

**Estudo dos efeitos de compostos de origem marinha no crescimento de
microrganismos da pele**

Andreia Filipa Alves São Pedro

2024

**Estudo dos efeitos de compostos de origem marinha no crescimento de
microrganismos da pele**

Andreia Filipa Alves São Pedro

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

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Susete Pinteus,
Doutora Joana Silva e Doutora Alice Martins

2024

Título: Estudo dos efeitos de compostos de origem marinha no crescimento de microrganismos da pele

Copyright © Andreia Filipa Alves São Pedro

Escola Superior de Turismo e Tecnologia 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, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Agradecimentos

A dissertação de mestrado aqui apresentada resulta do apoio, acompanhamento e sacrifício de inúmeras pessoas que, de uma forma ou outra, tiveram um papel fundamental na sua concretização. Graças ao vosso apoio e disponibilidade, foi possível alcançar mais um objetivo muito desejado. Por isso gostaria de agradecer:

À Doutora Susete Pintéus, orientadora científica desta dissertação, por todo o apoio e paciência disponibilizada ao longo do percurso e, particularmente, à Doutora Alice Martins, que acompanhou de perto este trabalho, especialmente na parte de química. À Doutora Joana Silva por todos os ensinamentos e apoio prestados ao longo desta tese. Agradeço também ao Doutor Celso Alves, pela disponibilidade e ajuda em todas as questões que surgiram ao longo deste trabalho.

À Patrícia Susano, brilhante colega e verdadeira amiga, obrigada por todas as horas passadas no laboratório, todos os ensinamentos, paciência e disponibilidade para me acompanhar. Agradeço também por todo o carinho, apoio, amizade e boa disposição demonstrada em todos os momentos, quer no laboratório (com as nossas *playlists*), quer na nossa pausa para café, nos telefonemas ou mensagens trocadas.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo deste período, Tânia, Mariana, Cláudia, Beatriz, bem como aos meus amigos, e segunda família, da comissão de praxe, por todas as palavras, brincadeiras e momentos partilhados, serão para sempre lembrados.

Ao Pedro, por todas as palavras amigas e apoio.

À minha mãe e irmã, obrigada por tudo! Obrigada pelo apoio, dedicação, e por me acompanharem em todos os momentos, os bons e os menos bons. Obrigada por todos os ensinamentos e valores inculcados. Obrigada por toda a vossa confiança e dedicação. Não há agradecimentos possíveis para tudo o que fizeram por mim!

Por fim, ao meu pai, que, onde quer que esteja, tenho a certeza que me apoiou e acompanhou ao longo deste trabalho.

O meu maior agradecimento a todos!

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 do 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

Dada a crescente relevância da aparência física na sociedade atual, as indústrias cosmética e dermatológica têm investido cada vez mais na busca por novos ingredientes que respondam às exigências dos consumidores, que optam cada vez mais por produtos de origem natural e que respondam às atuais exigências de sustentabilidade ambiental, sem prejuízo da sua eficácia.

A pele, sendo o maior órgão do corpo humano, desempenha um papel importante na defesa do organismo, atuando como barreira de proteção contra estímulos externos (e.g., microrganismos, radiação ultravioleta). No entanto, a mesma pode ser afetada por fatores endógenos e/ou exógenos, como fatores genéticos e ambientais, doenças crônicas, condições de higiene, entre outros, comprometendo a sua integridade funcional.

Os oceanos ocupam a maior área do planeta Terra, sendo habitat para muitos organismos marinhos com características únicas e distintas dos organismos terrestres. Entre eles, as macroalgas são extremamente abundantes e, como tal, têm sido amplamente investigadas quanto à possibilidade de serem usadas como fonte de compostos para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, dadas as suas funcionalidades bioativas, como, por exemplo, atividade antimicrobiana.

Deste modo, o objetivo desta dissertação de mestrado consistiu em avaliar o potencial antibacteriano dos compostos eleganolone, loliolide, alloaromadendrene, sphaerococcenol A e um seu análogo, isolados das macroalgas *Bifurcaria bifurcata*, *Codium tomentosum* e *Sphaerococcus coronopifolius*, recolhidas na costa de Peniche (Portugal). Os compostos mais promissores foram sujeitos a estudos complementares para avaliar quais os possíveis mecanismos de ação antimicrobiana.

O composto sphaerococcenol A apresentou capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* (IC₅₀ de 25,66 µg/mL). No entanto, o seu análogo demonstrou a maior atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus hominis* (IC₅₀ de 61,06 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (IC₅₀ de 22,94 µg/mL) e *Cutibacterium acnes* (IC₅₀ de 9,25 µg/mL).

Os resultados indicam que as atividades antimicrobianas poderão estar associadas a perturbações na membrana plasmática dos microrganismos, particularmente relacionadas

Resumo

com alterações no potencial de membrana. Foram identificadas três situações em que ocorreu despolarização da membrana e cinco situações em que ocorreu hiperpolarização. Além disso, observou-se que o análogo 5, na concentração do IC₅₀, causou danos estruturais totais na membrana celular de *Staphylococcus hominis*.

Em suma, o trabalho desenvolvido demonstrou o potencial antibacteriano do bromoditerpeno sphaerococcenol A e do seu análogo contra algumas espécies microbianas comensais da microbiota cutânea, evidenciando a importância das macroalgas como fonte de novos compostos bioativos para os cuidados da pele.

PALAVRAS-CHAVE: MACROALGAS; PRODUTOS NATURAIS MARINHOS; ANTIMICROBIANO; MICROBIOMA DA PELE.

Abstract

Abstract

Given the growing significance of physical appearance in our society, the dermatological industry has invested heavily in the search for new ingredients to meet consumer's demands. Therefore, there is an increase in the search for nature-sourced products that also meet current environmental sustainability requirements without compromising efficacy.

As the largest organ of the human body, the skin plays a vital role in maintaining a healthy appearance and defending the organism, acting as a protective barrier against external stimuli (e.g., microorganisms, ultraviolet radiation). However, it can be affected by endogenous and/ or exogenous factors, such as genetic and environmental factors, chronic diseases, hygiene conditions, etc., which can compromise its functional integrity.

The oceans cover the largest area of the Earth's surface and serve as a habitat for many marine organisms with unique characteristics distinct from the terrestrial ones. Among these, macroalgae are extremely abundant and have been extensively studied for their potential use as a source of compounds for the development of new biotechnological products due to their bioactive functionalities, such as antimicrobial activity.

Thus, the objective in this study, it was evaluated the antibacterial properties of the compounds eleganolone, loliolide, alloaromadendrene, sphaerococcenol A, and its chemical analogue, isolated from the macroalgae *Bifurcaria bifurcata*, *Codium tomentosum*, and *Sphaerococcus coronopifolius*, respectively, collected from the coast of Peniche (Portugal). The most promising compounds underwent further studies to evaluate possible mechanisms of action.

Sphaerococcenol A showed the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus epidermidis* (IC₅₀ of 25,66 µg/mL). However, its analogue demonstrated higher antibacterial capacity, inhibiting the growth of *Staphylococcus hominis* (IC₅₀ of 61,06 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (IC₅₀ of 22,94 µg/mL) and *Cutibacterium acnes* (IC₅₀ of 9,25 µg/mL).

The results indicate that the antimicrobial activity may be associated with disruptions in the microorganism membrane, particularly related to changes in membrane

Abstract

potential. Three instances of membrane depolarization and five instances of hyperpolarization were identified. Furthermore, it was observed that analogue 5, at the IC₅₀ concentration, caused total structural damage to the cell membrane of *Staphylococcus hominis*.

In summary, the developed work demonstrated the antibacterial potential of the bromoditerpene sphaerococcenol A and its analogue against some commensal microbial species of the skin microbiota, highlighting the importance of macroalgae as a source of new bioactive compounds for skin care.

KEYWORDS: MACROALGAE; MARINE NATURAL PRODUCTS; ANTIMICROBIAL; SKIN MICROBIOME.

Índice

Índice

1.	Introdução.....	37
1.1.	A microbiologia da pele e a sua importância na saúde.....	37
1.1.1.	A pele.....	37
1.1.2.	O papel da microbiota da pele e o desenvolvimento de patologias.....	38
1.1.3.	A indústria cosmética e dermatológica.....	41
1.2.	Compostos de origem marinha e o seu potencial biotecnológico.....	43
1.2.1.	<i>State of art</i> dos produtos naturais de origem marinha e o seu potencial	43
1.2.2.	Os produtos naturais marinhos como agentes antimicrobianos.....	45
1.2.3.	As macroalgas como fonte de agentes antimicrobianos.....	46
2.	Objectivos.....	51
	Objectivos específicos.....	51
3.	Materiais e Métodos.....	55
3.1.	Extração das macroalgas e fracionamento dos extratos.....	55
3.2.	Isolamento de compostos bioativos.....	55
3.3.	Identificação dos compostos isolados.....	56
3.4.	Atividade antimicrobiana.....	57
3.4.1	Meio de cultura.....	57
3.4.2.	Manutenção das culturas microbianas.....	57
3.5.	Avaliação da atividade inibitória da formação de biofilme bacteriano.....	59
3.6.	Avaliação de danos no ADN.....	60
3.7.	Avaliação do efeito dos compostos na membrana celular bacteriana.....	60
3.8.	Tratamento de dados e análise estatística.....	62
4.	Resultados.....	65
4.1.	Isolamento e identificação de compostos bioativos.....	65
4.2.	Avaliação da capacidade antimicrobiana.....	66

Índice

4.3. Atividade inibitória de formação de biofilmes	73
4.4. Avaliação de danos no ADN	77
4.5. Efeito dos compostos na membrana celular bacteriana.....	78
4.5.1. Avaliação de alteração do potencial (Ψ) de membrana	78
4.5.2. Avaliação de indução de danos de membrana	80
5. Discussão de Resultados.....	85
6. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	93
7. Referências Bibliográficas.....	99
Anexos.....	113

Índice de figuras

Índice de figuras

Figura 1.1- Diagrama representativo das camadas estruturais da pele.....	38
Figura 1.2- Lesões provocadas por Hidradenite Supurativa.....	40
Figura 1.3- Representação esquemática das aplicações de compostos de algas.....	46
Figura 3.1 -Esquema representativo do processo de cromatografia em camada fina...55	55
Figura 4.1- Fluxograma de extração e isolamento dos compostos bioativos.....	65
Figura 4.2- Atividade antimicrobiana dos compostos testados contra <i>Staphylococcus hominis</i>	67
Figura 4.3- Atividade antimicrobiana dos compostos testados contra <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Figura 4.4- Atividade antimicrobiana dos compostos testados contra <i>Staphylococcus epidermidis</i>	70
Figura 4.5- Atividade antimicrobiana dos compostos testados contra <i>Cutibacterium acnes</i>	72
Figura 4.6- Capacidade de formação de biofilme de <i>Staphylococcus hominis</i>	74
Figura 4.7- Capacidade de formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Figura4.8- Capacidade de formação de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	76
Figura 4.9- Capacidade de formação de biofilme de <i>Cutibacterium acnes</i>	76
Figura 4.10- Fotografia do gel de agarose após eletroforese.....	77
Figura 4.11-- Potencial (Ψ) de membrana de <i>Staphylococcus hominis</i>	78
Figura 4.12-- Potencial (Ψ) de membrana de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	79
Figura 4.13-- Potencial (Ψ) de membrana de <i>Cutibacterium acnes</i>	80
Figura 4.14- Avaliação dos danos na membrana plasmática.....	81

Índice de tabelas

Índice de tabelas

Tabela 1.1- Compostos de origem marinha usados em medicina	45
Tabela 3.1- Condições de crescimento das espécies em estudo	58

Lista de abreviaturas/ acrónimos

Lista de abreviaturas/ acrónimos

A5- Análogo 5

Abs- Absorbância

CC- Cromatografia em coluna preparativa

Ct- Controlo

DA- Dermatite atópica

DIBAC4(3)- Bis-(1,3-Ácido Dibutilbarbitúrico)Trimetino Oxonol, do inglês

Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol

DMSO- Dimetilsulfóxido

EMA- Agência Europeia de Medicamentos, do inglês *European Medicines Agency*

EPM- Erro Padrão da Média

FDA- Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drugs Administration*

FFUL- Faculdade Farmácia da Universidade de Lisboa

Fl- Fluorescência

¹H-RMN- Ressonância magnética nuclear de protão

HPLC- Cromatografia de alta resolução, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*

HPV- Vírus do Papiloma Humano, do inglês *Human Papillomavirus*

HS- Hidradenite Supurativa

I&D- Investigação e Desenvolvimento

IgE - Imunoglobulina

LB- *Luria Broth*

PBS-Tampão Fosfato Salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PNM's -Produtos Naturais Marinhos

rpm- Rotações por minuto

Lista de abreviaturas/ acrónimos

Sph. A- Sphaerococcenol A

TAE- Tampão Tris Acetato C/ Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA)

TLC- Cromatografia em camada fina, do inglês *Thin Layer Chromatography*

TSB- *Tryptone Soya Broth*

TSYE- *Tryptone Soya Broth* com extrato de levedura a 0,3%

UV- Ultravioleta

VLC- Cromatografia líquida a vácuo, do inglês *Vacumn Liquid Chromatography*

Introdução

1. Introdução

1.1. A microbiologia da pele e a sua importância na saúde

1.1.1. A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha um papel importante na defesa do organismo, protegendo-o de ameaças externas físicas, químicas e biológicas. Este órgão está também envolvido em outras funções básicas à vida, como a regulação da temperatura, a retenção de água no organismo e a síntese de vitamina D (Skowron *et al.*, 2021).

A pele é composta por várias camadas (Figura 1.1), que são diferenciadas entre si, sendo a mais exterior a camada córnea que tem origem na camada inferior chamada de epiderme, composta por três estratos diferentes (basal, espinhoso, granuloso), com capacidade de constante renovação (Bouwstra & Ponc, 2006). A epiderme apresenta uma espessura de, aproximadamente, 30-100 µm sendo considerada a mais resistente (Bouwstra *et al.*, 2006; Geerlig, 2009). É constituída principalmente por queratinócitos, que migram para a camada superior e rapidamente perdem a sua viabilidade, existindo uma renovação constante. Nesta camada podem ainda encontrar-se melanócitos, células de Langerhans e de Merkel, sustentadas através do plasma que circula nos vasos sanguíneos dérmicos.

A camada seguinte designa-se derme e encontra-se ligada à epiderme através da junção dermoepidérmica, que lhe confere adesão, simultaneamente permitindo uma interdinâmica entre camadas, essencial ao controlo de passagem de moléculas entre a derme e a epiderme (Burgeson & Christiano, 1997). A derme encontra-se dividida entre duas regiões anatómicas: derme papilar (mais superficial) e derme reticular (mais profunda). A derme papilar é a camada mais fina da derme, representando cerca de 10% da mesma, maioritariamente formada por fibras elásticas e colagénio. Já a derme reticular é formada por fibras que se encontram orientadas na horizontal e por isso é responsável pelas elasticidade e resistência da pele. Estas camadas trabalham em conjunto na derme,

desempenhando essencialmente uma função mecânica, protegendo os vasos sanguíneos contra danos mecânicos (Geerligts, 2009).

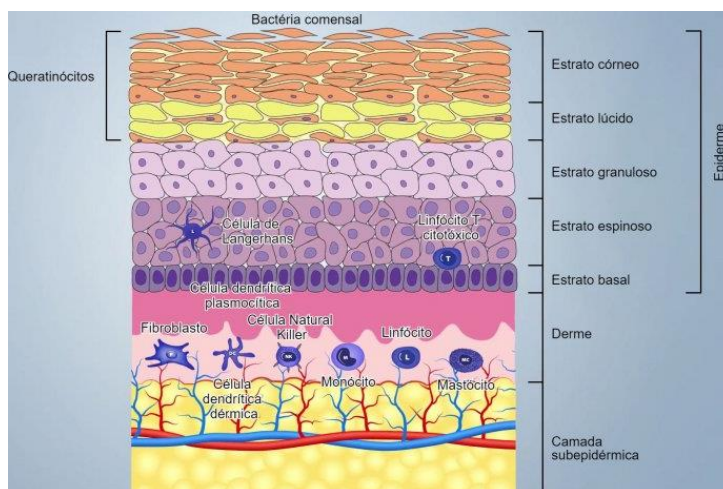


Figura 1.1 - Diagrama representativo das camadas estruturais da pele. Fonte: https://www.3tres3.com.pt/artigos/sistema-imunitario-e-imunidade-no-porco-a-pele_11392/ (Consultado a 21-01-2024)

A camada mais profunda de todas é designada hipoderme, sendo constituída principalmente por tecido conjuntivo e adiposo que faz a divisão entre a derme e a fáscia dos músculos. É influenciada por vários fatores extrínsecos e biológicos como idade, sexo, estado físico e/ ou nutricional do indivíduo. Este tecido é composto principalmente por células vasculares estromais, como leucócitos, fibroblastos e macrófagos (Avram *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2003).

1.1.2. O papel da microbiota da pele e o desenvolvimento de patologias

A pele humana é composta por várias espécies de microrganismos que compõem a sua microbiota. Numa pele saudável, estes microrganismos encontram-se em pleno equilíbrio, no entanto o seu desequilíbrio pode levar ao desenvolvimento de patologias dermatológicas, como a acne, foliculite e psoríase. A manutenção das condições entre o hospedeiro e a sua microbiota é um processo fundamental para uma pele saudável, contudo, a sua constituição pode ser alterada por vários fatores internos, como idade, fatores genéticos, doenças pré-existentes, e externos como pH, humidade e oleosidade. O estudo da microbiota em diferentes zonas da pele, e em diferentes indivíduos, permitiu entender as causas de várias disfunções dermatológicas (Byrd *et al.*, 2018). Entre os

vários microrganismos que habitam a pele, a grande maioria pertence aos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, com distribuições variáveis ao longo de todo o corpo humano. Esta distribuição é intimamente regulada pelas propriedades da pele nesses locais, como a quantidade de sebo, onde há uma predominância de espécies pertencentes ao género *Cutibacterium* (antes conhecido por *Propionibacterium*) e *Staphylococcus*. Por outro lado, zonas de maior humidade como axilas, têm uma predominância de espécies pertencentes a *Corynebacterium* (Schommer & Gallo, 2013).

Uma vez que a constituição da microbiota da pele é influenciada pelas condições do meio circundante, as perturbações no equilíbrio deste poderão resultar no desenvolvimento de doenças ou infeções da pele. Estima-se que a maioria das doenças do foro cutâneo têm alguma ligação subjacente à microbiota, podendo ter origem em vários fatores, como por exemplo as dirupções da própria microbiota, ou a presença de microrganismos estranhos ou comensais, que, por algum motivo, se tornam invasivos, provocando infeção cutânea (Grice & Segre, 2011).

Doenças como a dermatite atópica (DA), acne, psoríase, ou infeções provocadas por um microrganismo invasor, podem ser altamente debilitantes para o doente, sendo necessário o recurso a terapêuticos. A DA, também reconhecida por eczema atópico, é uma patologia inflamatória e crónica da pele, cuja ocorrência tem vindo a aumentar nas últimas décadas, com especial ascensão em países desenvolvidos, resultando em elevados custos em cuidados de saúde (Torres *et al.*, 2019). Esta patologia é provocada pela hipersensibilidade da pele e das membranas mucosas a determinadas substâncias ambientais, o que leva à maior produção de imunoglobulina (IgE). As crises, para além de serem despoletadas pelo contacto com determinadas substâncias, poderão ser ainda originadas por stress ou disfunções da pele, nomeadamente disfunções microbiológicas (Leung, 1999). Contudo as fisiopatologias da DA permanecem em muito desconhecidas. Sabe-se apenas que fatores biológicos e ambientais, bem como as interações entre estes, podem influenciar a ocorrência e o desenvolvimento desta doença (Mohammad *et al.*, 2024).

A acne é uma doença inflamatória cutânea que se manifesta muito comumente na adolescência, atingindo cerca de 85% de jovens em todo o mundo, ocupando a oitava posição das doenças que mais prevalecem globalmente. Esta patologia da pele é complexa e multifuncional, contudo, os mecanismos de infeção envolvidos ainda não são totalmente

Introdução

conhecidos, sabendo-se apenas que o seu processo inflamatório ocorre principalmente nas unidades pilossebáceas, onde se reúnem condições para o seu desenvolvimento, como a elevada concentração de sebo e a presença elevada de *Cutibacterium acnes* (Bernaes Salinas, 2021). A *C. acnes* faz parte da microbiota cutânea, contudo existem fatores que podem promover o seu desenvolvimento descontrolado, o que pode resultar em lesões na pele. Fatores como a interação desta bactéria com os queratinócitos que irão produzir citocinas e ativar uma resposta inflamatória, poderão estar na origem da predisposição do indivíduo para desenvolver acne. No entanto, existem ainda fatores biológicos, como a genética ou fatores imunológicos, que poderão estar envolvidos nesta patologia (Baboo Prasad, 2016).

A hidradenite supurativa (HS) é uma doença inflamatória da pele, também conhecida como acne inversa, que se traduz numa inflamação crónica que provoca um elevado desconforto no doente. A HS predomina em zonas onde ocorra formação de dobras cutâneas, glúteas ou perianais e axilas, tendo um impacto profundo na vida do portador devido à dor que provoca no local das lesões (Figura 1.2) limitando os movimentos, e às secreções libertadas pelas lesões provocadas por esta inflamação. A causa desta patologia pode estar relacionada com variados fatores genéticos, ambientais, hormonais ou distúrbios na microbiota da pele. Estes podem levar à obstrução folicular e a respostas imunológicas, resultando na ativação de citocinas pró-inflamatórias que se traduzem numa inflamação com ocorrência de secreções e cicatrizes irreversíveis (Sabat *et al.*, 2020).



Figura 1.2- Lesões provocadas por Hidradenite Supurativa (Fonte: < <https://skinsight.com/skin-conditions/hidradenitis-suppurativa/> > Consultado: 23/01/2024

Alguns microrganismos comensais da pele não estão diretamente associados a patologias dermatológicas, no entanto, podem desempenhar um papel significativo em outros tipos de infeções. Por exemplo, os microrganismos do género *Staphylococcus* estão implicados em infeções hospitalares adquiridas, as quais podem acarretar consequências graves. Um exemplo prático são os microrganismos *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hominis*. Estes dois microrganismos também fazem parte do microbioma normal da pele, contudo, ambos estão associados a infeções hospitalares frequentemente relacionadas a dispositivos médicos, como cateteres ou instrumentos protésicos utilizados em várias áreas, incluindo a cardiologia. As infeções causadas por estes microrganismos podem resultar em consequências graves, como endocardite ou, em situações mais extremas, septicemia (Singh *et al.*, 2022).

Deste modo, torna-se pertinente a busca por soluções que previnam a disrupção do equilíbrio microbiano da pele, bem como para o controlo de sintomas e tratamento de doenças dermatológicas, sendo este um tópico que merece a atenção da comunidade científica e médica, bem como da indústria cosmética a nível global.

1.1.3. A indústria cosmética e dermatológica

As indústrias cosmética e dermatológica são das que maior valor de mercado tem em todo o mundo, devido ao aumento constante da procura por produtos cosméticos/dermatológicos que promovam o bem-estar e saúde, particularmente nas últimas décadas. O sector dos cosméticos engloba produtos que estão ligados à saúde, beleza e bem-estar da pele, bem como do cabelo e boca. A Europa é o principal produtor de produtos cosméticos, tendo gerado 78.6 mil milhões de euros em 2018. Este é também um setor científico altamente inovador que tem vindo a captar grandes investimentos para investigação e desenvolvimento (I&D), nomeadamente 2.35 biliões de euros em 2017, incluindo 77 novas instalações e envolvendo cerca de 28 800 cientistas que dedicam o seu trabalho ao desenvolvimento de novos produtos (*Socio-Economic Contribution of the European Cosmetics Industry*, 2019).

Os produtos cosméticos, para além de terem um efeito na manutenção da beleza da pele, boca e cabelo, poderão ainda ser úteis como produtos funcionais, auxiliando preventivamente e no tratamento de distúrbios da pele ou cabelo. Este contém ingredientes, como por exemplo, as ceramidas que são lípidos estruturais presentes na

epiderme, desempenhando um papel importante no equilíbrio e hidratação da mesma (Meckfessel & Brandt, 2014). Estas moléculas podem ser encontradas em produtos de cuidado de pele, por exemplo CeraVe™, sendo úteis para o alívio de sintomas relacionados com a doença da psoríase, ou a dermatite atópica (Meckfessel & Brandt, 2014). O ácido gálico é também utilizado nos cosméticos devido às suas propriedades antioxidantes, de proteção contra a radiação UV-B, e capacidade de inibir a melanogénese, mostrando-se um composto interessante para combater a hiperpigmentação (Choubey *et al.*, 2015). Por outro lado, o ácido gálico também demonstrou capacidade antimicrobiana contra microrganismos intervenientes em patologias da pele, nomeadamente contra um fungo patogénico oportunista presente na microbiota da pele, *Candida albicans* (Li *et al.*, 2017) que, para além de ser responsável pela candidíase vaginal, pode afetar outras partes do corpo. Todavia, a medicina enfrenta a crescente problemática relacionada com a evolução das resistências microbianas a antibióticos, que têm vindo a aumentar nos últimos anos, sendo expectável que as doenças infecciosas venham a ser a principal causa de morte no mundo em 2050 (O'Neill, 2016). Este aumento da ocorrência de microrganismos resistentes a antibióticos tem origem em diversos fatores, sendo a principal causa o uso desenfreado destes agentes terapêuticos, não só na saúde humana, mas também na veterinária e na agricultura (Mellon *et al.*, 2004). Por outro lado, a pesquisa por novas terapêuticas antimicrobianas teve o seu auge entre 1960 e 1990, sendo que, desde essa altura, houve um decréscimo significativo de investimento nesta área de investigação (Hutchings *et al.*, 2019; Walsh & Wencewicz, 2013).

Como referido anteriormente, a pele serve de barreira de proteção ao corpo humano, sendo influenciada por variados fatores, como microrganismos, poluição ambiental, tabagismo, má alimentação, radiação UV, assim como a existência de doenças crónicas (Whiting *et al.*, 2024). Esta fragilidade, associada à presença de microrganismos resistentes a antibióticos na microbiota da pele como *Staphylococcus aureus* (Parlet *et al.*, 2019) poderá representar uma problemática para a manutenção do equilíbrio da microbiota cutânea.

Apesar de existirem tratamentos para as doenças cutâneas com origem na microbiota, na maioria das vezes estes apenas atuam no alívio dos sintomas, fazendo com que o paciente tenha reincidências, afetando não só a sua saúde física, mas também a psicológica (Teng *et al.*, 2023). Deste modo, é extremamente importante a pesquisa por novos compostos

bioativos que possam resultar em terapêuticas mais eficazes para uma pele saudável. Por outro lado, dada a crescente consciencialização da necessidade de desenvolvimento de produtos mais sustentáveis, amigos do ambiente e de origem natural, nas últimas décadas observou-se um aumento na prospeção de ingredientes biológicos.

Os cosméticos ou produtos dermatológicos orgânicos trazem consigo benefícios como a diminuição de efeitos secundários e riscos para a saúde a longo prazo, quando comparados aos sintetizados quimicamente, fornecendo assim uma alternativa aos compostos ativos sintéticos. Para obtenção de compostos orgânicos passíveis de serem utilizados na indústria cosmética têm vindo a ser exploradas vários recursos naturais, como as plantas ou, mais recentemente, as algas marinhas (Bharadvaja *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2019). Na verdade, desde os seus antepassados, o ser humano sempre recorreu à natureza, nomeadamente às plantas, para combater doenças, no entanto, com o desenvolvimento de novas tecnologias como equipamentos de mergulho e ROVs (*remoted operated vehicles*), surgiu um novo mundo passível de ser explorado, que oferece estruturas químicas diferentes das biosintetizadas por organismos terrestres (Alves *et al.*, 2020).

1.2.Compostos de origem marinha e o seu potencial biotecnológico

1.2.1. *State of art* dos produtos naturais de origem marinha e o seu potencial

A massa oceânica ocupa cerca de 70% do planeta Terra, representando um habitat muito rico em biodiversidade (Thakur *et al.*, 2005). As espécies que habitam neste meio demonstram ter uma grande capacidade de adaptação às alterações das condições do meio que as rodeia, como alterações na salinidade e pressão na coluna de água, diferenças térmicas, de luz e oxigénio (Jimeno *et al.*, 2004).

Muitos organismos marinhos são sésseis, o que significa que estão fixos no substrato e, portanto, mais vulneráveis a predadores naturais. No entanto, esses organismos desenvolveram mecanismos de defesa química conhecidos como metabolitos secundários para se protegerem (Thakur *et al.*, 2005). Devido à sua incapacidade de locomoção, esses organismos também estão sujeitos às variações do ambiente em seu redor, especialmente as espécies encontradas na zona intertidal. Esta área sofre variações com as marés, expondo as espécies a condições ambientais stressantes (Davison &

Pearson, 1996). Todos esses fatores fazem com que as espécies da zona intertidal sejam alvos particularmente interessantes para explorar novos compostos bioativos para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos (Kumar & Tewari, 2018). Na verdade, os produtos naturais marinhos (PNMs) têm despertado grande interesse na comunidade científica e, por isso, têm sido amplamente explorados para diversas aplicações, tanto na indústria alimentar quanto na formulação de novos fármacos (Kumar & Tewari, 2018) devido às suas propriedades antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas, entre outras (Couceiro, 2014).

Os primeiros compostos marinhos que resultaram no desenvolvimento de fármacos inovadores foram a espongotimidina e a espongouridina, isolados a partir de uma esponja marinha, a *Tectitethya crypta* (Bergmann & Feeney, 1951). Estes permitiram o desenvolvimento de análogos sintéticos com grande atividade biológica, sendo ainda hoje utilizados no meio farmacêutico. A citarabina, um análogo da espongotimidina, é um composto utilizado em casos de leucemia, aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 1969. Já a vidarabina, um análogo da espongouridina, é um antiviral usado em infecções promovidas pelos vírus do herpes simplex e varicela zoster, aprovado pela FDA em 1976 (Bergmann & Burke, 1956; Glaser & Mayer, 2009; Malve, 2016; Sousa, 2021). Quanto à cosmética, os organismos marinhos também demonstraram potencial, por exemplo, flavonoides isolados da macroalga *Monostroma obscurum*, foram inseridos em formulações cosméticas devido à sua ação antioxidante. Extratos de algas também têm vindo a ser utilizados em formulações cosméticas, por exemplo, extratos de *Arthrospira* e *Spirulina platensis* foram utilizados em formulações anti-idade ou extratos de *Ceramium rubrum* em formulações hidratantes (Balboa *et al.*, 2015).

Após a descoberta destes dois compostos, houve uma evolução no uso medicinal de moléculas de origem marinha, especialmente após 2010 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1- Compostos de origem marinha usados em medicina (adaptado de Lu *et al.*, 2021).

Nome do composto	Organismo marinho de origem	Classe química	Área terapêutica	Ano de aprovação (FDA/EMA)
Cefalosporina	Fungo marinho	β - Lactano	Antibacteriano	1965
Rifampicina	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Lactona macrocíclica	Tuberculose	1968
Trabectadina	Tunicado	Alcaloide	Cancro	2007
Carragelose	<i>Chondrus crispus</i>	Monossacarídeo sulfatado	Influenza	2010
Esqualamina	Tubarão	Aminoesterol	Cancro	2016
LAQ824	Espanja	Ácido gordo	Cancro	2018
GV-971	<i>Echlonia kurome</i>	Polissacarídeo	Alzheimer	2019

1.2.2. Os produtos naturais marinhos como agentes antimicrobianos

A atividade antimicrobiana dos compostos de origem marinha é uma das suas notáveis capacidades bioativas, representando um campo de estudo empolgante na comunidade científica. Estudos recentes revelaram que mais de 20.000 compostos isolados de fontes marinhas exibem potencial antibacteriano, evidenciando o vasto potencial desses recursos (Choudhary *et al.*, 2017; Dinarvand & Spain, 2021). Por exemplo, o aminoesterol esqualamina, encontrado em algumas espécies de tubarões, apresentou capacidade antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* (Rao *et al.*, 2000). Os metabolitos secundários de fungos marinhos também são uma fonte de compostos com bioatividades interessantes, inclusive antimicrobiana. O fungo marinho do género *Pestalotia* encontrado na superfície da alga *Rosenvingea* sp., produz pestalona, um composto que exibiu um excelente potencial antimicrobiano contra *S. aureus* resistente a meticiclina e ainda contra *Enterococcus faecium* (Cueto *et al.*, 2001). Os fungos do género *Penicillium*, isolados a partir de um tunicado marinho, apresentam um metabolismo secundário capaz de produzir dois compostos com capacidade antimicrobiana interessante, o penicilosídeo A, que apresentou atividade antimicrobiana

contra *C. albicans* e o penicilósídeo B, que apresentou capacidade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Escherichia coli*.

1.2.3. As macroalgas como fonte de agentes antimicrobianos

As macroalgas são seres aquáticos fotossintéticos, que se encontram divididos em três classes, baseando-se no pigmento fotossintético que possuem, as algas castanhas (*Phaeophyceae*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e algas verdes (*Chlorophyta*). A maior parte das algas são seres sésseis e, por isso, detêm uma grande capacidade de adaptação às condições do ambiente que as rodeiam, encontrando-se distribuídas em diversas localizações do oceano (Biris-Dorhoi *et al.*, 2020). Esses organismos são considerados como alguns dos principais produtores primários no ambiente marinho e a sua composição molecular e nutricional varia de acordo com as características do ecossistema em que vivem. São fontes ricas em moléculas de diferentes classes químicas que têm uma variedade de aplicações potenciais (Figura 1.3), incluindo alimentação humana e animal, biorremediação, biocombustíveis, agricultura, cosméticos, produtos farmacêuticos, produção de biopolímeros naturais como bioplásticos, aquacultura, entre outros (Leandro *et al.*, 2019). As algas, para além serem produtoras de moléculas bioativas com grande

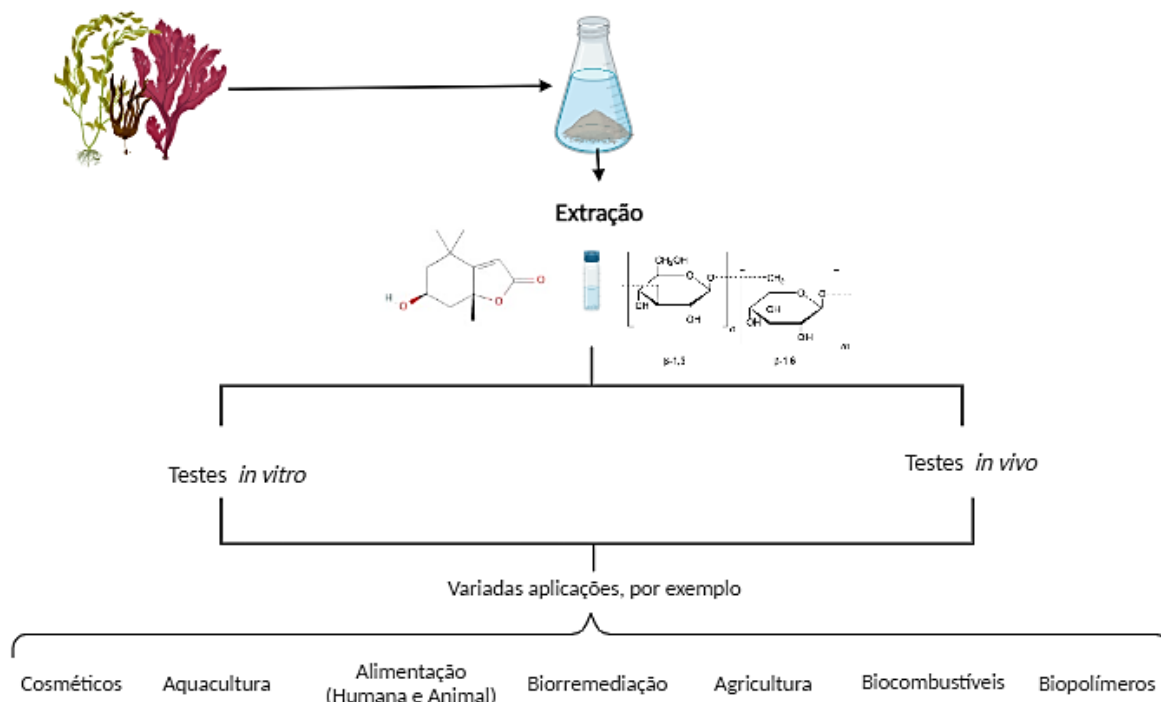


Figura 1.3- Representação esquemática das possíveis aplicações de compostos derivados de macroalgas

potencial biotecnológico com uma grande variedade de aplicações, são consideradas um dos maiores produtores de biomassa no ambiente marinho, proporcionando assim uma grande quantidade de biomassa disponível (Pérez *et al.*, 2016).

De entre as várias classes de moléculas presentes nestes seres, foram já identificadas várias com propriedades benéficas para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos para doenças distintas, como por exemplo os fucoidanos, encontrados principalmente em algas castanhas, os quais demonstraram ter atividade antiviral, anti-inflamatória e anticoagulante (Cumashi *et al.*, 2007; Damonte *et al.*, 2012; Déléris *et al.*, 2016).

A capacidade antimicrobiana dos metabolitos de macroalgas marinhas tem vindo a ser explorada ao longo da última década. No trabalho de Oh *et al.* (2008) foi testada a capacidade antimicrobiana de bromofenóis isolados a partir de uma alga vermelha, a *Odonthalia corymbifera*, que apresentou atividade antimicrobiana contra várias bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas. Por sua vez, Govindasamy *et al.* (2011), avaliaram a capacidade antimicrobiana exibida por compostos encontrados em extratos de três macroalgas, onde o extrato de acetona de *Gracilaria cortiana* demonstrou atividade contra vários microrganismos patogénicos humanos. Outros autores Dhanya *et al.* (2016) demonstraram que os metabolitos secundários de *Ulva reticulata* inibiam significativamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Também Mishra (2018) se dedicou a esta área, tendo avaliado o efeito de extratos de quatro macroalgas recolhidas na costa da Índia, *Gracilaria edulis*, *Sargassum wightii*, *Ulva lactuca* e *Gracilaria cortiana*, contra microrganismos patogénicos humanos, tendo verificado capacidade antimicrobiana contra bactérias como *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Num artigo de revisão (Pérez *et al.*, 2016), os autores debruçaram-se sobre o vasto potencial antimicrobiano de moléculas encontradas em algas marinhas, verificando-se várias classes de moléculas com excelente atividade antimicrobiana, o que suporta, mais uma vez, o potencial destes organismos marinhos como fonte de compostos com aplicação para medicamentos.

Os resultados promissores obtidos na área da saúde, incluindo o combate ao cancro, problemas cardíacos e atividade antibacteriana observada em compostos ou extratos de algas, despertaram o interesse da indústria cosmética em utilizar macroalgas

Introdução

como fonte de compostos benéficos para a incorporação em produtos cosméticos orgânicos. Esses compostos, por serem biologicamente ativos, têm a capacidade de melhorar a saúde da pele, o que vai ao encontro das exigências dos consumidores atuais (Pimentel *et al.*, 2017). Embora muitos cosméticos já contenham extratos de algas, há falta de informação sobre as moléculas bioativas de origem marinha. Neste sentido, é importante caracterizar as substâncias ativas presentes nos extratos de algas, bem como explorar os seus possíveis mecanismos de ação, visando o desenvolvimento de novos produtos cosméticos mais eficazes para o tratamento de patologias infecciosas, reduzindo o uso de substâncias químicas responsáveis por efeitos secundários e nocivas para o meio ambiente (Ariede *et al.*, 2017).

Objetivos

2. Objectivos

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento significativo na importância dada aos cuidados diários da pele, impulsionado pelo crescente interesse dos consumidores sobre o quão crucial é manter a saúde cutânea. No entanto, alcançar uma pele saudável pode ser um desafio devido a vários fatores que a podem prejudicar, como a poluição ambiental e a presença de doenças ou perturbações neste órgão. Assim, é fundamental unir esforços e explorar novas soluções para ajudar as pessoas a melhorar os seus hábitos diários de cuidados com a pele. Por outro lado, existe uma maior consciencialização da sociedade para os impactos negativos induzidos por substâncias químicas poluentes no meio ambiente, bem como para a saúde humana, existindo uma crescente procura por produtos orgânicos naturais e ecologicamente mais sustentáveis. Como resposta, a indústria cosmética tem investido cada vez mais na busca de ingredientes de origem natural que possam ser usados em formulações mais saudáveis e amigas do ambiente. Os organismos marinhos apresentam-se como uma fonte abundante de moléculas bioativas, muitas delas novas para a ciência, que poderão dar resposta às necessidades e desafios da indústria cosmética.

Neste contexto, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar o efeito dos compostos eleganolone, loliolide, Alloaromadendrene, Sphaerococcenol A e um seu análogo, isolados das macroalgas *Bifurcaria bifurcata*, *Codium tomentosum* e *Sphaerococcus coronopifolius*, no crescimento de alguns microrganismos da microbiota da pele, bem como avaliar os possíveis mecanismos de ação dos compostos com maior potencial antibacteriano.

Objetivos específicos

- 1) Extração, fracionamento e isolamento dos compostos acima mencionados a partir das macroalgas em estudo.
- 2) Avaliação da atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos associados a patologias e distúrbios da pele (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* e *Cutibacterium. acnes*).

3) Avaliação do efeitos dos compostos mais bioativos nas células bacterianas:

- a) Indução de danos de ADN bacteriano;
- b) Alterações no potencial da membrana celular;
- c) Indução de danos estruturais na membrana celular.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Extração das macroalgas e fracionamento dos extratos

A extração e o fracionamento das macroalgas *Sphaerococcus coronopifolius*, *Bifurcaria bifurcata* e *Codium tomentosum* foram realizados de acordo com metodologias previamente descritas (Córdoba, 2020; Rodrigues *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2019, 2021).

Os solventes puros e de qualidade HPLC utilizados nos processos de extração, fracionamento e isolamento de compostos foram obtidos de diferentes fornecedores, nomeadamente: Merck (Darmstadt, Alemanha), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), VWR-BDH Chemicals- Prolabo (Leuven, Bélgica) e Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). A água ultrapura (Tipo I) foi obtida num equipamento Advantage A10 Milli-Q Lab Equipment (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.2. Isolamento de compostos bioativos

A cromatografia líquida sob vácuo (VLC-*Vacuum Liquid Chromatography*) foi a primeira técnica cromatográfica utilizada e que permitiu uma separação preliminar dos extratos obtidos, geralmente muito complexos. Como fase estacionária foi usada sílica-gel 60 (0,06-0,2 mm, VWR, Leuven, Bélgica) decorrendo a eluição em gradiente de polaridade com misturas de hexano (*n*-hex): acetato de etilo (EtOAc). A análise do perfil químico das frações foi efetuada por cromatografia em camada fina analítica (TLC-*Thin Layer Chromatography*) (Figura 3.1).

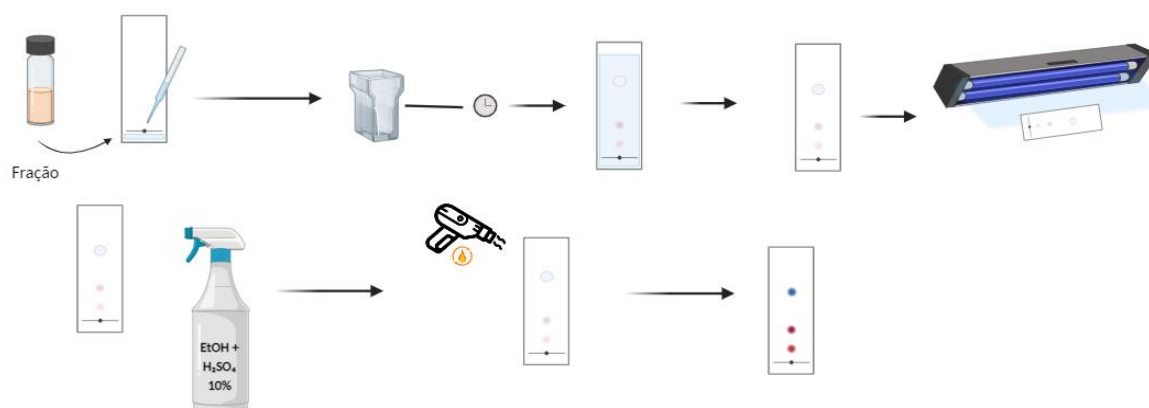


Figura 3.1- Esquema representativo do processo de cromatografia em camada fina

As frações provenientes das VLC foram sujeitas a novas técnicas cromatográficas como a cromatografia preparativa em coluna preparativa (CC) recorrendo ao enchimento de colunas de vidro com sílica-gel (40-63 μm ou 60-120 μm , VWR Chemicals, Leuven, Bélgica), decorrendo a eluição em gradiente de polaridade com misturas de hexano: acetato de etilo e/ou diclorometano: metanol. Em qualquer das separações cromatográficas acima referidas, as frações e/ou produtos puros obtidos foram analisados por TLC (Figura 3.1) através da visualização dos cromatogramas em lâmpada UV (254 nm e 366 nm) e após pulverização (H_2SO_4 10%, em etanol) e aquecimento, permitindo detetar a presença de compostos não ativos no UV.

Outro método cromatográfico aplicado foi a cromatografia em camada fina preparativa sempre que o perfil apresentado na TLC analítica evidenciasse a presença de dois ou três compostos maioritários na composição da fração analisada e uma massa considerável, em regra, superior a 50 mg.

Em alguns casos, para purificações mais finas, usou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- *High Performance Chromatography*) em coluna de fase reversa C_{18} (Synergi Fusion – RP 80 Å, Phenomenex, 250 mm \times 10 mm, 4 μm), recorrendo a um equipamento de HPLC analítico (Hitachi LaChrom Elite, Califórnia, EUA) e semi-preparativo (Extensa LC-4000, Jasco, Japão).

O HPLC analítico permitiu analisar o perfil das amostras e otimizar as condições de separação, enquanto no HPLC semi-preparativo foi possível o isolamento de compostos com maior grau de pureza. Em ambos os casos, a eluição decorreu em regime isocrático ou em gradiente com misturas de acetonitrilo: água.

3.3. Identificação dos compostos isolados

A identificação dos compostos isolados foi efetuada através de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN). Os espetros foram obtidos num equipamento Bruker Avance 400 (Bruker, Madrid, Espanha) a 400.13 MHz. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e os espetros obtidos à temperatura de 25 °C. Os desvios químicos (δ) são expressos em ppm e referenciados ao sinal residual do solvente ($\delta\text{H} = 7.26$ ppm)

3.4. Atividade antimicrobiana

Os compostos isolados foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana contra quatro bactérias Gram positivas, nomeadamente, *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), *Staphylococcus hominis* (DSM 20329), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 1798) e *Cutibacterium acnes* (DSM 1897). Estes microrganismos pertencem à microbiota da pele, sendo grande parte deles comensais, contudo oportunistas, e que podem resultar em infeções problemáticas. Todas as estirpes utilizadas neste trabalho foram obtidas do biobanco Alemão DSMZ- *German Collections of Microorganism and Cell Cultures*.

3.4.1 Meio de cultura

Para o crescimento das bactérias em estudo foram preparados os meios de cultura aconselhados pela DSMZ, nomeadamente, *Luria Broth* (L.B) (VWR Chemicals for Microbiology, Leuven Bélgica), *Tryptone Soya Broth* (TSB) (VWR Chemicals for Microbiology, Leuven Bélgica), *Tryptone Soya Broth with Yeast Extract* (TSYE). No caso de crescimento em placa (meio sólido) foi adicionado 1.5% de agar na preparação dos meios.

3.4.2. Manutenção das culturas microbianas

As condições de crescimento das culturas microbianas encontram-se descritas na Tabela I. No caso da atmosfera de anaerobiose recorreu-se ao sistema Anaerocult A Mini (Merck, Alemanha). Para ter culturas frescas para os ensaios, foi inoculado meio (5 mL) com uma colónia a partir de meio sólido, e incubado nas respetivas condições de crescimento (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Condições de crescimento das espécies em estudo

Microrganismo	Meio de Cultura	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Atmosfera	Tempo de crescimento
<i>S. aureus</i>	LB	37	150	aeróbica	Overnight
<i>S. epidermidis</i>	TSYE	37	150	aeróbica	Overnight
<i>S. hominis</i>	TSYE	37	150	aeróbica	Overnight
<i>C. acnes</i>	TSB	37	150	anaeróbica	2-3 Dias

3.4.3. Realização dos ensaios de atividade antimicrobiana

A capacidade antimicrobiana dos compostos foi testada em *S. aureus*, *S. hominis*, *S. epidermidis* e *C. acnes*. Para cada composto foram testadas 5 concentrações diferentes, nomeadamente, 1, 3, 10, 30, 100 µM, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (VWR, Chemicals BDH®, França). Após o cultivo e crescimento dos microrganismos, os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, adicionando-se 2 µL de cada composto e 198 µL de solução de trabalho (respetivo meio de cultura com microrganismo crescido, ajustado a uma densidade ótica de ≈ 0.15 (600 nm). O DMSO foi utilizado como controlo. Seguidamente, a densidade ótica foi lida no leitor de microplacas (Epoch2™, Biotek Instruments, Vermont, EUA), a um comprimento de onda de 600 nm, obtendo-se a absorvância do tempo inicial da inoculação (t_0).

Incubou-se a 37 °C, e realizou-se uma nova leitura espectrofotométrica na fase exponencial de crescimento de cada microrganismo (t_f).

O crescimento microbiano foi calculado de acordo com:

$$\text{Crescimento microbiano (\% controlo)} = \frac{Abs_{(t_f-t_0)}}{AbsCt_{(t_f-t_0)}} \times 100$$

Onde:

Abs – Absorvância do crescimento microbiano na presença das amostras

AbsCt- Absorvância do crescimento microbiano na presença de DMSO (situação controle)

tf- tempo final

t0- tempo inicial

3.5. Avaliação da atividade inibitória da formação de biofilme bacteriano

Os microrganismos que coabitam, desenvolvem relações de simbiose entre eles, havendo espécies que evoluíram, desenvolvendo a capacidade de formar biofilmes (Davies *et al.*, 1998). As bactérias com capacidade para produzir biofilmes tendem a ser mais resistentes, pois o biofilme, para além de conferir proteção a agentes externos, permite às bactérias permanecerem em dormência, baixando o metabolismo, para quando numa situação favorável, voltarem a proliferar (Hoyle & Costerton, 1991). Este mecanismo de sobrevivência é um desafio para as formulações antimicrobianas, havendo, deste modo, a necessidade de encontrar compostos com capacidade para impedir os mecanismos de produção e desenvolvimento de biofilme.

Para avaliar a capacidade inibitória de biofilmes bacterianos recorreu-se a um protocolo adaptado de O'Toole (2011). Em microplacas de 96 poços foram realizadas diluições sucessivas de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ M. Na situação de controlo, utilizou-se DMSO em vez de amostra. Incubaram-se por 36 horas todas as bactérias, exceto a *C. acnes* que foi incubada durante 4 dias. Terminado o tempo de incubação, o meio de cada poço foi aspirado cuidadosamente, e os poços lavados com 120 μ L de solução salina a 0,85% (m/v). Seguidamente, adicionaram-se 120 μ L de violeta cristal a cada poço a 0,4% (v/v) (QCA, Espanha) e, após 20 minutos, o violeta cristal foi aspirado e os poços lavados com água corrente. Após secagem na câmara de fluxo, adicionaram-se 130 μ L de ácido acético a 30% (v/v) (VRW Chemicals BDH[®], França) e foi realizada a leitura da microplaca no leitor de microplacas (Epoch2[™], Biotek Instruments, Vermont, EUA) a um comprimento de onda de 550 nm.

A formação de biofilmes foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Formação de biofilme (\% controlo)} = \left[\frac{Abs_{teste}}{\bar{x} Abs_{ct}} \right] \times 100$$

Onde:

Abs_{teste}- Absorvância do crescimento microbiano na presença dos compostos

Abs_{ct}- Absorvância do crescimento microbiano na presença de DMSO

3.6. Avaliação de danos no ADN

Com a finalidade de avaliar se os compostos têm potencial para promover danos em ADN bacteriano, efetuou-se um protocolo utilizando ADN plasmídico, ao qual foi adicionado as amostras. Preparou-se um *master mix* com 5 μ L de pADN, 2 μ L de amostra e 13 μ L de água *Mili-Q* que foi incubado por 1 h a 37 °C. A ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, Riedstr, Israel) foi usada como controlo positivo e o DMSO como controlo negativo. Após o tempo de incubação, adicionou-se 3 μ L de *loading buffer* (ThermoScientific, EUA) e carregou-se 10 μ L nos poços de um gel de agarose a 0.8% contendo 5 μ L de *Gel Star DNA Gel Stain* (Lonza, Basel, Suíça). Como referência da corrida, carregou-se o primeiro poço do gel com 5 μ L de Marcador de ADN (Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, ThermoFisher Scientific, EUA). A eletroforese decorreu a 85V por 45 minutos. Os resultados foram visualizados no equipamento no *Gel DOC E3 Imager* (Biorad, Califórnia, EUA).

3.7. Avaliação do efeito dos compostos na membrana celular bacteriana

Os compostos com maior potencial antimicrobiano foram avaliados quanto à sua capacidade para alterar o potencial eletroquímico e para induzir danos na membrana citoplasmática dos microrganismos. Para tal recorreu-se a dois fluoróforos, o DIBAC₄(3) (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol) e o Sytox Green.

É importante avaliar alterações do potencial de membrana uma vez que este influencia uma vasta gama de condições fisiológicas e comportamentais das bactérias (e.g., transportes de membrana, resistência a antibióticos, divisão celular, comunicação elétrica), estando associado a alterações na viabilidade celular das mesmas (Benarroch & Asally, 2020).

1.4.1. Análise do potencial de membrana

O potencial de membrana foi avaliado de acordo com Clementi *et al.* (2014), com algumas modificações. Foram combinados dois corantes fluorescentes, nomeadamente o corante potenciométrico bis- (ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol (DiBAC₄(3)) com o corante de coloração de DNA, iodeto de propídio (PI). Quando as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento, foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes e resuspenso em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) (1x) e a turbidez ajustada a 1,5 unidades de MacFarland. Seguidamente, adicionaram-se 250 µL de solução glucose (1 M), obtendo-se a solução de ensaio. Foram preparados brancos com PBS em vez da suspensão celular. De seguida, 45 µL de DiBAC₄(3) (25 µM) e 90 µL de PI (500 µg/mL) foram adicionados à solução de ensaio e aos brancos, distribuídos em placas pretas de 96 poços (99 µL/poço), e então incubados a 37 °C, 1h, no escuro. No caso do controlo positivo, realizou-se um tratamento térmico a 100 °C por 10 min (permeabilização total da membrana), a um tubo Eppendorf que continha 500 µL de suspensão celular.

Após 1 h, foi lida a fluorescência (excitação λ : 490 nm; emissão λ : 516 nm para DiBAC₄(3)) e (excitação λ : 535 nm; emissão λ : 617 nm para PI) em intervalos de 30 s por 5 min no leitor de placas Synergy H1 (Synergy H1 Multi-Mode, BioTek® Instruments, Winooski, USA). Após concluída esta leitura, foi adicionado 1 µL de cada composto/ DMSO nos poços respetivos e, em seguida, a placa foi lida nos comprimentos de onda anteriormente referidos, por 10 minutos com intervalos de 30 segundos. Os resultados são apresentados em unidades de fluorescência relativa (RFU) DiBAC₄(3).

1.4.2. Avaliação dos danos de membrana

A membrana celular serve de barreira biológica entre o meio intracelular e extracelular, sendo uma barreira seletiva que permite a troca de algumas substâncias entre o interior e o exterior da célula. O confinamento de meio intracelular é importante para a integridade das funções celulares, bem como para a sobrevivência da mesma (Ammendolia *et al.*, 2021).

O *Sytox Green* é um fluoróforo sem capacidade para atravessar as membranas citoplasmáticas, no entanto, quando as membranas são corrompidas, este pode penetrar as membranas ligando-se ao ácido nucleico, emitindo fluorescência.

Os danos de membrana foram avaliados segundo o protocolo de Pinteus *et al.*, (2020), com ligeiras alterações. Após atingirem a fase exponencial de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* resuspendido numa solução salina 0,85% (estéril), ajustando-se a O.D₆₀₀ entre 0,5-0,6 obtendo assim a solução de trabalho. Num volume total de 1000 µL, foram adicionados 10 µL de cada composto (2IC₅₀, IC₅₀ e ½IC₅₀) a 990 µL de solução de trabalho e foram incubados durante 4 h, a 37 °C.

Nos brancos a solução de trabalho foi substituída por solução salina estéril (0,85%). No controlo negativo foi utilizado DMSO em vez da amostra em teste. O controlo positivo foi preparado com tratamento térmico (100 °C por 10 minutos), para induzir a permeabilidade total da membrana. Após este período, as amostras foram posteriormente transferidas para uma microplaca preta de 96 poços, e incubadas com *Sytox™ Green* (2 µM) durante 10 minutos a 37 °C, no escuro. A fluorescência foi medida no leitor de microplacas de fluorescência (Synergy H1 Multi-Mode, BioTek® Instruments, Winooski, USA), (excitação λ: 535 nm; emissão λ: 595 nm). Os danos de membrana foram calculados em % do controlo.

3.8. Tratamento de dados e análise estatística

Foi realizada uma análise estatística dos dados obtidos nos ensaios anteriormente descritos. Com a finalidade de observar as diferenças significativas, quando comparadas aos controlos, foi realizado uma análise de variância unidirecional (ANOVA), com teste de comparações múltiplas de Dunnett. Todos os dados foram verificados quanto à sua normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene). Para obtenção dos valores de IC₅₀, foi utilizado o software GraphPad v8.1 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Califórnia, EUA), através da equação de $y=100/(1+10^{(X-\text{Log IC}_{50})})$. Todos os dados foram obtidos através de, pelo menos, três experiências independentes (n=3) e são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), sendo considerados significativos a um nível de 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados

4. Resultados

4.1. Isolamento e identificação de compostos bioativos

Os compostos foram obtidos segundo os protocolos citados no capítulo 3.1. Para tal, recorreu-se a diferentes técnicas de cromatografia, nomeadamente VLC, TLC, CC e HPLC. Através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e comparação dos dados espectrais (Anexo A) com dados reportados em trabalhos anteriores, foi possível identificar os compostos isolados como sendo: alloaromadendrene, sphaerococcenol A, loliolide e eleganolone. O fluxograma de extração e isolamento de compostos a partir de cada uma das macroalgas encontra-se esquematizado na Figura 4.1.

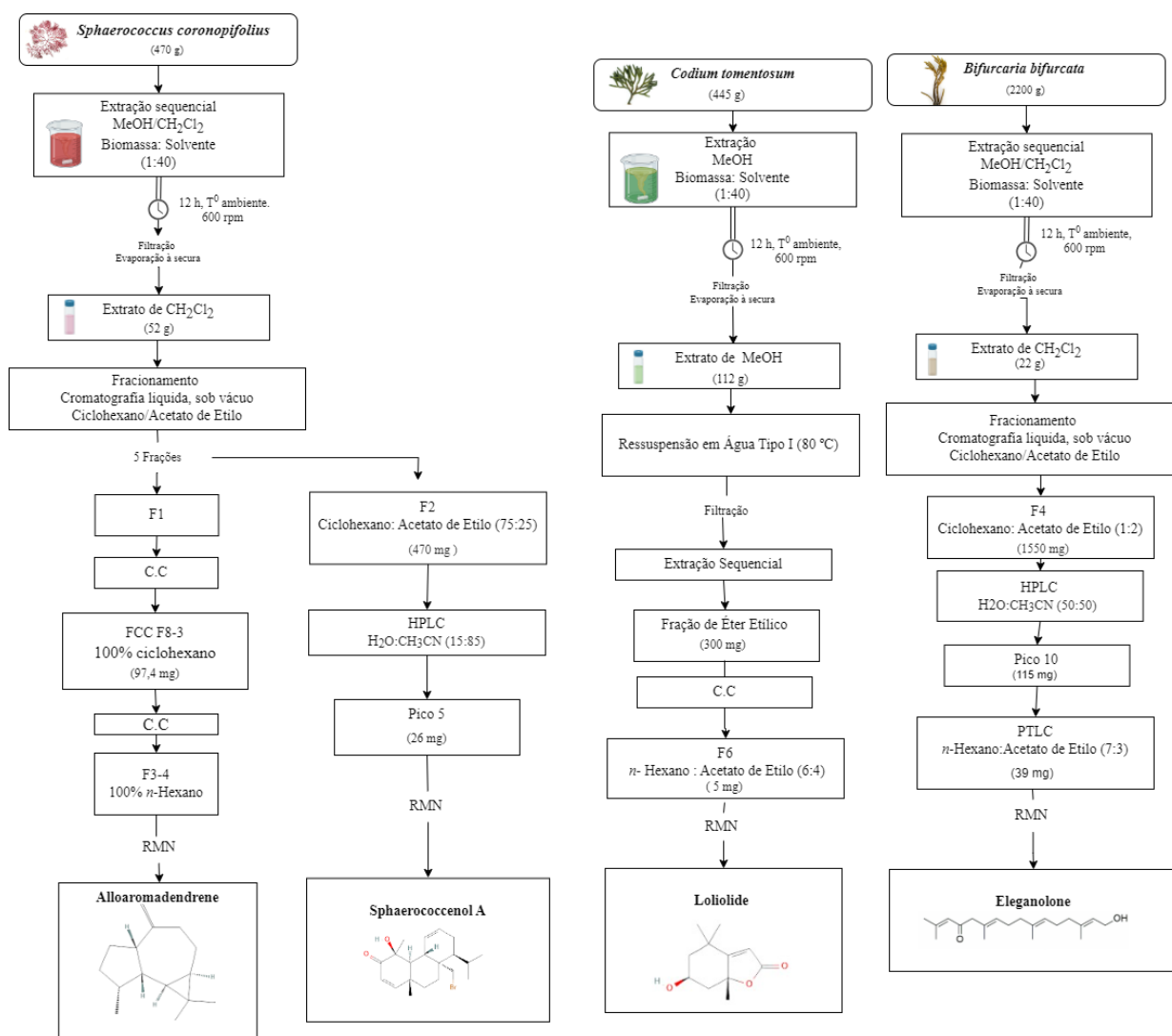


Figura 4.1.- Fluxograma de extração e isolamento dos compostos bioativos

Para além dos quatro compostos naturais marinhos acima mencionados, o composto (3*R*,4*S*,4*aS*,4*bS*,8*S*,8*aS*,10*aR*) -8*a*-(bromomethyl) -8-isopropyl-4,10*a*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,4*b*,7,8,8*a*,9,10,10^a dodecahydrophenanthrene-3,4-diol) designado como “Análogo 5” foi sintetizado quimicamente a partir do bromoditerpeno sphaerococcol A por investigadores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL). A sua estrutura foi também confirmada por ¹H RMN (Anexos) e a atividade biológica igualmente avaliada no decorrer deste trabalho.

4.2. Avaliação da capacidade antimicrobiana

Dada a necessidade de novos ingredientes de origem natural com capacidade antimicrobiana, para combater doenças cutâneas associadas ao desequilíbrio da microbiota da pele, avaliou-se o potencial dos compostos em estudo contra quatro microrganismos, nomeadamente, *S. hominis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, e *C. acnes*. Os resultados obtidos da avaliação da capacidade antimicrobiana dos compostos em estudo, contra *S. hominis* encontram-se expostos na Figura 4.2.

Resultados

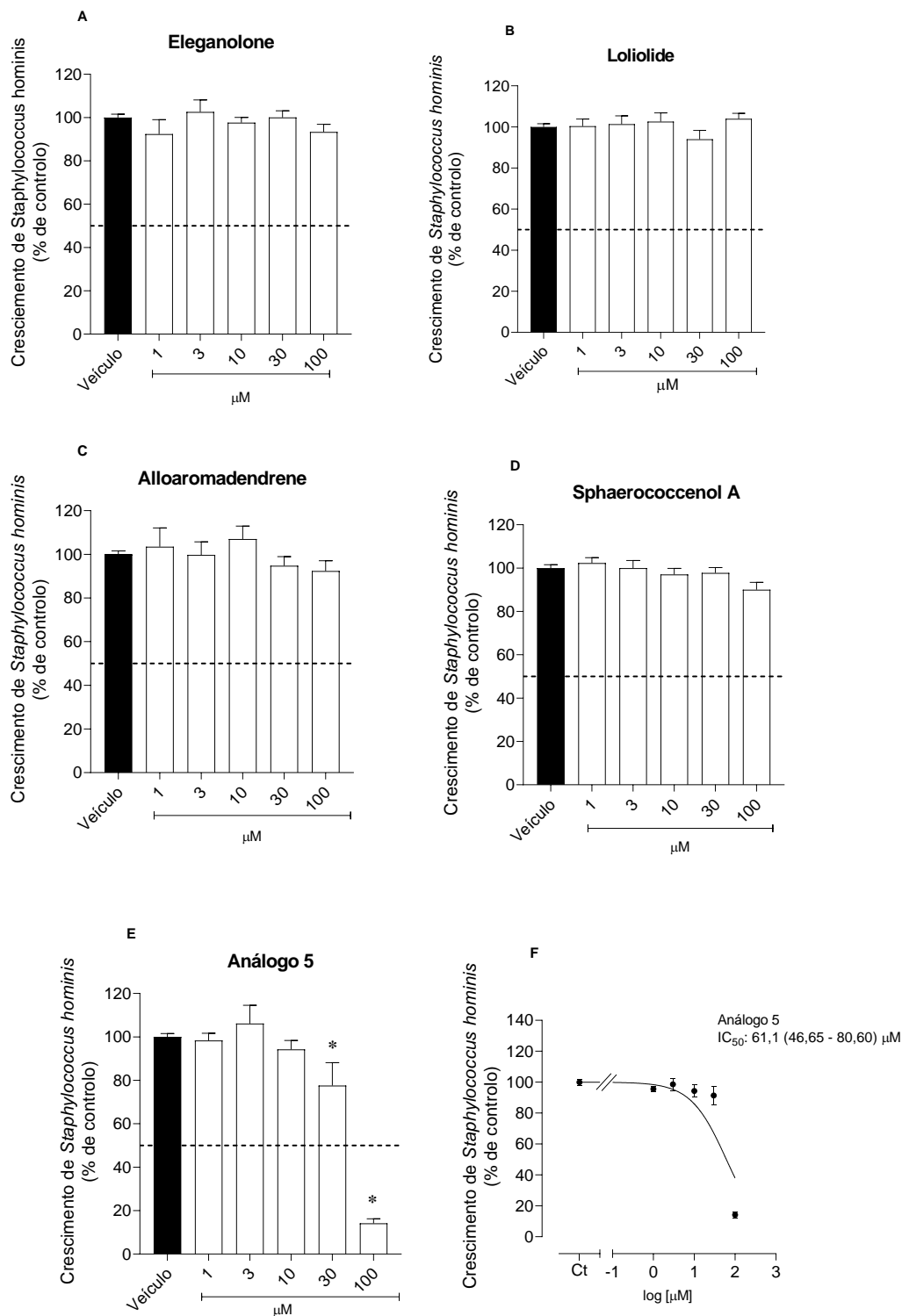


Figura 4.2- (A - E) Atividade antimicrobiana dos compostos testados (1 – 100 μM) contra *Staphylococcus hominis*. DMSO foi usado como veículo. Os resultados são expressos como percentagem do controle (% do controle). Os valores correspondem à média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). * representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o veículo. (F) Curva dose resposta do análogo 5 no crescimento de *Staphylococcus hominis*. Os símbolos representam a média de, pelo menos, 3 experiências independentes, as linhas verticais indicam o erro padrão da média

Resultados

A Figura 4.2 A evidencia a atividade dos compostos nas cinco concentrações testadas contra *S. hominis*. É possível verificar que apenas o análogo 5 reduziu significativamente o crescimento deste microrganismo, com uma inibição de cerca de 85% a 100 μM , tendo sido determinado o valor de IC_{50} de 61,06 μM . Este composto foi sujeito a mais ensaios para tentar avaliar os possíveis mecanismos de ação que poderão estar associados à atividade antimicrobiana apresentada. Os resultados obtidos da avaliação da capacidade antimicrobiana dos compostos em estudo, contra *S. aureus* encontram-se expostos na Figura 4.3.

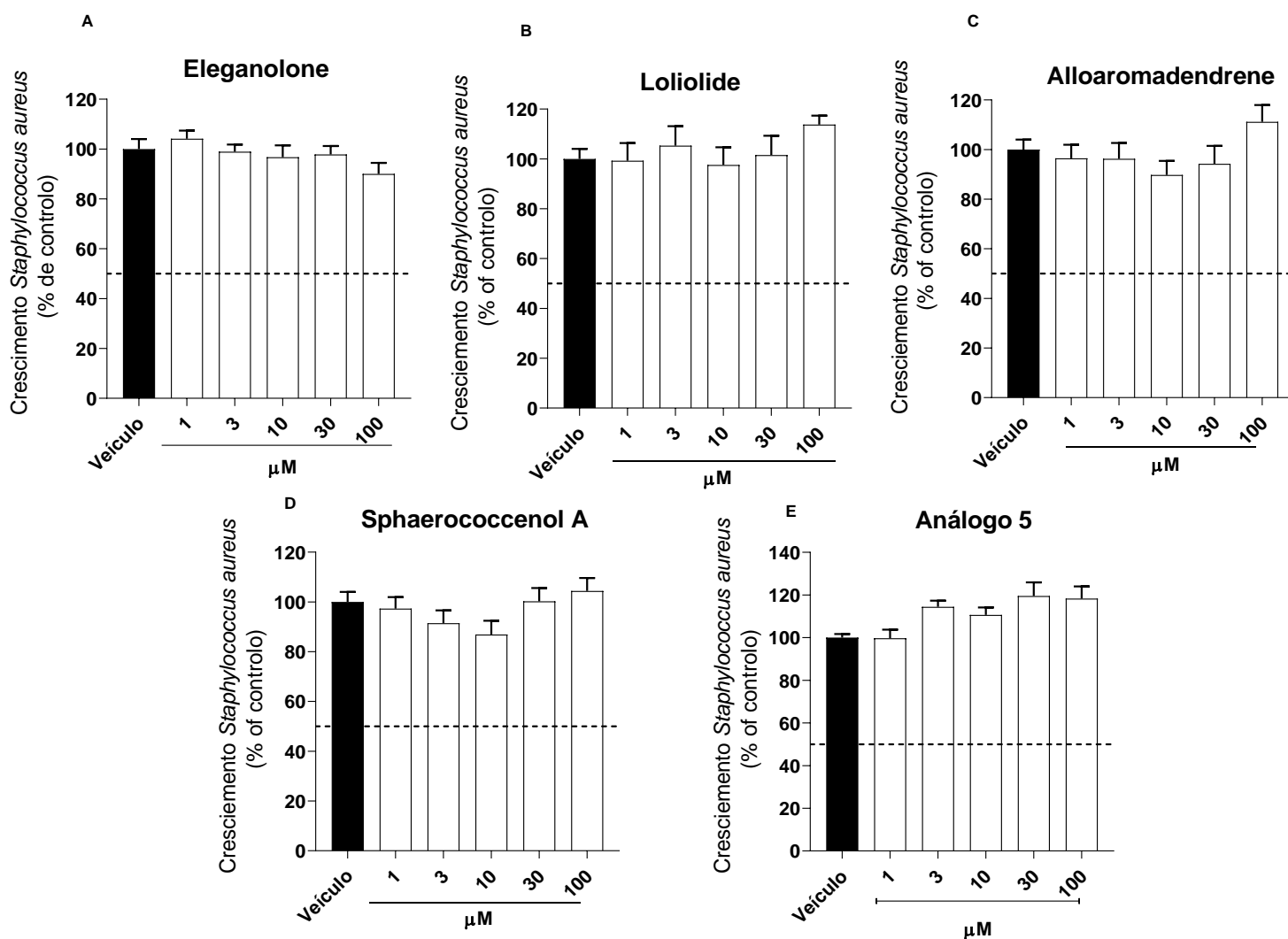


Figura 4.3.(A - E) Atividade antimicrobiana dos compostos testados (1 – 100 μM) contra *Staphylococcus aureus*. DMSO foi usado como veículo. Os resultados são expressos como percentagem do controlo (% do controlo). Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média (EPM) (n=3). * representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $\rho < 0,05$), em comparação com o veículo

Resultados

Na Figura 4.3 estão apresentados os resultados obtidos relativos à capacidade de os compostos em estudo inibirem o crescimento de *S. aureus*, podendo observar-se que nenhum dos compostos apresentou capacidade em inibir o crescimento deste microrganismo nas concentrações testadas. Os resultados obtidos da avaliação da capacidade antimicrobiana dos compostos em estudo, contra *S. epidermidis* encontram-se expostos na Figura 4.4.

Resultados

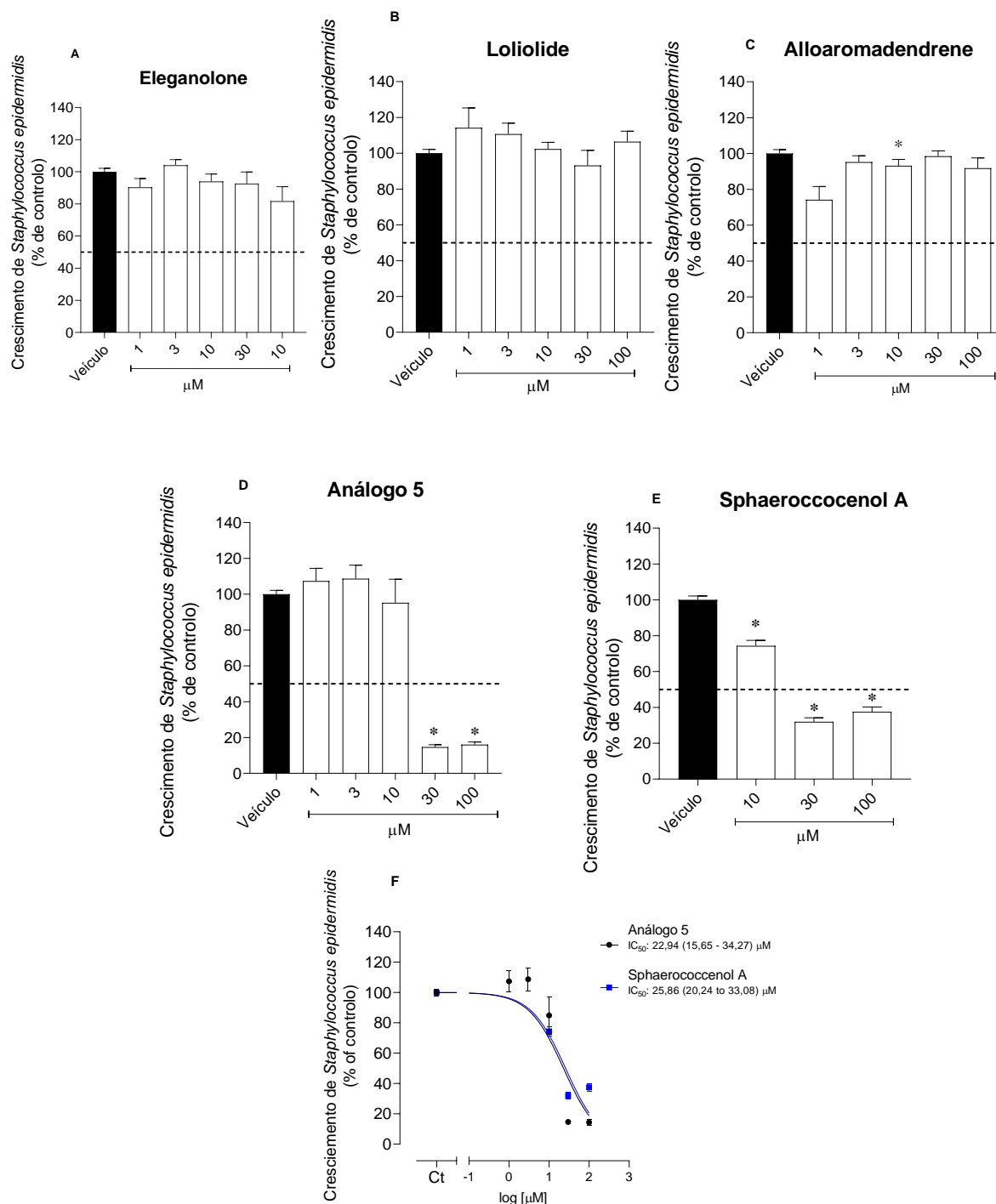


Figura 4.4- (A - E) Atividade antimicrobiana dos compostos testados (1 – 100 μM) contra *Staphylococcus epidermidis*. DMSO foi usado como veículo. Os resultados são expressos como porcentagem do controle. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). * representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o veículo. (F) Curva dose resposta do análogo 5 e sphaerococcenol A no crescimento de *Staphylococcus epidermidis*. Os símbolos representam a média de, pelo menos, 3 experiências independentes, as linhas verticais indicam o erro padrão da média

Analisando os resultados apresentados na Figura 4.4, verifica-se que apenas o sphaerococcenol A e o seu análogo apresentaram atividade antimicrobiana notável contra *S. epidermidis*, reduzindo o seu crescimento em 75% e 85%, respectivamente, nas

Resultados

concentrações de 30 e 100 μM . Para estes dois compostos foi efetuada uma curva dose-resposta tendo-se obtido os valores IC_{50} de 22,94 μM para o análogo 5 e de 25,86 μM para o sphaerococcenol A.

Na Figura 4.5 estão expressos os resultados obtidos da avaliação antimicrobiana dos compostos em estudo contra *C. acnes*.

Resultados

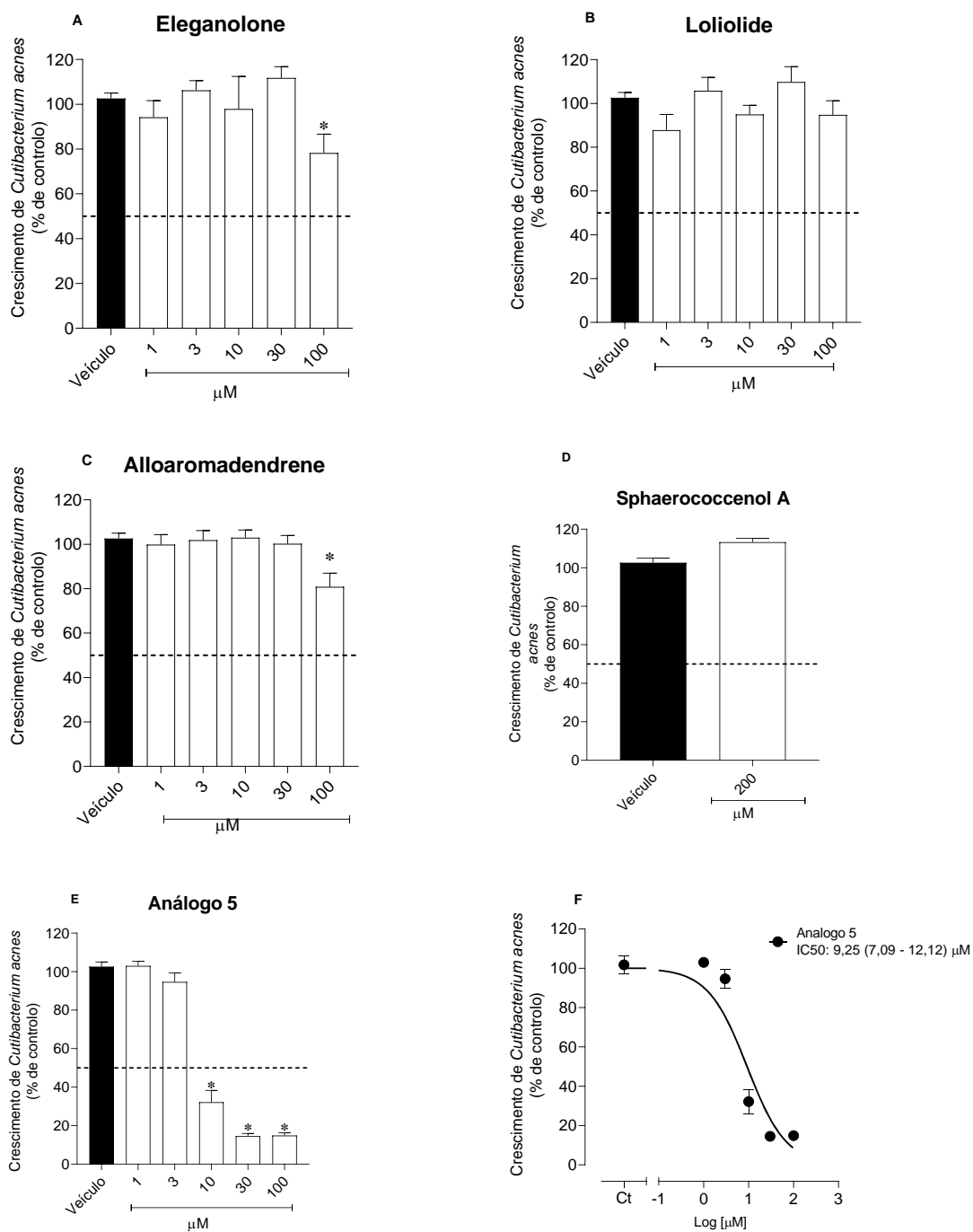


Figura 4.5-(A - E) Atividade antimicrobiana dos compostos testados (1 – 100 μM) contra *Cutibacterium acnes*. DMSO foi usado como veículo. Os resultados são expressos como percentagem do controle (% do controle). Os valores correspondem à média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). * representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o veículo. **(F)** Curva dose resposta do análogo 5 no crescimento de *Cutibacterium acnes*. Os símbolos representam a média de, pelo menos, 3 experiências independentes, as linhas verticais indicam o erro padrão da média

Analisando os resultados obtidos na Figura 4.5, é possível verificar que apenas o análogo 5 demonstrou capacidade de inibir o crescimento de *C. acnes*, nas concentrações de 10, 30 e 100 μM , revelando um valor de IC_{50} de 9,25 μM .

4.3. Atividade inibitória de formação de biofilmes

As populações bacterianas, quando num biofilme, ficam agrupadas entre si e aderentes a uma matriz, criando ligações entre si e/ou a uma superfície (Costerton *et al.*, 2003), o que lhes confere proteção contra agentes externos. Os mecanismos pelos quais algumas bactérias têm capacidade para desenvolver biofilmes é independente das suas estratégias de multiplicação celular. Desta forma, neste trabalho foi também avaliada a capacidade dos compostos em estudo inibirem a formação de biofilmes bacterianos. Para este ensaio foram testados os compostos em cinco concentrações diferentes (6,25; 12,5; 25 ;50 e 100 μM).

Na Figura 4.6 encontram-se expostos os resultados obtidos na avaliação do efeito dos compostos sobre a formação de biofilmes para *S. hominis*.

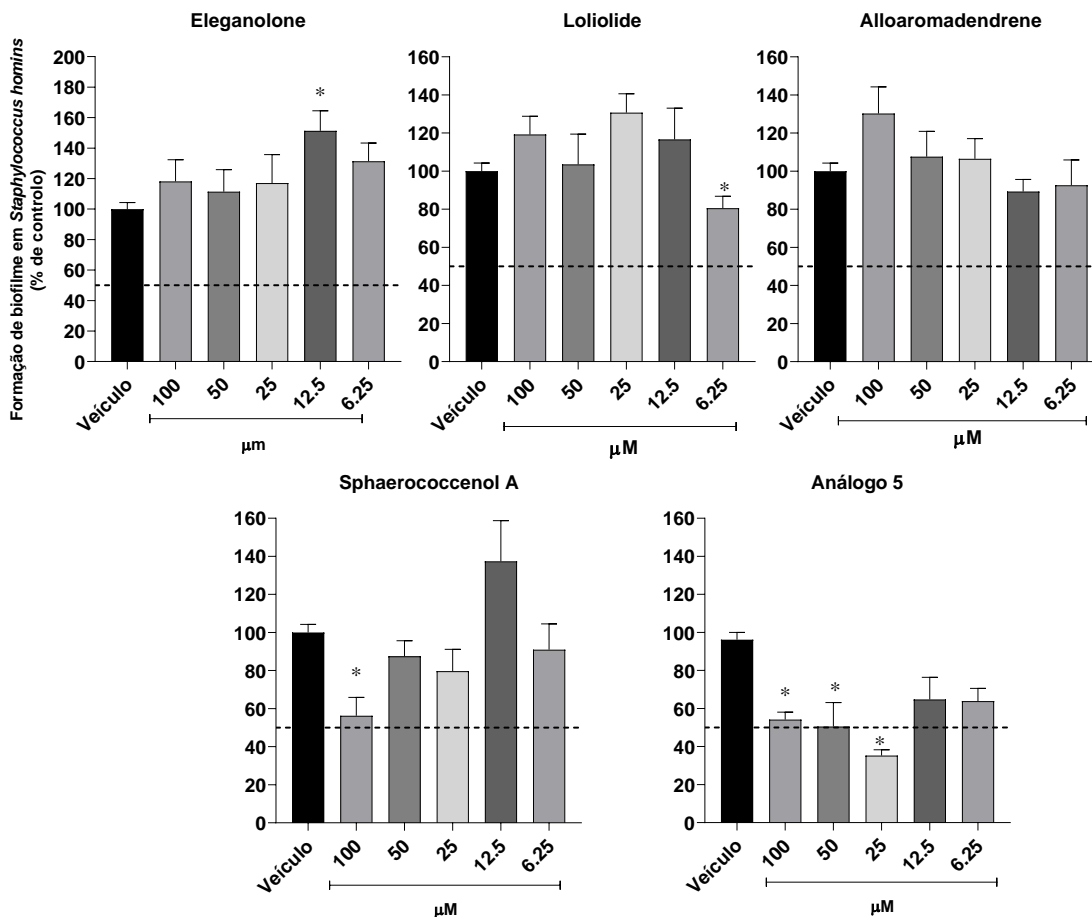


Figura 4.6- Capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus hominis* expressa em %. DMSO foi usado como veículo. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) (n=3), diferenças estatisticamente significativa (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o veículo

Com base na análise da Figura 4.6, verifica-se que apenas dois compostos inibiram a formação de biofilme de *S. hominis*, nomeadamente o sphaerococcenol A (100 μM), e o análogo 5 às concentrações de 25, 50 e 100 μM, sendo notável a concentração de 25 μM, apresentando uma inibição acima dos 50 %. É possível observar ainda que o composto eleganolone, nas concentrações testadas apresentou capacidade de estimular a formação de biofilme em *S. hominis*.

Na Figura 4.7 encontram-se expostos os resultados obtidos na avaliação do efeito dos compostos sobre a formação de biofilmes para *S. aureus*.

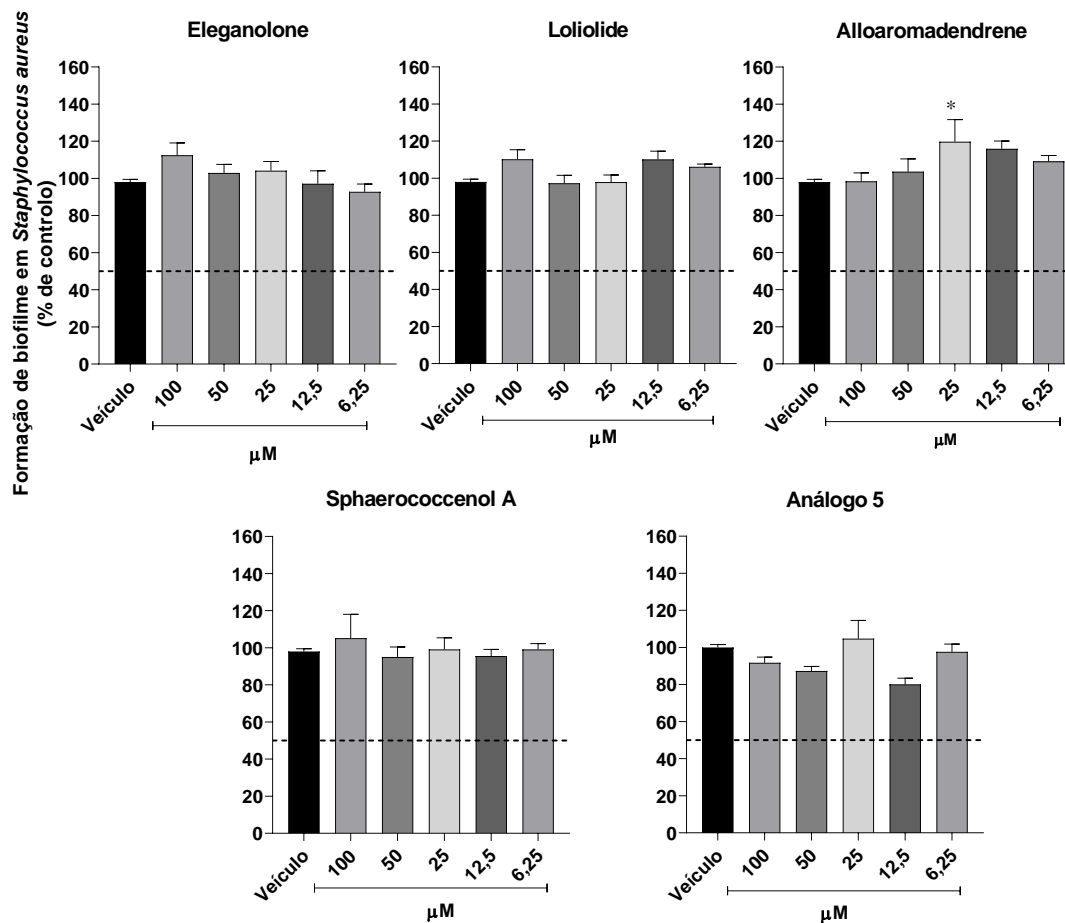


Figura 4.7- Capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* expressa em %. DMSO foi usado como veículo. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) (n=3), * diferenças estatisticamente significativa (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o veículo

A análise da Figura 4.7 revela que nenhum dos compostos testados tem um impacto significativo na inibição da formação de biofilme para *S. aureus*.

Na Figura 4.8 encontram-se expostos os resultados obtidos na avaliação do efeito dos compostos sobre a formação de biofilmes para *S. epidermidis*

Resultados

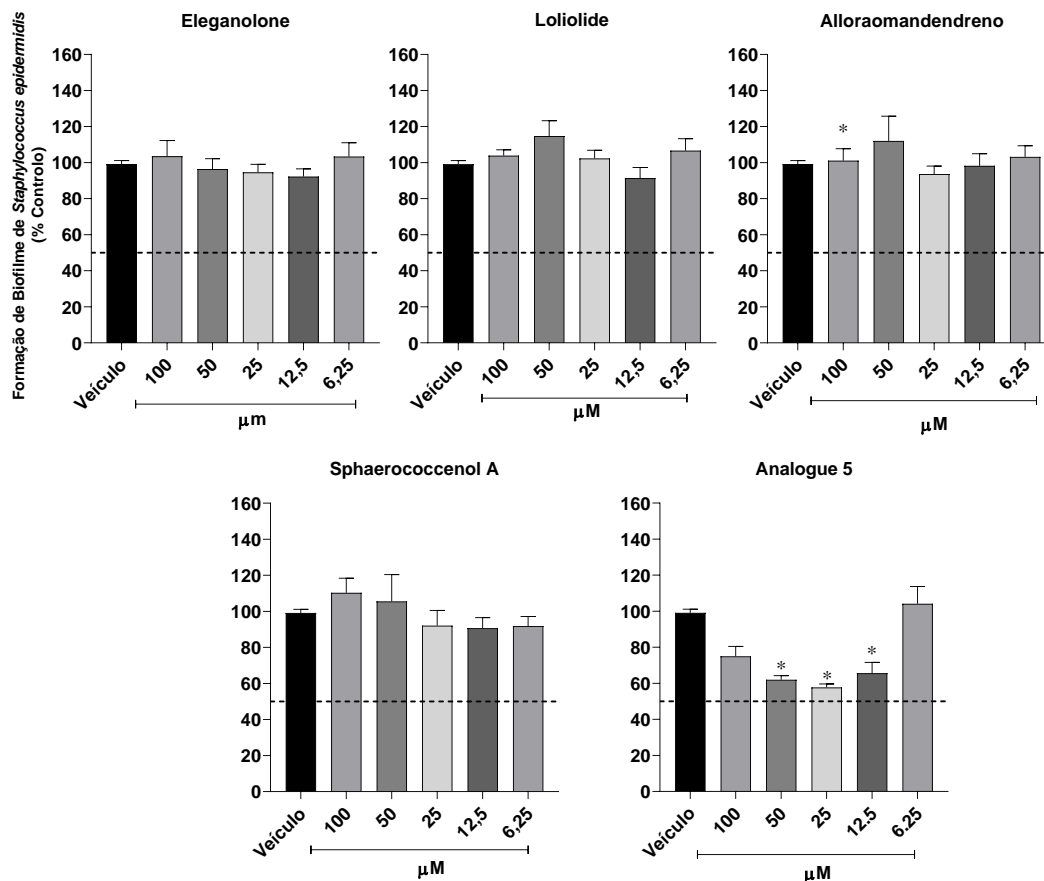


Figura 4.8- Capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* expressa em %. DMSO foi usado como veículo. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) ($n=3$), * representa diferenças estatisticamente significativa (ANOVA, teste Dunnett $p<0,05$), em comparação com o veículo

Avaliando os dados expostos na Figura 4.8, é possível observar que apenas o análogo 5 teve capacidade para inibir a produção de biofilme de *S. epidermidis* às concentrações de 12,5; 25 e 50 μM .

Na Figura 4.9 encontram-se expostos os resultados obtidos na avaliação do efeito dos compostos sobre a formação de biofilmes para *C. acnes*.

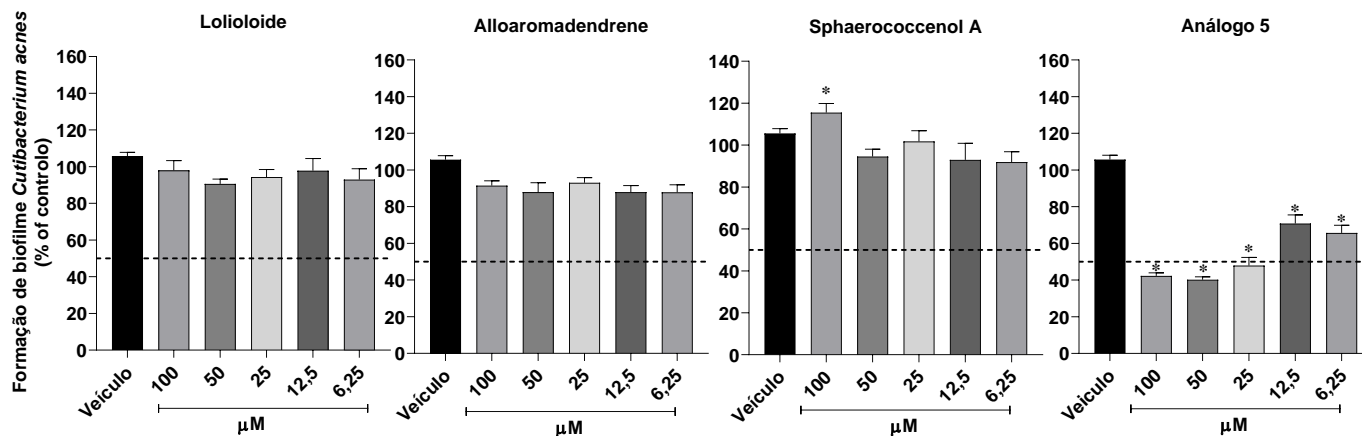


Figura 4.9- Capacidade de formação de biofilme de *Cutibacterium acnes* expressa em %. DMSO foi usado como veículo. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) ($n=3$), * representa uma diferença estatística significativa (ANOVA, teste Dunnett $p<0,05$), em comparação com o veículo

Nos resultados evidenciados na Figura 4.9 é possível observar que, à semelhança dos resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos, o único composto que demonstrou ter efeito na formação de biofilme de *C. acnes* foi o análogo 5. Este efeito foi observado em todas as concentrações testadas, mas apenas a 100, 50 e 25 μM houve uma inibição superior a 50% do biofilme bacteriano.

4.4. Avaliação de danos no ADN

O ADN é uma molécula extremamente importante para os organismos vivos, desempenhando várias funções vitais à sobrevivência. Algumas classes de substâncias antimicrobianas têm como alvo o ADN bacteriano, uma vez que pequenas alterações nesta molécula podem conduzir a latência ou morte celular (Shapiro, 2015).

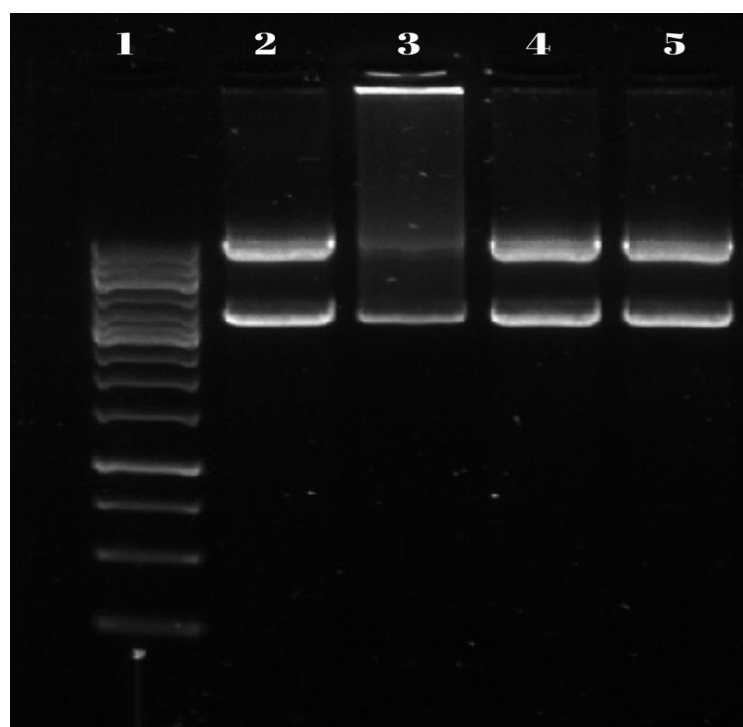


Figura 4.10- Fotografia do gel de agarose após eletroforese. 1- Marcador; 2- Controle negativo (DMSO); 3- Controle Positivo (Ciprofloxacina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 4- Análogo 5; 5- Sphaerococcenol A. A corrida foi efetuada a 85v por 45 min. A imagem foi obtida pelo equipamento Gel DOC E2.

Na Figura 4.10 é possível visualizar as bandas do ADN expostas aos compostos em estudo após eletroforese em gel de agarose. No controle negativo, DMSO, é possível observar bandas do ADN bem definidas, sem arrastamento e com fragmentos mais

pequenos, indicando que não ocorreram danos no ADN. No controlo positivo com ciprofloxacina é possível verificar que houve quebra do ADN, visível pela baixa intensidade da banda e intenso arrastamento. Relativamente ao análogo 5 (poço 4) e ao sphaerococcenol A (poço 5), é possível verificar que ambas as bandas se assemelham com o controlo negativo, não se verificando arrastamento nem bandas com menor intensidade, sugerindo que não induziram danos de ADN.

4.5. Efeito dos compostos na membrana celular bacteriana

4.5.1. Avaliação de alteração do potencial (Ψ) de membrana

Os compostos que tiveram capacidade de inibir em mais de 50% o crescimento de um microrganismo foram investigados quanto ao seu potencial para alterar o potencial de membrana dos microrganismos afetados, dado que este é um mecanismo essencial à multiplicação celular. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 4.11 a 4.13.

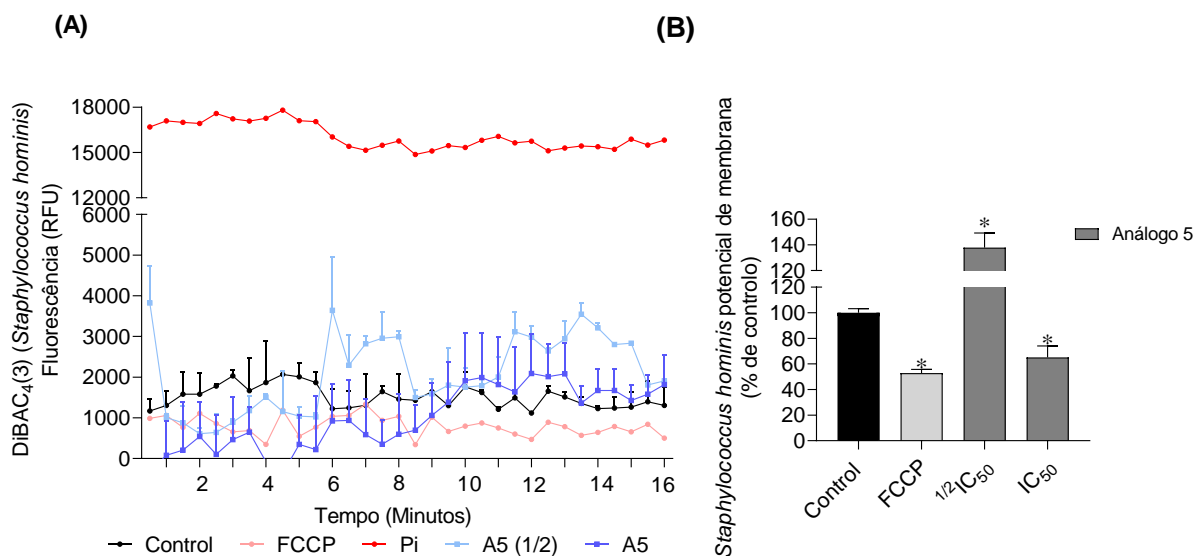


Figura 4.11- Potencial (Ψ) de membrana de *Staphylococcus hominis* quando exposto ao análogo 5 ($1/2IC_{50}$ e IC_{50}), marcado com o fluoróforo DiBAC₄(3); (A) leituras de 10 minutos com intervalos de 30 segundos (B) Alterações do potencial de membrana após 10 minutos. Foi utilizado DMSO como controlo negativo e FCCP (100 μ M) como controlo positivo. Os valores correspondem à média \pm EPM de, pelo menos, 3 experiências independentes. * representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o controlo. # representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o FCCP.

Na Figura 4.11 estão representados os resultados obtidos no protocolo DiBAC₄(3) para o análogo 5 em *S. hominis*. É possível verificar que, à concentração de $1/2IC_{50}$, existe uma despolarização da membrana, uma vez que a fluorescência emitida

Resultados

por estes é superior à do controlo. Já à concentração de IC_{50} os valores apresentados são menores do que os obtidos no controlo e semelhantes aos resultados obtidos na FCCP, sugerindo que existe uma hiperpolarização da membrana, podendo isto significar que a atividade antimicrobiana relatada para este composto possa ter origem nestas alterações de potencial.

(NOTA: Não se testou a $2IC_{50}$ (122 μM) por ser uma concentração superior à máxima definida para este estudo – 100 μM).

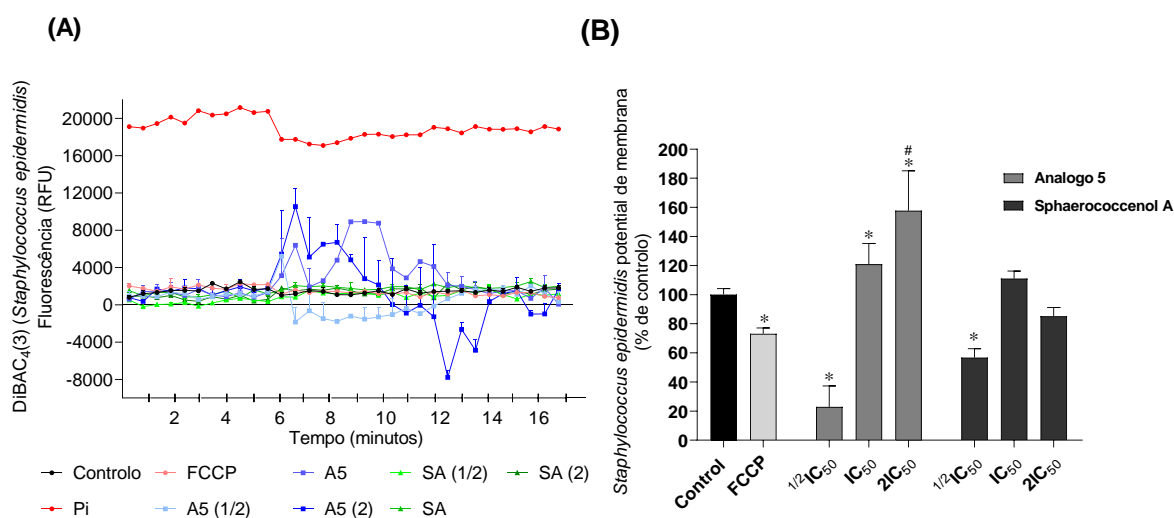


Figura 4.12- Potencial (Ψ) de membrana de *Staphylococcus epidermidis* quando exposto ao análogo 5 às concentrações de $\frac{1}{2}IC_{50}$ (A5 (1/2)), IC_{50} (A5) e $2IC_{50}$, (A5 (2)) e ao sphaerococconol A às concentrações de $\frac{1}{2}IC_{50}$ (SA (1/2)), IC_{50} (SA) e $2IC_{50}$, (SA (2)), marcado com o fluoróforo DiBAC₄(3); **(A)** leituras de 10 minutos com intervalos de 30 segundos **(B)** Alterações do potencial de membrana após 10 minutos. Foi utilizado DMSO como controlo negativo e FCCP (100 μM) como controlo positivo. Os valores correspondem à média \pm EPM de pelo menos 3 experiências independentes* representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o controlo. # representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o FCCP.

Observando os dados de DiBAC₄(3) para *S. epidermidis* (Figura 4.12), é possível notar que o análogo 5, na concentração do IC_{50} , exibe um aumento de fluorescência, indicando uma possível despolarização da membrana, quando comparado aos resultados obtido no controlo. Nas concentrações de $\frac{1}{2}IC_{50}$ e $2IC_{50}$, em comparação com o controlo exibem um valor de fluorescência menor, indicando uma hiperpolarização da membrana, sendo mais evidente este efeito à concentração de $2IC_{50}$. Já com o sphaerococconol A foi apenas notada uma hiperpolarização à concentração de $\frac{1}{2}IC_{50}$, dada a diminuição de fluorescência quando comparada ao controlo e a semelhança da mesma da fluorescência emitida pela FCCP (controlo positivo).

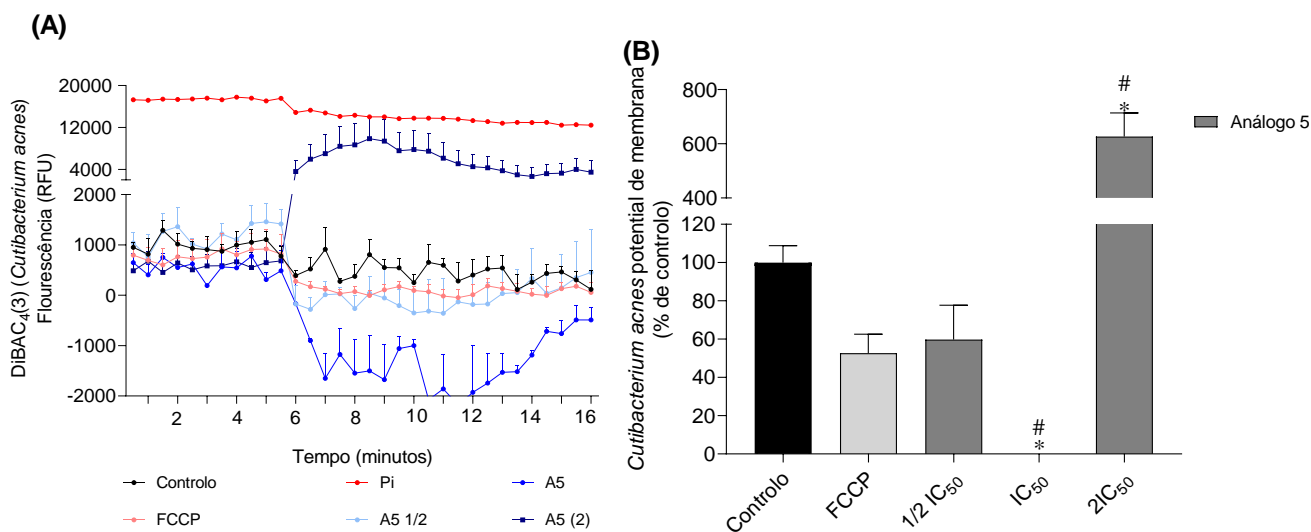


Figura 4.13- Potencial (Ψ) de membrana de *Cutibacterium acnes* quando exposto ao análogo 5 às concentrações de $\frac{1}{2}IC_{50}$ (A5 (1/2), IC_{50} (A5) e $2IC_{50}$ (A5 (2)), marcado com o fluoróforo DiBAC4(3); (A) leituras de 10 minutos com intervalos de 30 segundos (B) Alterações do potencial de membrana após 10 minutos. Foi utilizado DMSO como controlo negativo e FCCCP (1000 μ M como controlo positivo. Os valores correspondem à média \pm EPM de, pelo menos, 3 experiências independentes* representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o FCCCP.

O análogo 5 promoveu uma hiperpolarização da membrana citoplasmática de *C. acnes* (Figura 4.13), sugerido pelo decréscimo de fluorescência às concentrações de $\frac{1}{2} IC_{50}$ e IC_{50} sendo mais marcado na concentração de IC_{50} . Já a $2IC_{50}$ existe uma notória despolarização da membrana, dado que o valor de fluorescência é, em muito, superior ao do emitido na situação controlo.

4.5.2. Avaliação de indução de danos de membrana

Dado que um dos possíveis mecanismos de ação que pode estar associado à inibição do crescimento bacteriano é a indução de danos estruturais na membrana citoplasmática, este mecanismo foi analisado usando o fluoróforo *Sytox Green*. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 4.14.

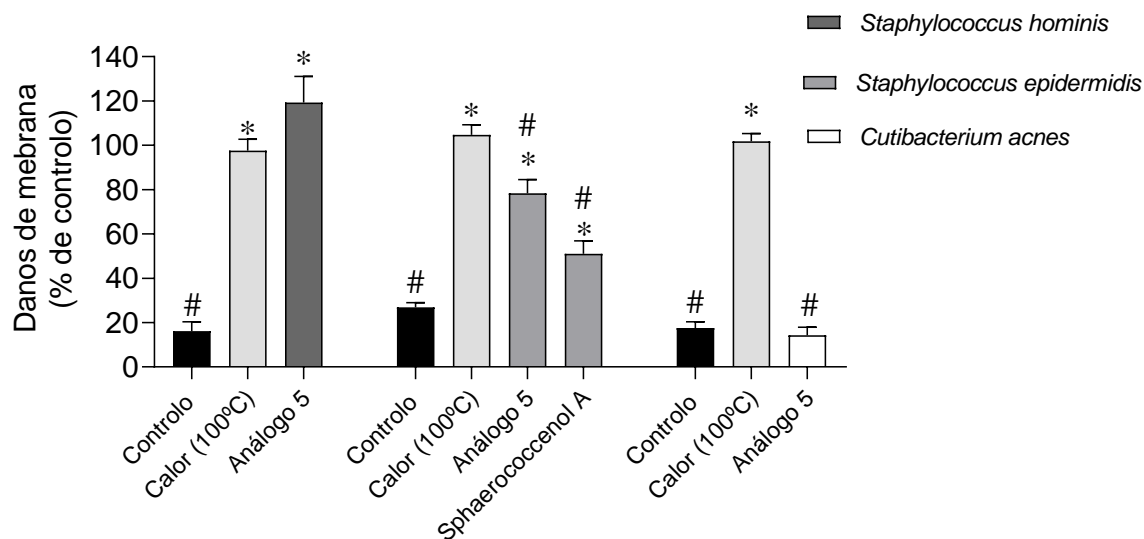


Figura 4.14 Avaliação dos danos na membrana plasmática induzidos pelo análogo 5 (A5) e pelo sphaerococcenol A (S.A) às concentrações de IC₅₀ para cada microrganismo em estudo – *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Cutibacterium acnes*, marcados com *Sytox Green*. DMSO foi utilizado como controlo negativo, sendo o controlo positivo células bacterianas expostas a um tratamento térmico (10 min, 100 °C). Os valores correspondem à média ± EPM de 3 experiências independentes. * representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o controlo. # representa diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste Dunnett $p < 0,05$), em comparação com o FCCP.

Analisando os efeitos do análogo 5 e do sphaerococcenol A na membrana citoplasmática de *S. hominis* (Figura 4.14), é possível verificar que o análogo 5 induziu os danos mais significativos na membrana deste microrganismo, não apresentando diferenças com o tratamento térmico. Relativamente ao *S. epidermidis* foi possível detetar danos promovidos por ambos os compostos, uma vez que os mesmos apresentaram diferenças significativas com o controlo, contudo os danos não são tão marcados como com o tratamento térmico. Já em *C. acnes*, o análogo 5 não demonstrou capacidade de induzir qualquer tipo de danos na membrana deste microrganismo.

Discussão de Resultados

5. Discussão de Resultados

Os organismos marinhos poderão dar resposta às necessidades da indústria cosmética na prospeção de compostos bioativos de origem natural que possam constituir uma alternativa viável aos sintetizados quimicamente que são usados no combate ao envelhecimento cutâneo, ou no tratamento de patologias associadas ao desequilíbrio da microbiota da pele. Deste modo, o objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar a atividade antimicrobiana, e os possíveis mecanismos de ação, de cinco compostos de origem marinha, isolados de macroalgas recolhidas na costa de Peniche, contra microrganismos associados a diferentes patologias ou distúrbios da pele. Os compostos alvo de estudo foram o eleganolone, loliolide, alloaromadendrene, sphaerococcenol A e o seu análogo químico, designado como análogo 5.

A capacidade antimicrobiana dos compostos acima referidos (Figuras 4.2 a 4.5), indicam que apenas dois dos cinco compostos testados apresentaram capacidade em inibir o crescimento dos microrganismos alvo de estudo. O composto sphaerococcenol A inibiu o crescimento de *S. epidermidis*, apresentando um valor de $IC_{50} = 25,66$ (20,24-33,08) μM . Já no caso do análogo 5, foi notável a sua atividade antibacteriana em três microrganismos distintos, nomeadamente contra *S. epidermidis* ($IC_{50} = 22,94$ (15,55-33,08)) μM), *S. hominis* ($IC_{50} = 61,06$ μM (46,65 – 80,60) μM) e *C. acnes* ($IC_{50} = 9,25$ (7,083-12,12) μM).

O composto sphaerococcenol A, um composto isolado a partir da macroalga *S. coronopifolius*, é um bromoditerpeno que já tem vindo a ser estudado, tendo demonstrado potencial antimalárico (Etahiri *et al.*, 2001), antibacteriano e ainda capacidade citotóxica (Alves *et al.*, 2022). Contudo, os mecanismos por detrás destas bioatividades permanecem desconhecidos. O análogo 5 foi obtido a partir do sphaerococcenol A através da substituição do grupo carbonilo por um grupo hidroxilo e por isso considerado um análogo estrutural. Este foi também avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana, sendo o composto em estudo que demonstrou maior potencial antibacteriano. A atividade antimicrobiana exibida pelo análogo 5 foi notória quando comparada com a atividade demonstrada pelo sphaerococcenol A, uma vez que o análogo exibiu atividade antibacteriana contra três microrganismos distintos, especificamente *S. hominis*, *S. epidermidis* e *C. acnes*, enquanto o sphaerococcenol A apenas exibiu atividade contra *S.*

epidermidis. O aumento do espectro de ação poderá estar associado ao novo rearranjo molecular desencadeado pelo grupo hidroxilo introduzido na estrutura do composto em substituição do grupo carbonilo que poderá interagir com as células microbianas, conduzindo à atividade antimicrobiana observada. A investigação de análogos para aplicações terapêuticas já revelou as suas potencialidades. Alguns trabalhos desenvolvidos com análogos, com alterações a nível molecular, potenciaram a atividade antimicrobiana. (Ganellin & Fischer, 2010). Um exemplo é o análogo estrutural do fármaco clorpromazina, a imipramina, que foi projetado como um potente neuroléptico, exibindo propriedades antidepressivas que não foram registadas na clorpromazina (Wermuth, 2006). Conforme mencionado anteriormente, o bromoditerpeno phaecococcenol A e seu análogo demonstraram uma atividade antimicrobiana significativa. Apesar de não existirem referências demonstrando o potencial antimicrobiano destes compostos nos microrganismos aqui testados, existem trabalhos que mostraram a atividade antimicrobiana exibida por extratos da alga *Sphaerococcus coronopifolius*, de onde foi isolado do composto Sphaerococcenol A. No trabalho Bouhlal *et al.*, (2013), os autores demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. hominis* e *S. epidermidis* de extratos de *S. coronopifolius*, indicando que alguns dos compostos, ou combinação de compostos presentes nestes extratos, seriam responsáveis pela atividade antimicrobiana verificada. Estes resultados vão de encontro aos obtidos neste trabalho, onde foi verificada atividade antimicrobiana contra os mesmos microrganismos. Para a bactéria *C. acnes*, existem poucos trabalhos que avaliam o potencial antimicrobiano de extratos de algas vermelhas neste microrganismo, tal como referido no trabalho de revisão de Januário *et al.*, (2021). No entanto, os autores referem também que, apesar de haver um número limitado de estudos que avaliam o potencial das *Rhodophyta*, os estudos disponíveis demonstram uma atividade potente desta classe de macroalgas contra *C. acnes*. Também Jae-Suk Choi *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antimicrobiana de extratos da macroalga vermelha *Symphyclocladia latiuscula* em *C. acnes* e verificaram uma elevada capacidade inibitória, tendo esta capacidade sido relacionada com o teor de bromofenóis detetado nesta alga. Barreto & Meyer (2006) também demonstraram o potencial bactericida e fungicida do composto lanosol isolado de uma macroalga vermelha, *Osmundaria serrata*, contra fungos e bactérias, incluindo *C. acnes*, verificando uma elevada capacidade de inibição do crescimento deste microrganismo, o que suporta os resultados obtidos neste trabalho.

Discussão de Resultados

Como referido anteriormente, a formação de biofilmes bacterianos é outro dos fatores que mais preocupam a comunidade científica, uma vez que estão intimamente relacionados com a capacidade de um dado microrganismo resistir a terapêuticas antimicrobianas (Rather *et al.*, 2021). Os biofilmes são compostos poliméricos, como exopolissacarídeos e proteínas produzidos por algumas bactérias que diminuem a penetração de substâncias antibacterianas (Singh *et al.*, 2022). Estudos estimam que as bactérias com capacidade formadora de biofilmes são responsáveis por 80% das infeções crónicas e 60% de todas as infeções bacterianas humanas, muitas delas em ambientes hospitalares (Assefa & Amare, 2022; Elhabibi T & Ramzy S, 2017; Preda & Săndulescu, 2019). As infeções causadas por microrganismos formadores de biofilmes aumentam significativamente as taxas de mortalidade dos pacientes. As bactérias do biofilme apresentam certas características que as tornam mais resistentes à erradicação (Del Pozo, 2018). Por outro lado, estes biofilmes permitem às bactérias reduzir o seu metabolismo e entrar num estado de latência até as condições do meio ambiente serem mais favoráveis ao seu desenvolvimento, permitindo a sua sobrevivência na presença de substâncias que lhes são nocivas. Na verdade, a capacidade de produzir biofilme está intimamente associada à problemática da resistência dos microrganismos patogénicos a terapêuticas antimicrobianas, sendo um dos principais desafios para a medicina ao nível das doenças infecciosas (Assefa & Amare, 2022). A pele sendo amplamente colonizada por microrganismos tem as condições ideais para a formação de biofilmes bacterianos, sendo esta a forma dominante de crescimento de microrganismos na microbiota da pele (Domenico *et al.*, 2019). Este facto reforça a importância da pesquisa por soluções que inibam a formação de biofilmes em bactérias associadas à microbiota da pele, uma vez que a regulação microbiológica da pele é um dos principais fatores para uma pele saudável. No presente trabalho foi avaliado o potencial dos compostos isolados de macroalgas em inibir a formação de biofilmes pelas bactérias em estudo. Pôde verificar-se que, mais uma vez, o análogo 5 foi o composto que demonstrou ter efeitos notórios na inibição da formação de biofilme em algumas das espécies estudadas, nomeadamente em *S. hominis*, *S. epidermidis* e *C. acnes*. O seu composto de origem, sphaerococcenol A demonstrou apenas atividade de inibição de biofilme em *S. hominis*.

Uma comparação entre os ensaios que avaliam a capacidade de inibição da formação de biofilmes e os ensaios de inibição do crescimento bacteriano livre revelou uma notável similaridade. Isso sugere que, além de inibirem o crescimento dos microrganismos *S.*

Discussão de Resultados

hominis, *S. epidermidis* e *C. acnes*, os compostos em questão, especialmente o sphaerococcol A e seu análogo 5, também têm a capacidade de reduzir a formação de biofilme bacteriano. Embora sejam contextos e as dinâmicas entre microrganismos distintas, essa similaridade de resultados pode ser relevante, considerando que a pele é propícia à formação de biofilmes bacterianos, os quais podem ocasionar problemas microbiológicos cutâneos.

Dentro dos compostos testados não existem, pelo menos até à data, publicações que reflitam sobre o efeito na formação de biofilme bacteriano. A informação sobre extratos ou compostos com origem na macroalga *S. coronopifolius*, também é bastante escassa, porém, existem publicações que demonstram a capacidade de inibição da formação de biofilme bacteriano exibido por alguns extratos/ compostos de algumas algas marinhas vermelhas. O trabalho de Piruthiviraj *et al.*, (2024) demonstrou que a macroalga vermelha, *Amphiroa fragilissima* tem capacidade de inibir a formação de biofilme, por *Staphylococcus* spp. A inibição de formação de biofilme microbiano poderá estar relacionada com alterações no *Quorum-sensing*, que é um mecanismo de comunicação entre as bactérias, fundamental para a produção de biofilme (Da *et al.*, 2013).

Os compostos que diminuía o crescimento antimicrobiano em mais de 50% foram avaliados quanto ao possível mecanismo de ação que poderá estar envolvido na atividade antimicrobiana apresentada, nomeadamente a possibilidade de induzirem danos de ADN, de promover alterações do potencial da membrana citoplasmática ou promover danos estruturais. Para avaliar o efeito dos compostos no ADN bacteriano, recorreu-se a um ADN plasmídico como modelo (Pinteus *et al.*, 2020). Verificou-se que os compostos testados não induziram danos no ADN plasmídico o que sugere que outros mecanismos de ação deverão estar associados à inibição verificada, como interferências na síntese ou na integridade da membrana celular (Hancock & Chapple, 1999; Hooper, 2001).

Para avaliar possíveis alterações nas membranas dos microrganismos, foram efetuados dois ensaios que permitem avaliar diferentes mecanismos, a alteração do potencial de membrana e indução de danos estruturais. O potencial de membrana, representa uma fonte de energia livre que permite às células realizar trabalho químico e mecânico sendo essencial à multiplicação celular, e estando envolvido em vários processos de manutenção das células e da comunicação entre elas, sendo que algum tipo de alteração poderá levar à morte celular (Benarroch & Asally, 2020; Lee *et al.*, 2017; Prindle *et al.*, 2017).

Discussão de Resultados

As diferenças eletroquímicas que existem entre o meio exterior e interior das membranas citoplasmáticas são essenciais para a troca iônica, bem como a sua interação com o potencial de membrana. Estas são essenciais a uma variedade de processos vitais, como sinalização e processamento de informações, o transporte de membrana, a manutenção de homeostase de pH, a motilidade, a resistência aos antibióticos ou a divisão celular, são alguns exemplos de processos que são afetados com estas alterações de potencial (Allison *et al.*, 2011; Benarroch & Asally, 2020). Deste modo, quando este equilíbrio eletroquímico é alterado, quer por despolarização ou hiperpolarização, poderá levar à morte celular.

Com a finalidade de avaliar se os compostos que demonstraram capacidade antimicrobiana induziram alterações no potencial de membrana, recorreu-se à marcação das células com o fluoróforo DiBAC₄(3). Verificou-se que os compostos sphaerococcenol A e o seu análogo, têm potencial para promover alterações no potencial de membrana. O sphaerococcenol A demonstrou capacidade de induzir hiperpolarização da membrana, em metade da concentração IC₅₀, no microrganismo *S. epidermidis*. No caso do análogo 5, foi possível registar uma despolarização da membrana nas concentrações IC₅₀ para *S. epidermidis* e no dobro da concentração IC₅₀ para *S. hominis* e *C. acnes*. Foi possível ainda registar hiperpolarizações da membrana induzidas pelo análogo 5, sendo registada nas seguintes condições: no dobro da concentração IC₅₀ para *S. epidermidis*, na concentração IC₅₀ para *S. hominis* e na metade da concentração IC₅₀ para os microrganismos *S. epidermidis* e *C. acnes*. Estudos anteriores mostraram que os compostos produzidos por algas vermelhas têm capacidade para impactar o potencial de membrana. O trabalho desenvolvido por Matias *et al.* (2022) avaliou a capacidade antimicrobiana de extratos da macroalga *Gelidium corneum* onde se verificou que os dois extratos desta alga promoveram uma hiperpolarização da membrana em *C. acnes* e *S. epidermidis* o que vai de encontro aos resultados obtidos no presente estudo. Outro trabalho onde foram avaliados mecanismos de ação associados à atividade antimicrobiana exibida por óleos essenciais obtidos da macroalga verde *Ulva linza*, contra *E. coli*, demonstrou que a atividade antimicrobiana também está relacionada com alterações do potencial de membrana (Kumar Patra *et al.*, 2015). No trabalho de Juskewitz *et al.*, (2022) foram avaliados vários mecanismos de ação de um composto natural marinho, o lulworthinone que exibiu potencial antimicrobiano, tendo sido verificado que este

composto induz alterações no potencial da membrana celular, podendo ser esta a causa da atividade antimicrobiana registrada.

O confinamento do meio intracelular do meio que o rodeia é uma particularidade globalizada à vida microscópica e, por este motivo, a membrana plasmática desempenha um papel importante na vitalidade e função da sobrevivência celular. Por este motivo alterações na morfologia da mesma podem resultar em morte celular (Ammendolia *et al.*, 2021). Neste sentido, foram avaliados os possíveis danos induzidos pelos compostos que apresentaram maior capacidade antimicrobiana, para se clarificar se as diminuições de crescimento microbiano registrado estão relacionadas com a presença de danos na membrana plasmática.

Recorreu-se ao fluoróforo *Sytox Green* para avaliar se os compostos em estudo induzem danos de membrana nos microrganismos alvo. Este fluoróforo emite fluorescência apenas quando entra em contato com o material genético, o que indica a presença de rutura na membrana. Este fluoróforo não é capaz de atravessar a membrana plasmática das células bacterianas não comprometidas, sendo a única forma de entrar em contato com o material genético através de falhas estruturais na membrana celular das bactérias. Os resultados sugerem que, tanto o análogo 5 como o sphaerococcenol A, induziram danos na membrana citoplasmática de *S. epidermidis*. Em relação a *S. hominis*, o análogo 5 demonstrou capacidade de induzir danos de membrana totais, uma vez que apresenta valores muito próximos aos obtidos no tratamento térmico. Os danos estruturais da membrana celular, dependendo da sua intensidade, desempenham um importante papel na inativação das células microbianas (Pagán & Mackey, 2000). Não existem publicações que avaliem os danos de membrana induzidos por compostos ou extratos de *S. coronopifolius*. No entanto, ao comparar com os resultados obtidos em macroalgas vermelhas, o estudo de Pinteus *et al.*, (2020) demonstrou que frações de *Asparagopsis armata*, uma macroalga vermelha encontrada na costa de Peniche, provocaram danos na membrana em algumas estirpes bacterianas. Embora o uso de compostos de origem marinha demonstre capacidade biológica, muitos dos mecanismos de ação subjacentes à atividade antimicrobiana permanecem desconhecidos, dificultando a compreensão dos mecanismos associados em muitos dos casos relatados.

Conclusões e Perspetivas Futuras

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Devido à elevada procura pelos consumidores de produtos naturais ambientalmente sustentáveis, a indústria cosmética e dermatológica tem concentrado os seus esforços na pesquisa de novos produtos de origem natural que possam ser incorporados em novas formulações com propriedades benéficas para a pele.

A aplicação de compostos isolados de macroalgas marinhas na área dermatológica e cosmética continua a ser pouco explorada, apesar da literatura disponível sobre este recurso demonstrar um excelente potencial, com interesse para várias aplicações neste setor.

O presente trabalho focou-se no estudo do potencial antimicrobiano de compostos isolados das macroalgas *Sphaerococcus coronopifolius*, *Bifurcaria bifurcata* e *Codium tomentosum*. Os resultados obtidos permitiram concluir que, dos cinco compostos estudados, apenas dois revelaram atividade antimicrobiana promissora, os bromoditerpenos sphaerococcenol A e o seu análogo estrutural (Análogo 5). Estes dois compostos demonstraram atividade inibitória no crescimento de células bacterianas bem como na produção de biofilmes, sendo mais evidente a atividade antimicrobiana exibida pelo Análogo 5, sugerindo que a alteração estrutural efetuada no composto sphaerococcenol A aumentou o potencial bioativo. O mecanismo de ação poderá estar associado com perturbações na membrana plasmática dos microrganismos, particularmente relacionadas com alterações no potencial de membrana.

Como trabalho futuro, seria importante avaliar o potencial antimicrobiano dos compostos aqui estudados em contextos para além da microbiota da pele, bem como a sua avaliação contra diversos tipos de microrganismos patogénicos, tais como fungos ou bactérias Gram-negativas. Isto é particularmente relevante visto que, no estudo atual, as bactérias investigadas são todas Gram-positivas. A investigação da capacidade antimicrobiana contra bactérias patogénicas Gram-negativas, como *Salmonella* sp. ou *Klebsiella* sp. é aliciante devido à presença de uma parede celular protetora, ausente nas bactérias Gram-positivas. Seria de interesse avaliar se os compostos em análise mantêm

alguma capacidade de interação com a parede celular ou com os processos biológicos associados a este tipo de bactérias.

De qualquer forma, a avaliação da atividade antimicrobiana desses compostos representa apenas o primeiro passo na investigação sobre seu potencial na indústria cosmética e dermatológica. A continuação do presente trabalho focando outras atividades biológicas interessantes como o seu potencial anti-inflamatório, de fotoproteção e de antienvelhecimento, são apenas alguns exemplos.

Em particular, seria relevante avaliar o poder anti-inflamatório do análogo 5 contra variadas patologias inflamatórias da pele. A acne, relacionada com o microrganismo *C. acnes*, é uma doença inflamatória da pele e, por isso, a avaliação do poder anti-inflamatório deste composto em macrófagos seria interessante, já que o mesmo demonstrou capacidade de inibir o crescimento deste microrganismo. Seria também de interesse avaliar o poder anti-inflamatório contra linhas celulares associadas à psoríase, uma doença inflamatória da pele, uma vez que o aumento da presença de determinados microrganismos como *S. epidermidis* e *S. hominis* foi associado com a inflamação observada a esta patologia. De igual modo, a avaliação do efeito dos compostos sobre os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias seria também uma abordagem a considerar.

Um dos focos da indústria cosmética é a procura de ingredientes que retardem o envelhecimento cutâneo e que ofereçam proteção contra radiação UV. Neste âmbito, seria importante avaliar a capacidade dos compostos em inibirem a formação de espécies reativas de oxigénio induzidos pela exposição a esta radiação bem como a outros fatores externos e internos.

Por último, e não menos importante, a avaliação da citotoxicidade em queratinócitos humanos através diversos ensaios *in vitro*, como por exemplo, o MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) permitirá determinar a concentração não tóxica dos compostos mais promissores antes de serem incorporados em formulações a serem testadas em modelos 3D da pele e/ou *in vivo* em voluntários humanos.

Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho, e as propostas de continuidade do mesmo, poderão dar respostas a várias problemáticas existentes na área da cosmética e dermatologia, ao permitirem clarificar a potencialidade dos compostos estudados relativamente às suas capacidades antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-envelhecimento e de fotoproteção, entre outras. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados em formulações para aplicação tópica, de modo a garantir a viabilidade e segurança destes compostos como ingredientes bioativos em novas aplicações cosméticas e dermatológicas.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Albright, A. L., & Stern, J. S. (1998, May 30). *Adipose Tissue*. Encyclopedia of Sports Medicine and Science. <https://sportssci.org/encyc/adipose/adipose.html>
- Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, *473*(7346), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10069>
- Alves, A., Sousa, E., Sousa, E., Kijjoo, A., Pinto, M., & Pinto, M. (2020). Marine-Derived Compounds with Potential Use as Cosmeceuticals and Nutricosmetics. *Molecules* *2020*, *Vol.* *25*, *Page* *2536*, *25*(11), 2536. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25112536>
- 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>
- Ammendolia, D. A., Bement, W. M., & Brumell, J. H. (2021). Plasma membrane integrity: implications for health and disease. *BMC Biology* *2021* *19*:1, *19*(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/S12915-021-00972-Y>
- Assefa, M., & Amare, A. (2022). Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. *Infection and Drug Resistance*., *15*, 5061–5068. <https://doi.org/10.2147/IDR.S379502>
- Avram, A. S., Avram, M. M., & James, W. D. (2005). Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *53*(4), 671–683. <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2005.05.015>
- Baboo Prasad, S. (2016). Acne vulgaris: A review on pathophysiology and treatment. *Asian Journal of Phamaceutical And Clinical Research*, *9*(4), 54–56. <https://www.researchgate.net/publication/305542890>

Referencias Bibliográficas

- Balboa, E. M., Conde, E., Soto, M. L., Pérez-Armada, L., & Domínguez, H. (2015). Cosmetics from Marine Sources. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, 1015–1042. https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_44
- Barreto, M., & Meyer, J. J. M. (2006). Isolation and antimicrobial activity of a lanosol derivative from *Osmundaria serrata* (Rhodophyta) and a visual exploration of its biofilm covering. *South African Journal of Botany*, 72(4), 521–528. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2006.01.006>
- Benarroch, J. M., & Asally, M. (2020a). The Microbiologist's Guide to Membrane Potential Dynamics. *Trends in Microbiology*, 28(4), 304–314. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.12.008>
- Benarroch, J. M., & Asally, M. (2020b). The Microbiologist's Guide to Membrane Potential Dynamics Trends in Microbiology. *Trends in Microbiology*, 28(4). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.008>
- Bergmann, W., & Burke, D. C. (1956). Contributions to the Study of Marine Products. XL. The Nucleosides of Sponges. IV. Spongosine. *Journal of Organic Chemistry*, 21(2), 226–228. https://doi.org/10.1021/JO01108A020/ASSET/JO01108A020.FP.PNG_V03
- Bergmann, W., & Feeney, R. J. (1951). Contributions to the study of marine products. XXXII. the nucleosides of sponges. I. *Journal of Organic Chemistry*, 16(6), 981–987. https://doi.org/10.1021/JO01146A023/ASSET/JO01146A023.FP.PNG_V03
- Bernales Salinas, A. (2021). Acne vulgaris: role of the immune system. *International Journal of Dermatology*, 60(9), 1076–1081. <https://doi.org/10.1111/IJD.15415>
- Bharadvaja, N., Gautam, S., & Singh, H. (2023). Natural polyphenols: a promising bioactive compounds for skin care and cosmetics. *Molecular Biology Reports*, 50(2), 1817–1828. <https://doi.org/10.1007/S11033-022-08156-9/TABLES/3>
- Biris-Dorhoi, E. S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., Socaci, S. A., & Farcas, A. C. (2020). Macroalgae—A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 3085*, 12(10), 3085. <https://doi.org/10.3390/NU12103085>
- Boix-Lemonche, G., Lekka, M., & Skerlavaj, B. (2020). A Rapid Fluorescence-Based Microplate Assay to Investigate the Interaction of Membrane Active Antimicrobial

Referencias Bibliográficas

- Peptides with Whole Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(2).
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9020092>
- Bouhlal, R., Riadi, H., & Bourgougnon, N. (2013). Antibacterial activity of the extracts of *Rhodophyceae* from the Atlantic and the Mediterranean coasts of Morocco. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(6), 2431–2439.
<https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7099/1324>
- Bouwstra, J. A., Pilgram, G. S. K., & Ponec, M. (2006). Structure of the Skin Barrier. In *Skin Barrier* (pp. 65–95). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/B14173-10>
- Bouwstra, J. A., & Ponec, M. (2006, December 1). The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12), 2080–2095. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2006.06.021>
- Burgeson, R. E., & Christiano, A. M. (1997). The dermal-epidermal junction. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5), 651–658. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80118-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80118-4)
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Choubey, S., Varughese, L. R. achel, Kumar, V., & Beniwal, V. (2015). Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 4(4), 305–315. <https://doi.org/10.4155/PPA.15.14>
- Choudhary, A., Naughton, L. M., Montánchez, I., Dobson, A. D. W., & Rai, D. K. (2017). Current Status and Future Prospects of Marine Natural Products (MNPs) as Antimicrobials. *Marine Drugs* 2017, Vol. 15, Page 272, 15(9), 272.
<https://doi.org/10.3390/MD15090272>
- Clementi, E. A., Marks, L. R., Roche-Håkansson, H., & Håkansson, A. P. (2014). Monitoring changes in membrane polarity, membrane integrity, and intracellular ion concentrations in *Streptococcus pneumoniae* using fluorescent dyes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 84. <https://doi.org/10.3791/51008>
- Córdoba, J. J. G. (2020). *Study of the neuroprotective effects of terpenes isolated from the red marine alga Sphaerococcus coronopifolius in an in vitro model of Parkinson's disease* [Master Thesis, Politécnico de Leiria].

Referências Bibliográficas

- <https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/5383/1/Master%2bDissetation%2bJuan%2bGranados%2bCorrigida.pdf>
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (2003). MICROBIAL BIOFILMS. *Annual Review Of Microbiology*, 49, 711–745. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.49.100195.003431>
- Couceiro, T. A. C. (2014). *ESTADO DA ARTE, EM 2013, DOS FÁRMACOS DE ORIGEM MARINHA* [Mestrado, Egas Moniz]. <http://hdl.handle.net/10400.26/13007>
- Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E., & Clardy, J. (2001). Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *Journal of Natural Products*, 64(11), 1444–1446. https://doi.org/10.1021/NP0102713/SUPPL_FILE/NP0102713_S.PDF
- Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D’Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G. E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N. E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S., & Nifantiev, N. E. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17(5), 541–552. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWM014>
- Da, D., Trentin, S., Giordani, R. B., & Macedo, A. J. (2013, January 30). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, 213–236.
- Damonte, E., Matulewicz, M., & Cerezo, A. (2012). Sulfated Seaweed Polysaccharides as Antiviral Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 11(18), 2399–2419. <https://doi.org/10.2174/0929867043364504>
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295–298. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.280.5361.295>

Referencias Bibliográficas

- Davison, I. R., & Pearson, G. A. (1996). STRESS TOLERANCE IN INTERTIDAL SEAWEEDS. *Journal of Phycology*, 32(2), 197–211. <https://doi.org/10.1111/J.0022-3646.1996.00197.X>
- Del Pozo, J. L. (2018). Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 16(1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
- Déléris, P., Nazih, H., & Bard, J. M. (2016). Seaweeds in Human Health. *Seaweed in Health and Disease Prevention*, 319–367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00010-5>
- Dhanya, K. I., Swati, V. I., Vanka, K. S., & Osborne, W. J. (2016). Antimicrobial activity of *Ulva reticulata* and its endophytes. *Journal of Ocean University of China*, 15(2), 363–369. <https://doi.org/10.1007/S11802-016-2803-7/METRICS>
- Dinarvand, M., & Spain, M. (2021). Identification of Bioactive Compounds from Marine Natural Products and Exploration of Structure-Activity Relationships (SAR). *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 337, 10(3), 337. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10030337>
- Domenico, E. G. Di, Cavallo, I., Capitanio, B., Ascenzioni, F., Pimpinelli, F., Morrone, A., & Ensoli, F. (2019). *Staphylococcus aureus* and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7090301>
- Elhabibi T, & Ramzy S. (2017). Biofilm Production by Multi Drug Resistant Bacterial Pathogens Isolated From Patients in Intensive Care Units in Egyptian Hospitals. *J Microb Biochem Technol*, 9(4), 4. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000359>
- Etahiri, S., Bultel-Poncé, V., Caux, C., & Guyot, M. (2001). New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Journal of Natural Products*, 64(8), 1024–1027. <https://doi.org/10.1021/NP0002684>
- Ganellin, C. R., & Fischer, J. (2010). Analogue-based Drug Discovery. *Chemistry International - Newsmagazine for IUPAC*, 32(4), 12–15. <https://doi.org/10.1515/CI.2010.32.4.12>
- Geerligs, M. (2009). *Skin layer mechanics* [Phd]. Eindhoven University.

Referencias Bibliográficas

- Glaser, K. B., & Mayer, A. M. S. (2009). A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology*, 78(5), 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.015>
- Govindasamy, C., Narayani, S., Arulpriya, M., Ruban, P., Anantharaj, K., & Srinivasan, R. (2011). In vitro antimicrobial activities of seaweed extracts against human pathogens. *Journal of Pharmacy Research*, 4(7), 2076–2077.
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 2011 9:4, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Gupta, P. L., Rajput, M., Oza, T., Trivedi, U., & Sanghvi, G. (2019). Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. *Natural Products and Bioprospecting*, 9(4), 267–278. <https://doi.org/10.1007/S13659-019-0215-0/TABLES/3>
- Hancock, R. E. W., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1317–1323. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1317/ASSET/DB3C29FA-721B-4334-A5B8-2DCD31ABF10F/ASSETS/GRAPHIC/AC0690761002.JPEG>
- Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 32(Supplement_1), S9–S15. <https://doi.org/10.1086/319370>
- Hoyle, B. D., & Costerton, J. W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research. Fortschritte Der Arzneimittelforschung. Progres Des Recherches Pharmaceutiques*, 37, 91–105. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7139-6_2
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2019.10.008>
- Jae-Suk Choi, Hee-Jung Bae, Sung-Jo Ki, & In Soon Choi. (2011). In vitro antibacterial and anti-inflammatory properties of seaweed extracts against acne inducing bacteria, *Propionibacterium acnes*. *Journal of Environmental Biology; Lucknow*, 32(3), 313–318. <https://www.proquest.com/docview/876868469?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true&sourcetype=Scholarly%20Journals>

Referencias Bibliográficas

- Januário, A. P., Félix, R., Félix, C., Reboleira, J., Valentão, P., & Lemos, M. F. L. (2021). Red Seaweed-Derived Compounds as a Potential New Approach for Acne Vulgaris Care. *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 1930, 13(11), 1930. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13111930>
- Jimeno, J., Faircloth, G., Sousa-Faro, J. F., Scheuer, P., & Rinehart, K. (2004). New Marine Derived Anticancer Therapeutics — A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Marine Drugs*, 2(1), 14. /pmc/articles/PMC3783878/
- Juskewitz, E., Mishchenko, E., Dubey, V. K., Jenssen, M., Jakubec, M., Rainsford, P., Isaksson, J., Andersen, J. H., & Ericson, J. U. (2022). Lulworthinone: In Vitro Mode of Action Investigation of an Antibacterial Dimeric Naphthopyrone Isolated from a Marine Fungus. *Marine Drugs*, 20(5), 277. <https://doi.org/10.3390/MD20050277/S1>
- Kumar Patra, J., Das, G., & Baek, K.-H. (2015). *Antibacterial mechanism of the action of Enteromorpha linza L. essential oil against Escherichia coli and Salmonella Typhimurium*. <https://doi.org/10.1186/s40529-015-0093-7>
- Kumar, R., & Tewari, A. K. (2018, January 1). Medicinal properties of marine plants. *Synthesis of Medicinal Agents from Plants*, 257–282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102071-5.00011-8>
- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2019). Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Marine Drugs* 2020, Vol. 18, Page 17, 18(1), 17. <https://doi.org/10.3390/MD18010017>
- Lee, D.-Y. D., Prindle, A., Liu, J., & Süel, G. M. (2017). Direct electron transfer through cytochromes and nanowires Soluble redox-active molecules Ion-channel-mediated electrochemical signaling relay SnapShot: Electrochemical Communication in Biofilms. *Cell*, 170, 214-214.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.026>
- Leung, D. Y. M. (1999). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(3), S99–S108. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70051-5](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70051-5)
- Li, Z. J., Liu, M., Dawuti, G., Dou, Q., Ma, Y., Liu, H. G., & Aibai, S. (2017). Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. *Phytotherapy Research*, 31(7), 1039–1045. <https://doi.org/10.1002/PTR.5823>

Referencias Bibliográficas

- Malve, H. (2016). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 8(2), 83–91. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700>
- Matias, M., Pinteus, S., Martins, A., Silva, J., Alves, C., Mouga, T., Gaspar, H., & Pedrosa, R. (2022). Gelidiales Are Not Just Agar-Revealing the Antimicrobial Potential of *Gelidium corneum* for Skin Disorders. *Antibiotics*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040481>
- Meckfessel, M. H., & Brandt, S. (2014). The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *American Academy of Dermatology*, 71(1), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.01.891>
- Mellon, M., Benbrook, C., & Benbrook, K. L. (2004). *Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock*. <https://www.ucsusa.org/resources/hogging-it-estimates-antimicrobial-abuse-livestock#ucs-report-downloads>
- Mishra, A. K. (2018). Sargassum, Gracilaria and Ulva Exhibit Positive Antimicrobial Activity against Human Pathogens. *Open Access Library Journal*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.4236/OALIB.1104258>
- Mohammad, S., Karim, M. R., Iqbal, S., Lee, J. H., Mathiyalagan, R., Kim, Y. J., Yang, D. U., & Yang, D. C. (2024). Atopic dermatitis: Pathophysiology, microbiota, and metabolome – A comprehensive review. *Microbiological Research*, 281, 127595. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2023.127595>
- Oh, K. B., Lee, J. H., Chung, S. C., Shin, J., Shin, H. J., Kim, H. K., & Lee, H. S. (2008). Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(1), 104–108. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2007.11.003>
- O’neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations The Review On Antimicrobial Resistance*.
- O’Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 47. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Pagán, R., & Mackey, B. (2000). Relationship between Membrane Damage and Cell Death in Pressure-Treated *Escherichia coli* Cells: Differences between Exponential-

Referencias Bibliográficas

- and Stationary-Phase Cells and Variation among Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2829. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2829-2834.2000>
- Parlet, C. P., Brown, M. M., & Horswill, A. R. (2019). Commensal *Staphylococci* Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. *Trends in Microbiology*, 27(6), 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>
- Pérez, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2016a). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs* 2016, Vol. 14, Page 52, 14(3), 52. <https://doi.org/10.3390/MD14030052>
- Pérez, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2016b). Marine Drugs Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/md14030052>
- Pimentel, F. B., Alves, R. C., Rodrigues, F., & Oliveira, M. B. P. P. (2017). Macroalgae-Derived Ingredients for Cosmetic Industry—An Update. *Cosmetics* 2018, Vol. 5, Page 2, 5(1), 2. <https://doi.org/10.3390/COSMETICS5010002>
- Pinteus, S., Lemos, M. F. L., Simões, M., Alves, C., Silva, J., Gaspar, H., Martins, A., Rodrigues, A., & Pedrosa, R. (2020a). Marine invasive species for high-value products' exploration – Unveiling the antimicrobial potential of *Asparagopsis armata* against human pathogens. *Algal Research*, 52, 102091. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2020.102091>
- Piruthiviraj, P., Swetha, B. R. M., Balasubramanian, C., Krishnamoorthy, R., Gatasheh, M. K., Ahmad, A., Parthasarathi, R., Pandurangan, P., Bhuvaneshwari, V. K., & Vijayakumar, N. (2024). Exploring the potential: Inhibiting quorum sensing through marine red seaweed extracts – A study on *Amphiroa fragilissima*. *Journal of King Saud University - Science*, 36(4), 103118. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2024.103118>
- Preda, V. G., & Săndulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, 7(3), e10. <https://doi.org/10.15190/D.2019.13>
- Prindle, A., Liu, J., Asally, M., Ly, S., Garcia-Ojalvo, J., & Süel, G. M. (2017). Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Cell*, 214–215. <https://doi.org/10.1038/nature15709>

Referencias Bibliográficas

- Rao, M. N., Shinnar, A. E., Noecker, L. A., Chao, T. L., Feibush, B., Snyder, B., Sharkansky, I., Sarkahian, A., Zhang, X., Jones, S. R., Kinney, W. A., & Zasloff, M. (2000). Aminosterols from the dogfish shark *Squalus acanthias*. *Journal of Natural Products*, *63*(5), 631–635. <https://doi.org/10.1021/NP990514F>
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology* 2021 52:4, *52*(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/S42770-021-00624-X>
- 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* 2015, Vol. 13, Pages 713-726, *13*(2), 713–726. <https://doi.org/10.3390/MD13020713>
- Sabat, R., Jemec, G. B. E., Matusiak, Ł., Kimball, A. B., Prens, E., & Wolk, K. (2020). Hidradenitis suppurativa. *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1, *6*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0149-1>
- Schommer, N. N., & Gallo, R. L. (2013). Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology*, *21*(12), 660–668. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2013.10.001>
- Shapiro, R. S. (2015). Antimicrobial-Induced DNA Damage and Genomic Instability in Microbial Pathogens. *PLoS Pathogens*, *11*(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004678>
- Shen, W., Wang, Z. M., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., Imielinska, C., Ross, R., & Heymsfield, S. B. (2003). Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obesity Research*, *11*(1), 5. <https://doi.org/10.1038/OBY.2003.3>
- Silva, J., Alves, C., Freitas, R., Martins, A., Pinteus, S., Ribeiro, J., Gaspar, H., Alfonso, A., & Pedrosa, R. (2019). Antioxidant and Neuroprotective Potential of the Brown Seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an in vitro Parkinson's Disease Model. *Marine Drugs* 2019, Vol. 17, Page 85, *17*(2), 85. <https://doi.org/10.3390/MD17020085>
- Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Susano, P., Simões, M., Guedes, M., Martins, A., Rehfeldt, S., Gaspar, H., Goettert, M., Alfonso, A., & Pedrosa, R. (2021). Disclosing the

Referencias Bibliográficas

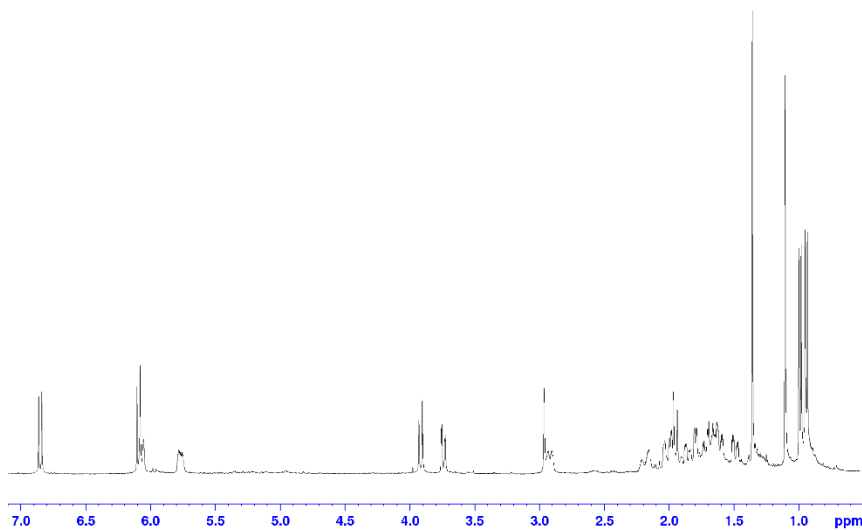
- potential of eleganolone for Parkinson's disease therapeutics: Neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Pharmacological Research*, 168, 105589. <https://doi.org/10.1016/J.PHR.2021.105589>
- Singh, A., Amod, A., Pandey, P., Bose, P., Pingali, M. S., Shivalkar, S., Varadwaj, P. K., Sahoo, A. K., & Samanta, S. K. (2022). Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. *Biomedical Materials*, 17(2), 022003. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/AC50F6>
- Skowron, K., Bauza-kaszewska, J., Kraszewska, Z., Wiktorczyk-kapischke, N., Grudlewska-buda, K., Kwiecińska-piróg, J., Walecka-zacharska, E., Radtke, L., & Gospodarek-komkowska, E. (2021). Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. *Microorganisms 2021, Vol. 9, Page 543*, 9(3), 543. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9030543>
- Socio-Economic Contribution of the European Cosmetics Industry*. (2019).
- Sousa, P. M. I. H. F. De. (2021). *Fármacos de origem marinha: desafios e oportunidades* [Tese de Mestrado]. Universidade de Lisboa.
- Teng, Y., Li, S., Tang, H., Tao, X., Fan, Y., & Huang, Y. (2023). Medical Applications of Hydrogels in Skin Infections: A Review. *Infection and Drug Resistance*, 16, 391–401. <https://doi.org/10.2147/IDR.S396990>
- Thakur, N. L., Thakur, A. N., & Müller, W. E. G. (2005). Marine natural products in drug discovery. *Natural Product Radiance*, 4(6), 471–477.
- Torres, T., Ferreira, E. O., Gonçalo, M., Mendes-Bastos, P., Selores, M., & Filipe, P. (2019). A Dermatite Atópica em Revisão. *Acta Médica Portuguesa*, 32(9), 606–613. <https://doi.org/10.20344/amp.11963>
- Walsh, C. T., & Wencewicz, T. A. (2013). Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *The Journal of Antibiotics 2014 67:1*, 67(1), 7–22. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.49>
- Wermuth, C. G. (2006). Similarity in drugs: reflections on analogue design. *Drug Discovery Today*, 11(7–8), 348–354. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2006.02.006>

Referencias Bibliográficas

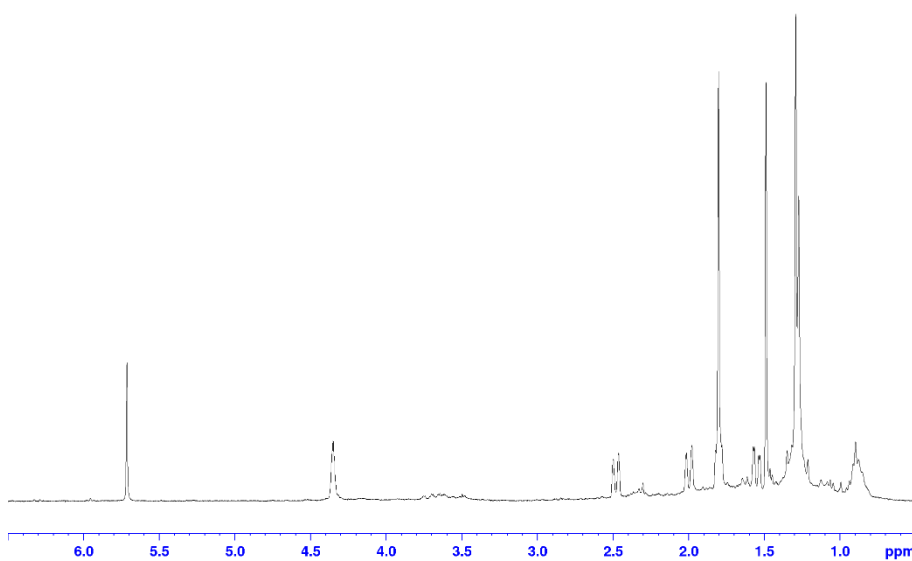
- Whiting, C., Abdel Azim, S., & Friedman, A. (2024). The Skin Microbiome and its Significance for Dermatologists. *American Journal of Clinical Dermatology*, 25(2), 169–177. <https://doi.org/10.1007/S40257-023-00842-Z/FIGURES/1>
- Wu, Y., Bai, J., Zhong, K., Huang, Y., & Gao, H. (2017). A dual antibacterial mechanism involved in membrane disruption and DNA binding of 2R,3R-dihydromyricetin from pine needles of *Cedrus deodara* against *Staphylococcus aureus*. *Food Chemistry*, 218, 463–470. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.07.090>

Anexos

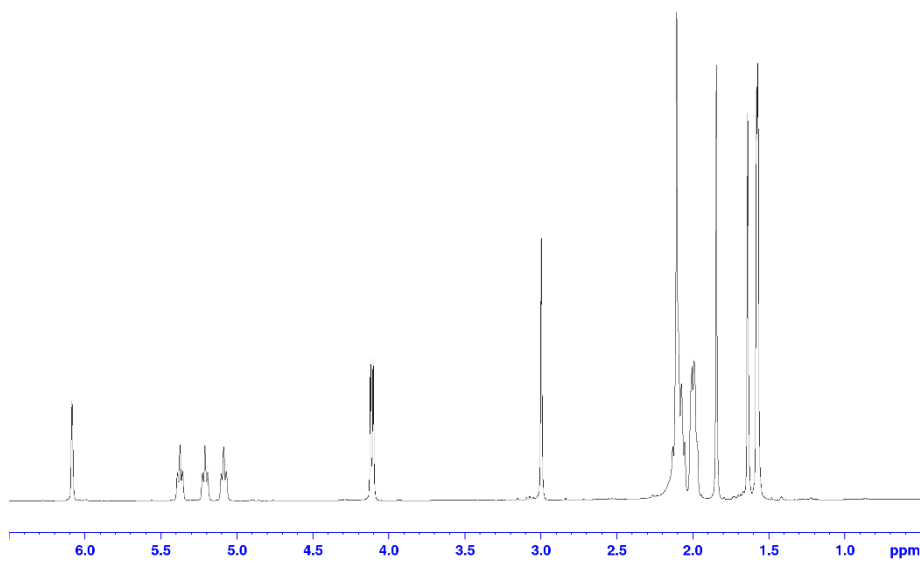
Anexos



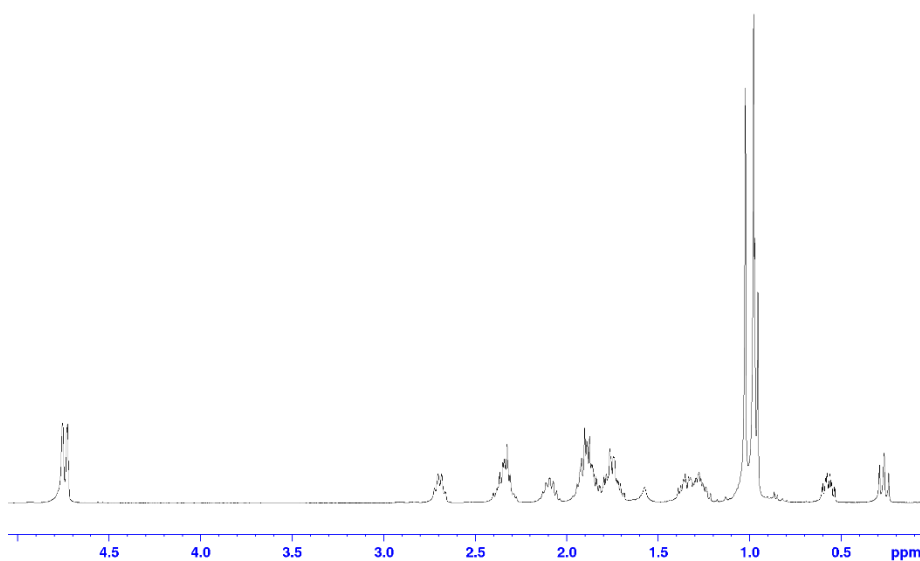
Espectro RMN Sphaerococcenol A



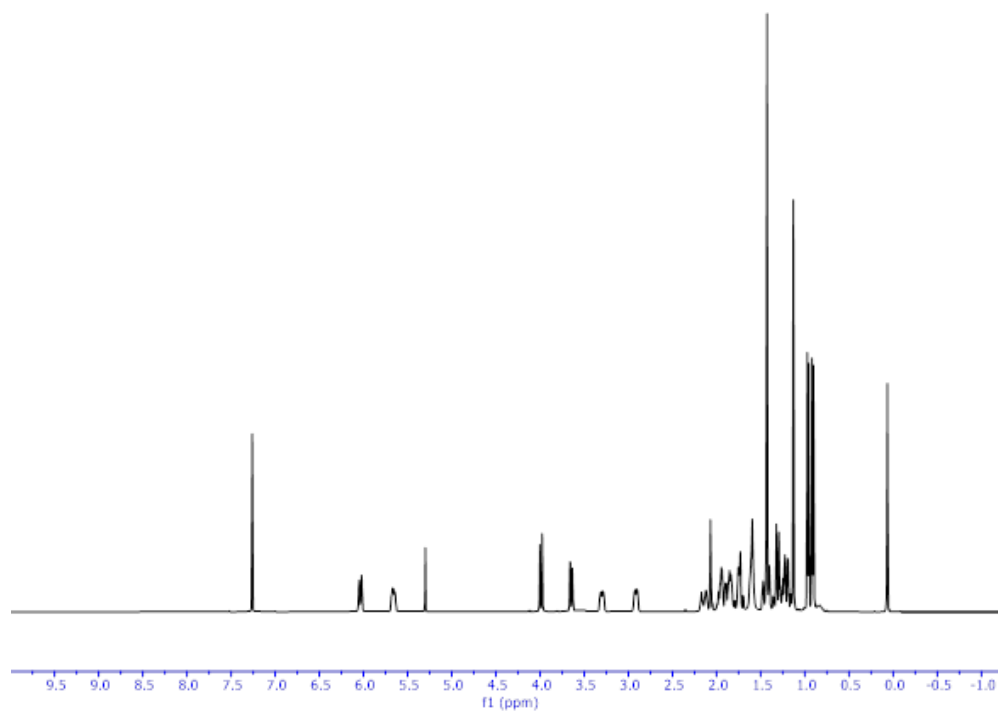
Espectro RMN Loliolide



Espectro RMN Eleganolone



Espectro RMN Alloaromandendrene



Espectro RMN “Análogo 5”