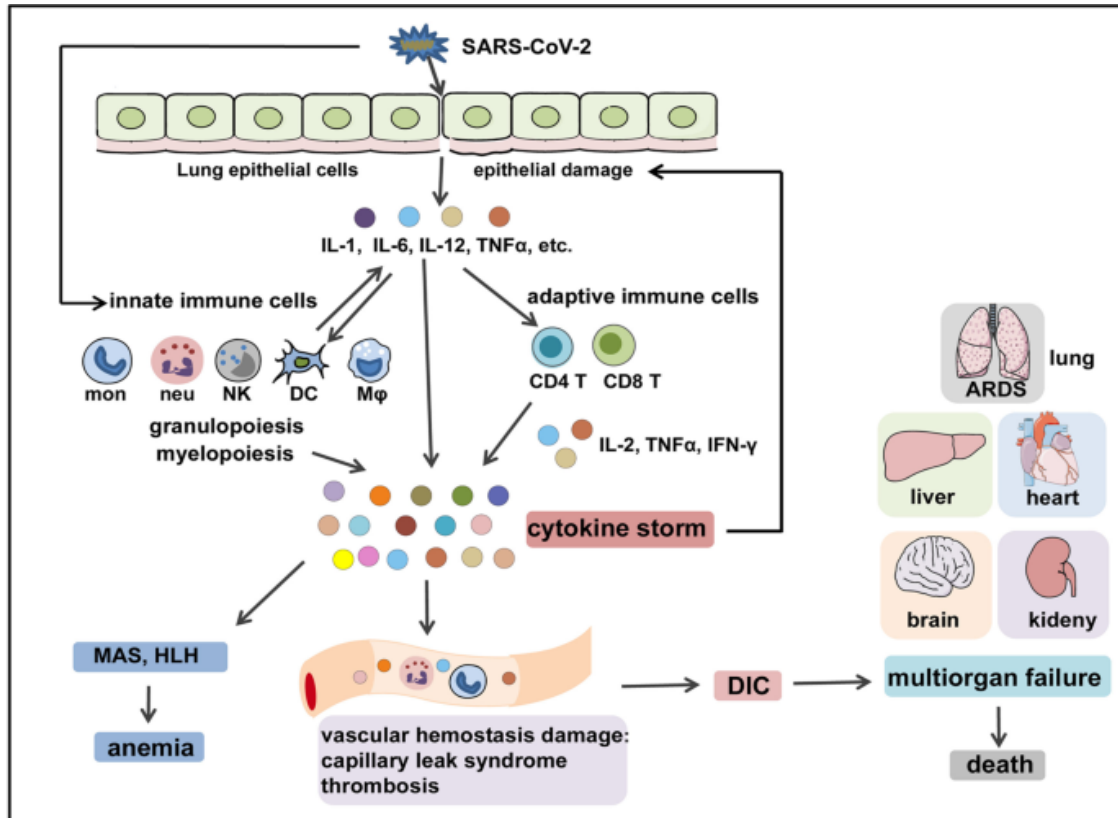


Figura 4. Mecanismos imunopatológicos inerentes à infecção por SARS-CoV-2 (Fonte: Zhang e colaboradores, 2020).

A hipercitocinemia é caracterizada pela libertação descontrolada de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, podendo desencadear diversas doenças crônicas assim como trombose e danos em órgãos extrapulmonares. Foi descrita a presença de dano alveolar difuso em cerca de 90% dos casos, presença de grandes êmbolos pulmonares, microtrombose em múltiplos órgãos, incluindo o cérebro, e hemofagocitose (Xiaohong *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2020). Este fenómeno é característico da infeção por SARS-CoV-2 em células epiteliais pulmonares, existindo um esforço global para compreender a ocorrência deste fenómeno, visando caracterizar a progressão da doença e identificar possíveis alvos terapêuticos para intervenção (Figura 4).

Em pacientes com COVID-19 em estágio grave, foram observados elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, Interleucina-8 (IL-8) e TNF- α , sugerindo a possibilidade destes mediadores inflamatórios serem usados como biomarcadores de prognóstico para diagnosticar a progressão da doença para um quadro grave ou crítico da doença (Figura 5). Altos níveis de IL-1 β , IFN- γ , Interleucina-10 (IL-10) em pacientes com COVID-19 podem ativar células T tipo 1 (Th1), que são fundamentais na ativação de imunidade específica, tendo sido detetados em pacientes com essa patologia (Mangalmurti *et al.*, 2020; Marchingo *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

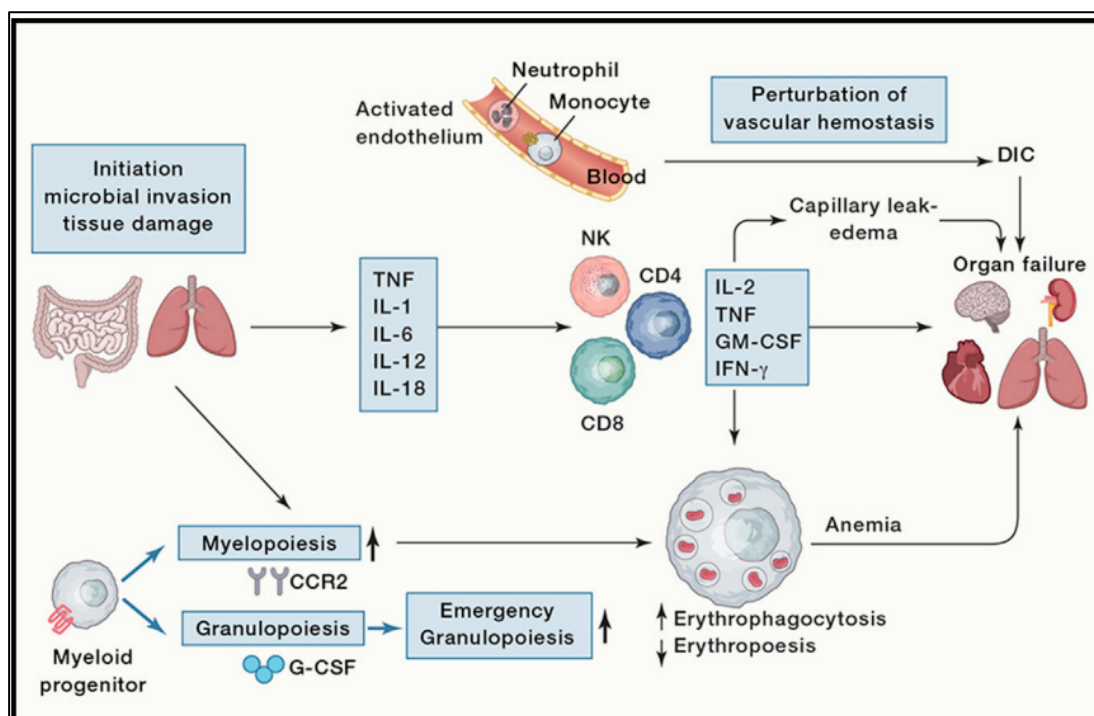


Figura 5 Fisiopatologia da hipercitocinemia (adaptado de Mangalmurti e colaboradores, 2021).

Dada essa relação direta entre a COVID-19 e a resposta inflamatória, o desenvolvimento de agentes terapêuticos com efeito antiviral e anti-inflamatório, inibindo a produção descontrolada de citocinas e eliminando ou prevenindo o desenvolvimento do agente infeccioso no organismo é da máxima relevância (Coperchini *et al.*, 2020).

Os coronavírus codificam a proteína não estrutural 15 da endorribonuclease (Nsp15), que interage com um importante supressor de tumor, a pRb, através da via ubiquitina-proteassoma. A expressão de Nsp15 leva a uma redução na expressão de pRb, o que induz transformação celular, instabilidade cromossômica e alterações na expressão gênica associada ao ciclo celular. Isto é altamente relevante porque pRb é reconhecido como um importante gene supressor de tumor (Manning, *et al.*, 2010; Bhardwaj *et al.*, 2012; Coschi *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2020).

Se o SARS-CoV-2 não estabelecer uma relação estável com o seu hospedeiro, a única possibilidade de transformação celular depende da capacidade das células infetadas escaparem à vigilância imunológica e ao efeito citopático do vírus. Esta possibilidade é particularmente atraente considerando a ligação entre a haploinsuficiência do pRb e a instabilidade cromossômica. A perda de uma única cópia do gene que codifica a pRb induz instabilidade cromossômica cria um ambiente ideal para a transformação celular. Embora a inibição do pRb mediada por Nsp15 e a instabilidade genômica sejam provavelmente resolvidas automaticamente com a eliminação do vírus, as mutações originadas pela instabilidade genômica são irreversíveis. Algumas destas mutações podem ter efeitos a longo prazo e aumentar a suscetibilidade ao cancro mesmo anos após a infecção primária (Burkhart *et al.*, 2008; Stingi *et al.*, 2021; Amiama *et al.*, 2023)

1.3 Produtos naturais marinhos como fonte de novos fármacos

Os ecossistemas marinhos abrangem cerca de 70% da superfície da Terra, representando o maior recurso inexplorado do mundo. O primeiro censo da Vida Marinha, realizado entre 2000 e 2010, revelou um nível surpreendente de biodiversidade, com foco nas águas costeiras, expandindo a estimativa de espécies marinhas conhecidas para quase 250.000. Estima-se que haja pelo menos um milhão de espécies marinhas e dezenas ou mesmo centenas de milhões de espécies microbianas (Snelgrove, 2016). A *Global Ocean Sampling Expedition*, em 2003, identificou 1,2 milhões de novos genes e duplicou o número de sequências de proteínas no *GenBank* do *National Institutes of Health* (NIH), demonstrando a vasta diversidade de

organismos marinhos ainda por explorar. Os produtos naturais têm sido utilizados como base para o desenvolvimento de inúmeros agentes terapêuticos para tratamento de diversas patologias ao longo de séculos (Figura 6).

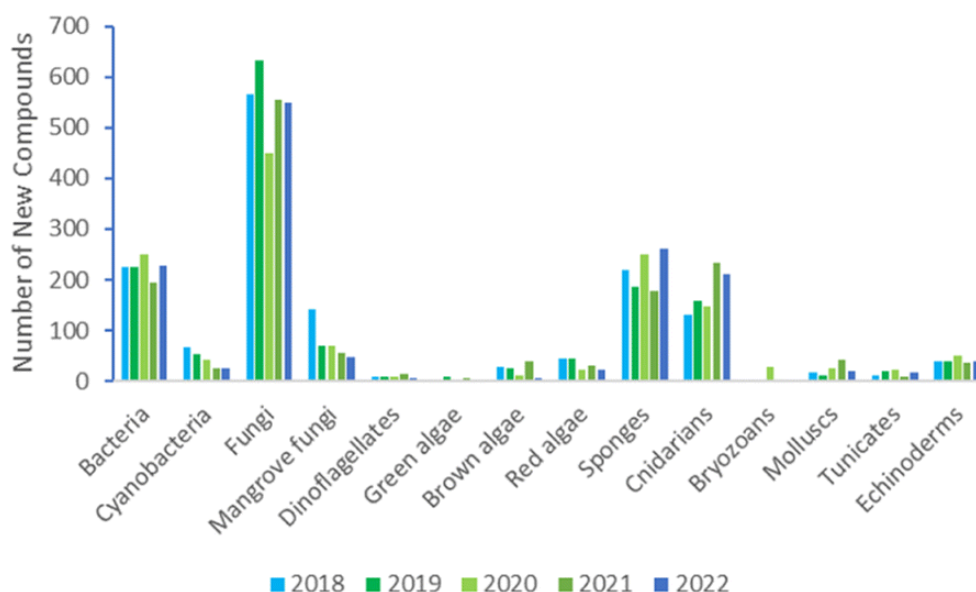


Figura 6. Número total de novos produtos naturais marinhos (MNP) reportados por cada ano entre 2017 e 2022 (Fonte: Carroll et al., 2024).

Estes têm desempenhando um papel vital no atendimento das necessidades básicas das populações humanas, com uso predominante em cuidados primários de saúde em muitas partes do mundo (Rusch *et al.*, 2007; Cragg e Newman, 2013). Nos últimos anos, houve um aumento na procura por novos produtos naturais, com um interesse crescente nos organismos marinhos devido à presença de moléculas com características químicas distintas das observadas no ambiente terrestre, e com atividades biológicas promissoras para tratamento de diferentes condições patológicas. O oceano oferece condições ideais para a produção de substâncias bioativas devido à sua grande diversidade de ambientes, onde os organismos ao longo da sua evolução desenvolveram adaptações específicas para sobreviver neste ambiente exigente, incluindo a produção de compostos essenciais para a sua sobrevivência (Mayer & Gustafson 2008).

Diversos estudos conduzidos com organismos marinhos, incluindo bactérias, fungos, algas, microalgas, invertebrados e vertebrados, têm demonstrado uma elevada diversidade de compostos com distintas atividades biológicas, nomeadamente anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais entre outras (Regan, *et al.*, 1992). O desenvolvimento bem-sucedido de fármacos a partir destas moléculas complexas enfrenta

desafios, como extração, purificação e identificação dos compostos puros. Avanços tecnológicos, como estratégias de amostragem, técnicas de cromatografia, técnicas de espectrometria, técnicas de espectroscopia, síntese química, e fermentação são cruciais para o desenvolvimento de novos fármacos baseados em produtos naturais de origem marinha.

Uma análise comparativa realizada por Kong e colaboradores (2010) demonstrou que os produtos naturais marinhos apresentam uma diversidade química relativamente superior aos produtos naturais de origem terrestre. Ao redor do 71% dos tipos de estruturas moleculares identificadas no Dicionário de Produtos Naturais Marinhos eram únicos e exclusivos destes. De igual forma, os metabolitos produzidos pelos organismos marinhos exibem uma maior bioatividade quando comparada com a apresentada pelos organismos terrestres. Por exemplo, em testes de citotoxicidade pré-clínica realizados pelo *National Cancer Institute*, aproximadamente 1% das amostras marinhas testadas mostraram potencial antitumoral, em comparação com apenas 0,1% das amostras de origem terrestre (Carroll *et al.*, 2024).

1.4 Pipeline clínico dos fármacos de origem marinha

Os compostos naturais são amplamente distribuídos globalmente e encontram-se em abundância em várias fontes naturais, como microrganismos, plantas e organismos marinhos (Atanasov *et al.*, 2015). Ao longo das últimas décadas, esses elementos têm desempenhado um papel crucial no avanço de inúmeros tratamentos para diversas doenças e distúrbios de saúde, sendo reconhecidos como uma fonte significativa para a exploração biológica e o desenvolvimento de novos medicamentos (Atanasov *et al.*, 2015; El-Demerdash *et al.*, 2016; Cragg e Pezzuto, 2016; Newman e Cragg, 2016).

Efetivamente os produtos naturais têm desempenhado um papel fundamental na indústria farmacêutica, em que cerca de 60-70% dos fármacos aprovados, são derivados ou inspirados em elementos naturais (Mullard, 2024).

O ambiente marinho, devido às suas condições exigentes tais como variações de temperatura, pH e pressão, assim como predação e competição, promove a síntese de metabolitos biologicamente ativos, tanto primários como secundários, com características distintas dos presentes em bibliotecas de compostos sintéticos. Estima-se que o mercado global de ingredientes ativos marinhos apresente uma taxa de crescimento impressionante de 2023 a 2033. O mercado global deverá ultrapassar uma avaliação de US\$ 9.709,0 milhões em 2023,

esperando que atinja uma avaliação de US\$ 18.058,5 milhões até 2033. (Daniotti e Re, 2021; Banday *et al.*, 2024)

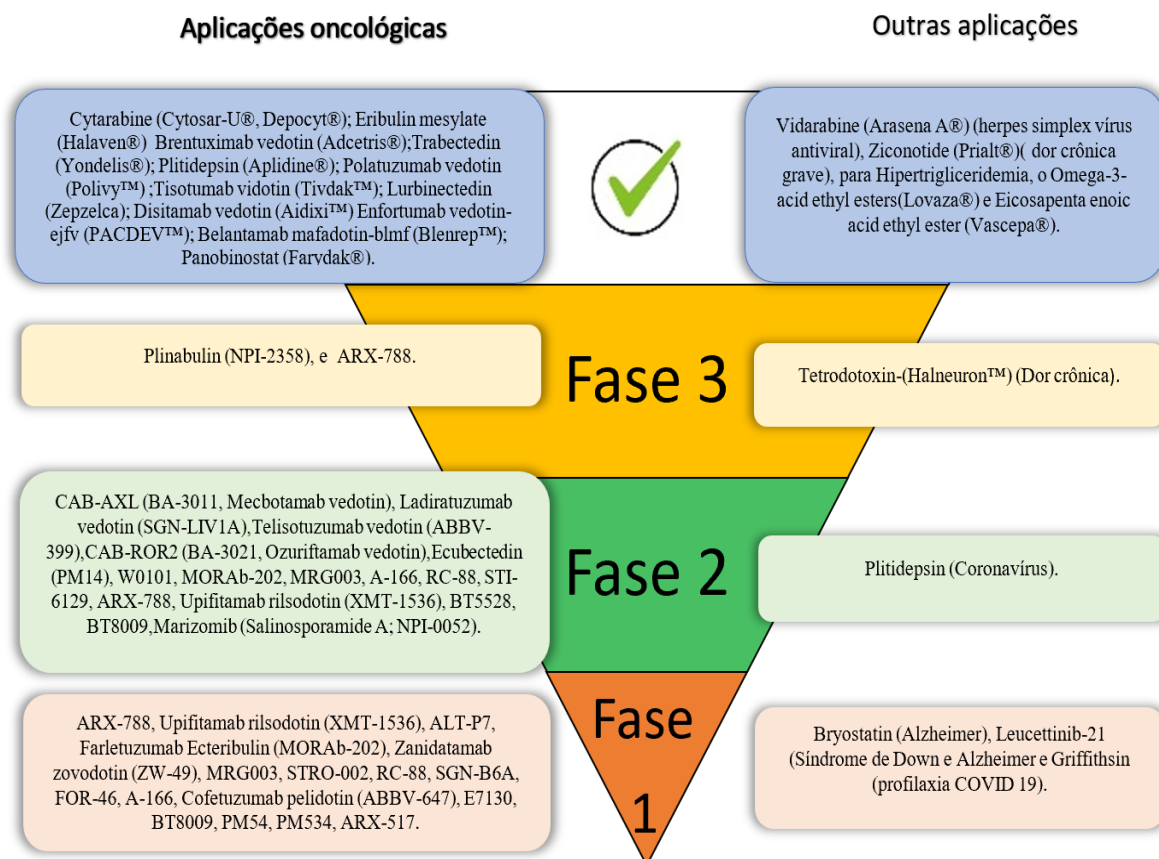


Figura 7 Pipeline clínica dos fármacos de origem marinho

Ao longo dos últimos 50 anos de investigação contínua, foram identificados mais de 30.000 compostos de origem marinha, provenientes de uma variedade de organismos, como bactérias, cianobactérias, fungos, dinoflagelados, algas, esponjas, cnidários, briozoários, moluscos, ascídias e equinodermos (Alves *et al.*, 2018; Carroll *et al.*, 2024). Estes organismos marinhos têm a capacidade de produzir uma ampla gama de compostos bioativos, incluindo alcaloides, antraquinonas, péptidos, polissacarídeos, policetídeos e terpenos, com elevado potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Lu *et al.*, 2021; Carroll *et al.*, 2024).

Atualmente, existem 14 medicamentos de origem marinho aprovados pelas agências de regulamentação referidos da Figura 7. Contudo, o fármaco *omega-3-carboxylic acid* (Epanova®) foi descontinuado em 2021. A maior parte dos fármacos têm indicação para o

tratamento de diversos cânceros; como a *cytarabine* (Cytosar-U®, Depocyt®, aprovado pela FDA em 1969) para a leucemia; *eribulin mesylate* (Halaven®, aprovado pela FDA em 2010) para o câncer de mama metastático; *brentuximab vedotin* (Adcetris®, aprovado pela FDA em 2011) para o linfoma maglinante sistêmico anaplásico de grandes células T, doença de Hodgkin; *trabectedin* (Yondelis®, aprovado pela FDA em 2015) para sarcoma de tecidos moles e câncer de ovário; *plitidepsin* (Aplidine®, aprovado na Austrália em 2018) para o mieloma múltiplo, leucemia e linfoma; *polatuzumab vedotin* (Polivy™, aprovado pela FDA em 2019) para o linfoma não-Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, linfoma, e linfoma de células B folicular; *tisotumab vedotin* (Tivdak™, aprovado pela FDA em 2021) para o câncer cervical metastático; *lurbinectedin* (Zepzelca™, aprovado pela FDA em 2020, Austrália 2021) para o câncer do pulmão.

Disitamab vedotin (Aidixi™, aprovado na China em 2021) para o câncer avançado, câncer gástrico, carcinoma gástrico com superexpressão de HER2, câncer da mama avançado, e tumores sólidos; *enfortumab vedotin-efv* (PACDEV™, aprovado pela FDA em 2019) para o câncer urotelial metastático; *belantamab mafadotin-blmf* (Blenrep™, aprovado pela FDA em 2020) para o mieloma múltiplo; *panobinostat* (Farydak®, aprovado pela FDA em 2015) para o mieloma múltiplo. Para o vírus do herpes, a *vidarabine* (Vira-A®, aprovado pela FDA em 1976); para a dor crônica, o *ziconotide* (Prialt®, aprovado pela FDA em 2004); e finalmente para a hipertrigliceridemia, o *omega-3-acid ethyl esters* (Lovaza®) e *eicosapenta enoic acid ethyl ester* (Vascepa®) aprovados pela FDA em 2004 e 2012, respectivamente. Atualmente, existem compostos de origem marinha que têm demonstrado resultados promissores em estudos pré-clínicos e que avançaram já para ensaios clínicos em fase 1,2 e 3 referidos na Figura 7.

Estes medicamentos podem ser classificados com base na sua origem, tipo e mecanismo de ação. Cytarabine, Fludarabine, Nelarabine e Histoquines são exemplos de análogos de nucleosídeos sintéticos isolados a partir de uma esponja marinha, que inibem a síntese, replicação e alongamento do ADN em células cancerígenas. Outros exemplos incluem inibidores de microtúbulos, como o *Eribulin mesylate* (Halaven®), que têm a função de bloquear o ciclo celular na fase G2/M, inibindo o crescimento dos microtúbulos e os agentes alquilantes de ADN, como a *trabectedin* (Yondelis®) O Histoquines, previne danos no ADN e regula a apoptose sob oxidação em condição de estresse (Papon *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2022).

1.5 Evidências pré-clínicas e clínicas de atividades anti-inflamatórias e antivirais de compostos de origem marinha.

1.5.1 Anti-inflamatório

A inflamação crônica é central na patogênese de várias doenças, tais como asma, artrite reumatoide, inflamação do intestino (colitis), psoríase, esclerose múltipla, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e, recentemente, diabetes tipo 2 e cancro. Diversos fármacos têm sido utilizados no tratamento desta condição, contudo apresentam efeitos colaterais indesejados. Os produtos naturais provenientes do ambiente marinho têm sido destacados como fonte promissora de novos agentes com propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Cheung et al., 2016). Esses compostos incluem sesquiterpenos, diterpenos, esteroides, polissacarídeos sulfatados, alcaloides, ácidos gordos, proteínas entre outros (Gautam et al., 2009).

As determinações do mecanismo de ação dos produtos de origem natural com potenciais atividades anti-inflamatórias têm sido avaliadas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Em termos gerais, a atividade anti-inflamatória *in vitro* é determinada pela inibição da expressão das enzimas óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) responsáveis pela produção de óxido nítrico e prostaglandinas por exemplo, numa linha celular como os macrófagos RAW264.7 tratados com lipopolissacarídeos (LPS) ou interferon- γ (IFN - γ) (Huang et al., 2015)

Sesquiterpenos como lemnalol, isolado do coral *Lemnalia cervicorni*, e o estrepesquitriol, de *Streptomyces sp.*, demonstraram atividade anti-inflamatória em estudos pré-clínicos (Lee et al., 2013). O lemnalol atenuou a artrite gotosa em ratos, reduzindo a dor, o inchaço e a inflamação nas articulações, enquanto o estrepesquitriol suprimiu a produção de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS (Yang et al., 2013). A flavalina A, proveniente do coral *Lemnalia flava*, mostrou efeitos anti-inflamatórios *in vitro*, ao inibir a regulação positiva induzida por LPS das proteínas pró-inflamatórias iNOS e COX-2 em células de macrófagos RAW 264.7 (Lui et al., 2011). O diterpeno pseudopterano, isolado a partir do coral *Pseudopterogorgia*, suprimiu a expressão e secreção de COX-2, induzida por IFN- γ , IL-1 β , IL-6, iNOS, proteína quimioatraente de monócitos-1, e a secreção de óxido nítrico (NO) e TNF- α induzido por LPS. Por outro lado, os diterpenos da classe química dos briarans, provenientes do coral marinho *Briareum excavatum*, exibem uma notável ação inibitória na permeabilidade vascular cutânea, edema e expressão de marcadores inflamatórios como COX-2, iNOS e

metaloproteinase - 9. Além disso, reduzem a expressão de IL-6 e TNF- α em células dendríticas derivadas da medula óssea. Estes resultados sugerem o potencial deste grupo de compostos como agentes anti-inflamatórios (González et al., 2013).

Apesar de um elevado número de estudos *in vitro*, existe apenas um pequeno número de compostos de origem marinha que foram avaliados estudos pré-clínicos ou ensaios clínicos como agentes anti-inflamatórios.

O primeiro composto foi a Anabaseine, uma toxina alcaloide isolada a partir de vários vermes marinhos do Filo *Nemertea* (Coates et al., 1971). Esta molécula inspirou a síntese de diversos análogos, tendo-se observado que o seu derivado *sintético* 3-(2,4-dimetoxibenzilideno) - *anabaseína* (GTS-21) inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF - α e interleucina -1 β (IL-1 β) através dos seus efeitos nos recetores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$ em macrófagos (Cai et al., 2009). O potencial anti-inflamatório do GTS-21 foi também avaliado no modelo de endotoxina, que consiste na exposição de células RAW 264.7 à endotoxina (4 ng/ml ou 10 ng/mL) na presença ou ausência de GTS-21. Os ratos foram pré-tratados com GTS-21 (0,4 mg/Kg ou 4 mg/Kg, intraperitonealmente) ou solução salina 30 min antes do tratamento com a endotoxina (6 mg/Kg, por via intraperitoneal). O fator de necrose tumoral sérico foi analisado 1h30 min após a adição da endotoxemia. O GTS-21 inibiu de forma dependente da concentração o fator de necrose tumoral e a ativação do fator nuclear kappa B (NF-KB) *in vitro*. (Pavlov et al., 2007; Rosas-Ballina et al., 2009).

As pseudopterosinas são uma classe de glicosídeos diterpénicos que apresentam potentes atividades anti-inflamatórias e analgésicas, mediando assim a ação anti-inflamatória ao suprimir a libertação de eicosanóides das células inflamatórias através da inibição da fosfolipase e da 5-lipoxigenase que catalisam a hidrólise de ácidos gordos a partir de fosfolipídios presentes na membrana celular, além de transformá-los em leucotrienos, geralmente de natureza pró-inflamatória. (Potts et al. 1992). O derivado do éter metílico da pseudopterosina, a metopterosina, demonstrou estimular o processo de cicatrização e a atividade reepitelizante em feridas em modelos animais. Nos ensaios clínicos de fase I e II, a baixa solubilidade aquosa da metopterosina limitou a sua eficácia em sistemas de modelos biológicos pelo que os estudos foram suspensos (Martins et al. 2014).

A manoalida, é um antibiótico sesterterpenóide não esteróide extraído da esponja marinha *Luffariella variabilis* com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, exibindo a capacidade de suprimir, *in vitro*, a síntese de lípidios pro-inflamatórios, como prostaglandinas,

leucotrienos e ativadores de plaquetas (De Silva and Scheuer 1980; Mayer et al., 1993). Foi clinicamente validado em humanos e em estudos clínicos recentes de fase II como medicamento anti-inflamatório tópico. Contudo, devido à sua limitada biodisponibilidade, o desenvolvimento clínico no tratamento de pacientes psoriáticos foi interrompido (Tibes and Friebe 1997). Enquanto isso, tem inspirado a síntese de novos análogos de agentes anti-inflamatórios que possam ultrapassar as limitações observadas.

Outro produto natural marinho isolado da esponja *Cacospongia mollior* designado como escalaradial (de Carvalho and Jacobs, 1991) exibiu propriedades anti-inflamatórias em modelos *in vitro* e *in vivo*. Este terpenóide inibiu a atividade da fosfolipase A2 e bloqueou a libertação de ácido araquidónico em neutrófilos estimulados (Jacobson and Schrier, 1993). Também demonstrou capacidade para reduzir a formação de edema em orelhas de camundongos tratadas com éster de forbol quando aplicado topicamente (Marshall et al., 1994).

As algas marinhas produzem uma série de metabolitos com propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e antivirais, contribuindo para a indução de efeitos benéficos no tratamento de um grande número de doenças. Por exemplo, os polissacarídeos exibem atividades anticoagulantes, anti-inflamatórias, antivirais e anti-tumorais, tendo elevado interesse para a indústria farmacêutica (Jiao et al., 2011).

O ascofilano, isolado da alga castanha *Lobophora variegata*, é um exemplo de um fucoidano, o qual demonstrou capacidade antioxidante e anti-inflamatória contra a artrite induzida por Zimosan (Medeiros et al., 2008). Os polissacarídeos da alga vermelha *Digenea simplex* atenuaram o edema causado pelo tratamento com carrageninas e minimizaram a inflamação induzida por dextrano, histamina, serotonina e bradicinina, impedindo a migração de neutrófilos em direção à cavidade peritoneal e às patas dos murinos. Esta ação foi seguida de uma diminuição das concentrações de TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal (Pereira et al., 2014).

Outro grupo de compostos com inúmeras propriedades bioativas são os compostos fenólicos, tais como os polifenóis e os florotaninos, que apresentam uma elevada capacidade antioxidante por redução do stress oxidativo, inflamação e tumorigénese. Devido ao potencial dos florotaninos em reduzir o desenvolvimento e progressão do cancro, há grande interesse na sua aplicação biofarmacêutica. Por exemplo, o florotanino *6,6'-bieckol*, isolado a partir da alga

castanha *Ecklonia cava* exibiu capacidade anti-inflamatória inibindo a atividade da COX-2 e a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (Yang et al., 2009).

A administração oral de florotaninos policetídeos 6,8'- e 8,8'-*bieckol*, isolados da alga castanha *Eisenia arborea*, conduziu à inibição da inflamação na orelha de camundongo suprimindo a inflamação, através da supressão de mediadores químicos (histamina, leucotrieno B₄ e prostaglandinas E₂) e da expressão de ARNm e/ou da atividade da COX-2 (Sugiura et al., 2018).

A fucoxantina, um carotenóide isolado a partir de *Myagropsis myagroides*, tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios através da inibição da produção de óxido nítrico, redução da produção de prostaglandina-E₂, e supressão da expressão de mRNA de iNOS e COX-2 em macrófagos estimulados pelo tratamento por LPS. O tratamento com fucoxantina também demonstrou reduzir a liberação das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 de forma dependente da concentração (Heo et al., 2010; Huang et al., 2010)

A proteína lectina derivada da alga verde *Caulerpa cupressoides* demonstrou capacidade de suprimir a acumulação de leucócitos no líquido sinovial, conforme evidenciado pela atividade da mieloperoxidase. Além disso, a lectina também inibiu a entrada de leucócitos e a expressão de TNF- α e IL-1 β na articulação (Da Conceição et al., 2014).

1.5.2 Anti-viral

Em relação à atividade antiviral, tem havido um maior sucesso, já existindo um fármaco de origem marinha aprovado e comercializado. Os estudos pioneiros de Hitchings e Elion, iniciados em 1942, identificaram análogos naturais de bases purinas com propriedades anti-leucêmicas e imunossupressoras (Cullis, 1984; Prusoff *et al.*, 1989). O seu trabalho levou ao desenvolvimento de medicamentos que foram utilizados no tratamento de doenças malignas, sendo a Vidarabine, um nucleosídeo análogo da adenosine-vidarabine ou Ara-A e VIRA-A® (King Pharmaceuticals, Bristol, TN, EUA) um análogo sintético de arabinonucleosídeos inspirado na espongotimidine e na espongouridine de ocorrência natural. A Vidarabine inibe seletivamente os vírus de ADN, levando a uma desestabilização da cadeia de ADN, podendo também inibir a poliadenilação do pré-mARN, catalisada pela poli(A)-polimerase, impedindo a maturação do mARN, e interferindo na síntese e transcrição do ADN. Quando esta é incorporada numa cadeia de ADN, substitui muitas das bases da adenosina.

Outras moléculas de origem marinha encontram-se em ensaios clínicos de fase II como a plitidepsina, também conhecida como APLIDIN® (PharmaMar SA, Madrid, Espanha), o qual é um peptídeo cíclico sintético que foi originalmente extraído da ascídia *Aplidium albicans*. A plitidepsina pertence a uma classe de compostos conhecidos como didemninas, sendo um peptídeo cíclico sintético já aprovado como fármaco contra tumores em cancro de pâncreas, estômago, bexiga e próstata. Recentemente, em estudos pré-clínicos, a aplidina demonstrou ser aproximadamente 28 vezes mais eficiente que o remdesivir contra a doença do coronavírus 2019 (COVID-19), devido a potente inibição do fator extensão de tradução eucariótica e fator de alongamento de tradução eucariótica 1 (EF1A), o qual determina a inibição da replicação viral (Martinez, 2021).

Por exemplo, o 3-alkilpiridínio isolado da esponja do Mar Vermelho *Amphimedon chloros* inibiu de forma potente a protease NS3 do vírus do Nilo Ocidental (WSV), uma serina protease envolvida na formação de coágulos sanguíneos (O'Rourke et al., 2018). O espirocíclico γ -lactâmico espirostafiletrichin X, isolado do fungo *Cochliobolus lunatus* inibiu o crescimento de várias estirpes de vírus influenza ao inibir a polimerase viral PB2. O composto demonstrou capacidade de ligar-se a uma região altamente conservada do domínio de ligação da ARN polimerase PB2 (Wang et al., 2018).

Os péptidos isolados a partir de alguns invertebrados marinhos representam um grupo potencial de substâncias com propriedades antivirais. Por exemplo, peptídeos constituídos por sequências de 17-18 resíduos de aminoácidos obtidos a partir de caranguejos-ferradura *Tachypleus tridentatus* e *Limulus polyphemus* revelaram um efeito antiviral contra o VIH-1. A partir destes peptídeos, foram sintetizados compostos análogos, com uma composição de aminoácidos mais simples, taquiplesina I, isolada de hemócitos do caranguejo-ferradura japonês (*Tachypleus tridentatus*) na concentração de 7,5 $\mu\text{g/mL}$. A taquiplesina I suprimiu o desenvolvimento de efeitos citopáticos (CPE) em mais de 70% em células MT-4 infetadas com VIH (vírus associado à linfadenopatia). Um dos análogos (T144) exibiu um potente efeito inibidor, com um valor de IC_{50} de 2,6 nM contra VIH-1 e com uma baixa citotoxicidade ($\text{IC}_{50} = 44,6 \mu\text{M}$) (Iwanaga, 1991; De Clercq, 2000; Gustafson et al., 2004).

Por sua vez, as ficocianobilinas demonstraram elevada afinidade de ligação para as proteínas Mpro e RdRp relacionadas com o SARS-CoV-2 através de estudos *in silico* de acoplamento molecular. O éster etílico de esculetina da esponja marinha *Axinella cf.* apresentou uma forte interação com a protease do SARS-CoV-2, sugerindo a sua potencialidade para o

tratamento da COVID-19 (Pendyala et al., 2021). A *Griffithsin*, uma lectina derivada de algas vermelhas, foi estudada quanto à sua potencial aplicação antiviral, demonstrando a sua atividade contra o VIH-1 e a hepatite C. Um recente estudo *in vitro* realizado por Millet e colaboradores (2016) mostraram que a *Griffithsin* tem ação inibitória contra o MERS-CoV (Meuleman et al., 2011; Lusvardi et al., 2016).

Avanços científicos têm permitido explorar os recursos marinhos como fonte de compostos bioativos com potencial farmacológico, destacando-se as algas marinhas pelas suas propriedades, incluindo atividade antiviral. Nesta área, os polissacarídeos sulfatados e os compostos fenólicos são das moléculas mais estudadas, demonstrando atividade antiviral significativa. Os polissacarídeos sulfatados medeiam efeitos na ligação inicial da glicoproteína viral com os constituintes carregados negativamente das células hospedeiras, bloqueando assim a entrada do vírus. Entre os diferentes polissacarídeos, os fucoidanos têm sido especialmente promissores, exibindo atividade antiviral contra diversos vírus, como VIH, herpes-vírus simples (HSV), citomegalorívus (HCMV), influenza A (IAV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (Adhikari et al., 2006; Vo et al., 2010).

Os polissacarídeos de algas vermelhas, também demonstraram capacidade de inibir a replicação do VIH-1. O glucuronogalactano, exibiu capacidade de inibir a ligação vírus-célula hospedeira em modelos *in vitro*, um mecanismo característico da fase inicial da infecção pelo VIH. Além disso, a atividade antirretroviral de galactanos sulfatadas extraídos das algas *Grateloupia filicina* e *Grateloupia longifolia* foi observada num isolado primário de VIH-1 e células mononucleares de sangue periférico humano (Bourgougnon et al., 1996; Wang et al., 2012).

A carragenina característica das algas *Gigartina skottsbergii* demonstrou atividade anti-HPV em modelos *in vitro*, sendo três vezes mais eficaz do que a heparina. Atua principalmente impedindo a ligação do HPV às células, bloqueando a infecção pós-fixação de maneira independente do sulfato de heparina. De forma semelhante à heparina, a carragenina é reconhecida como fator de ligação às células do HPV, sendo um candidato promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o HPV, pois faz parte de aditivos alimentares, oferecendo vantagens como custos de produção baixos, novos modos de ação, amplo espectro, baixa citotoxicidade e segurança (Buck et al., 2006; Grassauer et al., 2008).

Fucanos isolados da alga castanha *Fucus vesiculosus* demonstraram ter um efeito marcado na inibição da transcriptase reversa do VIH quando testados a uma concentração de

0,5 a 1,0 mg/mL. Os fucanos apresentam anéis de glicose específicos que se orientam espacialmente e mudam a configuração para reconhecer a enzima e determinar a ligação para inibir a transcrição do ADN viral (Queiroz et al., 2008).

A laminarina, um polissacarídeo solúvel em água, obtido a partir de algas castanhas, também demonstrou atividade antiviral contra o VIH. A sua estrutura é baseada em unidades de glicose compostas por (1,3) - β -D-glucana com ramificação β -(1,6). Este polissacarídeo demonstrou capacidade de inibir a adsorção do VIH nos linfócitos e a atividade da transcriptase reversa do VIH, quando testada a uma concentração de 50 μ g/ mL (Muto et al., 1988, Karuppusamy et al., 2022).

Por sua vez, o alginato, um ácido polimérico extraído de algas castanhas, demonstrou aumentar a função imunológica da célula hospedeira e inibir a atividade da ADN polimerase do vírus da hepatite B (HBV), sugerindo o seu potencial para inibir a replicação do HBV. Além disso, o alginato foi também utilizado no desenvolvimento de filmes e revestimentos ativos com propriedades antivirais contra o norovírus murino (MNV-1) e o vírus da hepatite A (HAV), demonstrando o seu potencial uso em embalagens de alimentos ou como componente de fármacos antivirais (Gao et al., 2019; Cano et al., 2022).

Como resposta à procura de fármacos efetivos, que possam inibir e/ou eliminar os efeitos causados pelo SARS-CoV-2, tem existido um aumento do interesse nos produtos naturais de origem marinha. As ficocianobilinas isoladas demonstraram alta afinidade de ligação para as proteínas SARS-CoV-2 Mpro e RdRp através de estudos *in silico* de acoplamento molecular (Pendyala et al., 2021)

Os polissacarídeos presentes na alga *Saccharina sp* determinaram cinco possíveis inibidores potentes da proteína SARS-CoV-2 Mpro (fostularina 3, 1-hexadecoxipropano-1,2-diol, ácido palmitoleico, 15 α -metoxipupehenol e pupehediona), os quais se ligaram firmemente à proteína Spike do SARS-CoV-2 *in vitro*, sugerindo que podem interferir na ligação da proteína Spike ao co-receptor nos tecidos do hospedeiro, inibindo a infecção viral (Kwon et al., 2020).

1.6 Atividades biológicas da macroalga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* e seus terpenos.

Um dos ecossistemas que proporciona as condições ideais para os organismos biosintetizarem substâncias com propriedades biológicas distintas com aplicabilidade em

diferentes áreas é o oceano. Efetivamente, o ecossistema marinho apresenta uma grande diversidade de ambientes onde os organismos necessitam de desenvolver estratégias para se adaptarem e sobreviverem, incluindo a produção de metabolitos secundários. Tal como já referido, nas últimas décadas, os produtos de origem marinha têm despertado o interesse da comunidade científica, principalmente pela elevada diversidade de metabolitos produzidos, com elevado potencial biotecnológico e terapêutico (Malve, 2016).

Neste contexto, as macroalgas, principalmente as que pertencem à classe *Rhodophyta*, representam uma fonte importante de diferentes metabolitos secundários. A maioria dos estudos (57%) sobre o perfil químico de algas pertence à classe *Rhodophyta* e à família *Rhodomelaceae*. Cerca de 85% destes dizem respeito a compostos isolados a partir de espécies do género *Laurencia*, incluindo uma grande quantidade de sesquiterpenos halogenados e acetogeninas, juntamente com alguns terpenos (Lyakhova *et al.*, 2004).

A alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* é uma espécie também conhecida como *Haematocelis fissurata* Crouan.frat ou, em inglês, como *berry wart cress*. A primeira análise química desta alga foi realizada em 1976 e, desde então, um grande número de diterpenos cíclicos bromados foram isolados (Woelkerling, 1990). Esta alga cresce a partir de um suporte discóide para formar um talo cartilaginoso ereto, comprimido, de dois gumes, com folhas escarlates e eixos principais castanho-avermelhados escuros de 80 mm até 300 mm de comprimento. Possui um grande número de ramos que são elaborados em dísticos, subdicotómicos ou alternativos. (<http://www.algaebase.org>). *S. coronopifolius* é encontrada principalmente na costa sudoeste da Inglaterra, País de Gales, ao redor da Irlanda e nas costas ocidentais da Escócia. A fase tetraspórica foi registada na Irlanda, na Escócia e na costa Mediterrânica, Açores e costas atlânticas de Espanha e França e Ilhas Canárias (<http://www.habitas.org.uk/marinelife/>).

Esta macroalga tem-se revelado uma fonte extraordinariamente prolífica de diterpenos interessantes que possuem esqueletos di-, tri- ou tetracíclicos, muitas vezes rearranjados, a maioria dos quais contendo um ou mais átomos de bromo. O Sphaerococcenol A (Fenical *et al.*, 1976), e o Bromosphaerol são dois exemplos de bromoditerpenos mais abundantes nesta alga (Prousis *et al.*, 2021).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial bioativo dos terpenos halogenados isolados a partir da alga *S. coronopifolius*, nomeadamente com propriedades citotóxicas, antimicrobianas e *antifouling*. No estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2015), no

qual isolaram um novo diterpeno, o Sphaerodactylomelol, verificou-se que o Sphaerococcenol A exibiu a maior capacidade de inibir a proliferação de células HepG-2 a concentrações sub-tóxicas, e o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol exibiu a maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (IC₅₀: 6,35 µM). Quémener e colaboradores (2021) testaram 15 compostos, incluindo o Bromosphaerol, contra os principais bio-incrustantes marinhos. Cada metabolito apresentou atividade anti-incrustante contra pelo menos um organismo/enzima, onde o Sphaerococcenol A (4) e o 14*R*-hidroxi-13,14-di-hidro-esferococcinol A, revelaram ser os compostos mais potentes sem toxicidade para larvas de ostras utilizadas como organismos não alvo. No estudo realizado por Alves e seus colaboradores (2022) em oito linhas celulares tumorais diferentes, o Sphaerococcenol A apresentou citotoxicidade contra todas as linhas celulares testadas, com um intervalo de IC₅₀ entre 4,5 e 16,6 µM. A perda de viabilidade das células MCF-7 foi acompanhada pela produção de H₂O₂, disfunção mitocondrial, ativação da Caspase-9, alterações na morfologia nuclear do ADN e alterações no desenvolvimento das esferas tumorais enriquecidas com células estaminais cancerígenas colorretais.

Objetivos

2. Objetivo Geral

Nos últimos anos, constatou-se que os processos inflamatórios crônicos são a fonte de múltiplas doenças, causando danos aos tecidos, bem como ao ADN das células, o que, em muitos casos, leva ao desenvolvimento de várias patologias. Atualmente, os medicamentos utilizados, embora ajudem a reduzir a inflamação, apresentam uma série de efeitos adversos. Por exemplo em casos graves como o fenômeno denominado de hipercitocinemia, causado pela infecção viral do SARs-COV-2, existem fármacos com pouca eficácia para neutralizar os efeitos da resposta inflamatória, o que, na maioria das vezes leva à morte do paciente.

Os organismos marinhos têm demonstrado a capacidade de produzir compostos com atividades biológicas relevantes, incluindo anti-inflamatórias e anti-virais. Os bromoditerpenos presentes na macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* são um exemplo claro de compostos de origem marinha com eficácia biológica comprovada, como atividade citotóxica, anti-incrustante e antimicrobiana.

Desta forma, o objetivo da presente dissertação consistiu em avaliar a capacidade anti-inflamatória e a interação com proteínas virais dos bromoditerpenos obtidos a partir da alga marinha *Sphaerococcus coronopifolius*, a fim de determinar o seu potencial para inspirar o desenvolvimento de novos fármacos.

2.1 Objetivos específicos

De modo a atingir o objetivo principal acima descrito, foram definidos objetos específicos, nomeadamente:

1. Isolamento e identificação de bromoditerpenos mediante técnicas de cromatografia (TLC; CC; HPLC) e espectroscopia (^1H RMN).
2. Avaliação do efeito citotóxico dos bromoditerpenos no modelo celular de macrófagos (RAW 264.7).
3. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos bromoditerpenos em macrófagos RAW 264.7 com inflamação induzida por LPS.
4. Avaliação do efeito dos bromoditerpenos nos níveis de mediadores inflamatórios, TNF- α , IL-6 e IL-10 em macrófagos RAW264.7.
5. Avaliação da capacidade de associação dos bromoditerpenos com as proteínas de SARS-CoV-2 e processos celulares essenciais mediante um estudo *in-silico*

Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1 Solventes e Reagentes.

Solventes de qualidade analítica e HPLC: hexano, acetato de etilo, diclorometano e metanol foram adquiridos à VWR-BDH Chemicals (Fontenay-sous-Bois, França) e Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido), enquanto a água ultrapura foi obtida num equipamento de laboratório Advantage A10 Milli-Q (Merck, Darmstadt, Alemanha). Reagentes químicos de grau analítico usados nos bioensaios *in vitro* foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Lonza (Basel, Suíça) e Biowest (Riverside, CA, EUA). Os reagentes e meios de cultura para ensaios celulares *in vitro* foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha), Gibco (Grand Island, NY, EUA), Invitrogen (Life Technologies, Warrington, UK), e Sigma-Aldrich (Seelze, Germany).

3.2 Extração e purificação dos compostos

As diferentes etapas do isolamento dos compostos a partir de extratos da alga *Sphaerococcus coronopifolius* encontram-se esquematizadas na Figura 8.

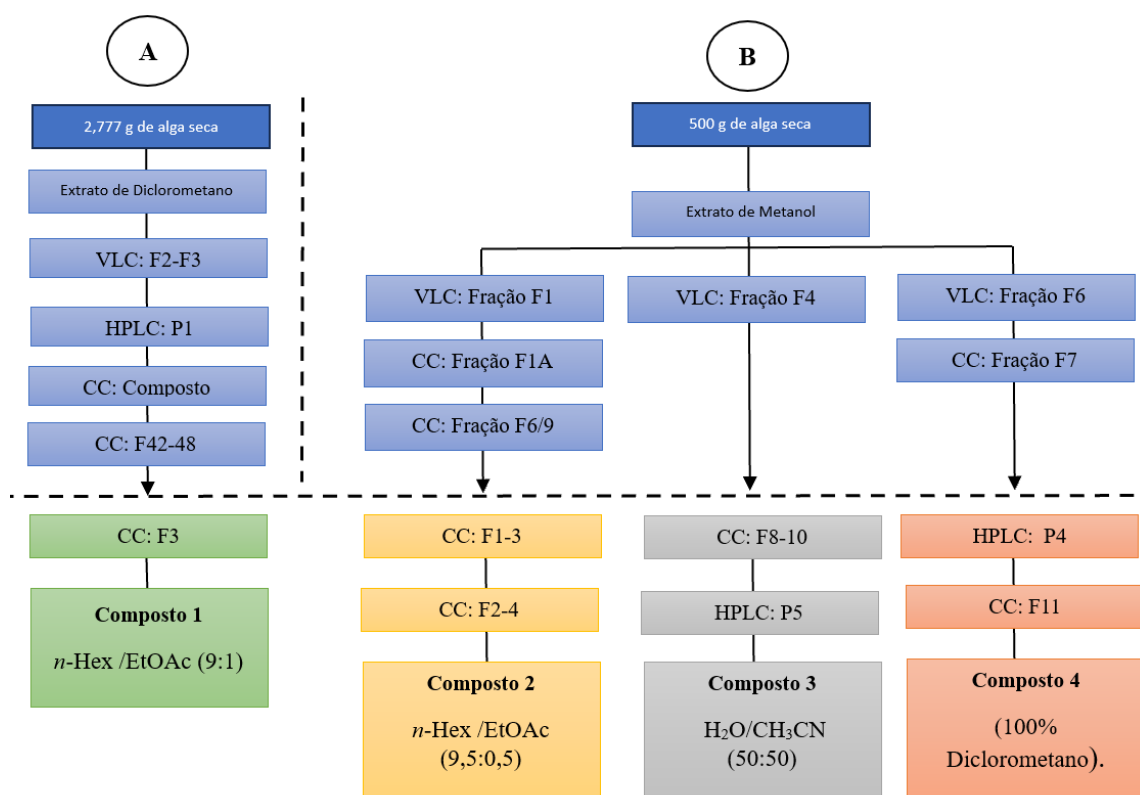


Figura 8 Etapas do processo de isolamento dos compostos a partir de extratos da alga *Sphaerococcus coronopifolius*.

Numa experiência prévia, a alga *S. coronopifolius* liofilizada (2,777 Kg) (Figura 8A) foi extraída sequencialmente com metanol (MeOH) e, seguidamente, com diclorometano (CH₂Cl₂) na proporção de 1:40 (p/v), à temperatura ambiente com agitação constante durante 12 horas, e ao abrigo da luz. Seguiu-se uma filtração (papel de filtro nº 4, VWR), sendo os extratos resultantes concentrados à secura sob vácuo, a 40 °C, num evaporador rotativo (IKA HB10, VWR Internacional, Alcabideche, Portugal). O extrato seco de CH₂Cl₂ (23,637 g) foi então fracionado por cromatografia líquida em vácuo (VLC) usando sílica gel 60 (0,06–0,2 mm) de fase normal (Scharlau, Espanha). A fase móvel foi composta por ciclohexano com quantidades crescentes (25%) de acetato de etilo (EtOAc).

As frações F2 e F3 resultantes da VLC foram purificadas em coluna semi-preparativa de HPLC de fase reversa (Synergi Fusion-RP 80^a, Phenomenex, 10 x 250 mm, 4 µm) com fluxo de 5,2 mL/min, usando como fase móvel uma mistura de H₂O: CH₃CN em regime isocrático de 0 a 5 min (25:75), um gradiente linear de 5 a 25 min (de 25:75 a 15: 85), e isocrático após 25 min (15:85). Esta primeira etapa de purificação proporcionou 12 sub-frações (P1-P12). A sub-fração P1 foi purificada em coluna preparativa (1) (2,0 x 19,5 cm) com enchimento de sílica gel 60 (Sharlau, 0,04-0,06 mm) utilizando como fase móvel uma mistura de *n*-Hex/EtOAc, tendo se obtido o composto **1** (maioritário/impuro) (P1.1, f12-f15), o qual foi submetido novamente a uma cromatografia em coluna (2), (2,0 x 32,0 cm), obtendo-se as frações F42-48. Finalmente, a partir desta fração foi realizada uma cromatografia em coluna (3) preparativa com sílica gel (0,06–0,2 mm), na qual foi obtida a fração F3 (*n*-Hex /EtOAc (9:1) donde resultou o **Composto 1** (125,0 mg).

Numa segunda experiência (Figura 8B), a partir de 500 gramas da alga seca, foi preparado um extrato com metanol. Este foi submetido a cromatografia líquida em vácuo de fase normal em sílica gel 60 (0,06–0,2 mm), usando ciclohexano com quantidades crescentes de EtOAc como fase móvel. As frações F1, F4 e F6 obtidas foram eluídas com 100% de ciclohexano e sujeitas a várias técnicas cromatográficas:

Fração 1 (F1A), foi submetida a cromatografia em coluna preparativa (1) com sílica gel 60 (Sharlau, 0,04–0,06 mm; 2,0 x 19,0 cm), obtendo-se a fração **F6/9**, a qual foi submetida a cromatografia em coluna preparativa (2) com sílica gel (VWR BDH Chemiclas, Leuven, Bélgica, 0,04–0,06 mm; 2,0 x 32,0 cm), utilizando gradientes de ciclohexano, com quantidades crescentes de EtOAc, obtendo a fração **F1/3** (110,5 mg) que foi submetida a cromatografia em

coluna preparativa (3) com sílica gel, e eluída com *n*-Hex /EtOAc (9,5:0,5). obtendo-se o **Composto 2** (27,0 mg).

Fração 4 foi submetida a cromatografia em coluna preparativa (1) com sílica gel 60 (Sharlau, 0,04–0,06 mm; 2,0 x 19,0 cm), obtendo-se a fração F8-10, a qual foi purificada em coluna semi-preparativa de HPLC de fase reversa (Synergi Fusion-RP 80^a, Phenomenex, 10 x 250 mm, 4 µm), fluxo de 6 mL/min, usando como fase móvel uma mistura de H₂O:CH₃CN em condições isocráticas (50:50) de 0 a 25 min, obtendo-se o Pico 5 correspondente ao **Composto 3** (3,8 mg).

Fração 6 foi submetida a cromatografia em coluna preparativa (1) com sílica gel 60 (0,04-0,06 mm; 2,0 x 19,0 cm). Obteve-se a fração F7, que foi purificada em coluna semi-preparativa de HPLC de fase reversa (Synergi Fusion-RP 80^a, Phenomenex, 10 x 250 mm, 4 µm), fluxo de 10 mL/min, usando como fase móvel uma mistura de H₂O: CH₃CN em condições isocráticas (50:50) de 0 a 25 min, obtendo-se o Pico D Esta fração foi submetida a uma cromatografia em pipeta de Pasteur com sílica gel 60 (Sharlau, 0,04–0,06 mm, 0,6 x 4,0 cm) e eluição com diclorometano (100%), obtendo a fração F11 que corresponde ao **Composto 4** (4,2 mg).

3.2.1 Identificação dos compostos

A identificação dos compostos isolados foi efetuada através de ressonância magnética nuclear de próton (1H-RMN). Os espectros foram obtidos num equipamento Bruker Avance 400 (Bruker, Madrid, Espanha) a 400.13 MHz. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl₃, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e os espectros obtidos à temperatura de 25 °C. Os desvios químicos (δ) são expressos em ppm e referenciados ao sinal residual do solvente (δH = 7.26 ppm).

3.3 Avaliação de efeito inflamatório anti-inflamatório no modelo celular RAW 264.7

A resposta inflamatória é mediada por um sistema complexo de fatores, que envolve células do sistema imunitário e uma variedade de mediadores inflamatórios. Estes mediadores são moléculas de sinalização-chave implicadas na ativação e regulação de processos inflamatórios. Existem vários mediadores associados com a resposta inflamatória, tais como, o óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Desta forma, induzindo uma condição de inflamação através do tratamento com LPS, avaliou-se a produção de mediadores

pró-inflamatórios, tais como a produção de óxido nítrico, os níveis de TNF- α e interleucina-6 (IL-6) e de mediadores anti-inflamatórios como a interleucina-10 (IL-10).

3.3.1 Manutenção da cultura celular

Os ensaios foram realizados num modelo *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 de rato induzidos pelo vírus da leucemia murina Abelson (ATCC TIB-71), adquiridos do biobanco *American Type Culture Collection* (ATCC). As células RAW 264.7 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem *phenol red* suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (v / v), 1% de antibiótico/antimicótico (100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina) e 1% de piruvato de sódio (100 mM). As células foram mantidas em cultura com 5% de CO₂, 95% de humidade e uma temperatura de 37 °C. A subcultura das células foi efetuada em frascos de crescimento de 75 cm² de acordo com as instruções da ATCC.

3.3.2 Avaliação da atividade citotóxica nas células RAW 264.7

A atividade citotóxica dos bromoditerpenos foi avaliada nas células RAW 264.7 através do ensaio colorimétrico MTT adaptado do método realizado por Yuan e Walsh (2006). As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de 5×10^4 células/poço, sendo posteriormente testados os compostos num intervalo de concentrações de 0.01 – 100 μ M durante um período de incubação de 24 h. As células não tratadas foram usadas como controlo, e a saponina foi usada como controlo de morte celular. Findo este período, o meio foi removido e as células lavadas com 200 μ L de tampão PBS (1 \times). Após esta lavagem, adicionaram-se 100 μ L de MTT (0,5 mg/mL), previamente preparado em meio de cultura sem soro, às células, seguindo-se a incubação no escuro, durante 1 h, na incubadora de CO₂. De seguida, aspirou-se o MTT e adicionaram-se 100 μ L de DMSO, de modo a solubilizar os cristais de formazano produzidos. Os resultados foram obtidos após a dissolução total dos cristais, através da leitura de absorvância a um comprimento de onda de 570 nm (Epoch, BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA). Os efeitos dos compostos sobre a viabilidade celular das células RAW 264.7 foram apresentados em percentagem do controlo (% do controlo).

3.3.3 Avaliação da atividade inflamatória e anti-inflamatória no modelo celular RAW 264.7

3.3.3.1 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) nas células RAW 264.7

Os efeitos inflamatórios e anti-inflamatório dos diterpenos e bromoditerpenos foram determinados através da quantificação do óxido nítrico (NO) de acordo com Yang e colaboradores (2009), com algumas modificações. As células foram semeadas em placas de 24 poços com uma densidade de 2×10^5 células/poço. De modo a determinar se os compostos induziam inflamação, as células foram tratadas com os compostos à concentração não tóxica, Sphaerococcenol A (0,01; 0,1 μ M), Aloaromadendreno (0,01; 0,1; 1 μ M), Bromosphaerol e 12*R*-hidroxi-bromosphaerol (0,01; 0,1; 1 e 10 μ M), durante 24 h e 48 h, e os níveis de NO determinados. Por sua vez, de modo a determinar se as amostras demonstravam atividade anti-inflamatória os compostos foram incubados nas células RAW 264.7 durante 24 h e 48 h numa condição de inflamação induzida com lipopolissacarídeos (LPS) a uma concentração de 1 μ g/mL.

Desta forma, as células foram pré-incubadas com os compostos nas concentrações de 0,1 e 0,01 μ M para o Sphaerococcenol A, 1,0.1 e 0,01 μ M para o Aloaromadendreno, e 10,1,0.1 μ M e 0,01 μ M para o Bromosphaerol e 12*R*-hidroxi-bromosphaerol durante 1 h e, posteriormente, adicionaram-se o LPS, seguindo-se uma incubação de 24 h e 48 h. Após este período, procedeu-se a uma centrifugação da placa a 200 g, 5 min a 4 °C. De seguida transferiram 150 μ L do sobrenadante para uma nova placa e adicionaram-se 50 μ L de reagente de Griess (1% (w/v) sulfanilamida, 0,1% (p/v) N-(1-naftil) etilenodiamina em 2,5% (v/v) de ácido fosfórico) preparado previamente. Após 30 min de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 546 nm num leitor de microplacas (Epoch, BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA). A dexametasona, um conhecido anti-inflamatório, foi usado como padrão à concentração de 30 μ M. Os resultados foram apresentados em percentagem do controlo (% do controlo).

3.3.3.2 Efeitos dos compostos nos níveis de citocinas mediadoras do processo inflamatório

Com o objetivo de determinar se o potencial anti-inflamatório dos diterpenos e bromoditerpenos isolados da alga *Sphaerococcus coronopifolius*, estava associado à alteração dos níveis dos mediadores inflamatórios TNF- α e IL-6 e anti-inflamatório IL-10, foram avaliados os níveis destas citocinas após 24 h e 48 h mediante o ensaio imunoenzimático

(ELISA) (Engvall, E., & Perlmann, P, 1971). As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 24 poços, a uma densidade de 2×10^5 células por poço. Após o período de incubação, foram recolhidos 350 μL do sobrenadante e armazenado a -80°C (Thermo, Electron Corporation, Massachusetts, Estados Unidos) para posterior quantificação. Os níveis das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram quantificados utilizando os *Kits* “TNF- α mouse uncoated ELISA KIT”, “IL-6 mouse uncoated ELISA kit e “IL-10 mouse uncoated ELISA kit” (Thermo Fisher Scientific, Vienna Austria: 88-7324-22, 88-7064-22 e 88-7105-22), respetivamente. Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante com pequenas modificações. A absorbância foi medida a 570 e 450 nm, de modo a permitir a subtração do comprimento de onda. Os dados analisados e os resultados foram apresentados em pg/mL.

3.4 Docking molecular

Foram realizadas simulações de screening virtual utilizando para o acoplamento molecular, o software *DockThor-VS*, disponível gratuitamente em <https://www.dockthor.lncc.br>, que se integra com o supercomputador brasileiro *SDumont*. Este software oferece orientação detalhada para a preparação de proteínas e ligantes mediante ferramentas como *PdbThorBox* e *MMFFLigand*, e permite a análise de resultados através de *DTStatistics*. O estudo concentrou-se em duas proteínas-alvo do SARS-CoV-2, a proteína Mpro (PDB:6LU7) (*Grid* x: -31 ; y: 21 ; z: 23) e a proteína Spike sem ACE2 (PDB:6M0J) (*Grid* x: -30 ; y: 14 ; z: 24), utilizando a variante genómica de tipo selvagem, bem como a proteína do retinoblastoma cadeia A-B (PDB:1O9K) (*Grid* x: 33 ; y: 161 ; z: 43) envolvida na eliminação de células cancerígenas, a qual pode ser inibida tanto em processos inflamatórios como pela ação de proteínas virais. Durante a simulação, manteve-se um pH de 6,6 a 7,4, e não se alterou o estado de protonação dos resíduos de aminoácidos, não se agregaram átomos de hidrogénio e não se congelaram as ligações giratórias do ligante com condições standard (# avaliações: 1000000; # corridas: 24)

A função de pontuação utilizada para avaliar as poses acopladas do ligante é baseada na soma dos termos do campo de força MMFF94S, conhecida como Energia Total, que inclui as energias de interação intermolecular, como as forças de Van der Waals (com constante de amortecimento $\delta = 0,35$) e os potenciais eletrostáticos entre os pares de átomos proteína-ligantes. O principal objetivo destas experiências de screening é determinar se os compostos obtidos da alga *Sphaerococcus coronopifolius* poderiam interagir com uma ou mais das

proteínas-alvo através de um protocolo de acoplamento convencional, utilizando as estruturas 3D de:

- 12*R*-hidroxi-bromosphaerol - PubChem CID: 46232318
- Aloaromadendreno - PubChem CID: 12305247
- Bromosphaerol - PubChem CID: 14565462
- Sphaerococcenol A - PubChem CID: 21775031

Para a visualização dos resultados assim como para gerar gráficos de interação recetor-ligando 2D optou-se por utilizar Discovery Studio Visualizer Client BIOVIA, desenvolvido e distribuído pela Dassault Systèmes, que é uma aplicação de modelagem molecular gratuita e rica em funções para ver, partilhar e analisar dados de pequenas proteínas e moléculas.

3.5 Tratamento de dados e análise estatística

Para determinar as diferenças significativas em relação ao controlo e/ou tratamento com LPS foi usado uma análise de variância unidirecional (ANOVA), com testes de comparação múltipla de Dunnett. Todos os dados foram verificados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Levene). Os cálculos foram realizados usando o software GraphPad v8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Todos os dados foram obtidos através de, pelo menos, três experiências independentes ($n=3$) e são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM), sendo consideradas as diferenças a um nível de significância de 0,0001 ($p < 0,0001$).

Resultados

4. Resultados

4.1 Identificação dos compostos isolados

O isolamento dos compostos maioritários das frações iniciais foi efetuado por meio de métodos de cromatografia líquida (VLC, CC e HPLC). A caracterização estrutural dos metabolitos isolados foi realizada por ressonância magnética nuclear de próton (^1H RMN), a qual permitiu a identificação de um sesquiterpeno e três bromoditerpenos biosintetizados pela alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius*.

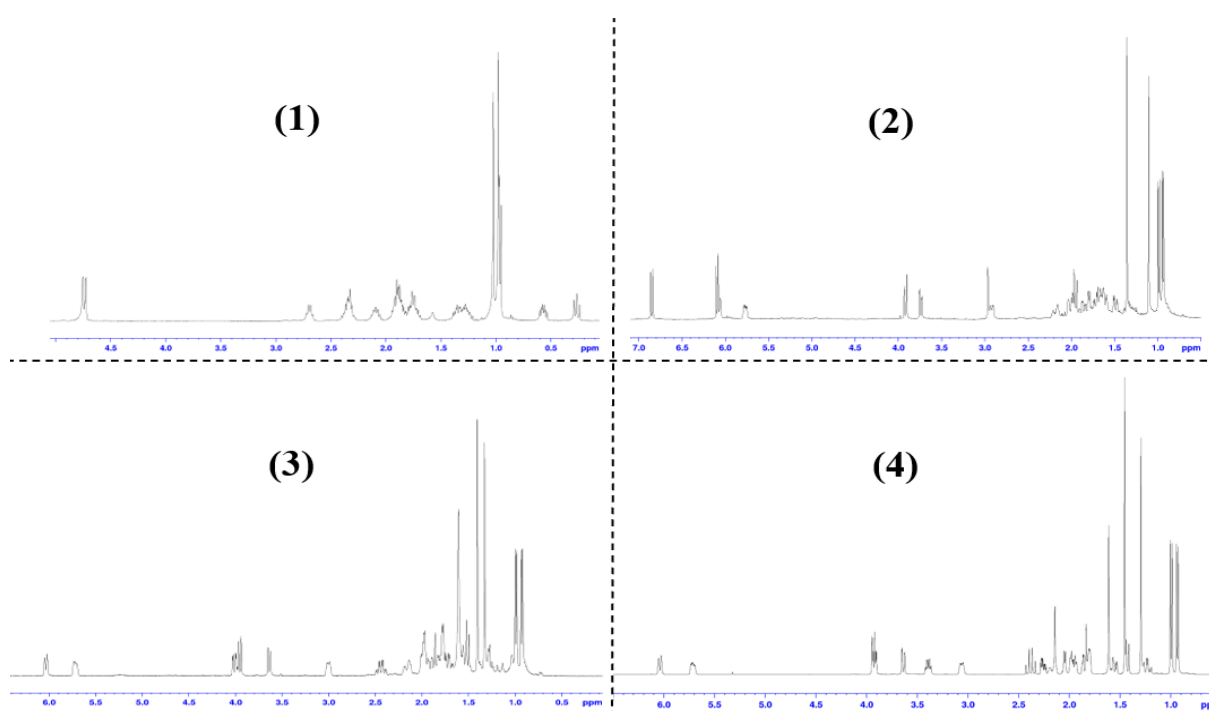


Figura 9 Espetros de ressonância magnética nuclear de próton dos compostos isolados da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius*

A análise dos espectros de ^1H RMN (Figura 9) e sua comparação com espectros de compostos anteriormente isolados a partir da mesma alga, bem como com dados espectrais reportados na literatura (Fenical et al., 1976; Fattorusso et al., 1976; De Rosa et al., 1988; Cafieri et al., 1987; Cafieri et al., 1990; Faure et al., 1991; Smyrniotopoulos et al., 2008; Smyrniotopoulos et al., 2010) permitiram identificar os compostos Aloaromadendreno **(1)**, Sphaerococcenol A **(2)**, Bromosphaerol **(3)**, e 12*R*-hidroxi-bromosphaerol **(4)**. As suas estruturas químicas encontram-se representadas na Figura 10.

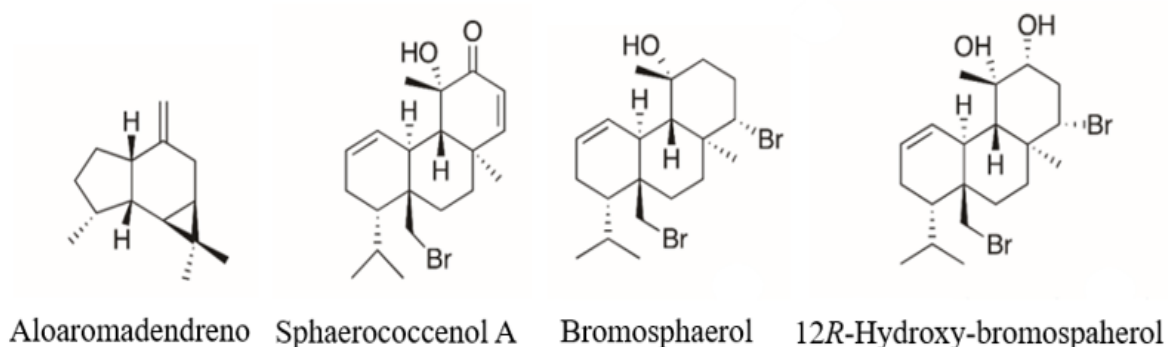


Figura 10 Estruturas químicas dos compostos isolado da *Sphaerococcus coronopifolius*.

Dados relativos à fórmula e peso molecular, bem como à massa obtida para cada composto na sequência do processo de isolamento efetuado, encontram-se resumidos a Tabela I.

Tabela I Fórmula química, peso molecular e massa obtida dos compostos isolados de *Sphaerococcus coronopifolius*

Composto	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Massa (mg)
Aloaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204.36	27,0
Sphaerococcenol A	C ₂₀ H ₂₉ BrO ₂	381.35	125,0
Bromosphaerol	C ₂₀ H ₃₂ Br ₂ O	448.28	3,8
12R-hidroxi-bromosphaerol	C ₂₀ H ₃₂ Br ₂ O ₂	464.28	4,2

Para os ensaios biológicos, preparou-se uma solução stock de cada composto em DMSO (100 mM), a partir da qual se prepararam as restantes concentrações (0,01; 0,1; 1; 10 µM).

4.2 Atividades biológicas realizadas em modelos celulares *in vitro*

4.2.1 Avaliação da atividade citotóxica nas células RAW 264.7

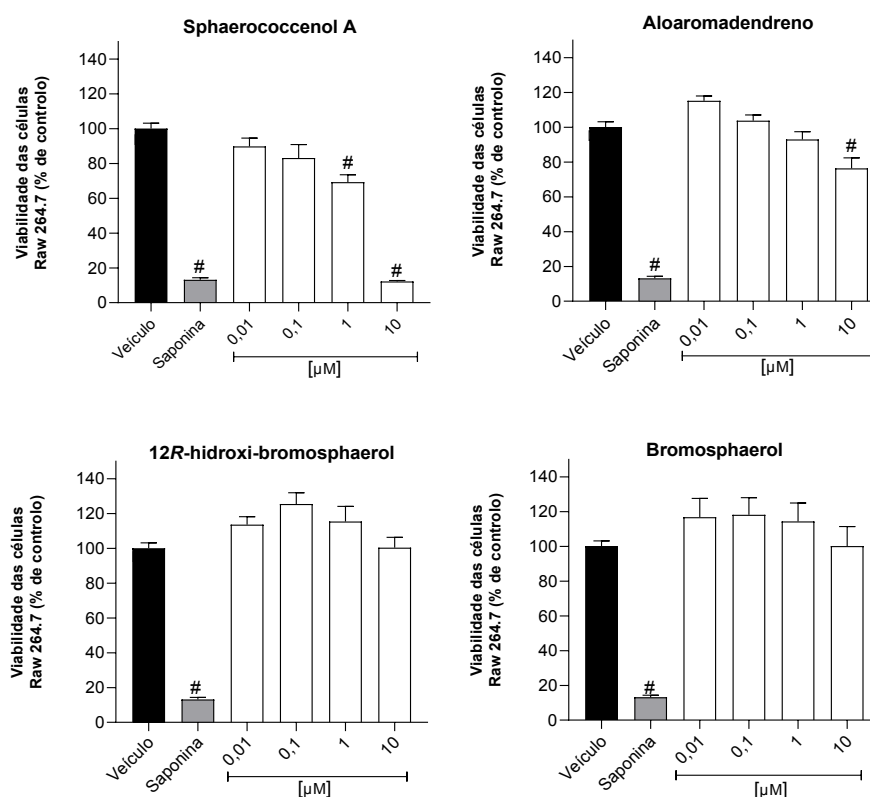


Figura 11 Viabilidade celular das células RAW 264.7 após 24 h de incubação com o terpeno Aloaromadendreno e os bromoditerpenos, Sphaerococcenol A, 12R-hidroxi-bromosphaerol e Bromosphaerol (0.01 – 10 µM), obtidos da alga *Sphaerococcus coronopifolius*. Os resultados são expressos em percentagem do controlo (% do controlo). A saponina (SAP) foi utilizada como controlo de morte celular. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média (SEM)(n=3). Os símbolos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,0001$, ANOVA, teste de Dunnet) quando comparados ao veículo: (#).

Quando as células RAW 264.7 foram tratadas com os compostos às concentrações definidas (0.01 – 10 µM) observou-se uma redução significativa na viabilidade celular (Figura 11). O efeito mais marcado foi induzido pelo composto Sphaerococcenol A às concentrações de 1 e 10 µM reduzindo significativamente a viabilidade celular em 87,7% e 30,7%, respetivamente. Por outro lado, o Aloaromadendreno a 10 µM reduziu significativamente a viabilidade celular em 23,6%. No que diz respeito ao 12R-hidroxi-bromosphaerol e ao Bromosphaerol, não houve redução significativa da viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas. Neste sentido, as concentrações dos compostos que não demonstraram citotoxicidade nas células RAW 264.7 foram selecionadas para estudar o seu potencial anti-inflamatório.

4.2.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos compostos nas células RAW 264.7

4.2.3 Produção de óxido nítrico nas células RAW 264.7

Depois de definidas as concentrações não tóxicas para os compostos testados, foi avaliado o efeito inflamatório e anti-inflamatório dos compostos através da quantificação de óxido nítrico. Os resultados são apresentados na Figura 12.

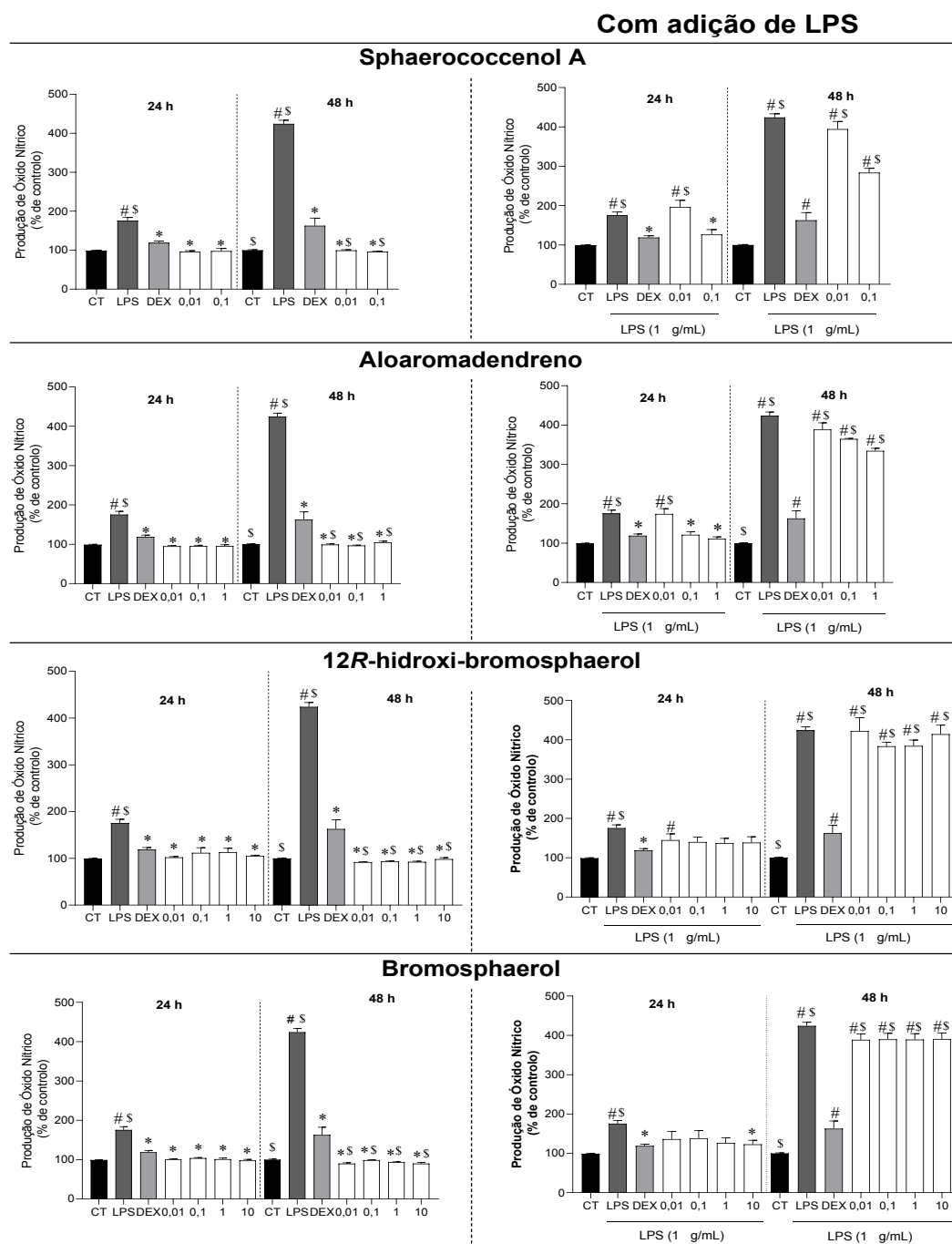


Figura 12 Avaliação da atividade inflamatória e anti-inflamatória nas células RAW 264.7: Inflamação (A) Produção de óxido nítrico após 24 h e 48 h de incubação com os compostos; Anti-inflamatórios (B)

Produção de óxido nítrico pelas células RAW 264.7 induzidas por LPS (1 µg/mL), após 24h e 48h de incubação com os compostos (0,01 – 10 µM). Os resultados são expressos como porcentagem do controlo (CT) (% do controlo). Dexametasona (DEX) foi utilizada como padrão anti-inflamatório. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média (SEM)(n=3). Os símbolos representam diferenças estatisticamente significativas (p <0,0001, ANOVA, teste de Dunnet) quando comparados ao controlo (#), LPS (*) e DEX (\$) .

Após exposição das células aos compostos nas concentrações selecionadas, observou-se que tanto às 24 horas como às 48 horas de incubação, nenhum deles estimulou a produção de NO referido na Figura 12A, quando comparado com o controlo. Por outro lado, quando as células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS, pôde observar-se que os compostos apresentaram capacidade de reduzir os níveis de NO. Após 24 h de incubação verificou-se que o composto Aloaromadendreno a 1 (111,0 ± 4,8 %) e 0,1 µM (121,4 ± 8%) seguido do Sphaerococcenol A a 0,1µM (126,6 ± 12,5%) e do Bromosphaerol a 10 µM (123,1 ± 10,9%) reduziram significativamente a produção de NO, quando comparado com o LPS (175,4 ± 8,2%). Por outro lado, o efeito verificado pelos compostos foi semelhante ao padrão anti-inflamatório dexametasona (118,9 ± 4.3%). Após 48 h de incubação verificou – se que apenas o Sphaerococcenol A a 0,1µM (283,8 ± 11,6%) apresentou capacidade de reduzir significativamente a produção de NO, quando comparado com o LPS (424,6 ± 8,2%) como observado na Figura 12B.

4.2.4 Efeitos dos compostos nos níveis de citocinas mediadoras do processo inflamatório

De forma a avaliar o efeito dos compostos isolados da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* ao nível dos mediadores inflamatórios, três citocinas inflamatórias, TNF - α, IL-6 e IL-10, foram quantificadas nas células RAW 264.7 quando expostas ao LPS na presença dos compostos. Os resultados são apresentados nas figuras 13 -15.

4.2.4.1 Citocina TNF-α

Os efeitos dos compostos nos níveis de TNF-α dos macrófagos 264.7 encontram-se representados na Figura 13. Quanto aos níveis de TNF-α após exposição das células ao LPS (1209,0 ± 84,6 pg/mL), observou-se um aumento significativo da concentração desta citocina quando comparado com o controlo. Contudo, quando tratado com o Sphaerococcenol A a 0,1 µM (760,9 ± 33,9 pg/mL) e o Bromosphaerol a 1 µM (804,2 ± 61,7 pg/mL) e 10 µM (737,6 ± 192,5 pg/mL) verificou-se uma redução significativa dos níveis de TNF-α. No entanto, é de

salientar que os níveis apresentados destas citocinas na presença dos compostos foram inferiores aos valores apresentados pela dexametasona (1030 ± 24 pg/mL).

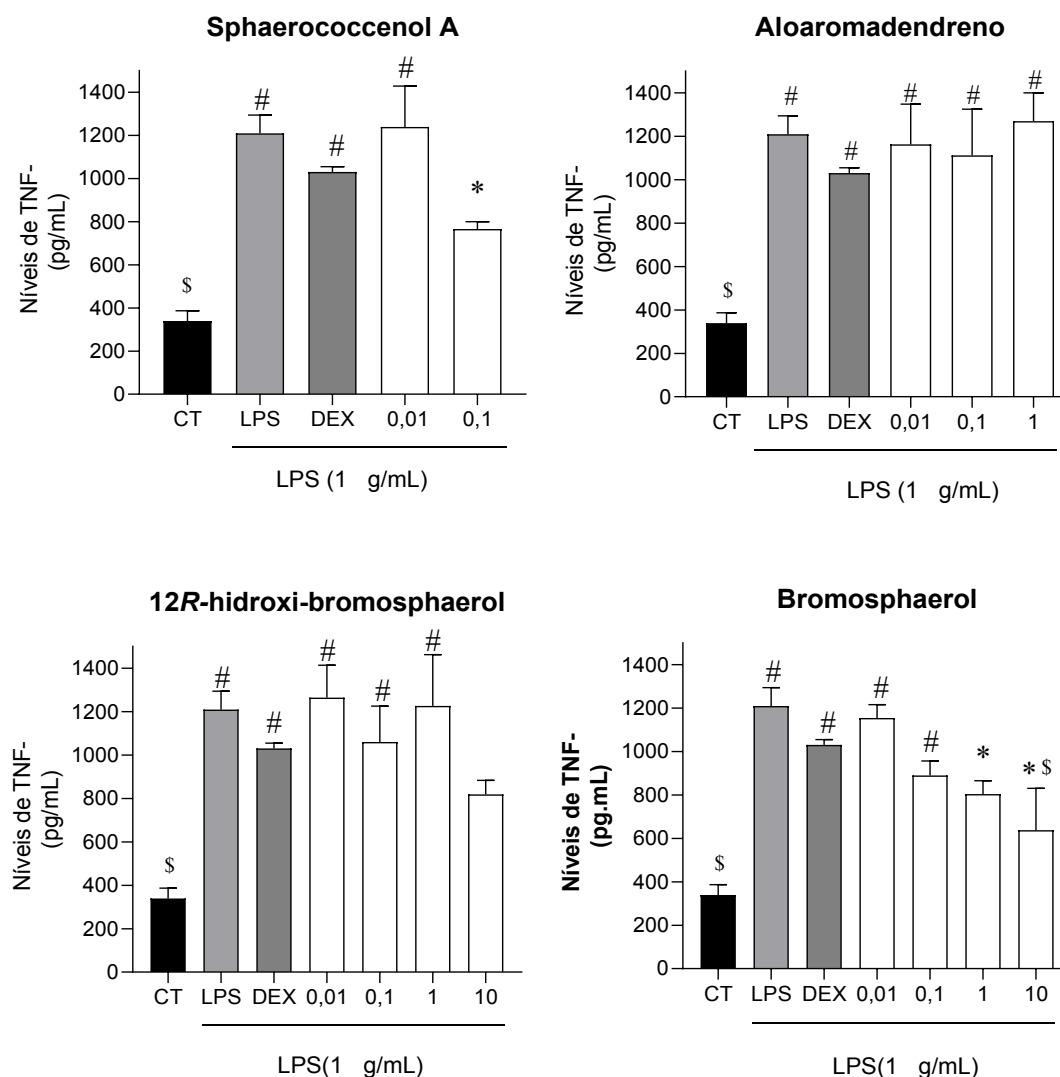


Figura 13 Efeito do terpeno (0.01 – 1 μM) e dos bromoditerpenos (0.01 -10 μM), obtidos da alga *Sphaerococcus coronopifolius*, nos níveis de TNF-α (pg/mL) em células RAW 264.7 induzidas por LPS (1 μg/mL), após 24 horas de incubação. Dexametasona (DEX) foi utilizada como padrão anti-inflamatório. Os valores em cada coluna representam a média ± erro padrão da média (SEM) de 3 experiências independentes. Os símbolos representam diferenças significativas ($p < 0,0001$, ANOVA, teste de Dunnet) quando comparados com o controlo (#), LPS (*) e DEX (\$).

4.2.4.2 Citocina IL-6

Os efeitos dos compostos nos níveis de IL-6 dos macrófagos 264.7 encontram-se representados na Figura 14. Quanto aos níveis da IL-6 após exposição das células ao LPS

($862,7 \pm 39,9$ pg/mL), observou-se um aumento significativo nos níveis da concentração desta citocina quando comparado com o controlo. Contudo, quando tratado com o Sphaerococconol A $0,1 \mu\text{M}$ ($129,3 \pm 31,3$ pg/mL) e o Bromosphaerol a $0,01 \mu\text{M}$ ($141,9 \pm 19,2$ pg/mL) e $0,01 \mu\text{M}$ ($182,7 \pm 49,2$ pg/mL) verificou-se uma redução significativa dos níveis de IL-6. É ainda de salientar que os valores obtidos pelos compostos quanto aos níveis de IL-6 foram inferiores aos obtidos pelo anti-inflamatório dexametasona ($489,3 \pm 26,9$ pg/mL).

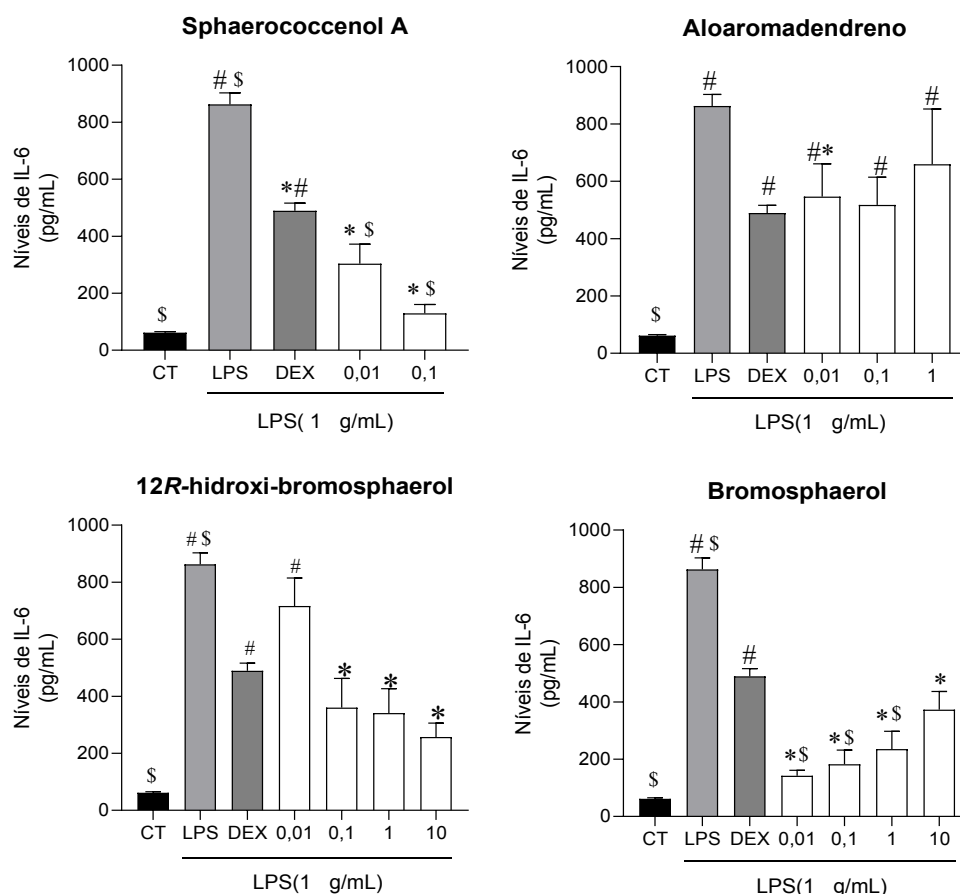


Figura 14 Efeito do terpeno (0.01 – $1 \mu\text{M}$) e dos bromoditerpenos (0.01 -10 μM), obtidos da alga *Sphaerococcus coronopifolius* nos níveis de IL-6 (pg/mL) em células RAW 264.7 induzidas por LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), após 24 horas de incubação. Dexametasona (DEX) foi utilizada como padrão anti-inflamatório. Os valores em cada coluna representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de 3 experiências independentes. Os símbolos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,0001$, ANOVA, teste de Dunnet) quando comparados com o controlo (#), LPS (*) e DEX (\$) .

4.2.4.3 Citocina IL-10

Os efeitos dos compostos nos níveis de IL-10 dos macrófagos 264.7 encontram-se representados na Figura 15. A capacidade de estimular o aumento dos níveis da citocina anti-

inflamatória IL-10, após exposição das células aos compostos quando estimuladas com LPS ($154,7 \pm 98,7$ pg/mL) foi avaliada, observando-se um aumento significativo nos níveis da concentração de IL-10 quando comparado com o controlo. Quando tratado com Sphaerococcenol A a $0,01 \mu\text{M}$ ($1015 \pm 212,6$ pg/mL) e 12R-hidroxi-bromosphaerol a $0,1 \mu\text{M}$ ($1175,1 \pm 266,1$ pg/mL), $1 \mu\text{M}$ ($1301 \pm 381,1$ pg/mL) e $10 \mu\text{M}$ (1001 ± 278 pg/mL) verificou-se um aumento significativo nos níveis de IL-10 quando comparado com o tratamento com LPS. Foi ainda possível observar que os valores apresentados pelos compostos quanto aos níveis de IL-10 foram superiores aos apresentados pela dexametasona ($588 \pm 63,2$ pg/ml), exceto para o Aloaromadendreno e o Bromosphaerol.

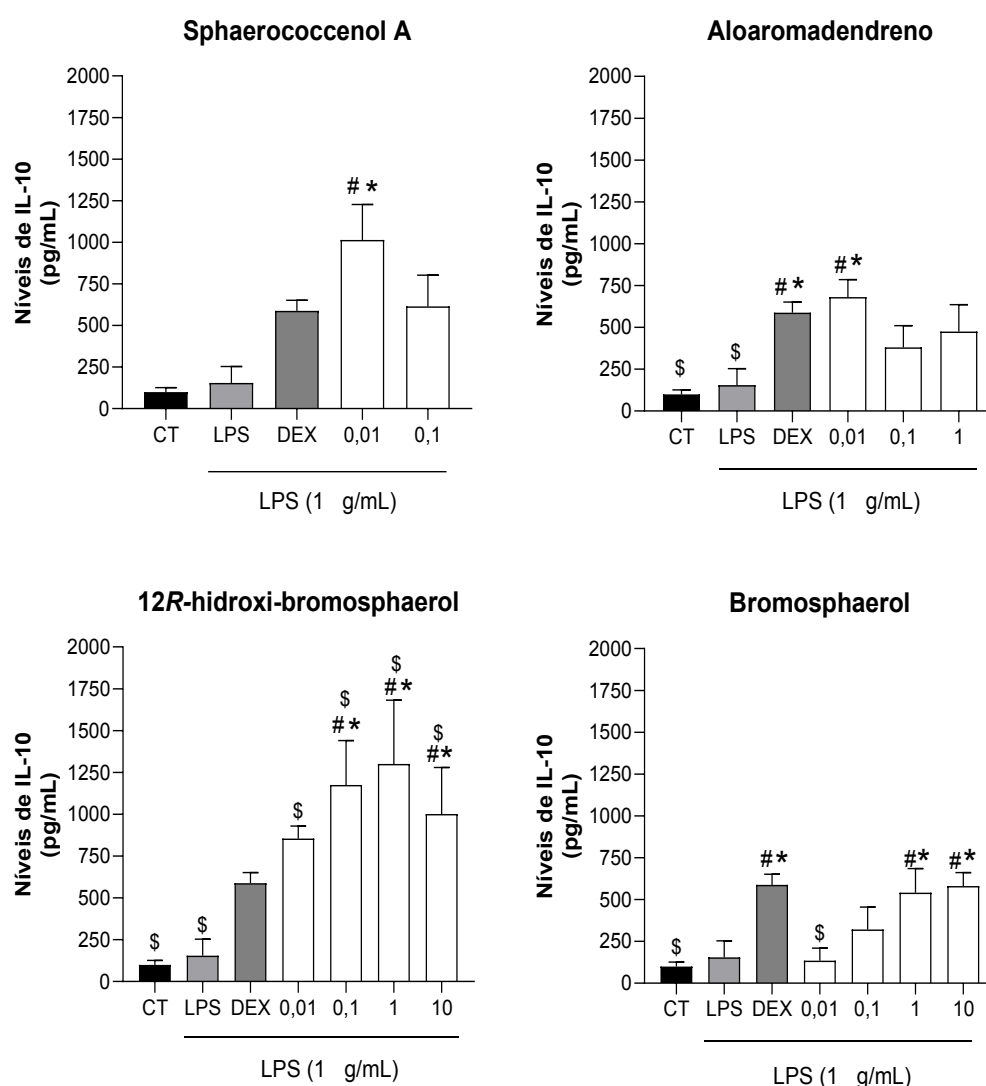


Figura 15 Efeito do terpeno (0.01 – $1 \mu\text{M}$) e dos bromoditerpenos (0.01 - $10 \mu\text{M}$), obtidos da alga *Sphaerococcus coronopifolius* nos níveis de IL-10 (pg/mL) em células RAW 264.7 induzidas por LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), após 24 horas de incubação. Dexametasona (DEX) foi utilizada como padrão anti-

inflamatório. Os valores em cada coluna representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de 3 experiências independentes. Os símbolos representam diferenças significativas ($p < 0,0001$, ANOVA, teste de Dunnet) quando comparados com o controlo (#), LPS (*) e DEX (\$) .

4.3 Interação com as proteínas Mpro, Spike e pRb, mediante Docking molecular.

Este estudo visou explorar o potencial de interação dos terpenos extraídos da alga *Sphaerococcus coronopifolius* com proteínas importantes na replicação do SARS-CoV-2, como a protease principal (Mpro) e a glicoproteína de pico (Spike), tendo sido também considerada a proteína do retinoblastoma (pRb). O objetivo foi avaliar se estes compostos podem ser candidatos promissores no desenvolvimento de fármacos mediante uma abordagem *in silico*, onde se utilizou a ferramenta DockThor para realizar um estudo dinâmico, as energias totais de afinidade discriminadas estão na Tabela II.

Tabela II Energia total de afinidade dos compostos obtidos com as proteínas Mpro, Spike e pRb (kcal/mol)

Compostos	Afinidade		
	Mpro	Spike	pRb
Aloaromadendreno	-7,8	-7,8	-7,8
Bromosphaerol	-7,9	-7,9	-8,2
Sphaerococcenol A	-6,7	-7,5	-7,2
12R-hidroxi-bromosphaerol	-8,1	-7,4	-8,4

Os resultados incluem energias de afinidade com as proteínas. Além disso, o software Discovery Studio forneceu informações sobre os mecanismos de ligação, podendo ter implicações significativas na procura de novos compostos com potencial terapêutico contra o SARS-CoV-2 e na compreensão de possíveis interações com proteínas-chave em processos celulares, como a eliminação de células cancerígenas (pRb).

A utilização da média da energia de acoplamento mais baixa é comum e eficaz para avaliar a afinidade de ligação, fornecendo informações cruciais sobre a força da interação e as preferências de orientação do ligante no sítio ativo das proteínas. A escolha da Energia Total como função de pontuação é apropriada para avaliar as poses acopladas do ligando, considerando diversos fatores na interação proteína-ligando. A decomposição da Energia Total em componentes específicos proporciona uma compreensão detalhada das contribuições

individuais para a estabilidade da união, incluindo forças de Van der Waals, potenciais eletrostáticos e termos torcionais. Em resumo, a Energia Total reflete tanto as interações intermoleculares como intramoleculares, permitindo avaliar a força da união e compreender como diferentes aspetos da estrutura molecular contribuem para a energia total. Os resultados são apresentados na Figura 16-18.

4.3.1 Interações com a proteína Mpro

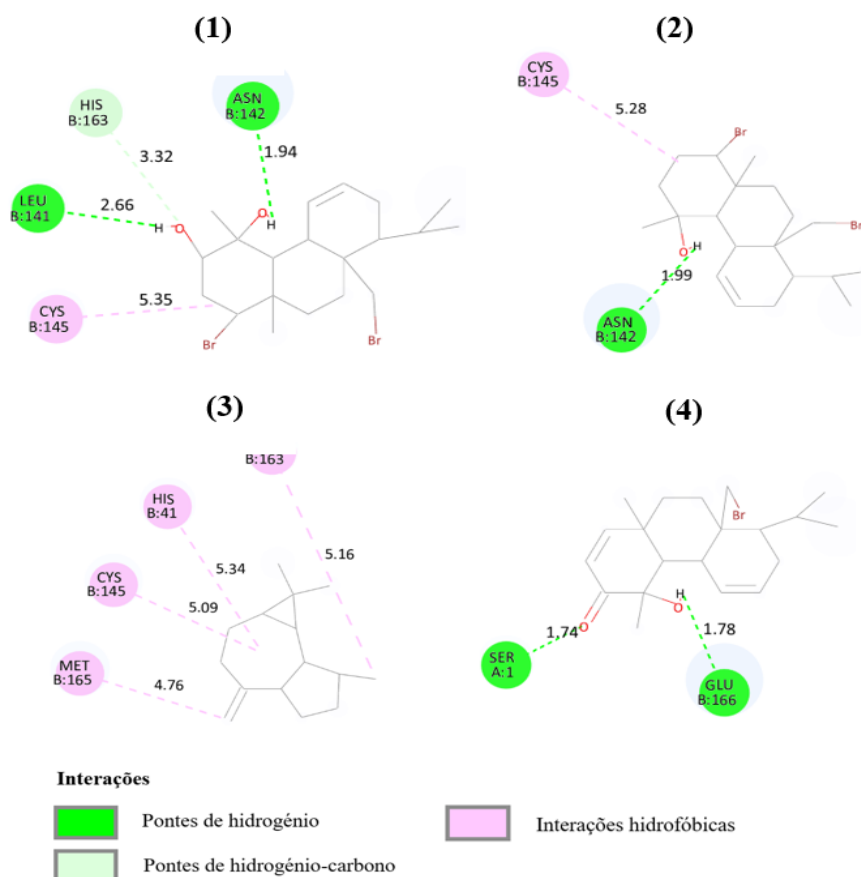


Figura 16 Diagramas 2D com interações intermoleculares, entre a Protease Principal do SARs-CoV-2 (Mpro) e (1) 12*R*-hidroxi-bromosphaerol, (2) Bromosphaerol, (3) Aloaromadendreno e (4) Sphaerococcenol A.

A estrutura dimérica de Mpro na sua conformação de proteína selvagem (PDB:6LU7) e sua interação com inibidores covalentes são aspetos relevantes, já que os inibidores covalentes oferecem uma poderosa forma de bloquear especificamente a atividade da proteína. Esta informação fornece uma base sólida para a conceção e desenvolvimento de medicamentos eficazes contra o SARS-CoV-2.

O composto mais promissor foi o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol, com uma energia de afinidade de -8,1 (kcal/mol). Este estabelece interações sólidas de hidrogénio com Asn142 e Leu141, uma interação carbono-hidrogénio com His163, e uma interação hidrofóbica com Cys145 (distância 5,3Å). Além disso, o Bromosphaerol apresentou uma afinidade significativa de -7,9 (kcal/mol), com interações de hidrogénio e hidrofóbicas com o resíduo chave Cys145 (distância 5,2Å). O Aloaromadendreno apresentou uma energia de afinidade de -7,8 (kcal/mol), com interações exclusivamente hidrofóbicas (His41-Cys145; distância 5,3 e 5 Å). Finalmente, o Sphaerococcenol A exibiu a menor energia de afinidade, -6,7 (kcal/mol), com ligações de hidrogénio com resíduos específicos.

4.3.2 Interações com a proteína Spike

A glicoproteína de pico (Spike) desempenha um papel fundamental ao facilitar a união do vírus com a célula hospedeira através do recetor ACE2, sendo um fator crítico para a entrada do vírus na célula (Song *et al.*, 2018; Jaimes *et al.*, 2020). A proteína Spike, estruturada num homotrímero, consiste em duas subunidades S1 e S2. A subunidade S1, especialmente o Domínio de Ligação ao Recetor (RBD), localizado entre os resíduos 319 e 541 e a sua região que faz contato direto com o recetor hospedeiro é chamada de Recetor Binding Motif (RBM) e está localizada entre os resíduos 437 e 508, crucial para o desenvolvimento de medicamentos devido à sua interação com o recetor do hospedeiro (Lan *et al.*, 2020; Yan *et al.*; em 2020).

No contexto do SARS-CoV-2, os resíduos de aminoácidos na Região de Ligação ao Recetor (RBM) são essenciais, com resíduos específicos nas posições 480 e 490 que têm um impacto significativo na progressão da doença (Xia *et al.*, 2021). Este estudo baseia-se na conformação selvagem de Spike (PDB:6M0J) sem ACE2. Para a proteína Spike, observou-se um aumento significativo no número de interações com os compostos. Os resultados são apresentados na Figura 17.

O Bromosphaerol destacou-se com uma energia de afinidade de -7,9(kcal/mol), estabelecendo uma ponte de hidrogénio com Gly496 (distância 1,84Å), e quatro interações hidrofóbicas, com Arg403, Tyr505, Tyr453 e Tyr495 (distância 4,7-5,4 Å), sendo estas últimas particularmente notáveis, uma vez que se formaram com átomos de bromo presentes na estrutura do composto. Em segundo lugar, o Aloaromadendreno mostrou uma afinidade de -7,8 (kcal/mol), interagindo através de três interações hidrofóbicas. O Sphaerococcenol A apresentou uma afinidade de -7,5 (kcal/mol), estabelecendo uma ligação de hidrogénio e uma interação hidrofóbica. Finalmente, o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol, com uma afinidade

ligeiramente menor de -7,4 (kcal/mol), formou o maior número de pontes de hidrogénio com Arg403, Tyr453 e Gln493 e uma interação hidrofóbica com Tyr495.

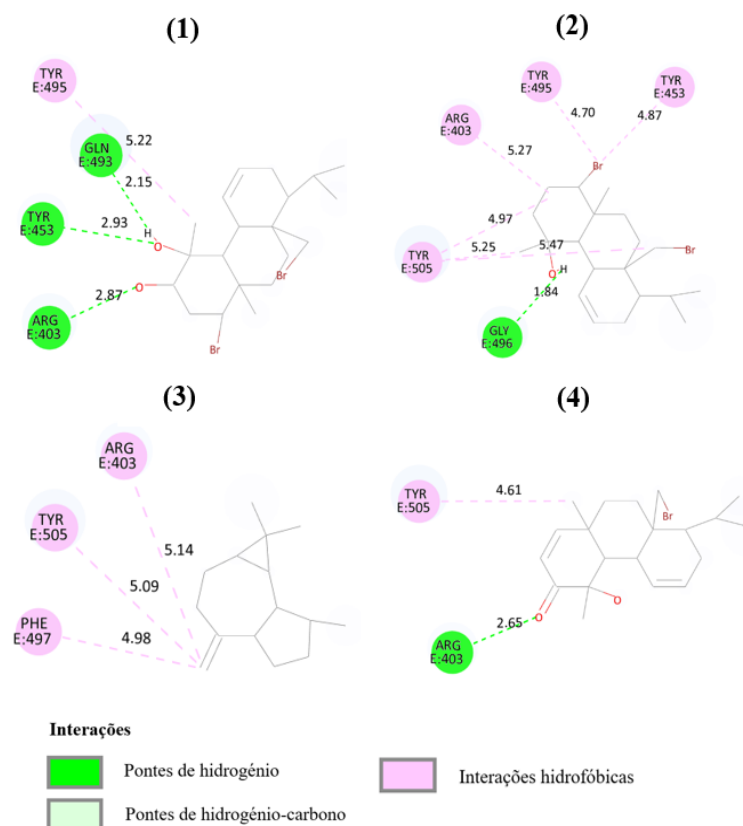


Figura 17 Diagramas 2D com interações intermoleculares, entre a glicoproteína de pico do SARS-COV2 (Spike) e (1) 12R-hidroxi-bromosphaerol, (2) Bromosphaerol, (3) Aloaromadendreno, (4) Sphaerococcenol A.

4.3.3 Interações com a proteína pRb

A proteína da retinoblastoma (pRb) desempenha um papel crucial na supressão de tumores ao bloquear o crescimento de células disfuncionais nas fases G1 e S do ciclo celular, impedindo a replicação do ADN (Xiao *et al.*, 2003). Descobriu-se que, do complexo E2F, só as duas regiões finais são necessárias para se juntarem a pRb: a região de caixa marcada e o domínio de trans-ativação composto pelos resíduos 243-437 (Le *et al.*, 1998). Neste estudo, utilizou-se a estrutura (PDB:1O9K), selecionando apenas as cadeias A e B para evitar a concorrência com o fator E2F e focando nos pontos de ligação específicos que poderiam levar à inibição da proteína.

Para a proteína do retinoblastoma referida na Figura 18, todos os compostos mostraram uma afinidade notável, sendo o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol o mais destacado com uma energia de -8,4 (kcal/mol). Este composto estabelece uma ligação de hidrogénio com Glu737 e 3 interações hidrofóbicas com Leu461, His699 e Val735. Em segundo lugar, o Bromosphaerol apresentou uma energia de 8.213 (kcal/mol) com várias interações, incluindo uma ligação de hidrogénio, e 3 interações hidrofóbicas. O Aloaromadendreno posiciona-se em terceiro lugar, com uma afinidade de -7,8 (kcal/mol), mostrando duas interações hidrofóbicas. Finalmente, o Sphaerococcenol A exibe uma energia de -7.2 (kcal/mol), com várias interações, incluindo uma ponte de hidrogénio com Arg467 (distância 2,5Å).

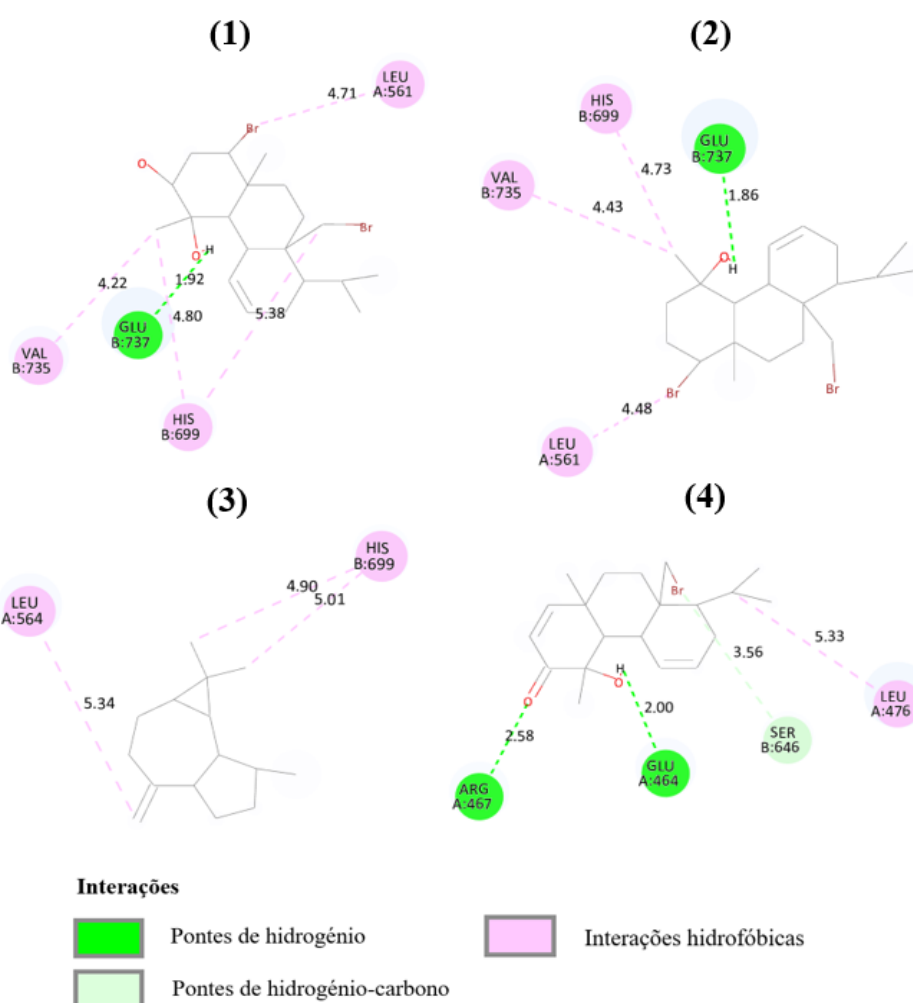


Figura 18 Diagramas 2D com interações intermoleculares, entre a proteína do Retinoblastoma (pRb) e 1(1) 12*R*-hidroxi-bromosphaerol, (2) Bromosphaerol, (3) Aloaromadendreno, (4) Sphaerococcenol A.

O resumo das diferentes atividades demonstradas pelos compostos isolados a partir da alga *Sphaerococcus coronopifolius* encontra-se representado na Tabela III.

Tabela III Representação ilustrativa da capacidade anti-inflamatória, anti-viral, e a interação com proteínas importantes em processos celulares dos terpenos isolados da alga *Sphaerococcus coronopifolius*.

Composto	Capacidade Anti-viral		Processos celulares pRb	Concentração (µM)	Capacidade Anti-inflamatória			
	Mpro	Spike			NO	TNF-α	IL-6	IL-10
Sphaerococcenol A	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	0,01	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
				0,1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aloaromadendreno	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0,01	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
				0,1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
				1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12R-hidroxi-bromosphaerol	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0,01	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
				0,1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
				1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
				10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Bromosphaerol	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0,01	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
				0,1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
				1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
				10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Interação direta com sítio ativo; Capacidade anti-inflamatória com diferenças significativas quando comparado com os LPS.

Sem interação direta com sítio ativo; Ausência de Capacidade anti-inflamatória

Com base na análise geral da Tabela III, percebe-se que o Sphaerococcenol A é o composto que apresenta atividade anti-inflamatória mais completa em comparação aos demais compostos, sendo importante destacar que o Bromosphaerol foi o único que conseguiu reduzir os níveis de TNF-α, assim como o 12R-hidroxi-bromosphaerol tem a maior capacidade de aumentar os níveis de IL-10.

Quanto ao *Docking* molecular, os compostos apresentaram interação com os sítios ativos das proteínas virais estudadas; no que se refere as proteínas envolvidas em processos celulares essenciais, só o Sphaerococcenol teve a capacidade de interagir com o sítio ativo da pRb.

Discussão e Conclusões

5. Discussão e Conclusões

Várias doenças crônicas estão associadas à inflamação e às suas vias regulatórias específicas na sua patogênese. Um estímulo inflamatório desencadeia vias de sinalização intracelular, permitindo e ativando a síntese e liberação de mediadores inflamatórios. Produtos microbianos e citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) atuam como estímulos primários e iniciam a inflamação interagindo com recetores *toll-like* (TLR), o recetor de IL-1 (IL-1R), o recetor de IL-6 (IL-6R) e o recetor de TNF (TNFR) (Kyriakis *et al.*, 2001; Kaminska, 2005; Henríquez-Olguín *et al.*, 2015).

A inflamação crónica e aguda é um processo fisiológico mediado pela ativação de células imunes, como células mononucleares fagocíticas e macrófagos. O mecanismo da inflamação é controlado por mediadores químicos endógenos, como aminas vasoativas, fator ativador de plaquetas, citocinas, bradicinina, fibrina, componente do complemento, óxido nítrico e espécies reativas de oxigénio (ROS). Portanto, níveis adequados desses componentes podem ser um fator fundamental na luta contra as doenças inflamatórias, sendo o principal desafio encontrar moléculas que promovam sua produção e inibam a produção de fatores inflamatórios como IL-1, TNF- α e IL-6 (Lintermans *et al.*, 2014; Headland *et al.*, 2015).

Na atualidade não existe nenhum agente anti-inflamatório de origem marinha no mercado, no entanto há alguns compostos que se encontram sob avaliação pré-clínica e clínica. Em estudos anteriormente realizados, foram descritos detalhadamente os mecanismos moleculares de ação de vários produtos naturais marinhos, geralmente visando neutrófilos e macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo* (Molinski *et al.*, 2009). Nos últimos anos, diversos estudos têm sido efetuados na procura por produtos naturais com elevados efeitos fisiológicos e baixa toxicidade, de modo a substituírem diversos produtos de origem sintética.

Neste contexto, as algas marinhas surgem como uma opção na procura de novos fármacos, devido à biossíntese de uma gama diversificada de metabolitos secundários que desempenham um papel fundamental como moduladores dos níveis de mediadores de inflamação. As macroalgas são ricas em compostos bioativos naturais (e.x. pigmentos, compostos fenólicos, lípidos) que apresentam diversos benefícios para a saúde humana. A alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* tem-se revelado uma fonte de terpenos halogenados com propriedades citotóxicas, antimicrobianas e *antifouling*, contudo o seu potencial como moduladores dos níveis de mediadores de inflamatórios continua desconhecido.

Por sua vez, no tratamento realizado com a presença dos compostos foi possível também verificar que nenhum dos compostos às concentrações selecionadas promoveu o aumento na produção de NO, apresentando apenas níveis basais de NO quando comparado com a situação com LPS. Por outro lado, foi possível observar que o Sphaerococcenol A, o Aloaromadendreno e Bromosphaerol às 24 h de incubação tiveram capacidade de inibir significativamente a produção de NO estimulado com o tratamento realizado com o LPS, tendo demonstrado resultados muito próximos ao padrão anti-inflamatório utilizado.

O óxido nítrico é um radical livre de natureza gasosa, sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintetases (NOS), sendo a sua expressão modulada por citocinas (e.g. IL-1 β , IL-6, INF γ). O NO nos macrófagos não é constitutivo, mas sim induzido em situações em que essas células são ativadas por citocinas. O NO participa praticamente em todos os processos fisiológicos do corpo; porém, em altas concentrações pode induzir danos prejudiciais nos tecidos. Quando o NO se combina com radicais superóxido, gera moléculas como o peroxinitrilo, reduzindo assim a sua disponibilidade (Green *et al.*, 1991; Carrizo *et al.*, 1998). Assim, a inibição deste radical pode estar ligada a dois mecanismos, sendo o primeiro seria uma ação puramente redutora da molécula sendo mais um efeito antioxidante. O segundo seria a inibição das enzimas que levam à sua síntese, mediante a diminuição da produção de citocinas relacionadas aos linfócitos TH1, como IL-2 e INF- γ , as quais estimulam os macrófagos para produção de grandes quantidades de NO, assim como a estimulação da produção das citocinas libertadas pelos linfócitos TH2, como IL-4 e IL-10, que regulam negativamente a produção de NO (Choudhari *et al.*, 2013; Escamilla *et al.*, 2022).

Apesar dos resultados promissores relativamente à capacidade de inibição dos níveis de NO, sabe-se que existem diferentes vias de sinalização intracelular e, desta forma, foram também avaliados os níveis de outros mediadores pró-inflamatórios, TNF- α , IL-6 e a citocina anti-inflamatória, IL-10. Analisando os resultados obtidos é possível afirmar que os níveis de TNF- α e IL-6 aumentaram significativamente na presença de LPS. Em termos gerais, nem todos os compostos apresentaram capacidade de reduzir os níveis de todos estes medidores, sendo que apenas alguns, em concentrações específicas, conseguiram reduzir significativamente os níveis de TNF- α e IL-6. O Sphaerococcenol A (0,01 μ M) e o Bromosphaerol (0,01 – 1 μ M) foram os que apresentam maior capacidade de inibição destas citocinas. No que diz respeito, à IL-10, houve compostos que mostraram potencial para estimular a expressão desta citocina.

Após 48 h de tratamento, os níveis de IL-10 aumentaram significativamente na presença do Sphaerococcenol A (0,01;0,1 μM), bem como como na presença do 12*R*-hidroxi-bromosphaerol (0,1 - 10 μM). Normalmente, a produção de IL-10 ocorre como resposta à produção de outras citocinas pró-inflamatórias (Iyer & Cheng, 2012). Com o composto 12*R*-hidroxi-bromosphaerol, pôde observar-se uma seletividade para a produção dessa citocina, sendo muito superior à de outros bromoditerpenos, mas sem inibir a produção das outras citocinas.

Embora o trabalho conduzido nesta dissertação corresponda ao primeiro estudo com compostos isolados da alga *Sphaerococcus coronopifolius*, existe concordância com estudos realizados anteriormente com os seus extratos, bem como com bromoditerpenos extraídos de outras algas vermelhas que apresentaram a capacidade de inibir a produção de NO e algumas citocinas. O estudo de Salehi e seus colaboradores (2018) demonstrou que o extrato de diclorometano da alga *S. coronopifolius* reduziu a produção de IL-8 em células endoteliais, evidenciando o seu potencial anti-inflamatório. Sendo que os compostos isolados provieram de um extrato bruto de diclorometano, é expectável que o efeito observado por Salehi et al. (2018) seja devido à presença destes compostos. Alves e seus colaboradores (2018) também observaram que com o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol e o Bromosphaerol não mostraram efeitos significativos na redução de IL-6 num modelo celular de co-cultura. Esses resultados estão, de certo modo, de acordo com os obtidos no presente trabalho, pois o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol não conseguiu inibir a produção de IL-6 em ambas as experiências, enquanto o Bromosphaerol apresentou efeito regulador negativo apenas neste estudo. Estas discrepâncias podem ser atribuídas às diferenças nos modelos celulares utilizados.

Compostos bromados, como o 3-bromo-4,5-dihidroxibenzaldeído, o 3-bromo-5-(etoximetil) benzeno-1,2-diol e o éter bromofenol bis(3-bromo-4,5-dihidroxibenzílico), isolados da alga *Polysiphonia morrowii*, num modelo celular de macrófagos RAW 264.7 induzidas por LPS demonstraram capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), assim como ativar o fator nuclear NF- κ B, resultando em efeitos anti-inflamatórios ao reduzir a produção de óxido nítrico, a expressão de iNOS e COX-2 (Katsui et al., 1967; Lui et al., 2011; Choi et al., 2018).

O composto 5 β -hidroxipalisadina B um sesquiterpeno bromado isolado da alga vermelha *Laurencia snackeyi*, suprimiu a produção de NO, a expressão de iNOS e COX-2 e libertação de TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-6, em células RAW 264.7 estimuladas por LPS

(Wijesinghe *et al.*, 2014). Os compostos neorogiol diol e o 11-15-ciclo-14-bromo-14,15-dihidrorogiol-3,11-diols são bromoditerpenos encontrados na alga *Laurencia glandulifera*, que demonstraram ter atividade anti-inflamatória *in vitro* usando células RAW 264.7, modelando negativamente a indução de iNOS e a produção de NO (Daskalaki *et al.*, 2019). De igual forma, os bromoditerpenos estudados neste trabalho, evidenciaram maior atividade anti-inflamatória comparada com a apresentada pelo terpeno não halogenado Aloaromadendreno. A presença do grupo bromo na composição destas moléculas parece contribuir para os efeitos anti-inflamatórios em comparação com diterpenos marinhos convencionais (Gonzales *et al.*, 2015).

O Sphaerococcenol A (0,1µM) destacou-se como o bromoditerpeno mais eficaz na inibição dos mediadores anti-inflamatórios NO, TNF- α e IL-6, enquanto estimulou a produção de IL-10. No entanto, a sua eficácia depende da concentração, pois doses elevadas podem ser citotóxicas. Por sua vez, o Bromosphaerol (1 µM) demonstrou também capacidade de reduzir os níveis de agentes inflamatórios, mantendo a sua eficácia estável, embora não tenha estimulado a produção de IL-10. O composto 12*R*-hidroxi-bromosphaerol não inibiu significativamente as citocinas pró – inflamatórias, mas estimulou a produção de IL-10, sugerindo o seu potencial para inflamações controladas. Já o Aloaromadendreno apresentou menor atividade anti-inflamatória, inibindo apenas a produção de NO, sugerindo que, como acima referido, terpenos com átomos de bromo na sua estrutura podem contribuir para potenciar os efeitos biológicos observados.

A doença da COVID-19, causada pela síndrome respiratória coronavírus aguda grave (SARS-CoV-2), teve um grande impacto na saúde e nas economias global (Chen *et al.*, 2020). O desenvolvimento de medicamentos neste contexto é complexo e vai desde a compreensão do mecanismo até à avaliação da eficácia e da toxicidade. O processo de descoberta de fármacos, que abrange várias etapas até à fase clínica III, pode levar aproximadamente 10 anos, e muitos fármacos podem ser descontinuados antes da sua aprovação (Yelin *et al.*, 2020). A falta de uma terapia aprovada pela FDA exerce pressão sobre as equipas científicas e médicas para desenvolver opções de tratamento para a COVID-19. Apesar da eficácia comprovada das vacinas pelas empresas farmacêuticas da Pfizer, da Moderna e da AstraZeneca, o seu rápido desenvolvimento provocou efeitos adversos, incluindo casos fatais (Liu *et al.*, 2020; Sethi *et al.*, 2020). A mutação do vírus gera variantes resistentes às vacinas, o que dificulta a eficácia das terapias atuais dirigidas a proteínas virais específicas. Este cenário coloca desafios significativos no tratamento da doença (Wu *et al.*, 2020).

A necessidade de desenvolver agentes terapêuticos antivirais mais eficazes contra vírus emergentes, como o SARS-CoV-2, destaca-se pelas limitações das terapias convencionais e pela possível redução da eficácia das vacinas contra as variantes com mutações em genes-chave (Wu *et al.*, 2020). Por conseguinte, é urgente conceber e desenvolver agentes terapêuticos antivirais naturais de largo espectro para fazer face à pandemia. Os produtos naturais marinhos são apresentados como opções promissoras, demonstrando resultados positivos em ensaios *in vitro* e *in silico*, devido às suas características estruturais específicas que podem impactar as proteínas-alvo do vírus.

Neste trabalho, o potencial antiviral dos bromoditerpenos da alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* mediante simulações *in silico* foi avaliado. A sua interação com as principais proteínas do SARS-CoV-2, Mpro e Spike, bem como com a proteína do retinoblastoma foi analisada. Os resultados revelaram que os bromoditerpenos mostraram afinidades significativas nos locais ativos e circundantes das proteínas-alvo. Especificamente, os compostos 12*R*-hidroxi-bromosphaerol e o Bromosphaerol interagiram com o resíduo Cys145 da díada catalítica, e juntamente com o Aloaromadendreno demonstraram interações favoráveis com a protease principal, principalmente, o Aloaromadendreno pela sua capacidade de interagir com toda a díada catalítica (Cys145-His41). Embora o Sphaerococcenol A tenha apresentado a menor afinidade, a sua interação com o resíduo Glu166 sugere uma especificidade que deve ser considerada ao tentar inibir completamente a proteína.

No que diz respeito à proteína Spike, foi observado que todos os compostos apresentaram energias de afinidade muito semelhantes, variando de -7,8 (kcal/mol) para o Bromosphaerol a -7,4 (kcal/mol) para o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol. Estes compostos foram capazes de estabelecer diversas interações com uma série de resíduos localizados no Domínio de Ligação ao Recetor (RBD) entre os resíduos 319 e 541, incluindo a alça de ligação ao recetor (RBM) localizada entre os resíduos 424 e 494. É importante destacar que 12*R*-hidroxi-bromosphaerol formou o maior número de ligações de hidrogénio, o que proporciona maior estabilidade à sua interação.

É importante notar que nenhum outro estudo *in silico* foi realizado avaliando este grupo específico de compostos com as proteínas-alvo analisadas neste trabalho. Da mesma forma, pôde observar-se semelhança nas ferramentas e estruturas utilizadas em outros ensaios, bem como nas afinidades obtidas com medicamentos comerciais e outras moléculas de origem marinha no estudo de Guedes e colaboradores (2021). Isto sugere que estes compostos podem

influenciar várias fases do ciclo viral, desde a entrada até à libertação, bem como interações específicas com o hospedeiro.

Os resultados obtidos são promissores, mostrando relevância em relação aos estudos existentes na literatura. Vários estudos utilizaram simulações dinâmicas com estruturas proteicas e ferramentas computacionais semelhantes para avaliar a interação de compostos com o SARS-CoV-2. Por exemplo, Abdelrady e colaboradores (2023) utilizaram uma abordagem de acoplamento molecular com Autodock Vina 1.5.6 para prever as afinidades de ligação de diterpenóides com a estrutura cristalina de Mpro (PDB: 6WTJ). Os autores observaram que os derivados de abietano, jatrofano, segetano, pepluano e paralian apresentavam maiores afinidades de ligação com SARS-CoV-2 Mpro, sendo o derivado 13 o mais proeminente com uma afinidade aproximada de $-6,7 \pm 0,2$ kcal/mol. No entanto, esses diterpenos comuns apresentaram menor afinidade e número de interações em comparação com o 12*R*-hidroxibromosphaerol.

Também é possível comparar os bromoditerpenos presentes na alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* com outros compostos provenientes de algas. Por exemplo no estudo realizado por Kalasariya e colaboradores (2022), em que se avaliou o potencial de moléculas derivadas da alga verde *Ulva fasciata* para o tratamento do SARS-CoV-2. Utilizando as estruturas (PDB:6Y84 e 6LU7) da protease principal (Mpro), observou-se que o 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol exibiu a melhor afinidade com um valor aproximado de -5,9 kcal/mol, sendo um valor inferior ao obtido com os 4 compostos testados no nosso estudo.

É essencial ter em conta um fator crucial na utilização de estruturas proteicas, pois podem existir vários resíduos diferentes que influenciam a afinidade e ligação final. Por exemplo, no caso da proteína Mpro, a sobreposição das estruturas revela alterações conformacionais significativas no sítio de ligação do ligante, especialmente nos resíduos Met49, Asn142 e Gln189. Isso é válido para a proteína Spike, onde a sua região RBM apresenta grande variabilidade no número de resíduos. Este aspeto destaca a importância de considerar múltiplas conformações proteicas em ensaios de triagem virtual para testar diversos compostos.

Outros compostos bromados exibem afinidades e interações muito semelhantes às dos terpenos do nosso estudo. Assim, num estudo realizado por El-Demerdash e colaboradores (2021), onde foram avaliados quatorze análogos de bromotirosina obtidos da esponja marinha *Suberea ianthelliformis*, o composto 13 (Anomoiano E) apresentou alta afinidade com a principal protease do SARS-CoV-2 (MPro) (PDB:6LU7), com pontuação de -8,5 kcal/mol. Este

composto estabeleceu uma ligação de hidrogénio com o resíduo Asn142 e uma interação hidrofóbica com o resíduo Glu166. Em relação à glicoproteína Spike (PDB: 6VYB), a psamaplisina D demonstrou maior afinidade (-7 kcal/mol), apresentando três ligações de hidrogénio e interação hidrofóbica no sítio ativo. Por outro lado, a fistularina-3 exibiu afinidade de -7,65 kcal/mol, com quatro ligações de hidrogénio facilitadas pela presença de grupos OH. Observou-se que, tal como nos resultados do presente trabalho, compostos com maior número de grupos OH tendem a formar mais interações, sendo que o 12*R*-hidroxi-bromosphaerol com menor energia total de afinidade que o Bromosphaerol, apresentou um número significativo de interações em comparação com outros compostos.

As ligações de hidrogénio desempenham um papel crucial como pontos de ancoragem na interação dos compostos com as proteínas, influenciando o seu arranjo espacial e facilitando outras interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Na conceção de medicamentos, é essencial identificar grupos hidrofóbicos tanto no composto como no recetor à medida que se enfrentam durante a ligação, enquanto grupos como o carbonil-amida e o grupo OH contribuem para a estabilidade da ligação. Em resumo, os vários grupos funcionais presentes em diferentes classes de compostos naturais determinam a sua ligação a proteínas-alvo específicas. Estudos *in silico* oferecem previsões sobre possíveis interações entre ligantes e alvos, facilitando a busca por novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos para alvos terapêuticos específicos. Embora os bromoditerpenos apresentem resultados promissores, os seus valores de afinidade são inferiores aos dos fármacos já existentes, conforme demonstrado no estudo dinâmico de Guedes e colaboradores (2021). Este estudo utilizou o software DockThor-VS para avaliar 20 candidatos a fármacos em ensaios pré-clínicos para proteínas alvo do SARS-CoV-2.

Na análise Mpro (PDB:6LU7), Ledipasvir e Imatinib, ambos em ensaios clínicos, demonstraram a melhor afinidade, com pontuações de -10,59 kcal/mol e -10,10 kcal/mol, respetivamente. Ombitasvir foi o melhor contra Spike (PDB:6M0J), com um score de Docking superior a -10 kcal/mol, enquanto a Atorvastatina apresentou afinidades moderadas contra Mpro e Spike, com scores previstos de -8,73 kcal/mol e -8,71 kcal/mol, respetivamente, valores superiores aos obtidos com os compostos testados neste estudo. Porém estes possuem mecanismos de ação diferenciados e específicos, o que lhes pode conferir vantagens em relação aos medicamentos já comercializados.

Finalmente, para descartar a interferência dos nossos compostos em processos celulares importantes, foi avaliada a sua interação com a proteína do retinoblastoma, crucial para suprimir

o crescimento das células cancerígenas. Foi identificado um núcleo hidrofóbico formado pelas cadeias laterais de 20 resíduos no domínio central pRb, na interface das cadeias A-B, E2F que se liga a este segmento através de interações fracas, incluindo duas interações hidrofóbicas com Phe482 e Lys530, duas ligações de hidrogénio com Glu554 e Thr645, e uma ligação iónica com Arg467 (Nevins, 2001; Kent *et al.*, 2019). A função desta proteína pode ser influenciada se alguma molécula competir com os sítios de ligação do fator E2F. Embora os nossos compostos apresentassem afinidades significativas com a proteína, nenhum interferiu nos sítios críticos de ligação do E2F, exceto o Sphaerococcenol A, o qual formou algumas interações com resíduos chave, portanto, o seu impacto neste processo celular pode ser negativo, sugerindo que este composto pode não ser adequado para uso.

Sphaerococcenol A, formou algumas interações com resíduos chave da pRb-E2F

Perspetivas Futuras

6. Perspetivas futuras

Um estímulo inflamatório desencadeia vias de sinalização intracelular que permitem e ativam a síntese e libertação de mediadores inflamatórios envolvidos em várias doenças crónicas.

O presente trabalho focou-se no estudo do potencial anti-inflamatório e anti-viral de compostos isolados da alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius*. Os resultados obtidos permitiram concluir que, dos compostos testados, o Sphaerococcenol A e o Bromosphaerol revelaram capacidade de reduzir os mediadores pró-inflamatórios como NO, TNF- α e IL-6. Como trabalho futuro, seria importante testar o seu efeito sobre outros agentes pró-inflamatórios, como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 12 (IL-12) e o interferon- γ (IFN- γ). Para além da capacidade específica do 12R-hidroxi-bromosphaerol em estimular a produção de IL-10 será também importante realizar um estudo complementar para avaliar se tem capacidade para promover outros agentes anti-inflamatórios como as interleucinas IL-4, IL-13, fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interferon - α (IFN- α). Por outro lado, o composto Bromosphaerol foi o único composto que teve a capacidade de reduzir significativamente a produção de TNF- α e será relevante estudar a dependência a sua concentração para determinar se o efeito se manteria por mais tempo.

Apesar dos resultados promissores, como trabalho futuro, os compostos que apresentaram maior atividade deveriam ser objeto de estudos mais aprofundados, incluindo a investigação das vias biossintéticas conducentes ao estímulo da sua produção pela própria alga para garantir uma fonte sustentável destes compostos. Paralelamente, o estudo da viabilidade de uma síntese química para modificar grupos funcionais que aumentem os efeitos observados, seria outra abordagem possível para seguir. Contudo, são necessários mais estudos em modelos *in vitro* com outras linhas celulares, bem como em co-cultura ou modelos 3D. A co-administração destes compostos também poderá ser explorada.

Seria importante avaliar se esses terpenos conseguem inibir ou estimular outros mediadores da inflamação como aminas vasoativas (histamina, serotonina, prostaglandinas), outras citocinas como Fator de Necrose Tumoral- β , Fator de Crescimento Transformante- β (TGF- β) e Interferons (IFN- α e β). Nesta parte, seria importante levar em consideração a realização dos testes em outros modelos celulares: a microglia BV-2 murina poderia ser utilizada para a produção de NO; para TNF- α numa linha celular de macrófagos monocíticos humanos Mono Mac 6, células BALB/3T3 ou em células THP-1; pela IL-6, o estudo poderia

ser realizado em mastócitos -2H3 de leucemia basofílica de rato (RBL), assim como a resposta inflamatória poderia ser induzida pela adição de IFN- γ ou TNF- α .

Os estudos dinâmicos *in silico* são abordagens fundamentais como um primeiro passo para identificar moléculas com capacidade de afetar a função proteica. No entanto, é imprescindível submetê-las a avaliações mais rigorosas por meio de ensaios experimentais e clínicos para confirmar a sua eficácia biológica e terapêutica. Antes de avançar para a validação experimental, é aconselhável aplicar técnicas avançadas de simulação, pois esse processo é mais económico e proporciona-nos resultados mais rápidos. Destaca-se que em futuros estudos é importante considerar múltiplas conformações de proteínas nas experiências de deteção virtual devido a possíveis mudanças conformacionais no sítio de ligação do ligante, detetando se existem diferenças em resíduos importantes, com o objetivo de garantir um acoplamento ideal com as nossas moléculas. Os dados obtidos para os bromoditerpenos 12*R*-hidroxibromosphaerol e Bromosphaerol apresentaram o maior potencial para inibir as proteínas Mpro e Spike, exibindo energias totais de afinidade superiores, bem como interagindo com os resíduos presentes no sítio ativo. Além disso, não interagiram com resíduos do sítio ativo da proteína do retinoblastoma, algo que foi observado na análise efetuada com o Sphaerococcenol A. Este pode ser um fator limitante para a sua futura aplicação antiviral, pois poderá interferir em processos celulares essenciais.

Em estudos futuros seria importante avaliar também a ação dos compostos isolados com outras proteínas importantes no SARS-COV2, como Nsp3 (domínio PLpro), Nsp5 (3CLpro), Nsp12, (RdRp), Nsp15 (NendoU) e proteína N, assim como considerar outras variantes das proteínas além da salvagem. O estudo dos mecanismos de ação da atividade antiviral dos compostos testados, recorrendo a vários modelos *in vitro*, incluindo enzimáticos e em modelos celulares, seria igualmente importante. De igual forma, em estudos futuros será importante estabelecer correlações entre a atividade anti-inflamatória e antiviral observadas, de forma a compreender o potencial destas moléculas no tratamento de doenças virais que tenham um quadro inflamatório subjacente como a COVID-19.

Em suma, os terpenos isolados a partir da alga *Sphaerococcus coronopifolius* demonstram capacidade de modular os níveis de diversos mediadores inflamatórios, assim como interagir com proteínas específicas, essenciais para infeção por SARS-Cov-2, abrindo novas oportunidades de investigação para inspirar o desenvolvimento de fármacos inovadores para o tratamento de doenças com uma base inflamatória e/ ou viral.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- Abdelrady, Y. A., Ashraf, N. M., Hamid, A., Thabet, H. S., Sayed, A. M., Salem, S. H., Hassanein, E. H., & Sayed, A. M. (2023). *In silico* assessment of diterpenes as potential inhibitors of SARS-COV-2 main protease. *Future Virology*, 18(5), 295–308. <https://doi.org/10.2217/fvl-2022-0163>
- Adhikari, U., Mateu, C. G., Chattopadhyay, K., Pujol, C. A., Damonte, E. B., & Ray, B. (2006). Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry*, 67(22), 2474–2482. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.024>
- Akkuş, Y., Baş, V. N., & Yılmaz, Z. (2020). Cushing syndrome induced by long term use of corticosteroids in the management of atopic dermatitis. *Pediatric Endocrinology, Diabetes, and Metabolism*, 26(4), 216–219. <https://doi.org/10.5114/pedm.2020.100803>
- Alves, C., Silva, J., Afonso, M. B., Guedes, R. A., Guedes, R. C., Alvariño, R., Pinteus, S., Gaspar, H., Goettert, M. I., Alfonso, A., Rodrigues, C. M. P., Alpoim, M. C., Botana, L., & Pedrosa, R. (2022). Disclosing the antitumour potential of the marine bromoditerpene Sphaerococcenol A on distinct cancer cellular models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112886. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112886>
- Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M. C., Botana, L. M., & Pedrosa, R. (2018). From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 777. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00777>
- Amiama-Roig, A., Pérez-Martínez, L., Rodríguez Ledo, P., Verdugo-Sivianes, E. M., & Blanco, J. R. (2023). Should We Expect an Increase in the Number of Cancer Cases in People with Long COVID?. *Microorganisms*, 11(3), 713. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030713>
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>

- Barkin R. L. (2015). Topical Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: The Importance of Drug, Delivery, and Therapeutic Outcome. *American Journal of Therapeutics*, 22(5), 388–407. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e3182459abd>
- Bhardwaj, K., Liu, P., Leibowitz, J. L., & Kao, C. C. (2012). The coronavirus endoribonuclease Nsp15 interacts with retinoblastoma tumor suppressor protein. *Journal of Virology*, 86(8), 4294-4304. <https://doi.org/10.1128/JVI.07012-11>
- BioMundo.(2022) Tribunal da UE fica do lado da Pharmamar na disputa de aprovação da Aplidina. Acedido em 30 de junho de 2022: <https://www.bioworld.com/articles/499498-eu-court-sides-with-pharmamar-in-aplidin-approval-dispute>
- Bourgougnon, N., Lahaye, M., Quemener, B., Chermann, J. C., Rimbart, M., Cormaci, M., & Kornprobst, J. M. (1996). Annual variation in composition and *in vitro* anti-HIV-1 activity of the sulfated glucuronogalactan from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Applied Phycology*, 8, 155-161. <https://doi.org/10.1007/BF02186319>
- Buck, C. B., Thompson, C. D., Roberts, J. N., Müller, M., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2006). Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathogens*, 2(7), e69. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020069>
- Burkhart, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 671-682. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>
- Cafieri F, Ciminiello P, Fattorusso E, Mangoni A. (1990). Two novel bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Gazz Chim Ital*, 120, 139–142. <https://dx.doi.org/10.1007/BF01949351>
- Cafieri, F., De Napoli, L., Fattorusso, E., Santacroce, C. (1987). Diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Phytochemistry* 26(2), 471-473. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87653-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87653-5)
- Cai, B., Chen, F., Ji, Y., Kiss, L., de Jonge, W. J., Conejero-Goldberg, C., Szabo, C., Deitch, E. A., & Ulloa, L. (2009). Alpha7 cholinergic-agonist prevents systemic inflammation

- and improves survival during resuscitation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9B), 3774–3785. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00550.x>
- Cano-Vicent, A., Hashimoto, R., Takayama, K., & Serrano-Aroca, Á. (2022). Biocompatible Films of Calcium Alginate Inactivate Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2. *Polymers*, 14(7), 1483. <https://doi.org/10.3390/polym14071483>
- Carlini, V., Noonan, D. M., Abdalalem, E., Goletti, D., Sansone, C., Calabrone, L., & Albin, A. (2023). The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in Immunology*, 14, 1161067. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161067>
- Carrizo, P. H., Dubin, M., & Stoppani, A. O. (1998). Efectos fisiopatológicos del óxido nítrico y su relación con el estrés oxidativo. *Medicina*, 58(4), 367–373. ID: lil-217516
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2024). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 40(2), 275–325. <https://doi.org/10.1039/d3np00061c>
- Catalfamo, M., Le Saout, C., & Lane, H. C. (2012). The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of VIH infection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 23(4-5), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.05.007>
- Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*, 39(5), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of clinical investigation*, 130(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
- Cheung, R. C. F., Ng, T. B., Wong, J. H., Chen, Y., & Chan, W. Y. (2016). Marine natural products with anti-inflammatory activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1645–1666. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7244-3>
- Choi, Y. K., Ye, B. R., Kim, E. A., Kim, J., Kim, M. S., Lee, W. W., Ahn, G. N., Kang, N., Jung, W. K., & Heo, S. J. (2018). Bis (3-bromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether, a novel bromophenol from the marine red alga *Polysiphonia morrowii* that suppresses LPS-induced inflammatory response by inhibiting ROS-mediated ERK signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1170–1177. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.121>
- Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A. R., & Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, 11, 118. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>
- Cicchillitti, L., Fasanaro, P., Biglioli, P., Capogrossi, M. C., & Martelli, F. (2003). Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19509–19517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300511200>
- Coates, R. M., Kem, W. R., & Abbott, B. C. (1971). Isolation and structure of a hoplonemertine toxin. *Toxicon* 9(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(71\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(71)90039-0)
- Coperchini, F., Chiovato, L., Croce, L., Magri, F., & Rotondi, M. (2020). The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine & Growth Factor reviews*, 53, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.003>
- Coschi, C. H., Ishak, C. A., Gallo, D., Marshall, A., Talluri, S., Wang, J & Dick, F. A. (2014). Haploinsufficiency of an RB–E2F1–Condensin II complex leads to aberrant replication and aneuploidy. *Cancer Discovery*, 4(7), 840-853. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0215>

- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Medical Principles and Practice*, 25(Suppl. 2), 41-59. <https://doi.org/10.1159/000443404>
- Cullis, P. A., & Cushing, R. (1984). Vidarabine encephalopathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 47(12), 1351–1354. <https://doi.org/10.1136/jnnp.47.12.1351>
- Da Conceição Rivanor, R. L., Chaves, H. V., do Val, D. R., de Freitas, A. R., Lemos, J. C., Rodrigues, J. A., Pereira, K. M., de Araújo, I. W., Bezerra, M. M., & Benevides, N. M. (2014). A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. *International Immunopharmacology*, 21(1), 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.009>
- Daniotti, S., & Re, I. (2021). Marine Biotechnology: Challenges and Development Market Trends for the Enhancement of Biotic Resources in Industrial Pharmaceutical and Food Applications. A Statistical Analysis of Scientific Literature and Business Models. *Marine Drugs*, 19(2), 61. <https://doi.org/10.3390/md19020061>
- Daskalaki, M. G., Vyrla, D., Harizani, M., Doxaki, C., Eliopoulos, A. G., Roussis, V., Ioannou, E., Tsatsanis, C., & Kampranis, S. C. (2019). Neorogioltriol and Related Diterpenes from the Red Alga *Laurencia* Inhibit Inflammatory Bowel Disease in Mice by Suppressing M1 and Promoting M2-Like Macrophage Responses. *Marine Drugs*, 17(2), 97. <https://doi.org/10.3390/md17020097>
- De Carvalho, M. S., & Jacobs, R. S. (1991). Two-step inactivation of bee venom phospholipase A2 by scalaradial. *Biochemical Pharmacology*, 42(8), 1621–1626. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90432-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90432-5)
- De Clercq E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (VIH) infection. *Medicinal Research Reviews*, 20(5), 323–349. [https://doi.org/10.1002/1098-1128\(200009\)](https://doi.org/10.1002/1098-1128(200009))

- De Rosa, S., de Stefano, S., Scarpelli, P., and Zavodnik, N. (1988). Terpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius* of the north Adriatic Sea. *Phytochemistry* 27, 1875–1878. doi: 10.1016/0031-9422(88)80468-0
- De Silva ED, Scheuer PJ (1980) Manoalide, un antibiótico sesterterpenoide de la esponja marina *Luffariella variabilis* (Polejaeff). *Tetraedro Lett* 21(17):1611–1614. doi: 10.1016/S0040-4039(00)77766-5
- Du, C., Bhatia, M., Tang, S. C., Zhang, M., & Steiner, T. (2015). Mediators of Inflammation: Inflammation in Cancer, Chronic Diseases, and Wound Healing. *Mediators of Inflammation*, 2015, 570653. <https://doi.org/10.1155/2015/570653>
- Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- El Demerdash, A. (2016). Isolation of Bioactive Marine Natural Products and Bioinspired Synthesis of Fused Guanidinic Tricyclic Analogues (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay). DOI: 10.13140/RG.2.2.34546.02246.
- El-Demerdash, A., Hassan, A., Abd El-Aziz, T. M., Stockand, J. D., & Arafa, R. K. (2021). Marine Brominated Tyrosine Alkaloids as Promising Inhibitors of SARS-CoV-2. *Molecules* ,26(20), 6171. <https://doi.org/10.3390/molecules26206171>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x)
- Escamilla-Gil, J. M., Fernandez-Nieto, M., & Acevedo, N. (2022). Understanding the Cellular Sources of the Fractional Exhaled Nitric Oxide (FeNO) and Its Role as a Biomarker of Type 2 Inflammation in Asthma. *BioMed Research International*, 2022, 5753524. <https://doi.org/10.1155/2022/5753524>
- Fattorusso, E., Magno, S., Santacroce, C., Sica, D., Di Blasio, B., Pedone, C., et al. (1976). Bromosphaerol, a new bromine containing diterpenoid from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Gazzetta Chimica Italiana* 106, 779-783. <https://dx.doi.org/10.1007/BF01949351>

- Faure, R., Ramanoelina, A. R., Rakotonirainy, O., Bianchini, J. P., & Gaydou, E. M. (1991). Two-dimensional nuclear magnetic resonance of sesquiterpenes. 4—Application to complete assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of some aromadendrane derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 29(9), 969-971. <https://dx.doi.org/10.1002/mrc.1260290920>
- Fenical, W., Finer, J., Clardy, J. (1976). Sphaerococcenol A; a new rearranged bromo-diterpene from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Tetrahedron Letters* 17(10) 731-734. [https://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)77936-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)77936-6)
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12), 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- Gao, Y., Zhang, L., & Jiao, W. (2019). Marine glycan-derived therapeutics in China. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 163, 113–134. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.02.006>
- Gautam, R., & Jachak, S. M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, 29(5), 767–820. <https://doi.org/10.1002/med.20156>
- González, Y., Doens, D., Santamaría, R., Ramos, M., Restrepo, C. M., Barros de Arruda, L., Lleonart, R., Gutiérrez, M., & Fernández, P. L. (2013). A pseudopterane diterpene isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia acerosa* inhibits the inflammatory response mediated by TLR-ligands and TNF-alpha in macrophages. *PloS One*, 8(12), e84107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084107>
- González, Y., Torres-Mendoza, D., Jones, G. E., & Fernandez, P. L. (2015). Marine Diterpenoids as Potential Anti-Inflammatory Agents. *Mediators of Inflammation*, 2015, 263543. <https://doi.org/10.1155/2015/263543>
- Grassauer, A., Weinmuellner, R., Meier, C., Pretsch, A., Prieschl-Grassauer, E., & Unger, H. (2008). Iota-Carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection. *Virology Journal*, 5, 107. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-107>

- Green, S. J., Nacy, C. A., & Meltzer, M. S. (1991). Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*, 50(1), 93–103. <https://doi.org/10.1002/jlb.50.1.93>
- Guedes, I. A., Costa, L. S. C., Dos Santos, K. B., Karl, A. L. M., Rocha, G. K., Teixeira, I. M., Galheigo, M. M., Medeiros, V., Krempser, E., Custódio, F. L., Barbosa, H. J. C., Nicolás, M. F., & Dardenne, L. E. (2021). Drug design and repurposing with DockThorVS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. *Scientific Reports*, 11(1), 5543. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84700-0>
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2024. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, University of Galway Acedido em 09 de Fevereiro de 2024: <https://www.algaebase.org>
- Gustafson KR, Oku N, Milanowski DJ *Curr. Medicina. Química. -Agentes Antiinfecciosos*. 2004; 3 : 233–249. <https://doi.org/10.2174/1389203043379468>
- Harirforoosh, S., Asghar, W., & Jamali, F. (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 821–847. <https://doi.org/10.18433/j3vw2f>
- Headland, S. E., & Norling, L. V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*, 27(3), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>
- Henríquez-Olguín, C., Altamirano, F., Valladares, D., López, J. R., Allen, P. D., & Jaimovich, E. (2015). Altered ROS production, NF- κ B activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(7), 1410–1419. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.012>
- Heo, S. J., Yoon, W. J., Kim, K. N., Ahn, G. N., Kang, S. M., Kang, D. H., Affan, A., Oh, C., Jung, W. K., & Jeon, Y. J. (2010). Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and chemical toxicology*, 48(8-9), 2045–2051. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.003>

- Herold, S., Steinmueller, M., von Wulffen, W., Cakarova, L., Pinto, R., Pleschka, S., Mack, M., Kuziel, W. A., Corazza, N., Brunner, T., Seeger, W., & Lohmeyer, J. (2008). Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(13), 3065–3077. <https://doi.org/10.1084/jem.20080201>
- Högner, K., Wolff, T., Pleschka, S., Plog, S., Gruber, A. D., Kalinke, U., Walmrath, H. D., Bodner, J., Gattenlöhner, S., Lewe-Schlosser, P., Matrosovich, (2013). Macrophage-expressed IFN- β contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS pathogens*, 9(2), e1003188. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003188>
- Huang, R., Zhou, X., Xu, T., Yang, X., & Liu, Y. (2010). Diketopiperazines from marine organisms. *Chemistry & Biodiversity*, 7(12), 2809–2829. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900211>
- Huang, T. Z., Chen, B. W., Huang, C. Y., Hwang, T. L., Uvarani, C., Dai, C. F., Sung, P. J., Su, J. H., & Sheu, J. H. (2015). Eunicellin-Based Diterpenoids, Hirsutalins S-V, from the Formosan Soft Coral *Cladiella hirsuta*. *Marine Drugs*, 13(5), 2757–2769. <https://doi.org/10.3390/md13052757>
- Iwanaga, S. (1991). Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Chemotherapy*, 37(3), 206–211. <https://doi.org/10.1159/000238855>
- Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical reviews in Immunology*, 32(1), 23–63. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30>
- Jacobson, P. B., & Schrier, D. J. (1993). Regulation of CD11b/CD18 expression in human neutrophils by phospholipase A2. *Journal of Immunology*. 151(10), 5639–5652.
- Jahnavi, K., Pavani Reddy, P., Vasudha, B., Boggula, N. (2019) Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i1-s.2287>
- Jaimes, J. A., André, N. M., Chappie, J. S., Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2020). Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals

- an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *Journal of Molecular Biology*, 432(10), 3309–3325. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.009>
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196–223. <https://doi.org/10.3390/md9020196>
- Kalasariya, H. S., Patel, N. B., Gacem, A., Alsufyani, T., Reece, L. M., Yadav, V. K., Awwad, N. S., Ibrahim, H. A., Ahn, Y., Yadav, K. K., & Jeon, B. H. (2022). Marine Alga *Ulva fasciata*-Derived Molecules for the Potential Treatment of SARS-CoV-2: An *In Silico* Approach. *Marine Drugs*, 20(9), 586. <https://doi.org/10.3390/md20090586>
- Kaminska B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1754(1-2), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.017>
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6008. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Karuppusamy, S., Rajauria, G., Fitzpatrick, S., Lyons, H., McMahon, H., Curtin, J., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. (2022). Biological Properties and Health-Promoting Functions of Laminarin: A Comprehensive Review of Preclinical and Clinical Studies. *Marine drugs*, 20(12), 772. <https://doi.org/10.3390/md20120772>
- Katsui, N., Suzuki, Y., Kitamura, S., & Irie, T. (1967). 5, 6-Dibromoprotocatechualdehyde and 2, 3-dibromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether: New dibromophenols from *Rhodomela larix*. *Tetrahedron*, 23(3), 1185-1188.
- Kedzierska, K., & Crowe, S. M. (2001). Cytokines and VIH-1: interactions and clinical implications. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 12(3), 133–150. <https://doi.org/10.1177/095632020101200301>
- Kent, L. N., & Leone, G. (2019). The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 19(6), 326–338. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0143-7>
- Kim, K. D., Zhao, J., Auh, S., Yang, X., Du, P., Tang, H., & Fu, Y. X. (2007). Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nature Medicine*, 13(10), 1248–1252. <https://doi.org/10.1038/nm1633>

- Kong, D. X., Jiang, Y. Y., & Zhang, H. Y. (2010). Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. *Drug Discovery Today*, 15(21-22), 884–886. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.09.002>
- Kwon, P. S., Oh, H., Kwon, S. J., Jin, W., Zhang, F., Fraser, K., Hong, J. J., Linhardt, R. J., & Dordick, J. S. (2020). Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 *in vitro*. *Cell Discovery*, 6(1), 50. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00192-8>
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81(2), 807–869. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.807>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Lee, H. P., Huang, S. Y., Lin, Y. Y., Wang, H. M., Jean, Y. H., Wu, S. F., Duh, C. Y., & Wen, Z. H. (2013). Soft coral-derived lemnalol alleviates monosodium urate-induced gouty arthritis in rats by inhibiting leukocyte infiltration and iNOS, COX-2 and c-Fos protein expression. *Marine Drugs*, 11(1), 99–113. <https://doi.org/10.3390/md11010099>
- Lee, J. O., Russo, A. A., & Pavletich, N. P. (1998). Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*, 391(6670), 859–865. <https://doi.org/10.1038/36038>
- Lew, T. W., Kwek, T. K., Tai, D., Earnest, A., Loo, S., Singh, K., Kwan, K. M., Chan, Y., Yim, C. F., Bek, S. L., Kor, A. C., Yap, W. S., Chelliah, Y. R., Lai, Y. C., & Goh, S. K. (2003). Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA*, 290(3), 374–380. <https://doi.org/10.1001/jama.290.3.374>
- Lintermans, L. L., Stegeman, C. A., Heeringa, P., & Abdulahad, W. H. (2014). T cells in vascular inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 5, 504. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00504>
- Liu, M., Hansen, P. E., & Lin, X. (2011). Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Marine Drugs*, 9(7), 1273-1292. <https://doi.org/10.3390/md9071273>

- Liu, Y., Du, X., Chen, J., Jin, Y., Peng, L., Wang, H. H. X., Luo, M., Chen, L., & Zhao, Y. (2020). Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *The Journal of infection*, *81*(1), e6–e12. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.002>
- Lu, W. Y., Li, H. J., Li, Q. Y., & Wu, Y. C. (2021). Application of marine natural products in drug research. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *35*, 116058. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116058>
- Lu, Y., Li, P. J., Hung, W. Y., Su, J. H., Wen, Z. H., Hsu, C. H., Dai, C. F., Chiang, M. Y., & Sheu, J. H. (2011). Nardosinane sesquiterpenoids from the Formosan soft coral *Lemnalia flava*. *Journal of natural products*, *74*(2), 169–174. <https://doi.org/10.1021/np100541aÇ>
- Luo, W., Yu, H., Gou, J., Li, X., Sun, Y., Li, J., & Liu, L. (2020). Clinical pathology of critical patient with novel coronavirus pneumonia (COVID-19). DOI: 10.13140/RG.2.2.22934.29762/1.
- Lusvardi, S., & Bewley, C. A. (2016). Griffithsin: An Antiviral Lectin with Outstanding Therapeutic Potential. *Viruses*, *8*(10), 296. <https://doi.org/10.3390/v8100296>
- Lv, T., Cao, W., & Li, T. (2021). VIH-Related Immune Activation and Inflammation: Current Understanding and Strategies. *Journal of Immunology Research*, 2021, 7316456. <https://doi.org/10.1155/2021/7316456>
- Lyakhova, E. G., Kalinovsky, A. I., Kolesnikova, S. A., Vaskovsky, V. E., & Stonik, V. A. (2004). Halogenated diterpenoids from the red alga *Laurencia nipponica*. *Phytochemistry*, *65*(18), 2527–2532. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.07.005>
- Malve H. (2016). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *8*(2), 83–91. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700>
- Mangalmurti, N., & Hunter, C. A. (2020). Cytokine Storms: Understanding COVID-19. *Immunity*, *53*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.017>

- Manning, A. L., Longworth, M. S., & Dyson, N. J. (2010). Loss of pRB causes centromere dysfunction and chromosomal instability. *Genes & Development*, 24(13), 1364–1376. <https://doi.org/10.1101/gad.1917310>
- Marchingo, J. M., Sinclair, L. V., Howden, A. J., & Cantrell, D. A. (2020). Quantitative analysis of how Myc controls T cell proteomes and metabolic pathways during T cell activation. *eLife*, 9, e53725. <https://doi.org/10.7554/eLife.53725>
- Marshall, L. A., Winkler, J. D., Griswold, D. E., Bolognese, B., Roshak, A., Sung, C. M., Webb, E. F., & Jacobs, R. (1994). Effects of scalaradial, a type II phospholipase A2 inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(2), 709–717.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., & Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Marine Drugs*, 12(2), 1066–1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>
- Mayer, A. M. S., Gustafson, K. S. (2008). Marine Pharmacology in 2005-2006: Antitumour and Cytotoxic Compounds. *European Journal of Cancro*, 44: 2357 - 2387. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.07.001>
- Mayer, A. M., & Spitzer, J. A. (1993). Modulation of superoxide anion generation by manoalide, arachidonic acid and staurosporine in liver infiltrated neutrophils in a rat model of endotoxemia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(1), 400–409.
- Medeiros, V. P., Queiroz, K. C., Cardoso, M. L., Monteiro, G. R., Oliveira, F. W., Chavante, S. F., Guimaraes, L. A., Rocha, H. A., & Leite, E. L. (2008). Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. *Biochemistry. Biokhimiia*, 73(9), 1018–1024. <https://doi.org/10.1134/s0006297908090095>
- Meuleman, P., Albecka, A., Belouzard, S., Vercauteren, K., Verhoye, L., Wychowski, C., Leroux-Roels, G., Palmer, K. E., & Dubuisson, J. (2011). Griffithsin has antiviral activity against hepatitis C virus. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 55(11), 5159–5167. <https://doi.org/10.1128/AAC.00633-11>

- Michels da Silva, D., Langer, H., & Graf, T. (2019). Inflammatory and Molecular Pathways in Heart Failure-Ischemia, HFpEF and Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/ijms20092322>.
- Millet, J. K., Séron, K., Labitt, R. N., Danneels, A., Palmer, K. E., Whittaker, G. R., & Belouzard, S. (2016). Middle East respiratory syndrome coronavirus infection is inhibited by griffithsin. *Antiviral research*, 133, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.011>
- Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., & Saludes, J. P. (2009). Drug development from marine natural products. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(1), 69–85. <https://doi.org/10.1038/nrd2487>
- Morton, O. & Picton, B.E. (2016). *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse. *Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland*. Acedido em 28 de Janeiro de 2024: <https://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=ZM6370>
- Mullard A. (2024). 2023 FDA approvals. *Nature reviews. Drug Discovery*, 23(2), 88–95. <https://doi.org/10.1038/d41573-024-00001-x>
- Murphy, K., Weaver, C. (2017). Pattern recognition by cells of the innate immune system. *Janeway's Immunobiology*. 9th ed. New York: Garland Science. <https://doi.org/10.1189/jlb.2RU1215-575R>
- Muto S., Niimura K., Oohara M., Oguchi Y., Matsunaga K., Hirose K., Kakuchi J., Sugita N., Furusho T., Et A (1988). Polysaccharides from Marine Algae and Antiviral Drugs Containing the Same as Active Ingredient. Application. U.S. Patent No. 5,089,481. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Nevins J. R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 699–703. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.699>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- O'Rourke, A., Kremb, S., Duggan, B. M., Sioud, S., Kharbatia, N., Raji, M., Emwas, A. H., Gerwick, W. H., & Voolstra, C. R. (2018). Identification of a 3-Alkylpyridinium

- Compound from the Red Sea Sponge *Amphimedon chloros* with *In Vitro* Inhibitory Activity against the West Nile Virus NS3 Protease. *Molecules* 23(6), 1472. <https://doi.org/10.3390/molecules23061472>
- Orús A. (2024). Número de muertes causadas por el coronavirus de Wuhan por país. *Statista*. <https://es.statista.com/estadisticas/1095779/numero-de-muertes-causadas-por-el-coronavirus-de-wuhan-por-pais/>
- Papon, N., Copp, B. R., & Courdavault, V. (2022). Marine drugs: Biology, pipelines, current and prospects for production. *Biotechnology Advances*, 54, 107871. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107871>
- Pavlov, V. A., Ochani, M., Yang, L. H., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, K., Lin, X., Levi, J., Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Czura, C. J., Larosa, G. J., Miller, E. J., Tracey, K. J., & Al-Abed, Y. (2007). Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 35(4), 1139–1144. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000259381.56526.96>
- Pavlov, V. A., Ochani, M., Yang, L. H., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, K., Lin, X., Levi, J., Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Czura, C. J., Larosa, G. J., Miller, E. J., Tracey, K. J., & Al-Abed, Y. (2007). Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 35(4), 1139–1144. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000259381.56526.96>
- Pendyala, B., Patras, A., & Dash, C. (2021). Phycobilins as Potent Food Bioactive Broad-Spectrum Inhibitors Against Proteases of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses: A Preliminary Study. *Frontiers in Microbiology*, 12, 645713. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645713>
- Pereira, J. G., Mesquita, J. X., Aragão, K. S., Franco, A. X., Souza, M. H., Brito, T. V., Dias, J. M., Silva, R. O., Medeiros, J. V., Oliveira, J. S., Abreu, C. M., de Paula, R. C., Barbosa, A. L., & Freitas, A. L. (2014). Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. *Carbohydrate Polymers*, 108, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.105>

- Potts, B. C., Faulkner, D. J., & Jacobs, R. S. (1992). Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. *Journal of Natural Products*, 55(12), 1701–1717. <https://doi.org/10.1021/np50090a001>
- Prousis, K. C., Kikionis, S., Ioannou, E., Morgana, S., Faimali, M., Piazza, V., Calogeropoulou, T., & Roussis, V. (2021). Synthesis and Antifouling Activity Evaluation of Analogs of Bromosphaerol, a Brominated Diterpene Isolated from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Marine Drugs*, 20(1), 7. <https://doi.org/10.3390/md20010007>
- Prusoff, W. H., Lin, T. S., August, E. M., Wood, T. G., & Marongiu, M. E. (1989). Approaches to antiviral drug development. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 62(2), 215.
- Queiroz, K. C., Medeiros, V. P., Queiroz, L. S., Abreu, L. R., Rocha, H. A., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H., & Leite, E. L. (2008). Inhibition of reverse transcriptase activity of VIH by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 62(5), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.03.006>
- Quémener, M., Kikionis, S., Fauchon, M., Toueix, Y., Aulanier, F., Makris, A. M., Roussis, V., Ioannou, E., & Hellio, C. (2021). Antifouling Activity of Halogenated Compounds Derived from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius*: Potential for the Development of Environmentally Friendly Solutions. *Marine Drugs*, 20(1), 32. <https://doi.org/10.3390/md20010032>
- Radisavljevic Z. (2004). Inactivated tumor suppressor Rb by nitric oxide promotes mitosis in human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(1), 1–5. <https://doi.org/10.1002/jcb.20063>
- Regan, J., Carrier, L., Gucinski, H., Olla, H. Yoshida, Fujimura, R. & Wicklund, R. (1992). DNA as a solar dosimeter in the ocean. *Photochemical Photobiology*, 56: 35- 42 <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb09599.x>
- Rizzolio, F., Lucchetti, C., Caligiuri, I., Marchesi, I., Caputo, M., Klein-Szanto, A. J., Bagella, L., Castronovo, M., & Giordano, A. (2012). Retinoblastoma tumor-suppressor protein phosphorylation and inactivation depend on direct interaction with Pin1. *Cell Death and Differentiation*, 19(7), 1152–1161. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.202>
- Rodrigues, D., Alves, C., Horta, A., Pinteus, S., Silva, J., Culioli, G., Thomas, O. P., & Pedrosa, R. (2015). Antitumor and antimicrobial potential of bromoditerpenes isolated from the

- red alga, *Sphaerococcus coronopifolius*. *Marine drugs*, 13(2), 713–726. <https://doi.org/10.3390/md13020713>
- Rosas-Ballina, M., Goldstein, R. S., Gallowitsch-Puerta, M., Yang, L., Valdés-Ferrer, S. I., Patel, N. B., Chavan, S., Al-Abed, Y., Yang, H., & Tracey, K. J. (2009). The selective alpha7 agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE. *Molecular Medicine*, 15(7-8), 195–202. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00039>
- Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, et al. (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* 5(3): e77. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050077>
- Ryan, P. M., & Caplice, N. (2020). COVID-19 and relative angiotensin-converting enzyme 2 deficiency: role in disease severity and therapeutic response. *Open heart*, 7(1), e001302. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2020-001302>
- Salehi, Ghizlane & Zbakh, Hanaa & Moussa, Hanaa & Hassoun, Mustapha & Bochkov, Valery & Ciudad, Carlos & Noé, Véronique & Riadi, Hassane. (2018). Antitumoral and anti-inflammatory activities of the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *European Journal of Integrative Medicine*.18. 10.1016/j.eujim.2018.02.001.
- Sanada, F., Taniyama, Y., Muratsu, J., Otsu, R., Shimizu, H., Rakugi, H., & Morishita, R. (2018). Source of Chronic Inflammation in Aging. *Frontiers in Cardiovascular medicine*, 5, 12. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00012>
- Sethi, B. A., Sethi, A., Ali, S., & Aamir, H. S. (2020). Impact of Coronavirus disease (COVID-19) pandemic on health professionals. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 36(COVID19-S4), S6–S11. <https://doi.org/10.12669/pjms.36.COVID19-S4.2779>
- Smyrniotopoulos V, Vagias C, Rahman MM, Gibbons S, Roussis V. (2010) Ioniols I and II, Tetracyclic Diterpenes with Antibacterial Activity, from *Sphaerococcus coronopifolius*. *Chem Biodivers*,7, 666. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2008.03.042>

- Smyrniotopoulos, V., Quesada, A., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., Roussis, V. (2008). Cytotoxic bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Tetrahedron* 64(22), 5184-5190. <https://dx.doi.org/10.1021/np8001817>
- Snelgrove P. V. (2016). An Ocean of Discovery: Biodiversity Beyond the Census of Marine Life. *Planta Medica*, 82(9-10), 790–799. <https://doi.org/10.1055/s-0042-103934>
- Song, W., Gui, M., Wang, X., & Xiang, Y. (2018). Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathogens*, 14(8), e1007236. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007236>
- Sostres, C., Gargallo, C. J., & Lanás, A. (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Research & Therapy*, 15 Suppl 3(Suppl 3), S3. <https://doi.org/10.1186/ar4175>
- Stingi, A., & Cirillo, L. (2021). SARS-CoV-2 infection and cancer: Evidence for and against a role of SARS-CoV-2 in cancer onset. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 43(8), e2000289. <https://doi.org/10.1002/bies.202000289>
- Su, M., Chen, Y., Qi, S., Shi, D., Feng, L., & Sun, D. (2020). A Mini-Review on Cell Cycle Regulation of Coronavirus Infection. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 586826. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.586826>
- Sugiura, Yoshimasa & Usui, Masakatsu & Katsuzaki, Hirotaka & Imai, Kunio & Kakinuma, Makoto & Amano, Hideomi & Miyata, Masaaki. (2018). Orally Administered Phlorotannins from *Eisenia arborea* Suppress Chemical Mediator Release and Cyclooxygenase-2 Signaling to Alleviate Mouse Ear Swelling. *Marine Drugs*. 16. 267. <https://doi.org/10.3390/md16080267>.
- Tibes, U., & Friebe, W. G. (1997). Phospholipase A2 inhibitors in development. *Expert opinion on investigational drugs*, 6(3), 279–298. <https://doi.org/10.1517/13543784.6.3.279>
- Vo, T. S., & Kim, S. K. (2010). Potential anti-VIH agents from marine resources: an overview. *Marine Drugs*, 8(12), 2871–2892. <https://doi.org/10.3390/md8122871>
- Wang, J., Chen, F., Liu, Y., Liu, Y., Li, K., Yang, X., Liu, S., Zhou, X., & Yang, J. (2018). Spirostaphylotrichin X from a Marine-Derived Fungus as an Anti-influenza Agent

- Targeting RNA Polymerase PB2. *Journal of Natural Products*, 81(12), 2722–2730. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00656>
- Wang, W., Liu, X., Wu, S., Chen, S., Li, Y., Nong, L., Lie, P., Huang, L., Cheng, L., Lin, Y., & He, J. (2020). Definition and Risks of Cytokine Release Syndrome in 11 Critically Ill COVID-19 Patients With Pneumonia: Analysis of Disease Characteristics. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(9), 1444–1451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa387>
- Wang, Wei & Zhang, Pan & Li, Chunxia & Hao, Cui & Qi, Xin & Zhang, Li-Juan & Guan, Hua-Shi. (2012). Preparation and Anti-Influenza A Virus Activity of k-Carrageenan Oligosaccharide and Its Sulphated Derivatives. *Food Chemistry*. 133. 880–888. [10.1016/j.foodchem.2012.01.108](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.108).
- Wijesinghe, W. A., Kim, E. A., Kang, M. C., Lee, W. W., Lee, H. S., Vairappan, C. S., & Jeon, Y. J. (2014). Assessment of anti-inflammatory effect of 5 β -hydroxypalisadin B isolated from red seaweed *Laurencia snackeyi* in zebrafish embryo *in vivo* model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.11.006>
- Woelkerling WJ. (1990) An introduction. In: *Biology of the Red Algae*. Cole KM, Sheath RG, editors, Cambridge, Cambridge University Press, 1–6.
- Wu, Alex & Jelielek, Karolina & Le, Henry & Butt, Maryam & Newman, David & Glaser, Keith & Pierce, Marsha & Mayer, Alejandro. (2022). The 2021 Marine Pharmacology and Pharmaceuticals Pipeline. *The FASEB Journal*. 36. [10.1096/fasebj.2022.36.S1.L7586](https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.L7586).
- Wu, D., & Yang, X. O. (2020). TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: An emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 53(3), 368–370. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.005>
- Xia X. (2021). Domains and Functions of Spike Protein in Sars-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses*, 13(1), 109. <https://doi.org/10.3390/v13010109>
- Xiao, B., Spencer, J., Clements, A., Ali-Khan, N., Mitnacht, S., Broceño, C., Burghammer, M., Perrakis, A., Marmorstein, R., & Gamblin, S. J. (2003). Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its

- regulation. National Academy of Sciences of the United States of America, 100(5), 2363–2368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436813100>
- Xiaohong, Y., Tingyuan, L., & Zhicheng, H. (2020). Coronavirus disease pneumonia 2019 (COVID-19): 3 cases of puncture histopathology in several locations. *Chin J Pathol*, 49. <https://doi.org/10.36660/abc.20200308>
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485), 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
- Yang, E. J. et al. (2009) Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(4), pp. 245–249. doi: 10.2478/v10102-009-0022-2.
- Yang, L. and Zhang, L.M. (2009) Chemical Structural and Chain Conformational Characterization of Some Bioactive Polysaccharides Isolated from Natural Sources. *Carbohydrate Polymers*, 76, 349-361. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.015>
- Yang, X. W., Peng, K., Liu, Z., Zhang, G. Y., Li, J., Wang, N., Steinmetz, A., & Liu, Y. (2013). Strepsesquitriol, a rearranged zizaane-type sesquiterpenoid from the deep-sea-derived actinomycete *Streptomyces sp.* SCSIO 10355. *Journal of Natural Products*, 76(12), 2360–2363. <https://doi.org/10.1021/np400923c>
- Yelin, D., Wirtheim, E., Vetter, P., Kalil, A. C., Bruchfeld, J., Runold, M., Guaraldi, G., Mussini, C., Gudiol, C., Pujol, M., Bandera, A., Scudeller, L., Paul, M., Kaiser, L., & Leibovici, L. (2020). Long-term consequences of COVID-19: research needs. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(10), 1115–1117. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30701-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30701-5)
- Yuan, Y. V., & Walsh, N. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), 1144–1150. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.02.002>
- Zhang, C., Wu, Z., Li, J. W., Zhao, H., & Wang, G. Q. (2020). Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *International journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 105954. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105954>

- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zornetzer, G. A., Frieman, M. B., Rosenzweig, E., Korth, M. J., Page, C., Baric, R. S., & Katze, M. G. (2010). Transcriptomic analysis reveals a mechanism for a profibrotic phenotype in STAT1 knockout mice during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Journal of Virology*, 84(21), 11297–11309. <https://doi.org/10.1128/JVI.01130-10>
- Banday, A., Azha, N., Farooq, R., Sheikh, S., Ganie, M., Parray, M., Mushtaq, H., Hameed, I., & Lone, M. (2024). Exploring the potential of marine natural products in drug development: A comprehensive review. *Phytochemistry Letters*, 59, 124-135. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2024.01.001>