

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

ALEXANDRE CORDEIRO DA SILVA

**TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRODUTOS MARINHOS:
ESPONJAS COLETADAS NA COSTA BRASILEIRA E COMPOSTOS DE
ORGANISMOS MARINHOS**

**FLORIANÓPOLIS
2005**

ALEXANDRE CORDEIRO DA SILVA

**TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIVIRAL DE PRODUTOS MARINHOS:
ESPONJAS COLETADAS NA COSTA BRASILEIRA E
COMPOSTOS DE ORGANISMOS MARINHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria
Oliveira Simões

**Florianópolis
2005**

Silva, Alexandre Cordeiro

Triagem da potencial atividade antiviral de produtos marinhos: esponjas coletadas na costa brasileira e compostos de organismos marinhos / Alexandre Cordeiro da Silva. Florianópolis, 2005. 112 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

1. Esponjas marinhas; 2. costa Brasileira; 3. ensaio do MTT; 4. citotoxicidade; 5. triagem antiviral; 6. HSV-1; adenovirus 5; 7. rotavirus SA11.

**TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
PRODUTOS MARINHOS: esponjas coletadas na costa
brasileira e compostos de organismos marinhos.**

**POR
ALEXANDRE CORDEIRO DA SILVA**

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pela Orientadora e membros
da Banca Examinadora.**

Banca Examinadora:

**Dra. Beatriz Mothes (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul – Membro
Titular)**

**Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti (Departamento de Microbiologia e
Parasitologia/Centro de Ciências Biológicas/UFSC- Membro Titular)**

**Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel (Departamento de Ciências Farmacêuticas /Centro
de Ciências da Saúde/UFSC- Membro Titular)**

**Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências
Farmacêuticas /Centro de Ciências da Saúde /UFSC- Orientadora)**

**Prof^a. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Florianópolis, 28 de fevereiro de 2005**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas Professoras Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) e Dra. Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq / MCT através do projeto 472337/2003-3.

Dedico este trabalho aos meus pais, Rui e Ângela, pelo apoio que me deram, pois sem sua contribuição este trabalho não seria realizado e, também, à minha orientadora pelo imenso aprendizado.

Agradecimentos

A Deus por me fornecer à oportunidade de realizar esta dissertação e a outras oportunidades a mim concedida

A minha família pelo apoio e carinho me fornecido para a realização desta dissertação

A Prof. Dra. Claudia M. O. Simões pela paciência, entusiasmo e dedicação como conduziu a orientação desta dissertação, e aos conhecimentos a mim oferecido.

A Professora Dra Célia Barardi pela enorme colaboração fornecida tanto para a realização deste trabalho como para a minha vida acadêmica.

Aos colegas: Luciane Savi, Márcia Carriel, Vanessa Muller, Jadel Kratz, Thais Sincero, Javier e Carla Andriguetti

Ao Prof. Dr. Carlos Zanetti pelas colaborações dadas em toda a minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Jorge Alejandro Palermo, da Universidade de Buenos Aires, por ter cedido os compostos de organismos marinhos testados nesta dissertação.

À Profa. Dra Amélia T. Henriques, da faculdade de Farmácia da UFRGS, por ter cedido os extratos testados nessa dissertação.

Às Dras. Beatriz Mothes e Cléa Lerner da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, pela identificação das esponjas marinhas.

RESUMO

TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRODUTOS MARINHOS: esponjas coletadas na costa brasileira e compostos de organismos marinhos.

Este estudo descreve a triagem *in vitro* de 27 diferentes espécies de esponjas marinhas (Porifera) coletadas na costa brasileira, para a pesquisa de novos fármacos. Os extratos aquosos e orgânicos foram preparados e testados para as atividades anti-herpética (HSV-1, cepa KOS), anti-adenovírus (AdV humano serotipo 5) e anti-rotavírus (RV SA11simio). A avaliação da citotoxicidade e da potencial atividade antiviral desses extratos foram realizados utilizando o ensaio do MTT e os resultados foram expressos como concentração que há 50% de citotoxicidade (CC_{50}) e concentração que há proteção de 50% das células (CE_{50}), e foram calculados em ordem para calcular o índice de seletividade ($IS=CC_{50} / CE_{50}$) para cada extrato. A partir de 40 extratos de esponjas marinhas testados, 17 extratos mostraram alguma atividade antiviral. Os resultados para a atividade antiviral foram obtidos utilizando-se três diferentes estratégias: (1) ensaio simultâneo, onde os extratos de esponjas foram adicionados a células ao mesmo momento da adição dos vírus; (2) ensaio de pré-tratamento, onde os extratos de esponjas foram adicionados 15 horas antes da adição dos vírus, e (3) ensaio de pós-tratamento, onde os vírus foram adicionados a células 2h antes da adição dos extratos das esponjas. Em relação ao ensaio antiviral para HSV-1/KOS e AdV-5, os resultados obtidos para o pré-tratamento foram mais promissores quando comparado ao ensaio simultâneo e para o ensaio de pós-tratamento. Em relação ao vírus RV-SA11, os resultados obtidos para o pré e pós-tratamento não demonstraram atividade antiviral significativa quando comparado ao ensaio simultâneo. Os extratos que apresentaram resultados mais promissores foram os extratos aquosos de *Cliona* sp., *Agelas* sp.2, *Tethya* sp., *Axinella* aff *corrugata*, *Polymastia janeirensis* and *Protosuberites* sp., and these extracts deserve a special attention for posterior studies. Também foram testados alguns compostos isolados de organismos marinhos para a atividade anti-herpética, mas com resultados não expressivos.

Palavras-chaves: Esponjas marinhas; costa Brasileira; ensaio do MTT; citotoxicidade; triagem antiviral; HSV-1; adenovírus 5; rotavírus SA11.

ABSTRACT

SCREENING OF POTENTIAL ANTIVIRAL ACTIVITY OF MARINE SPONGES COLLECTED OFF THE BRAZILIAN COAST

This study describes the *in vitro* screening of 27 different marine sponges (Porifera) collected off the Brazilian coastline, in the search for novel drug leads. With these sponges aqueous and organic extracts were prepared and tested for anti-herpetic (HSV-1, KOS strain), anti-adenovirus (human AdV serotype 5) and anti-rotavirus (simian RV SA11) activities. The evaluation of the cytotoxicity and the potential antiviral activity of these extracts were performed by using MTT assay, and the results were expressed as 50% cytotoxicity (CC_{50}) and 50% effective (CE_{50}) concentrations, respectively, in order to calculate the selectivity indices ($SI=CC_{50} / CE_{50}$) of each extract. From the 40 sponge extracts tested, just 17 extracts showed some antiviral action. The results concerning to the antiviral activity were obtained by using three different strategies: (1) simultaneous assay, when sponge extracts were added to the cells at the same time of the viruses; (2) pre treatment assay, when sponge extracts were added to the cells 15 h prior to the viruses infection; and (3) post treatment assay, when the viruses were added to the cells and remained during 2 h prior to the addition of sponge extracts. In relation to the antiviral assays with HSV-1/KOS and AdV-5, the results obtained from the pre treatment were more interesting than those obtained from simultaneous and post treatments. In relation to the RV-SA11 virus, the results obtained from the pre and post treatments did not present significant antiviral activity when compared to simultaneous assay. The extracts presenting the most promising results were the aqueous extracts of *Cliona* sp., *Agelas* sp.2, *Tethya* sp., *Axinella* aff *corrugata*, *Polymastia janeirensis* and *Protosuberites* sp., and these extracts deserve a special attention for posterior studies.

Keywords: marine sponges; Brazilian coastline; MTT assay; cytotoxicity; antiviral screening; HSV-1; adenovirus 5; rotavirus SA11.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fotos de esponjas marinhas. 24
- Figura 2:** Resultados da avaliação da atividade antiviral em relação ao vírus herpético tipo-1, cepa KOS (HSV-1/KOS), expressos através dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) dos extratos de esponjas, cujos resultados preliminares forneceram valores de $IS \geq 1,5$. 71
- Figura 3:** Resultados da avaliação da atividade antiviral em relação ao adenovírus sorotipo-5 (AdV-5), expressos através dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) dos extratos de esponjas, cujos resultados preliminares forneceram valores de $IS \geq 1,5$. 72
- Figura 4:** Resultados da avaliação da atividade antivira em relação ao rotavírus (RV-SA11), expressos através dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) dos extratos de esponjas, cujos resultados preliminares forneceram valores de $IS \geq 1,5$. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Compostos de origem marinha submetidos a estudos clínicos.	16
Tabela 2:	Vírus herpéticos humanos.	32
Tabela 3:	Classificação dos adenovírus humanos - gênero <i>Mastadenovirus</i> .	38
Tabela 4:	Doenças causadas pelos adenovírus humanos.	39
Tabela 5:	Extratos testados (aquoso-Aq e orgânico-Or) de esponjas marinhas, coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE).	46
Tabela 6:	Compostos testados de organismos marinhos.	47
Tabela 7:	Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.	61
Tabela 8:	Resultados da avaliação da citotoxicidade (células VERO) e da triagem da potencial atividade anti-herpética (HSV-1 cepa KOS) dos extratos de esponjas marinhas, coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE).	63
Tabela 9:	Resultados da avaliação da citotoxicidade (células HEp) e da triagem da potencial atividade antiadenovirus (AdV-5) dos extratos de esponjas marinhas, coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE).	64
Tabela 10:	Resultados da avaliação da citotoxicidade (células MA104) e da triagem da potencial atividade antirotavírus (RV-SA11) dos extratos de esponjas marinhas, coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE).	65
Tabela 11:	Resultados da citotoxicidade (células VERO) e da potencial atividade antiherpética (HSV-1/KOS) de compostos puros.	66
Tabela 12:	Resultados obtidos através do pré- e do pós-tratamento com os extratos de esponjas marinhas (vírus herpético HSV-1/ cepa KOS).	67
Tabela 13:	Resultados obtidos através do pré- e do pós-tratamento com os extratos de esponjas marinhas (adenovírus humano AdV-5).	67
Tabela 14:	Resultados do pré e pós-tratamento com os extratos de esponjas marinhas, obtidos com o vírus rotavírus RV-SA11.	68
Tabela 15:	Resultados mais promissores da triagem (tratamento simultâneo) das atividades anti-herpética (HSV-1/KOS), antiadenovírus (AdV-5) e anti-rotavírus (RV-SA11) dos extratos de esponjas marinhas.	69
Tabela 16:	Resultados obtidos frente aos vírus HSV-1/KOS e AdV-5 para os ensaios de pré- e pós-tratamento.	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Atividades farmacológicas de produtos marinhos.....	18
2.1.1 Atividade antifúngica	19
2.1.2 Atividade anti-helmíntica	20
2.1.3 Atividade antiprotozoária	20
2.1.4 Atividade antibacteriana	20
2.1.5 Atividade antiviral	22
2.2 Esponja marinhas.....	24
2.2.1 Aspectos gerais e definição	24
2.2.2 Atividades farmacológicas	24
2.2.3 Atividades antifúngica.....	25
2.2.4 Atividades antibacteriana	25
2.2.5 Atividades antiviral	256
2.3 Estudos de produtos marinhos no Brasil.....	29
2.4 OS vírus estudados	31
2.4.1 Vírus herpético do tipo 1	32
2.4.2 Adenovírus sorotipo 5	37
2.4.3 Rotavírus SA11	41
3. OBJETIVOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Materiais de estudo.....	45
4.1.1 Coleta e identificação das esponjas	45
4.1.2 Preparação dos extratos	45
4.1.4 Preparação das soluções-estoques	49
4.2 Culturas celulares.....	49

4.3 Vírus	50
4.3.1 Preparação das suspensões-estoques virais.....	50
4.3.2 Determinação dos títulos infecciosos virais.....	51
4.4 Avaliação da citotoxicidade	54
4.4.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	54
4.5 Avaliação da potencial atividade anti-herpética, antiadenovírus e anti-rotavírus.	55
4.5.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	55
4.6 Delineamento experimental e análise estatística	59
5 RESULTADOS	61
5.1 Determinação dos títulos virais	61
5.2 Avaliação da citotoxicidade	61
5.3 Avaliação da potencial atividade anti-herpética, antiadenovírus e anti-rotavírus	62
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	89
8 PERSPECTIVAS	90
REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de novos fármacos passou por significativos avanços nos últimos anos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo a realização de várias repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística consistente dos resultados. Os avanços tecnológicos que contribuem para a busca de novos compostos referem-se à descoberta de novos alvos moleculares, impulsionada pelas novas ferramentas de biologia molecular, e a evolução de novas técnicas de síntese orgânica, resultando em substâncias ativas mais eficazes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como protótipos de fármacos com atividades farmacológicas semelhantes às originais (HOUGHTON, 1996; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996; HOUGHTON, 2000; NIELSEN, 2002; NEWMAN; CRAGG, 2003, 2004).

Os produtos naturais, provindos dos reinos terrestres e marinhos, constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissora atividade antiviral, não apenas pelo grande número de espécies encontradas nesses reinos, com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados (CHE, 1991; HUDSON; TOWERS, 1999; HARVEY, 1999; ABAD et al., 2000).

Tais metabólitos, primários e secundários, são produzidos por vários organismos, em resposta aos estímulos externos, tais como mudanças nutricionais, infecções e competições para a sobrevivência. Muitos desses metabólitos, produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos e outros organismos, terrestres e marinhos, já foram isolados, identificados e caracterizados biológica e farmacologicamente (HOUGHTON, 1996; COWAN, 1999; STROHL, 2000; NIELSEN, 2002).

Newman e colaboradores avaliaram os resultados publicados de produtos naturais como fonte de novos fármacos no período de 1981 a 2002. Os padrões utilizados para a classificação de fármacos de origem natural foram: peptídeos e/ou proteínas isolados de microorganismos ou produzidos

por processos biotecnológicos **(B)**; produtos naturais sem modificações químicas **(N)**; produtos naturais com modificações através de semi-síntese **(ND)**; fármacos totalmente sintetizados, com base na estrutura do composto natural **(ND/S)**; fármacos obtidos por síntese total com sítio farmacofórico semelhante ao do composto natural **(ND/S*)**. Dentre o total de 1.031 fármacos liberados comercialmente no período citados, 55% se encaixaram nos padrões citados acima, isto é, têm alguma relação com fontes naturais. Dentre os 35 fármacos antivirais liberados, 11 se encaixaram nos padrões adotados pelos autores, sendo que dois fármacos fazem parte do grupo B, um do ND, um do ND/S e sete do ND/S*. Através da análise desses dados, percebe-se a importância dos produtos naturais, não só como fonte de novos compostos, mas também como modelos para a síntese de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2003, 2004).

Tratando-se, especificamente, de produtos naturais marinhos, os compostos deles são isolados, geralmente, em quantidades muito pequenas, tendo em vista a difícil obtenção dos organismos marinhos em seus habitats naturais e, além disso, estes compostos isolados são utilizados, quase que totalmente, no processo de sua elucidação estrutural. A principal estratégia para contornar esta situação está focada na química de produtos naturais, que obtêm compostos semelhantes a partir da síntese total e semi-síntese, o que permite o estudo mais aprofundado destes compostos, com vistas à uma potencial aplicação terapêutica (BLUNDEN, 2001).

Outra estratégia para a obtenção de compostos marinhos é o cultivo, principalmente, de esponjas em fazendas marinhas visando à produção de biomassa para pesquisa (BELARBI EL et al., 2003). Além disso, há estudos do cultivo, *in vitro*, de invertebrados marinhos e cultura de seus tecidos (SIPKEMA et al., 2003; DE ROSA et al., 2003).

A complexa interação simbiótica entre os invertebrados marinhos e um vasto repertório de bactérias, fungos e parasitas, muitos deles desconhecidos pelo homem, dificultam também o isolamento e a identificação dos metabólitos produzidos (KONIG; WRIGHT, 1996). Em muitos casos, a produção dos metabólitos de interesse é feita, não pelos organismos marinhos, tais como

esponjas ou tunicados, mas por bactérias, fungos e parasitas a eles associados simbioticamente (DAYLE, 2004). Desta forma, por exemplo, as colônias de bactérias estão sendo estudadas, objetivando sua identificação e posterior cultivo *in vitro*, visando à produção de metabólitos ativos biologicamente (HENTSCHEL, 2002).

Considerando-se que a pesquisa de produtos naturais marinhos representa, atualmente, uma grande parcela do número total de publicações na temática de produtos naturais em geral (PROKSCH; EDRADA; EBEL 2002; ALONSO et al., 2003) a pesquisa nacional de produtos naturais ativos de origem marinha necessita ser incrementada, pois sua realização é amplamente justificada pela razoável massa crítica de pesquisadores da área de química de produtos naturais e pelas características da costa brasileira, com 8.000 Km de extensão, com ampla diversidade de organismos marinhos e, conseqüentemente, grande potencial na geração de novos compostos ativos (BERLINCK et al., 2004).

Na Tabela 1 estão listados alguns exemplos de compostos de origem marinha, que estão sendo submetidos a ensaios clínicos.

Tabela 1: Compostos de origem marinha submetidos a ensaios clínicos.

Compostos	Fonte	Fase clínica / atividade
didemina B	Tunicado (<i>Trididemnum solidum</i>)	Fase II / câncer
dolastatina	Microorganismo marinho	Fase I e II / câncer
bengamida	esponja (<i>Jaspis</i> sp.)	Fase I / câncer
IPL-576,092	esponja (<i>Petrosia contignata</i>)	Fase II / antiasmática
monoalida	esponja (<i>Luffariaella variabilis</i>)	Fase II / antipsoríase
conotoxina	molusco (<i>Conus</i> sp.)	Pré-clínica / dor

Fonte: NEWMAN; CRAGG (2004)

Diante destes fatos, o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC iniciou uma parceria com Profa. Dra. Amélia T. Henriques da Faculdade de Farmácia, UFRGS e com as Dras. Beatriz Mothes e Cléa Lerner (Fundação Zoobotânica

do Rio Grande do Sul), com o objetivo de avaliar a potencial atividade antiviral de extratos de esponjas marinhas, coletadas nas costas de Santa Catarina, Pernambuco, Paraíba. Algumas esponjas que deram origem aos extratos testados nessa dissertação no que confere a atividade antiviral, anteriormente foram submetidas a estudos antibacterianas, anticancer e antiinflamatória, estudo este realizado por Monks et al., 2002. Além disso, também foi iniciada outra parceria, desta vez entre o Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC e o Departamento de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires, através da colaboração entre os Profs. Drs. Eloir Paulo Schenkel e Cláudia Maria Oliveira Simões e Jorge Alejandro Palermo, respectivamente. No âmbito deste projeto, apoiado pelo CNPq, estão previstas atividades de coleta de organismos marinhos nos dois países; estudos de extração, purificação, isolamento e elucidação estrutural; semi-síntese e/ou síntese total de compostos; estudos da potencial ação antiviral; e intercâmbios de alunos de pós-graduação e docentes. Tais atividades estão abrindo uma nova área de pesquisa na UFSC e colaborando para o aumento da mesma, no cenário nacional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Atividades farmacológicas de produtos marinhos

O ambiente marinho possui uma enorme diversidade de vida, representada com 34 dos 36 filos de todo o globo terrestre, possuindo 300.000 espécies relatadas de plantas e animais, tais como esponjas, tunicados, briozoários, moluscos, bactérias, cianobactérias, peixes e algas. A diversidade é ainda maior em ambientes onde há formação de corais, estimando-se um número de 1.000 espécies por m², em algumas áreas do Oceano Indo-Pacífico. Pressões ecológicas, tais como competição por espaço, predação, simbiose e variação das marés, originaram ao longo de milhares de anos, a biossíntese de metabólitos secundários complexos e variados, por parte desses organismos, que permitiram sua adaptação a um ambiente competitivo e hostil. Os primeiros estudos em relação às atividades biológicas de produtos marinhos iniciaram-se em meados das décadas de 50-60 com o isolamento, a partir de um tunicado, de um composto da classe dos arabinosídeos, que deu origem aos fármacos ara-A e ara-C, com atividades antiviral e antitumoral, respectivamente (MIERZWA et al., 1994; BERNAN; GREENSTEIN; MAIESE, 1997; ALONSO et al., 2003; BLUNT et al., 2004).

Especialmente para doenças infecciosas, a exploração do ambiente marinho representa uma nova e promissora fronteira na busca de novos compostos ativos, pois há necessidade de novos fármacos, devido ao aparecimento de resistência de diversos microorganismos aos tratamentos disponíveis, especificamente no que diz respeito às atividades antifúngica, antiparasitária, antibacteriana e antiviral. Os relatos são, majoritariamente, acerca de diversos metabólitos bioativos, provindos de invertebrados marinhos e microorganismos a eles associados, e são citados em várias revisões (FAULKNER, 1994, 1998, 2000, 2001, 2002; MAYER; HAMANN, 2002, 2004; BLUNT et al., 2003, 2004; DONIA; HAMANN, 2003).

No período de 1969 a 1999, cerca de 300 patentes envolvendo produtos marinhos foram depositadas, e estima-se que o número de compostos isolados e/ou sintetizados a partir de produtos marinhos exceda de 10.000, com

centenas de novos compostos descobertos a cada ano, alguns já sendo avaliados clinicamente. A dificuldade de obtenção dos compostos reside no fato de que, em média, se extrai somente cerca de 10^{-5} % do peso do organismo marinho, o que dificulta tanto as pesquisas *in vitro* quanto as *in vivo* e clínicas (FAULKNER, 2002; PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002).

As principais rotas biogénéticas, envolvidas na produção dos metabólitos de origem marinha são, principalmente as que originaram substâncias nitrogenadas, terpenóides, poliquetídeos e polissacarídeos. As substâncias nitrogenadas incluem, principalmente, amidas, peptídeos cíclicos e alcalóides indólicos. Entretanto, para alguns compostos obtidos a partir de organismos marinhos, a rota biogénética ainda não foi elucidada, e seu entendimento futuro contribuirá para o avanço do estudo de produtos naturais marinhos (KELECOM, 2002).

2.1.1 Atividade antifúngica

O desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos torna-se necessário devido ao avanço de doenças fúngicas, principalmente, em consequência da infecção pelo vírus HIV, da quimioterapia para o tratamento de câncer, e do uso freqüente de antibióticos de amplo-espectro. Os produtos marinhos despertam atenção em relação a uma potencial atividade antifúngica, pois os organismos marinhos produzem metabólitos secundários para adaptarem-se, muitas vezes, em uma relação de simbiose, com um repertório variado de fungos encontrados no ambiente marinho. Um composto constituído de anéis de poliéteres, denominado ácido gambiérico, isolado de um dinoflagelado (*Gambierdiscus toxicus*), demonstrou efeito inibitório no crescimento de *Aspergillus niger*, na concentração de 10 ng/disco e toxicidade de 1mg/Kg *in vivo*, o que representa um alto índice de seletividade; esse efeito foi muito superior ao do fármaco anfotericina B, com reconhecida ação antifúngica (NAGAI et al., 1993) Os organismos marinhos mais promissores para a obtenção de compostos antifúngicos são as esponjas marinhas, que serão tratados adiante em um tópico específico.

2.1.2 Atividade anti-helmíntica

Anti-helmínticos são fármacos utilizados contra parasitas intestinais nematóides (filo Nematoda), como por exemplo, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*, que são responsáveis por alguns distúrbios, tais como má digestibilidade e má absorção de nutrientes e, conseqüentemente, anemia e decréscimo do crescimento em indivíduos jovens. Apesar da disponibilidade de fármacos para uso clínico (benzimidazóis e macrolídeos) o número de nematóides resistentes aos sítios ativos desses fármacos vem aumentando e, por isso, novos anti-helmínticos devem ser pesquisados. Da alga marrom (*Notheia anomala*), isolou-se um composto dihidroxitetrahydrofurano, que apresentou alta atividade e seletividade contra os parasitas *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus columbriformis*, que infectam ruminantes (CAPON; BARROW; ROCHFORD, 1998)

2.1.3 Atividade antiprotozoária

Doenças causadas por protozoários são responsáveis por altas taxas de morbidez e mortalidade, em todo o mundo, e a atenção está voltada para espécies dos gêneros *Leishmania*, *Trypanossoma*, *Toxoplasma* e *Plasmodium*, causadoras de doenças como leishmaniose, chagas, toxoplasmose e malária. Novos fármacos devem ser pesquisados como possíveis alternativas para o tratamento destas doenças, visto que muitos dos fármacos atualmente usados causam sérios efeitos adversos e/ou alguns destes protozoários desenvolveram resistências aos medicamentos disponíveis. Da alga *Ulva* sp., associada via simbiose ao fungo *Acochyta salicorniae*, isolou-se o composto ascosalipirrolidinona A, um ácido tetrâmico, que demonstrou *in vitro* atividade contra *Trypanossoma cruzi*, e embora muito ativo, o composto foi também bastante citotóxico, apresentando assim baixo índice de seletividade (OSTERHAGE et al., 2000).

2.1.4 Atividade antibacteriana

O desenvolvimento de resistência de um grande número de bactérias para os antibacterianos atuais representa uma grande dificuldade no

tratamento de doenças dessa natureza. Há relatos de um grande número de compostos marinhos com atividades antibióticas.

A título ilustrativo, pode-se citar um aminoesterol, isolado do peixe-cão *Squalus acanthias*, e um diterpeno, obtido da alga vermelha (*Sphaerrococcus coronopifolius*), que apresentaram atividade frente ao *Staphylococcus aureus* (WEHRLI et al., 1993).

Do nudibrânquio *Jorunna funebris*, um organismo presente no sedimento marinho, obteve-se um alcalóide isoquinolínico, que inibiu o crescimento *in vitro* de bactérias Gram + (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo) em concentrações muito baixas, mas também citotóxicas (FONTANA et al., 2000).

Os compostos denominados, lolotinas A-D, uma família de decapeptídeos, isolados de um bactéria marinha não indentificada, exibiram *in vitro* atividade contra *Staphylococcus aureus* (uma cepa meticilina resistente) e contra *Streptococcus pneumoniae* (GERARD et al., 1999).

A toxicidade e a difícil obtenção de compostos provindos de determinados organismos marinhos são características comuns a vários compostos já estudados. Outra grande dificuldade é a identificação precisa do organismo que originou os compostos ativos, dificultando muito a reprodução de novas pesquisas (DONIA; HAMANN, 2003).

A re-emergência da tuberculose, decorrente do aumento da resistência do microrganismo *Mycobacterium tuberculosis* a vários fármacos utilizados na clínica e, também, o imunocomprometimento de pacientes infectados com o vírus HIV, fazem com que sejam constantemente buscados novos compostos ativos. O ambiente marinho, devido às suas características, é uma fonte potencial de tais compostos. De uma gorgônia (*Pseudopterogorgia elisabethae*), foi isolado um alcalóide diterpênico, responsável pela inibição de 97% do crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*. Outro diterpeno, isolado também de uma gorgônia coletada na Índia, inibiu em 96% o crescimento desse microrganismo (RODRIGUEZ; RAMIREZ, 1999). O litosterol, um hidroxiesteróide, obtido do coral *Litophyton viridis*, inibiu em 90% o crescimento da *M. tuberculosis*, em baixas concentrações (RODRIGUEZ; RAMIREZ; 2001)

Há, ainda, vários relatos na literatura dessa atividade para compostos oriundos de esponjas marinhas, que serão tratados posteriormente.

2.1.6 Atividade antiviral

A crescente resistência de vários vírus, principalmente, o vírus HIV, mas também os vírus herpéticos HSV-1 e HSV-2, exige que novos fármacos antivirais sejam desenvolvidos com urgência. Os compostos de origem marinha têm um grande potencial antiviral e, por isso, devem ser explorados. A seguir, são apresentados, a título ilustrativo, alguns destes exemplos.

As dideminas são uma classe de compostos depsipetídeos cíclicos obtidos de tunicados do gênero *Trididemnum*. Os compostos dessa família, além de apresentarem atividade antitumoral, também mostraram atividade antiviral, *in vitro* e *in vivo*. Em 1982, Canonico e colaboradores demonstraram atividade da didemina B frente aos vírus da febre do Vale Rift, ao vírus da encefalite venezuelana equina e ao da febre amarela. A administração da didemina B em ratos possibilitou a sobrevivência de 90% deles, infectados com o vírus da febre do Vale Rift. Entretanto, a didemina B apresentou baixo índice de seletividade, devido à sua alta citotoxicidade, que consiste na inibição da síntese do DNA e RNA celulares e da síntese de proteínas, em concentrações equivalentes àquelas que provocam a inibição viral. No entanto, as dideminas estão sendo estudadas quimicamente com o objetivo de realizar modificações estruturais, que as tornem mais ativas e menos citotóxicas, e também farmacologicamente, através da combinação sinérgica com outros fármacos antivirais (VERA; JOULLIE, 2002).

Frações ricas em polissacarídeos, obtidas das algas vermelhas *Cryptosyphonia woodii* e *Farlowia mollis*, exibiram atividade, *in vitro*, frente aos vírus HSV-1 e HSV-2. Essas frações quando administradas, previamente, por via tópica protegeram ratos da infecção pelo HSV-2, mas não foram ativas quando os ratos foram tratados após a infecção viral (RICHARDS et al., 1978).

As eudistominas fazem parte do grupo de alcalóides β -carbonílicos, isoladas do tunicado *Eudistoma olivaceum*, e tais compostos demonstraram atividade anti-HSV-1 e HSV-2 (RINEHART et al., 1984).

Da alga vermelha *Laurencia venusta*, foram isolados os compostos triterpenóides, tirsiferol, tirseferil e venustatriol, os quais inibiram a replicação do HSV-1 (SAKEMI et al., 1986).

As lactonas diterpênicas, brianteínas V, Y e Z, isoladas do coral *Briareum asbestinum*, demonstraram atividade inibitória da replicação do vírus HSV-1 e também do coronavírus (COVAL et al., 1988).

Gustafson e colaboradores, em 1989, isolaram compostos lipídicos sulfatados e demonstraram atividade anti-HIV. Tais compostos foram obtidos de uma cianobactéria associada via simbiose às algas azuis *Lyngbya lagerheimmi* e *Phormidium tenue*.

Extratos aquosos da alga *Polysiphonia denudata* também inibiram a replicação dos vírus HSV-1 e HSV-2 (SERKEDJIEVA, 2000).

Frações ricas em diterpenos, obtidas de corais do gênero *Lobophytum*, apresentaram atividade anti-HIV moderada (RASHID; GUSTAFSON; BOYD, 2000).

Extratos preparados das ostras *Crassostrea madrasensis*, *Crassostrea gryphoides*, *Meretrix casta* e *Villorita cyprinoides* demonstraram atividade antiviral promissora contra os vírus influenza - A e B (CHATTERJI et al., 2002).

2.2 Esponja Marinhas

2.2.1 Aspectos gerais e definição

As esponjas já foram consideradas como plantas e sua natureza animal foi reconhecida em 1765, mas sua classificação no reino animal continuou incerta até 1857, quando foram incluídas no reino Poriferae. O termo porífero (latim *porus* = poro + *ferre* = possuir) refere-se ao caráter poroso do corpo das esponjas, com muitas aberturas superficiais. Elas assemelham-se a alguns protozoários flagelados coloniais por terem grupos de células flageladas e digestão intracelular, mas diferem por apresentarem um maior arranjo celular, uma certa divisão de funções entre as células e um corpo com muitos poros. O funcionamento de uma esponja depende do constante fluxo de água, que passa através do seu corpo, que é uma fonte constante de oxigênio para a respiração; além disso, as substâncias de excreção, resultantes do metabolismo, são removidas por este mesmo sistema. Assim, as esponjas são consideradas animais multicelulares inferiores, móveis no estado larval e incapazes de movimento na vida adulta, fixadas em rochas, conchas e outros substratos sólidos, e com uma morfologia bastante variada: algumas se apresentam como crostas finas e chatas, outras em forma de vaso, ramificadas, globulares, etc, com dimensões que variam de 1 mm até 2 m de diâmetro. Muitas são cinzentas ou pardas e outras são brilhantes, vermelhas, alaranjadas, azuis, violáceas ou pretas. A maioria das esponjas é marinha, ocorrendo dos mares árticos até os tropicais, da linha de maré baixa até profundidades de 5.500 m (STORER et al., 1991). A Figura 1 apresenta duas fotos de esponjas marinhas que deram origem a extratos testados nessa dissertação



Cliona sp.



Pseudaxinella reticulata

Figura 1: Fotos de esponjas marinhas. Fonte: www.pirweb.org/pir04b_marine.htm

2.2.2 Atividades farmacológicas

Há, na literatura científica, um grande número de relatos acerca de atividades farmacológicas diversas de esponjas marinhas, tais os encontrados em trabalhos de revisão de diversos autores (FAULKNER, 1994, 1998, 2000, 2001, 2002; MAYER; HAMANN, 2002, 2004; BUNT et al, 2003; 2004; DONIA; HAMANN, 2003).

A título ilustrativo, serão aqui descritas algumas atividades farmacológicas de esponjas marinhas, com uma abordagem mais ampla no que se refere à atividade antiviral, pois diz respeito ao principal objetivo desta dissertação.

2.2.2.1 Atividade antifúngica

O composto denominado jaspamida, um depsipeptídeo isolado da esponja *Jaspis* sp., demonstrou atividade seletiva contra *Candida albicans* vaginal em ratos, quando esses foram tratados com uma solução de 2% de jaspamida. *In vitro*, o composto inibiu esse microorganismo, na concentração de 25 µg/mL. Esses resultados foram semelhantes aos do fármaco nitrato de miconazol, de reconhecida ação antifúngica. Relatou-se, também, atividade para o composto macrolídeo forboxazol, obtido da esponja *Phorbas* sp., contra *Candida albicans* (CREWS; MANES; BOEHLER, 1986).

2.2.2.2 Atividade antibacteriana

Um artigo publicado por pesquisadores brasileiros (TORRES et al., 2002) revelou as potencialidades antibacterianas de compostos marinhos obtidos da esponja *Arenosclera brasiliensis*. Os novos compostos, alcalóides alquilpiperidínicos, denominados arenosclerinas A-C e haliclonaclamina E, demonstraram atividade frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e 12 cepas bacterianas diferentes, oriundas do ambiente hospitalar. Para o grupo de bactérias Gram (+), as concentrações mínimas inibitórias (CMI) oscilaram entre 50 e 400 µg/ml, e entre 5 e 112 µg/ml para o grupo das Gram (-), com resultados promissores,

inclusive para alguns microorganismos resistentes. Deve-se mencionar que os resultados preliminares promissores dos ensaios antibacterianos, conduzidos com extratos brutos da referida esponja, foram o que motivou a continuação dos estudos, que conduziram aos isolamentos dos compostos bioativos citados

2.2.2.3 Atividade antiviral

Até o momento, os compostos mais importantes que se obteve de organismos marinhos foram os nucleosídeos espongouridina, espongotimidina e arabinosil, isolados a partir da esponja *Cryptotethya crypta* (= *Tectitethia crypta*) (BERGMANN; FEENEY, 1951). Modificações por semi-síntese realizadas nestes compostos resultaram em fármacos de grande importância clínica, para o tratamento de infecções virais, tais como ara-A (vidarabina), ara-C (citarabina), ACV (aciclovir) e AZT (zidovudina) (DE CLERCQ, 2001).

Também desta esponja, foram isolados os compostos furanotimidina, espongotimidina, espongosina e espongouridina, os quais se mostraram ativos contra o vírus HSV-1 (MUNRO; LEIBRAND; BLUNT, 1987).

Compostos diterpenóides (espongiadiol e o seu epímero epispongiadiol), isolados da esponja *Spongia officinalis*, inibiram a replicação do vírus herpético HSV-1 (KOHMOTO et al., 1987).

A partir de extratos da esponja *Disidea avara*, foram isolados compostos sesquiterpênicos ligados a grupamentos quinônicos, sendo os mais importantes o avarol e a avarona, que demonstraram atividade inibitória para o vírus HIV, na concentração de 0,1 a 1 µg/mL, *in vitro*. O grande interesse clínico deve-se à capacidade de tais compostos em atravessarem a barreira hemato-encefálica (SARIN et al., 1987). Seis compostos derivados do avarol e da avarona, também isolados da mesma esponja, demonstraram atividade anti-HIV, por inibirem a enzima transcriptase reversa (HIRSCH et al., 1991).

Perry e colaboradores relataram a atividade do composto micalamida A, isolado de uma esponja da Nova Zelândia (*Mycale* sp.) Camundongos infectados com o coronavírus A59 receberam 0,2 µg/mL/Kg, diariamente, de micalamida A, e o índice de sobrevivência, após 14 dias, foi de 100%. *In vitro*, este composto apresentou atividade anti-HSV-1 e antipoliiovírus. Outro composto

similar (micalamida B) mostrou-se mais citotóxico e com maior atividade antiviral do que a micalamida A. O mecanismo de ação de ambas as micalamidas é a inibição da síntese protéica viral (PERRY et al., 1988; 1990).

O composto calipeltina é um depsidecapeptídeo cíclico isolado de uma esponja do gênero *Callipelta*, que mostrou atividade inibitória do vírus HIV-1, em baixas concentrações, apresentando índice de seletividade de 29 e, portanto, uma atividade antiviral promissora (ZAMPELLA et al., 1996).

De extratos aquosos obtidos da esponja *Adocia* sp., obteve-se resultados promissores no que se refere à inibição do efeito citopático em células infectadas pelo vírus HIV-1. Com bases nestes resultados, foi isolado o composto ativo: a proteína adociavirina, capaz de inibir a replicação dos vírus HIV-1 e HIV-2 (O'KEEFE et al., 1998).

O composto denominado frondosina, um sesquiterpeno isolado da esponja *Euryspongia* sp., também inibiu o efeito citopático causado pelo vírus HIV-1 (HALLOCK et al., 1998).

Da esponja *Strongylophora hartmani*, oriunda do Caribe, foi isolado um composto sesquiterpênico denominado estrongilina A. Dois análogos desse composto apresentaram atividade inibitória da replicação do vírus influenza, e índice de seletividade igual a 9, para ambos os análogos (WRIGHT; RUETH; CROSS, 1999).

Os compostos denominados papuamidas A, B, C e D, depsipeptídeos cíclicos, isolados das esponjas *Theonella mirabilis* e *T. swihoei*, inibiram a infecção de linfócitos T pelo HIV-1, *in vitro*, mas seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado (FORD et al., 1999).

Os alcalóides 1,3 neofolotispatos, obtidos da esponja indiana *Neofolitista dianchora*, inibiram a replicação do vírus da hepatite B (VENKATESWARLU et al., 1999).

Dois ácidos norsesquiterpênicos, chamados mucubilona e mucubilina, isolados da esponja vermelha *Diacarnus erythraeanus*, apresentaram atividade antiviral frente ao HSV-1, e índices seletividade de 2 e 4, respectivamente (EL SAYED et al., 2001).

O alcalóide homofascaplisina, obtido da esponja *Hyrtius* cf. *erecta*, mostrou-se ativo na inibição dos vírus HIV-1 e da hepatite A (KIRSCH et al., 2000). O composto (S)-(+)-2-itrocurcufenol, um sesquiterpeno isolado da esponja *Didiscus oxeata*, foi ativo contra o vírus da hepatite A (EL SAYED et al., 2002).

Esponjas do gênero *Batzella* e *Crambe* são conhecidas por produzirem metabólitos secundários complexos do grupo dos compostos policíclicos das guanidinas. Há um grande interesse nesses compostos pelas suas promissoras atividades farmacológicas e pela possibilidade de serem sintetizados análogos ainda mais ativos. Análogos sintéticos do composto batzeladina, as batzeladinas A – E, demonstraram atividade no bloqueio da interação entre a glicoproteína gp120 do vírus HIV e os receptores celulares CD₄ (BEWLEY et al., 2004).

Um novo composto depsipeptídeo cíclico, isolado da esponja *Neamphius huxleyi*, inibiu a replicação do vírus HIV, em concentrações na ordem de nanomoles e com índice de seletividade de 9 (OKU et al., 2004).

2.3 Estudos de produtos marinhos no Brasil

O Brasil possui cerca de 8.000 Km de costa litorânea, a segunda maior do mundo depois da Austrália, e apresenta geograficamente diferenças climáticas e ecológicas, o que lhe confere grande número de espécies de organismos e microorganismos marinhos, representando uma fonte potencial de novos compostos bioativos.

O primeiro estudo referente à química de organismos marinhos no Brasil tratou do isolamento do colesterol a partir do organismo *Echinometra lucunter*, em 1963, por Tursch, Barreto e Sharapin, sendo que o primeiro era, na ocasião, professor da Universidade de Bruxelas, Bélgica. O Prof. Dr. Bernard Tursch é considerado o pioneiro do estudo da química marinha no contexto nacional e seus estudos foram realizados quando ele aqui residiu, por dois anos, como pesquisador visitante, iniciando um grupo de pesquisas no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da UFRJ. Após seu regresso à Bélgica, as pesquisas prosseguiram graças ao Prof. Dr. Alphonse Kelecom, que foi seu orientando de Doutorado. Com o Prof. Kelecom à frente do grupo do NPPN/UFRJ e, posteriormente, no Departamento de Biologia Geral/Universidade Federal Fluminense, as pesquisas evoluíram muito, tendo sido estudadas várias algas e invertebrados marinhos. Para maiores informações sobre a evolução das pesquisas nesta área, pode-se consultar as revisões por ele publicadas (KELECOM, 1997, 1998). Os trabalhos liderados por este pesquisador serviram para nuclear dois fortes grupos na área de química de produtos marinhos no Brasil: aquele liderado pela Profa. Dra. Rosângela Epifânio (Instituto de Química/UFF) e o coordenado pelo Prof. Dr. Ângelo da Cunha Pinto (Instituto de Química/UFRJ). Adicionalmente, formou-se um terceiro grupo coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck (Instituto de Química de São Carlos/USP).

Como exemplos de trabalhos conduzidos pela primeira equipe pode-se citar aqueles realizados com gorgônias, esponjas, ascídeas e octocorais (MARTINS; EPIFANIO, 1998; EPIFANIO et al., 1999; MAIA et al., 1999; VERVOORT; FENICAL; EPIFANIO, 2000; MAIA; EPIFANIO; FENICAL, 2000; EPIFANIO; MAIA; FENICAL, 2000; COUTINHO et al., 2002). A título ilustrativo,

pode-se também citar o trabalho realizado pelo segundo grupo (PITOMBO; KAISER; PINTO, 1996; KAISER; PITOMBO; PINTO, 2001). Os trabalhos do grupo do Prof. Berlinck iniciaram-se em 1996, quando se conduziu o primeiro estudo com extratos brutos de esponjas, objetivando a detecção de atividades citotóxica e hemolítica, entre outras (BERLINCK et al., 1996). Através de um projeto interinstitucional e interdisciplinar entre a Equipe de Poríferos do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul e a SOAD (?) para avaliar a atividade antifúngica e anticâncer de extratos de esponjas marinhas com os primeiros resultados sendo publicados em 1998. Com o apoio do CNPq a pesquisa continuou no período de 1998 a 2003 e os resultados estão em Monks et al., 2002. Atualmente a UFRGS prossegue como os estudos de atividades farmacológicas de esponjas marinhas e atualmente conta com estudos anticâncer e antiviral, a qual inclui a participação da USFC. Para maiores detalhes de produtos naturais marinhos no contexto nacional há uma grande revisão a respeito do estudo (BERLINCK et al., 2004).

Atualmente, estão sendo desenvolvidas pesquisas nesta área, em várias instituições, tais como UFRJ, UFF, UFPR, UFC, USP, UNICAMP, UFBA, UFRGS e, mais recentemente, a própria UFSC, estabelecendo-se, assim, um novo e promissor cenário na pesquisa de organismos e microorganismos marinhos no nosso país. Os trabalhos envolvem pesquisadores das áreas de taxonomia, ecologia, biogeografia, química e farmacologia, e a sua interação é fundamental para a descoberta de novos compostos marinhos bioativos genuinamente brasileiros

2.4 OS VÍRUS ESTUDADOS

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, que necessitam da atividade metabólica e das organelas da célula hospedeira para produção de energia e síntese de macromoléculas, ou seja, para sua multiplicação. Eles contêm apenas um tipo de material genético (RNA ou DNA) e seu material de reserva constitui-se apenas de proteínas ou glicogênio. Essas entidades infecciosas consistem de um genoma DNA ou RNA, acondicionado num *capsídeo* protéico, que pode ou não ser circundado por uma membrana de revestimento, o *envelope*. O material nucléico recoberto por proteína é denominado *nucleocapsídeo*. O termo *vírion* serve para designar partículas virais completas, potencialmente infecciosas, formadas na última fase da replicação viral. O capsídeo é composto por um número definido de unidades morfológicas, os *capsômeros*. A montagem dos vírus é definida pela natureza das ligações formadas entre os capsômeros individuais, o que confere a simetria do capsídeo, podendo esta ser helicoidal, icosaédrica ou mista (VOYLES, 1993).

Os vírus são capazes de reconhecer e de penetrar em células-alvo apropriadas, principalmente, pela especificidade dos receptores existentes na superfície dessas células hospedeiras e dos próprios vírus. O conjunto de eventos que vão desde a penetração do genoma viral na célula até a liberação dos vírions, é chamado de ciclo de multiplicação viral. A forma pela qual o vírus realiza as etapas do seu ciclo de multiplicação é determinada pela estrutura do genoma [se DNA ou RNA; se RNA positivo (+) ou negativo (-)] e da estrutura do próprio vírion a ser replicado. As principais etapas de multiplicação de um vírus qualquer podem ser resumidas numa fase inicial, com fixação do vírus à célula hospedeira, penetração e desnudamento (decapsidação) da partícula, e uma fase tardia, que vai desde a síntese macromolecular até a montagem e liberação dos vírions (WHITE; FENNER, 1994).

2.4.1 Vírus herpético do tipo 1

Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus da família Herpesviridae foram caracterizados, sendo que existem oito vírus herpéticos humanos (Tabela 1). Além disso, o vírus herpético B de macacos pode também infectar o homem causando encefalite mortal (ROIZMAN, 1996; DA SILVA, 2000).

Tabela 1: Vírus herpéticos humanos.

Gênero	Nome oficial	Nome Comum	Sigla
Alphaherpesvirinae Herpes simplex 1	Herpesvírus humano-1	Vírus herpes simples tipo 1	HSV-1
	Herpesvírus humano-2	Vírus herpes simples tipo 2	HSV-2
	Herpesvírus humano-3	Vírus da varicela zoster	VZV
Betaherpesvirinae Cytomegalovírus	Herpesvírus humano-5	Citomegalovírus	CMV
	Herpesvírus humano-6	Vírus herpes humano tipo 6	HHV-6
	Herpesvírus humano-7	Vírus herpes humano tipo 7	HHV-7
Gama herpesvirinae Epstein- Barr	Herpesvírus humano-4	Vírus Epstein-Barr	EBV
	Herpesvírus humano-8	Vírus herpes humano tipo 8	HHV-8

Fonte: modificado de DA SILVA (2000).

O HSV-1 pertence à subfamília Alphaherpesvirinae, apresentando propriedades biológicas de crescimento rápido, lise das células infectadas e estabelecimento de infecções latentes em gânglios nervosos sensoriais. O fato do próprio vírus herpético codificar as principais enzimas necessárias à replicação do DNA viral, mantendo um grau de virulência suficiente para não ser subjugado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, faz com que sua sobrevivência em células neurais (permanentes), que não replicam DNA e não se dividem, constitua um fato bastante provável de ocorrer (WHITE; FENNER, 1994; LUPI; PEREIRA JR., 2000).

Ao contrário da maioria das outras famílias de vírus, os vírus herpéticos podem causar infecções líticas, latentes e transformadas. A infecção latente

com subsequente doença recorrente é uma de suas características. Durante o período de recorrência herpética, os vírus são inacessíveis ao sistema imune e aos medicamentos atualmente disponíveis (ROIZMAN, 1996).

O HSV-1 é composto de um cerne contendo DNA linear, de fita dupla, associado às proteínas do core, ancorado por fibrilas à um capsídeo icosaédrico de 100nm de diâmetro composto de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros) e de um envelope lipoprotéico de 120-200nm com numerosos peplômeros glicoprotéicos. Seu genoma é um dos maiores genomas virais de herpesvírus humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas (WHITE; FENNER, 1994).

Na infecção primária pelos vírus herpéticos ou primo-infecção, o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou soluções de continuidade da pele. Muitos indivíduos são infectados já em idade precoce. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do sítio de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares. Após, o vírus dissemina-se para células nervosas adjacentes. Nos neurônios, o nucleocapsídeo é encaminhado para o núcleo, iniciando a infecção latente. Nesta fase, o genoma viral está reprimido e integrado ao DNA da célula. O vírus pode então ser ativado por vários estímulos, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultravioleta, etc, e depois passar retrogradamente pelo nervo, causando lesões características em sítios específicos da pele e mucosas (CLEMENTS; TIMBURY; GRIFFITHS, 1990; LUPI; PEREIRA JR., 2000).

As manifestações clínicas primárias e recorrentes podem variar desde gengivomastites, faringotonsilites e herpes labial até querato-conjuntivites, encefalites e doença disseminada. Após a recuperação da infecção primária, o indivíduo retém o DNA herpético no gânglio trigêmio por toda a vida, com no mínimo 50% de chances de sofrer ataques recorrentes de herpes labial várias vezes no decorrer da sua existência. Em pacientes imunocomprometidos (submetidos à transplantes, quimioterapia anticâncer e portadores de AIDS), as infecções latentes são freqüentemente reativadas (WHITE; FENNER, 1994).

O HSV-1 está associado a infecções orais, enquanto que o HSV-2 a infecções genitais. Contudo, ambos os vírus podem causar infecções

cl clinicamente indistinguíveis em vários locais e podem permanecer latentes no gânglio sensorial, o qual pode ser reativado em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

Resumidamente, o ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos consiste nas seguintes etapas (ROIZMAN, 1996);

- Adsorção: ocorre a ligação específica dos receptores superficiais das células hospedeiras com as glicoproteínas do envelope viral;
- Penetração e desnudamento: a principal via de penetração do HSV é por fusão na membrana da superfície celular, mas também pode ocorrer por endocitose. Neste último caso, o capsídeo é digerido por enzimas lisossomais celulares, enquanto que no primeiro caso, a fusão do envelope com a membrana celular permitirá que o material genético seja liberado, iniciando a replicação viral;
- Transcrição, tradução e replicação: a transcrição e a síntese protéica prosseguem de forma coordenada, reguladas em três fases: imediata (α), precoce (β), e tardia (γ). Os produtos imediatos e precoces são algumas enzimas, que promovem a replicação do DNA viral e enzimas destruidoras, que iniciam a degradação do RNAm celular. Após a replicação, os genes tardios são transcritos e codificam proteínas estruturais do capsídeo e outras proteínas que formarão o vírion;
- Montagem e liberação dos vírions: as proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios ou preenchidos com DNA. Os nucleocapsídeos brotam de porções modificadas da membrana nuclear com glicoproteínas virais, e sofrem exocitose.

Normalmente, o isolamento do HSV é feito em cultura de tecidos, onde 2-7 dias são necessários para a visualização dos efeitos citopáticos característicos. O diagnóstico mais rápido para lesões mucocutâneas é a imunofluorescência direta de fragmentos corados de pele. O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o DNA do HSV em fluido cérebro-espinhal é mais rápido e mais sensível do que a cultura viral, e o diagnóstico pode detectar a encefalite herpética, além de confirmar infecções em outros

locais do corpo. Testes sorológicos específicos podem ser usados para diferenciar infecções por HSV-1 e/ou HSV-2, ou confirmar casos suspeitos (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

As infecções herpéticas estão descritas na literatura médica há séculos, porém, a terapia anti-herpética começou a ser desenvolvida somente na década de 60. Atualmente, as infecções causadas pelo HSV estão entre as mais comuns na população e, é estimado que 60-95% das pessoas adultas estejam infectadas. Para a seleção do tratamento, alguns fatores importantes devem ser considerados, tais como a imunidade do paciente, o local da infecção e, se a infecção é primária ou recorrente. Os agentes anti-herpéticos (HSV-1 e HSV-2) atualmente disponíveis na clínica são:

Aciclovir e Valaciclovir: possuem ação seletiva contra os vírus herpéticos, pois esses induzem a atividade de uma timidina quinase (TQ) nas células que infectam. Essa enzima catalisa a fosforilação do aciclovir em monofosfato e as enzimas celulares completam a fosforilação em trifosfato. A atividade destes fármacos contra os vírus herpéticos está diretamente relacionada à sua capacidade indutora de TQ. Os vírus HSV-1 e 2 são os indutores de TQ mais ativos e são facilmente inibidos pelo aciclovir. Para tornar-se ativo, ele precisa ser fosforilado, o que ocorre somente em células infectadas por vírus herpéticos. O trifosfato de aciclovir inibe a replicação viral através da competição com o trifosfato de guanosina pela DNA polimerase viral. Essa enzima incorpora o trifosfato de aciclovir à cadeia do DNA em formação, uma vez que o aciclovir não possui a hidroxila em 3', essencial à incorporação dos demais nucleotídeos à cadeia de DNA em formação. O aciclovir é cem vezes mais seletivo para a DNA polimerase viral do que para a enzima celular, possuindo, desta forma, toxicidade mínima. O aciclovir não elimina o vírus do hospedeiro e deve ser usado nas recidivas. A resistência dos vírus herpéticos ao aciclovir não é uma questão recente, mas a disseminação de cepas resistentes em pacientes imunocomprometidos e a decorrente progressão da doença são preocupantes. A resistência pode ser devido à expressão reduzida da TQ viral nessas cepas, ou à existência de uma TQ não funcional, além de TQ mutantes capazes de selecionar o substrato

nucleosídico do aciclovir. O desenvolvimento da resistência pode estar relacionado com o uso de altas doses terapêuticas ou profiláticas do aciclovir, associado à imunossupressão no caso de pacientes com AIDS. A biodisponibilidade do aciclovir oral é de 10-20%, enquanto que a do valaciclovir (éster L-valina do aciclovir) é em torno de 50%. A administração oral do valaciclovir resulta na conversão em aciclovir, no fígado e no intestino, sendo mais eficiente do que a administração parenteral. Devido à sua maior biodisponibilidade, o valaciclovir pode ser administrado com menor frequência, tornando-se uma opção conveniente para o tratamento oral de infecções herpéticas em pacientes imunocompetentes. Entretanto, o valaciclovir não é efetivo contra infecções resistentes ao aciclovir.

Penciclovir e Fanciclovir: possuem mecanismo de ação similar ao do aciclovir. O trifosfato de penciclovir é cerca de cem vezes menos potente na inibição da replicação viral do que o aciclovir; entretanto, esse atinge maior concentração plasmática e tem maior tempo de meia-vida nas células infectadas. O penciclovir só está disponível em cremes para uso tópico, e estudos sobre sua segurança e eficácia ainda estão em andamento. O fanciclovir, éster diacetil do penciclovir, é bem absorvido no trato gastrointestinal, e está disponível somente em formas farmacêuticas orais.

Trifluoridina: o trifosfato de triflouridina inibe a DNA polimerase celular e viral, em baixas concentrações; porém, é tóxico no uso sistêmico. Está disponível como solução nos tratamentos de infecções oculares pelo HSV.

Vidarabina: análogo da adenina, que é fosforilado por quinases celulares à trifosfato de vidarabina, o qual inibe a DNA polimerase viral e, um pouco menos, a celular. Está disponível em pomadas para o tratamento de infecções oculares.

Foscarnet: inibe diretamente a DNA polimerase viral e não requer fosforilação pela TQ do vírus. É ativo contra vírus resistentes ao aciclovir e vírus deficientes de TQ. A resistência ao foscarnet é rara e surge de mutações do vírus.

Cidofovir: nucleosídeo 5'-monofosfato, que é fosforilado por TQ de células hospedeiras em um metabólito biologicamente ativo, o qual inibe

seletivamente a replicação viral. Por não ser dependente da TQ viral, pode ser ativo contra vírus deficientes em TQ. A resistência ao cidofovir é rara e surge de mutações virais. Seu tempo de meia-vida é longo e, por isso, permite apenas uma dose semanal. Pode ser usado topicamente ou por via intravenosa no tratamento de HSV resistentes ao aciclovir e ao foscarnet.

Docosanol: inibe a fusão entre a membrana plasmática da célula hospedeira e o envelope do HSV, bloqueando a entrada do vírus. É disponível em cremes tópicos no tratamento de herpes labial recorrente.

Brivudina: atua como inibidor da DNA polimerase viral, após fosforilação intracelular. Pode atuar como um substrato alternativo e, portanto, ser incorporado pelo DNA viral, reduzindo sua integridade e prejudicando seu funcionamento. Esta disponível para uso tópico e oral no tratamento de infecções causadas pelo HSV-1.

Ganciclovir: atua na DNA polimerase viral, onde é fosforilado a trifosfato de ganciclovir, sendo então incorporado como monofosfato de ganciclovir ao DNA viral, impedindo sua replicação. É encontrado em formas intravenosas, orais e implantes intraoculares.

Todas as informações sobre a terapia anti-HSV-1 e anti-HSV-2 aqui apresentadas encontram-se na literatura consultada (FIELD; BIRON, 1994; CASSADY; WHITLEY, 1997; DE CLERCQ, 2001; BRADY; BERNSTEIN, 2004).

2.4.2 Adenovírus sorotipo 5

Os adenovírus (Advs) pertencem à família Adenoviridae e são subdivididos em dois gêneros: *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*. No primeiro são encontrados vírus que acometem mamíferos e marsupiais e, no segundo, os responsáveis por algumas doenças de aves. O gênero *Mastadenovirus* compreende 47 sorotipos humanos, que são classificados em seis subgêneros (Tabela 2).

Os adenovírus não são envelopados, têm morfologia icosaédrica, com 80-90 nm de diâmetro e são compostos por dois tipos de capsômeros: 240 héxons com 20 faces triangulares, e 12 péntons que originam 12 vértices,

onde em cada pénton alonga-se uma fibra, assemelhando-se a um satélite. O material genético viral é composto por DNA de filamento duplo, de 36 a 38 kbp, associado à proteínas (FLINT et al., 2000).

Tabela 3: Classificação dos adenovírus humanos - gênero *Mastadenovirus*.

Subgêneros	Sorotipos humanos
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47
E	4
F	40, 41

Fonte: WHITE; FENNER (1994).

Em 1953, Rowe e colaboradores caracterizaram os adenovírus como agentes capazes de ocasionar degeneração de células epiteliais. Atualmente, os adenovírus humanos são reconhecidos como agentes etiológicos causadores de diversas doenças, tais como infecções gastrointestinais, urinárias, do trato respiratório e do globo ocular (Tabela 3). As principais formas de infecção se dão pela via respiratória (pessoa-pessoa e ar, através da inalação de aerossóis) e pela via feco-oral (pessoa-pessoa, ingestão de água e alimentos contaminados) (FIELD; KNIPE; HOWLEY, 1996; KIDD et al., 1996; ALLARD; KAJON; WADELL, 1994). As infecções por adenovírus ocorrem durante todo o ano, com pequena ou nenhuma variação sazonal de liberação destes vírus para o ambiente (CHAPRON et al., 2000).

Os sintomas clínicos em crianças incluem diarreia, vômitos e febre e, em comparação com as infecções causadas por rotavírus, os adenovírus entéricos causam diarreia menos severa, porém por um período mais prolongado, podendo persistir por semanas. Estudos sorológicos indicam que 50% das crianças mais velhas e adultos jovens apresentam imunidade à doença (WHITE; FENNER, 1994).

Tabela 4: Doenças causadas pelos adenovírus humanos.

Doença	Idade	Sorotipos	Subgêneros
Infecções respiratórias	Crianças novas e militares	1,2,3,4,5,6,7,14,21	B,C,E
Infecções oculares	Todas as idades	1,2,3,4,6,7,8,19,37	B,C,D,E
Infecções genitourinárias	Todas as idades	11,19,21,37	B, D
Infecções entéricas	Crianças novas	31,40,41	A,F
Infecções em pacientes imunocomprometidos	Todas as idades, inclusive pacientes com AIDS	7,11,34,35	B
Gastroenterites	Pacientes com AIDS	Todos, incluindo 43-47	D
Infecções generalizadas	Pacientes com AIDS	2,5	C

Fonte: WHITE; FENNER, (1994)

Os adenovírus entéricos e os não entéricos, responsáveis pelas infecções respiratórias e do globo ocular, podem ser isolados das fezes, sendo assim, detectados em esgotos, rios, mares e moluscos (PINA et al., 1998)

As infecções respiratórias são provocadas pelos adenovírus tipos 1 a 7, que causam faringite aguda, faringoconjuntivite, pneumonia e inflamação nas tonsilas. O adenovírus sorotipo 5 está associado ao quadro clínico de tosse (WIEDBRAUK; JOHNSTON, 1992).

Assim, como os demais vírus entéricos, os adenovírus apresentam estabilidade à ação de agentes químicos, como cloro, e físicos, como a radiação UV, bem como em condições diversas de pH. Essas características possibilitam sua permanência no meio ambiente por longos períodos. Alguns deles apresentam certa resistência aos estágios primário e secundário do tratamento de águas de esgoto, o que aumenta ainda mais o risco da população ser contaminada por esses vírus (ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; REYNOLDS et al., 2001).

Segundo White e Fenner (1994), o ciclo de multiplicação dos adenovírus envolve as seguintes etapas:

- Adsorção: ocorre a ligação específica dos receptores superficiais das células hospedeiras com a proteína CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor);

- Penetração e desnudamento: a principal via de penetração é por endocitose, que requer a ativação da enzima fosfatidilinositol-3-OH quinase;
- Transcrição, tradução e replicação: o capsídeo externo é removido e o genoma viral, ao qual estão associadas histonas, liga-se ao núcleo onde ocorre a transcrição do RNAm, a replicação do DNA e a montagem dos vírions. No núcleo, o genoma viral é transcrito pela RNA polimerase II celular, de acordo com um programa complexo que envolve as 2 fitas de DNA. Os produtos da região E1A são requeridos para a baixa regulação da transcrição de outras regiões do genoma, incluindo a inibição de promotores virais pelos repressores virais. Posteriormente, a replicação do DNA viral envolve a formação de proteínas estruturais, as quais são produzidas em excesso;
- Montagem e liberação dos vírions: as proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios ou preenchidos com DNA. Os nucleocapsídeos brotam de porções modificadas da membrana nuclear com glicoproteínas virais, e sofrem exocitose.

Dependendo da apresentação clínica, diferentes materiais para diagnóstico devem ser coletados: fezes, *swab* da faringe, aspirado da nasofaringe, lavagem brônquica, *swab* da conjuntiva, coleta de material da córnea ou lágrima, secreções genitais, urina e tecidos para biópsia (fígado ou baço) ou autópsia do pulmão ou cérebro. Os métodos imunoenzimáticos são os de escolha para a detecção de antígenos virais solúveis, em fezes e em secreções nasofaríngeas. Um anticorpo monoclonal com um epítipo comum a todos os sorotipos é utilizado para a identificação. Existem kits comerciais para diagnóstico que apresentam 90-95 % de especificidade e 70-90% de sensibilidade. Os ensaios de imunofluorescência podem ser empregados para detectar antígenos virais em células do trato respiratório, olhos, urina, e de materiais de biópsia ou autópsia. Atualmente, a técnica mais empregada pelos laboratórios de referência é o isolamento viral. A replicação do adenovírus em culturas de células é tempo-dependente, pois muitos sorotipos se replicam

vagarosamente. As linhagens celulares utilizadas são: HeLa, HEp-2, KB, A-549 e células diplóides embrionárias (HDF), oriundas da faringe ou tonsilas. Os sorotipos mais comuns de adenovírus, sorotipos 1 a 7, geralmente apresentam efeito citopático no período de 1 a 2 semanas. Outros sorotipos, especialmente os que pertencem aos subgêneros A e D, replicam-se lentamente, e o efeito citopático não se apresenta da maneira clássica, podendo não ser evidenciado por até um mês (WHITE; FENNER, 1994).

Não há tratamento específico para indivíduos infectados com adenovírus; deve-se tratar os sintomas clínicos decorrentes da infecção viral. A vacinação tem sido usada nos Estados Unidos e Canadá para a proteção de militares contra infecções respiratórias provocadas pelos adenovírus; entretanto, essa estratégia é acompanhada de um alto índice de queratoconjuntivite, o que merece atenção especial (LJUNGMAN, 2004).

2.4.3 Rotavírus

Os rotavírus são responsáveis por gastroenterites severas em humanos e em animais. Após replicarem-se no trato gastrointestinal, estes vírus são excretados e também podem se dispersar em águas ambientais, principalmente, devido à resistência dos mesmos aos agentes físico-químicos utilizados no tratamento de águas servidas. Uma vez dispersos no meio ambiente, principalmente as crianças podem ser contaminadas, através da ingestão de água e alimentos contaminados pelos rotavírus (WHITE; FENNER, 1994).

Os rotavírus são classificados em um gênero da família Reoviridae. Os vírions apresentam morfologia esférica com simetria icosaédrica, não envelopados, e possuem cerca de 72nm de diâmetro. O genoma é constituído de RNA dupla-fita, consistindo de 11 segmentos separados, que possuem de 18 a 27 kpb no total. Cada segmento representa um gene que codifica uma proteína, seja ela estrutural ou não-estrutural. A partícula viral é uma estrutura tripla, formada por capsídeo duplo, um externo e outro interno, formados por proteínas distintas, e por um núcleo mais interno que envolve o RNA viral. As proteínas estruturais são denominadas VP e numeradas de 1 a 7, de acordo

com o gene pelo qual cada uma é codificada. A proteína VP7 (codificada pelo gene 7, 8 ou 9, dependendo da cepa viral) é glicosilada e forma o capsídeo externo, que é penetrado por mais de 60 espículas da proteína VP4 (codificada pelo gene 4), que é hemaglutinante e responsável pelo ataque do vírus à célula. Para poder penetrar na célula, ocorre a clivagem de VP4 em VP5 e VP8 pela tripsina. A proteína VP6 forma o capsídeo interno. O núcleo interno é composto pelas proteínas VP1, VP2 e VP3 (codificadas pelos genes 1, 2, 3, respectivamente) (WHITE; FENNER, 1994).

Até o momento, foram identificados sete sorogrupos de rotavírus definidos de acordo com a antigenicidade da proteína VP6, e nomeados de A a G, mas somente três são infectantes para o homem (A, B e C). Os rotavírus do grupo A podem ainda ser subdivididos, de acordo com a antigenicidade de VP6, em subgrupos I e II. Os rotavírus do grupo A são freqüentemente identificados como o mais importante patógeno viral em doenças diarréicas, que requerem tratamento ou hospitalização de crianças abaixo de 2 anos de idade, e são os maiores responsáveis por diarréias severas em crianças no mundo todo (WHITE; FENNER, 1994). A via de contaminação é feco-oral e o período de incubação é cerca de 48 horas. Os sintomas são gastroenterite com vômitos, diarréia aquosa e um pouco de febre. Em pacientes imunocomprometidos, os rotavírus podem causar várias complicações associadas à diarréia, tais como desidratação, desequilíbrio eletrolítico, acidose, sintomas neurológicos e infecção persistente com grande envolvimento de todo o organismo (GILGER, et al., 1992).

Os vírus são eliminados nas fezes em grandes quantidades ($> 10^{12}$ partículas virais/ g fezes), fazendo com que os rotavírus sejam facilmente detectáveis em efluentes de esgotos e águas poluídas (GAJARDO et al., 1995).

O método de diagnóstico mais praticado é o imunoenzimático por apresentar maior sensibilidade para a detecção do vírus nas fezes. Os ensaios de aglutinação por látex e hemaglutinação passiva reversa também são sensíveis, específicas e simples. Para a detecção dos sorogrupos virais, utiliza-se reação cruzada com anticorpos monoclonais. A cultura *in vitro* do rotavírus é difícil; entretanto, torna-se mais simples com a adição de tripsina no

meio de cultura, livre de soro fetal bovino, para a quebra a proteína VP4, reponsável pelo capsídeo protéico, o que facilita a entrada do vírus na célula. As linhagens celulares mais utilizadas para a cultura *in vitro* do vírus são a MA104 (células de rins de macaco) e a CaCo-2 (células humanas de carcinoma de cólon). O efeito citopático não é muito visível e o ensaio de imunofluorescência é usado para a identificação do antígeno do rotavírus em células infectadas (WHITE; FENNER, 1994).

O tratamento da infecção por rotavírus consiste em tratar os sintomas clínicos, como a diarréia e o vômito, administrando-se eletrólitos ao paciente, por via oral ou venosa. Leite materno contendo anticorpos para rotavírus também é usado com sucesso para o tratamento de crianças imunodeficientes com infecções crônicas por rotavírus (GLASS et al., 1991). O desenvolvimento inicial de vacinas anti-rotavírus iniciou-se há 15 anos, em alguns países, visto que algumas cepas infecciosas são específicas de determinadas regiões. A UNICEF e a Organização Mundial da Saúde se empenham na elaboração de protocolos, que auxiliem os países, com grande incidência de infecções, no desenvolvimento de vacinas (BRESEE et al., 1999).

3. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a citotoxicidade e a potencial atividade antiviral de extratos de esponjas coletadas na costa brasileira e de compostos isolados de organismos marinhos.

ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de extratos de esponjas coletadas na costa brasileira e de substâncias isoladas de organismos marinhos, frente às células VERO, HEp2 e MA-104, através do ensaio colorimétrico do MTT.
- Avaliar a potencial atividade de extratos de esponjas coletadas na costa brasileira e de substâncias isoladas de organismos marinhos, através da inibição da replicação do vírus herpético humano do tipo-1, do adenovírus humano sorotipo 5 e do rotavírus símio SA-11, pelo ensaio colorimétrico do MTT, usando diferentes estratégias metodológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais de estudo

4.1.1 Coleta e identificação das esponjas

As esponjas foram coletadas manualmente em seu habitat natural, na costa brasileira (Santa Catarina e Pernambuco) entre uma profundidade de 0,5 e 14m. A taxonomia e indentificação foi realizada através de estudos de microscopia eletrônica, do esqueleto e das espículas dos poríferos. A coleta das esponjas e os estudos taxonômicos foram conduzidos pelas Dras Beatriz Mothes e Clea Lerner, da Fundação Zoobotânica, Museu de Ciências Naturais, do Rio Grande do Sul.

4.1.2 Preparação dos extratos

As esponjas coletadas foram lavadas exaustivamente com água com o objetivo de eliminar os contaminantes que acompanham o material coletado. Após esse processo, as esponjas foram trituradas, maceradas com água bi-destilada durante 30 min e, posteriormente, os macerados foram filtrados com papel filtro e liofilizados (**extratos aquosos**). Os materiais remanescentes foram extraídos com uma mistura de metanol: tolueno (3:1, v/v), também por maceração, durante 5 dias. Os extratos resultantes foram filtrados e concentrados através de rotavapor (**extratos orgânicos**). A preparação dos extratos foi realizada pelo grupo da Profa. Dra. Amélia T. Henriques, da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A Tabela 4 apresenta os diferentes extratos avaliados.

No total, foram testados 45 extratos, sendo que alguns deles foram preparados com as mesmas esponjas; entretanto, elas haviam sido coletadas em locais diferentes (Santa Catarina, Pernambuco, Paraíba). Sabe-se que as condições ecológicas, climáticas e geográficas são determinantes para a geração de diferentes metabólitos pelos organismos marinhos e, por isso, foram testados todos os extratos.

Tabela 5 – Extratos testados (aquoso-Aq e orgânico-Or) de esponjas marinhas coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE)

Especies	Familia	Autores	Origem geografica	Extratos testados
<i>Petromica citrina</i>	Halichondriidae	Muricy et al., 2001	SC	A
<i>Tedania ignis</i>	Tedaniidae	(Duchassaing and Michelotti, 1864)	SC	O + A
<i>Dragmacidon reticulatus</i>	Axinellidae	(Ridley and Dendy, 1886)	SC	O + A
<i>Polymastia janeirensis</i>	Polymastidae	(Boury-Esnault, 1973)	SC	O + A
<i>Axinella aff. corrugata</i>	Axinellidae	(George and Wilson, 1919)	SC	O + A
<i>Haliclona tubifera</i>	Chalinidae	(George and Wilson, 1919)	SC	A
<i>Niphates</i> sp.	Chalinidae		PB	A
<i>Haliclona</i> sp.	Chalinidae		SC	A
<i>Haliclona</i> sp.	Chalinidae		PE	A
<i>Mycale arcuiris</i>	Mycalidae	Lerner and Hadju, 2002	SC	A
<i>Cinachyrella alloclada</i>	Tetillidae	(Ulikczka, 1929)	PB	O + A
<i>Cinachyrella</i> sp.	Tetillidae		PE	A
<i>Cinachyrella alloclada</i>	Tetillidae	(Ulikczka, 1929)	PE	A
<i>Guitarra sepia</i>	Guitarridae	Lerner et. al., 2004	SC	O + A
<i>Agelas</i> sp. 1	Agelasidae		PB	O + A
<i>Agelas</i> sp.2	Agelasidae		PB	O + A
<i>Protosuberites</i> sp.	Suberitidae		PE	O + A
<i>Tethya</i> sp.	Tethyidae		PE	A
<i>Cliona</i> sp.	Clionidae		SC	A
<i>Cliona</i> sp.2	Clionidae		PE	A
<i>Cliona</i> sp1.	Clionidae		PE	A
<i>Halichondria</i> sp.	Halicondriidae		PE	A
<i>Halichondria</i> sp.1	Halicondriidae		PE	A
<i>Halichondria</i> sp.2	Halicondriidae		PE	A
<i>Chondrosia collectrix</i>	Chondrillidae	(Schmidt, 1862)	PE	O + A
<i>Arenosclera</i> sp.	Callyspongiidae		SC	A
<i>Raspailia elegans</i>	Raspailiidae	(Boury-Esnault, 1973)	SC	A
<i>Suberites</i> sp.	Suberitidae		PE	A
<i>Placospongia</i> cf. <i>intermedia</i>	Placospongiidae		PE	A
<i>Placospongia</i> cf. <i>intermedia</i>	Placospongiidae		PE	A

A= Aquoso; O= Orgânico; SC, PE, PB= Santa Catarina, Pernambuco e Paraíba, respectivamente

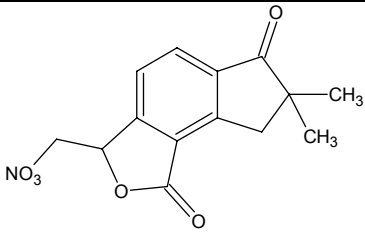
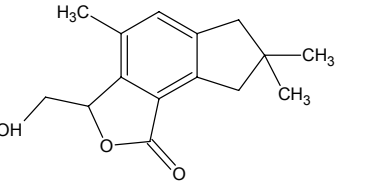
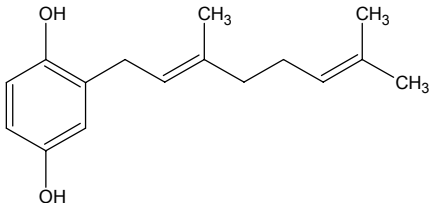
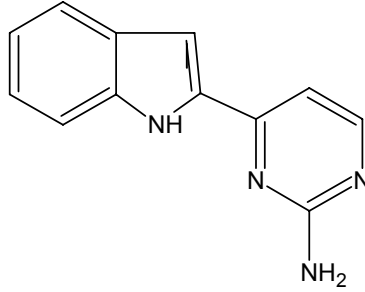
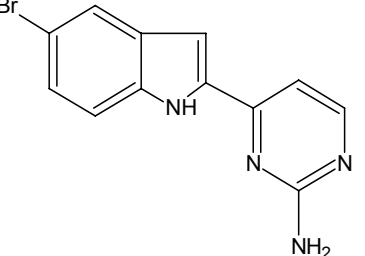
4.1.3 Compostos de organismos marinhos

Foram também testados alguns compostos isolados de organismos marinhos e dois compostos sintetizados com base em compostos naturais cedidos gentilmente pelo Professor Dr. Jorge Parlema, da Universidade de Buenos Aires (Tabela 5).

Tabela 6: Compostos testados de organismos marinhos.

Compostos	Estrutura química	Organismo	Referência
H09L2A		Compostos isolados do octocoral <i>Alcyonium paessleri</i>	Palermo et al. (2000)
H09L2B			
H09L3A			
H09L3B			
H09L5B			
H09L6D			

(...)

H09L7A		<p>Compostos isolados do octocoral <i>Alcyonium paessleri</i></p>	<p>Palermo et al. (2000)</p>
H09L7B			
6HQ		<p>Composto isolado de uma esponja do gênero <i>Callyspongiae</i></p>	<p>*</p>
ISOMERIDIANINA G			
ISOMERIDIANINA C			

* Cedidos, gentilmente, pelo Prof. Dr. Jorge Palermo (Universidade de Buenos Aires).

A Prof. Dra. Amélia T. Henriques (UFRGS) também cedeu, gentilmente, três frações purificadas de lectinas, obtidas a partir de fontes naturais, sendo que uma dessas frações foi obtida do extrato aquoso da esponja marinha *Axinella* cff. *corrugata*.

4.1.4 Preparação das soluções-estoques

Os extratos aquosos e orgânicos, e os compostos puros foram dissolvidos em meio de cultura MEM e DMSO, este último na concentração máxima de 1 %. As concentrações iniciais das soluções-estoques foram de 1 mg/mL para os extratos disponíveis em maior quantidade, e de 500 e 250 µg/mL, para os extratos disponíveis em menor quantidade. Para os compostos puros, as concentrações das soluções-estoques variaram conforme as quantidades disponíveis, de 1.000 a 175 µg/mL. Posteriormente, todos os materiais-teste foram filtrados assepticamente (filtros Millipore de 0,22 µm), aliquotados e armazenados a -20°C até a sua utilização.

4.2 Culturas celulares

As células utilizadas foram células VERO, que são culturas contínuas de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), e foram fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz/SP. São células permissivas ao HSV-1, possibilitando sua multiplicação e demonstrando efeito citopático bem visível ao microscópio ótico.

A linhagem celular HEP-2, que são células de carcinoma de orofaringe humana, permissivas à infecção *in vitro* pelo adenovírus, foram fornecidas pelo Banco de Células da UFRJ/RJ.

Também foram utilizadas células MA104, que são culturas contínuas de fibroblastos de rins embrionários do macaco *Rhesus*, permissivas à infecção *in vitro* pelo rotavírus, e foram fornecidos pelo ICB/USP/ SP.

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o Meio MEM (Sigma). O Meio MEM contém quase todos os aminoácidos e vitaminas, vários constituintes de ácidos nucleicos, metabólitos intermediários e fatores de crescimento acessórios. O pH do meio deve ser de 7,2 a 7,4, o que condiciona o uso de uma incubadora com atmosfera de 5% de CO₂, já que o sistema tampão utilizado é HCO₃/CO₂. A atmosfera umidificada da estufa previne a evaporação e o aumento da osmolaridade do meio.

O Meio MEM não é, isoladamente, adequado para iniciação do crescimento celular, apesar de manter a viabilidade das culturas celulares, e foi, portanto, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB (Gibco BRL) para promoção do crescimento ou com 5% para manutenção da linhagem celular. As culturas celulares infectadas com vírus foram mantidas com Meio MEM não suplementado com SFB, já que alguns componentes do soro sabidamente inibem a replicação viral.

A enzima proteolítica tripsina a 0,25% (tripsina: EDTA 1: 250, Sigma) foi o agente de dispersão celular utilizado para a obtenção de subculturas, para a manutenção das culturas e para a realização dos experimentos.

Uma solução de antibióticos + antifúngico foi adicionada ao meio para evitar a contaminação das culturas por bactérias, fungos e leveduras, na proporção de 1ml de penicilina G/estreptomicina/anfotericina B (Gibco BRL: 10.000U penicilina G, 10.000 µg estreptomicina, 25 µg anfotericina B) para cada 100ml de meio MEM.

4.3 Vírus

Os experimentos foram realizados com os seguintes vírus: herpético humano tipo-1 cepa KOS (HSV-1/KOS) (Universidade de Rennes, França); adenovírus humano sorotipo 5 (AdV-5) (ICB/USP / SP) e rotavírus símio RV-SA11 sorotipo G3 (ICB/USP, SP), cujas características podem ser assim sumarizadas:

- HSV-1 = Vírus DNA envelopado
- AdV-5 = Vírus DNA não envelopado
- RV-SA11 = Vírus RNA envelopado

4.3.1 Preparação das suspensões-estoques virais

Em frascos de cultura, as suspensões virais já existentes (HSV-1, AdV-5 e RV-SA11) foram inoculadas às células VERO, HEp-2 e MA104, respectivamente. Após, foram incubados a 37°C em estufa com 5 % de CO₂, até a destruição do tapete celular, onde o período de tempo depende do ciclo de replicação de cada vírus (HSV-1= 72h; AdV-5= 128h; RVSA11= 24h, todos

4 ciclos). Para completar a lise celular, os frascos foram congelados e descongelados 3X, e as suspensões virais foram centrifugadas (5 min, 350 Xg) para precipitar os fragmentos celulares, e os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados a -80°C até a sua utilização.

4.3.2 Determinação dos títulos infecciosos virais

Antes de se iniciar os testes da potencial atividade antiviral dos extratos e dos compostos isolados, faz-se necessário conhecer a infectividade viral dos inóculos. A infectividade dos vírus pode usualmente ser determinada utilizando-se três diferentes metodologias, com cálculo da dose infectante a 50% do tecido celular (TCID₅₀), das unidades formadoras de placas (pfu) ou das unidades formadoras de focos (ffu), dependendo do vírus utilizado.

Alguns conceitos básicos devem ser considerados antes de se iniciar a descrição do método propriamente dito. Segundo Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992):

Infectividade viral é a capacidade que uma partícula viral possui de invadir uma célula e parasitá-la para se replicar;

MOI (multiplicidade de infecção) é o número de partículas virais por célula;

Título é o número de partículas virais infecciosas por unidade de volume;

Unidade infecciosa é a menor quantidade de vírus que produz algum efeito reconhecível na célula hospedeira;

Efeito citopático (ECP) é o conjunto de todas as lesões provocadas por uma partícula viral nas células onde ela se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio. No caso dos vírus herpéticos, o ECP se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, freqüentemente ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando os focos. Esses focos têm o aspecto característico de cachos de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (GIRARD; HIRTH, 1989). O ECP do adenovírus é caracterizado pela presença de células arredondadas e agrupadas em focos, as quais, eventualmente, se descolam do frasco de

cultura celular. O ECP dos rotavírus é caracterizado por células arredondadas e granulação. Eventualmente, as células se destacam, desintegrando a monocamada (WIEDBRAUK; JOHNSTON, 1992).

A cepa KOS do HSV-1 foi titulada segundo o método das diluições limites, com cálculo do ponto de infecção a 50%, de acordo com a metodologia clássica de Reed e Munch (1938) e, também, pelo método das placas de lise (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992). O AdV-5 foi também titulado pelo método das placas de lise e o rotavírus SA-11 por imunofluorescência (BARARDI et al., 1998).

Procedimento do método das diluições limites: Preparou-se uma série de diluições 1:10, a partir de uma suspensão-estoque viral (HSV-1) de título desconhecido. Inoculou-se esta série nas células VERO (2×10^5 células/mL), cultivadas em meio MEM, com 5 % de SFB, por 24 h, e o efeito citopático viral, decorrente da replicação de até uma única partícula viral, foi observado microscopicamente. A titulação foi realizada em placas de microtitulação de 96 cavidades, na razão de 12 poços por cada diluição, cada poço contendo 50 μ l da suspensão viral. Após incubação a 37 °C, 5% de CO₂, durante 72h (= 4 ciclos de multiplicação do HSV-1), foi contado o número de poços onde o efeito citopático foi positivo e negativo, e foi então determinada a diluição que produz resposta positiva em 50% das amostras (TCID₅₀ = 50% tissue culture infectious dose = ID₅₀ = dose infectante 50%).

Procedimento do método das placas de lise: Células VERO e HEp2, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio MEM, suplementado com 5% de SFB, até atingirem confluência (=24h). O inóculo viral (HSV-1 e AdV-5) foi diluído em forma seriada (razão 1:10) em meio MEM sem SFB e com antibióticos/antifúngico. O meio foi aspirado e 500 μ L das diferentes diluições foram adicionadas em cada cavidade (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas a 37°C, estufa com 5% de CO₂, durante 1h e, a cada 15 min, foram suavemente agitadas para uma melhor distribuição do inóculo viral. Após esse tempo, o inóculo foi removido e foi adicionado 1,0 mL da seguinte solução: meio MEM 2X + solução aquosa a 1,5% de

carboximetilcelulose, na proporção 1:1, previamente esterilizada. As placas foram, então, novamente incubadas, durante 72h ou 120 h (= 4 ciclos de multiplicação do HSV-1 e do AdV-5, respectivamente). Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 500 μ L do corante preto de naftaleno (Sigma) preparado da seguinte forma: 0,1g do corante em 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v), pH 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel de filtro e estocada a 4° C. As células foram incubadas com o corante durante 30 min, a temperatura ambiente. Após este período, o corante foi aspirado e as placas foram deixadas para secar ao ambiente e quantificadas através da visualização por microscópio estereoscópio. Para calcular o título, contaram-se os focos de infecção que se apresentaram na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas. O título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placas/mL (pfu/mL) e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante. O título viral foi calculado através da fórmula:

$\text{n}^\circ \text{ de placas formadas na última diluição} \times \text{recíproca da diluição} \times \text{recíproca do volume (mL)}$

Procedimento de imunofluorescência: Células MA104 foram cultivadas na concentração de 5×10^4 células/mL em meio MEM durante 24h, em placas de 8 cavidades, especiais para este tipo de ensaio, até a formação de um tapete confluyente. A suspensão viral (RV-SA11) foi diluída de forma seriada (razão 1:10), em meio MEM (sem SFB acrescido de 5 μ g/mL de tripsina) e distribuída nas placas. Para a infecção viral, as células contidas em cada cavidade foram semeadas com 100 μ L de cada diluição viral. As placas foram incubadas durante 60 min com o rotavírus, a 37° C, em atmosfera de 5% em estufa de CO₂ para que ocorresse a adsorção dos vírus às células. Após esse período, o inóculo foi removido e, em seu lugar, foram adicionados 300 μ L de meio MEM. As células foram, então, incubadas durante 24h (=4 ciclos de

multiplicação do rotavírus), sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera acima mencionadas. Após o período de incubação, o meio foi removido das placas. Em seguida, as células foram fixadas pela adição de 300 μL de metanol a -20°C e mantidas, durante 5 min, a temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida para garantir a fixação adequada das células e, posteriormente, as placas foram secas ao ar. As células foram reidratadas com 300 μL de PBS, que foi retirado após 5 min. A próxima incubação foi realizada com 300 μL da solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1% e Tween 20 a 0,05%), durante 15 min. Posteriormente, em cada cavidade foram adicionados 100 μL de sobrenadante do hibridoma contendo o anticorpo monoclonal anti-rotavírus M60, diluído 1:2 em solução bloqueadora para o rotavírus; as placas foram incubadas, durante 12 h, a 4°C . Após, as células foram lavadas 3X com solução bloqueadora e, finalmente, incubadas, durante 15 min, a 37°C , com 100 μL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:100. As células foram novamente lavadas 3X com solução bloqueadora. Deixou-se secar e adicionou-se 10 μL de meio de montagem [PBS 40%, glicerol 50%, formalina 5%, NaCl 5% e DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octano) 2,5%; pH 8,6]. As placas foram recobertas com lamínulas para a realização da leitura em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com um filtro de excitação verde (515-560 nm), 200X. O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos/mL (ffu/mL).

4.4 Avaliação da citotoxicidade

4.4.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

O sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazana de coloração azul-escuro, não solúvel em água e fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio

colorimétrico com MTT mede a quantidade de formazana formado através de espectrofotometria tipo ELISA e é sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis. Neste trabalho, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com algumas modificações segundo Sieuwerts e colaboradores (1995).

Procedimento: Células VERO, HEp-2 e MA104 foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade, 100 μ L/cavidade) até confluência (=24h) usando meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 200 μ L dos materiais-teste diluídos seriadamente (razão 1:2). Foram feitos controles celulares (200 μ L meio MEM) e branco (100 μ L de DMSO). Após, as placas foram novamente incubadas, por 4, 5 e 3 dias, respectivamente, para as células VERO, HEp-2 e MA104. Posteriormente, foi aspirado todo o meio e adicionou-se 50 μ L de MTT (Sigma, 1mg/mL), diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por mais 4h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio+MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionou-se 100 μ L de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazana. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e lidas a 540nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800). O percentual de citotoxicidade foi calculado como $[(A-B)/A \times 100]$, onde A e B foram as absorbâncias lidas, relativas aos materiais-testes e aos controles celulares, respectivamente. Para cada material-teste, foi calculado o valor de CC₅₀, que é definido como a concentração que reduz a absorbância das células em 50%, quando comparada com os controles celulares.

4.5 Avaliação da potencial atividade anti-herpética, antiadenovírus e anti-rotavírus.

4.5.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

4.5.1.1 Procedimento 1: adição simultânea dos materiais-teste + vírus: Células VERO, HEp-2 e MA104 foram cultivadas em placas de

microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade) até confluência (=24h) usando meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100µL dos materiais-teste diluídos (razão 1:2) e 100µL da suspensão viral (HSV-1, HEp-2 ou RV-SA11), com MOI de 0,5, em cada cavidade. Foram feitos controles celulares (200µL meio MEM), controles virais (100µL suspensão viral + 100µL meio), controle positivo para os testes envolvendo o HSV-1 (100µL suspensão viral + 100µL aciclovir 10µg/mL) e branco (100µL de DMSO). Após, as placas foram novamente incubadas, por 96h, 120h e 72h, respectivamente, para as células VERO infectadas com HSV-1, HEp-2 infectadas com AdV-5 e MA104 infectadas com RV-SA11. Posteriormente, aspirou-se todo o meio e foram adicionados 50 µL de MTT (Sigma, 1mg/mL) diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por mais 4h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio+MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e foram adicionados 100µL de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazan. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e lidas a 540nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, El_x 800).

Para cada material-teste, foi calculado o valor de CE₅₀, que é definido como a concentração que inibe em 50% a replicação viral, quando comparada com os controles virais. Utilizou-se a seguinte fórmula para a avaliação da atividade antiviral (% inibição):

$$(A - B) / C - B \times 100 = \% \text{ inibição}$$

A,B,C= absorbâncias dos materiais-testes, dos controles virais e dos controles celulares, respectivamente.

Quando de posse dos valores de CC₅₀ e de CE₅₀, foi possível calcular os índices de seletividade (IS= CC₅₀/ CE₅₀), que indicam quão promissora é a atividade antiviral do material-teste em questão.

Ao utilizar o ensaio do MTT para avaliar a atividade antiviral é importante obter um valor igual ou inferior a 0,2 na razão (A)_{CV} / (A)_{CC}. Isto significa que a

garantia da sensibilidade do ensaio se deve à diferença entre os valores de absorbância (A) (entenda-se viabilidade celular) dos controles viral (CV) e celular (CC). O ideal é que, ao final do tempo de incubação da placa, o controle celular esteja viável enquanto o controle viral esteja totalmente destruído. Qualquer porcentagem de viabilidade celular detectada nos testes será conferida à ação antiviral do material em teste e o grau desta proteção poderá ser calculado para cada concentração do material testado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

4.5.1.2 Procedimento 2: pré-tratamento das células com os materiais-testes, antes da adição dos vírus: Células VERO, HEp-2 e MA104 foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade) até confluência (=24h) usando meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100µL dos materiais-teste diluídos (razão 1:2), que ficaram em contato com o tapete celular por 15h. Decorrido este período, os materiais-teste foram aspirados, e adicionou-se 100µL da suspensão viral (HSV-1, AdV-5 ou RV-SA11), com MOI de 0,5, em cada cavidade. Foram feitos controles celulares (200µL meio MEM), controles virais (100µL suspensão viral + 100µL meio), controle positivo para os testes envolvendo o HSV-1 (100µL suspensão viral + 100µL aciclovir 10µg/mL) e branco (100µL de DMSO). Após, as placas foram incubadas novamente por 96h, 120h e 72h, respectivamente, para as células VERO infectadas com HSV-1, células HEp-2 infectadas com AdV-5 e células MA-104 infectadas com RV-SA11. Posteriormente, aspirou-se todo o meio e adicionou-se 50 µL de MTT (Sigma, 1mg/mL), diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por 4h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio+MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e foram adicionados 100µL de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazan. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e lidas a 540nm num espectrofotômetro (Bio-Tek,

Elx 800). A quantificação do experimento foi feita através da análise de regressão linear, a partir de curvas concentração *versus* efeito.

Da mesma forma que no item anterior, foram calculadas os valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material teste.

4.5.1.3 Procedimento 3: pós-tratamento das células infectadas com os materiais-testes: Células VERO, HEp-2 e MA104 foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/cavidade) até confluência (=24h) usando meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO_2 . O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100µL da suspensão viral dos vírus (HSV-1, AdV-5 ou RV-SA11), com MOI de 0,5, que ficaram em contato com o tapete celular por 3 h. Decorrido este período, a suspensão viral foi aspirada, e foram adicionados 100µL de PBS para a lavagem; retirou-se toda a suspensão viral das cavidades e logo após foram adicionados 100µL dos materiais-teste diluídos (razão 1:2). Foram feitos controles celulares (200µL meio MEM), controles virais (100µL suspensão viral + 100µL meio), controle positivo para os testes envolvendo o HSV-1 (100µL suspensão viral + 100µL aciclovir 10µg/mL) e branco (100µL de DMSO). Após, as placas foram novamente incubadas por 96h, 120h e 72h, respectivamente, para as células VERO infectadas com HSV-1, células HEp-2 infectadas com AdV-5 e células MA-104 infectadas com RV-SA11. Posteriormente, aspirou-se todo o meio e adicionou-se 50 µL de MTT (Sigma, 1mg/mL), diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por 4h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio+MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionou-se 100µL de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazan. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e lidas a 540nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800). A quantificação do experimento foi feita através da análise de regressão linear, a partir de curvas concentração *versus* efeito. Da mesma forma que no item anterior, foram calculadas os valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material teste.

4.6 Delineamento experimental e análise estatística

Tanto na avaliação da citotoxicidade, como na avaliação da potencial atividade antiviral, foi utilizada a metodologia de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo multifatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade da placa constitui uma unidade experimental e os tratamentos foram realizados com os diferentes extratos de esponjas e compostos de organismos marinhos *versus* as diferentes concentrações testadas.

Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa, tendo sido feitas três repetições, em placas diferentes e em dias diferentes. O sorteio dos tratamentos sobre as unidades experimentais aumenta a probabilidade de que possíveis fatores interferentes desconhecidos fiquem igualmente distribuídos nos blocos e faz com que a estimativa dos valores e médias dos tratamentos e do erro experimental não sejam tendenciosas. Cada bloco (placa) agrupa uma repetição de todos os tratamentos. Realizou-se uma análise de regressão linear para calcular os valores de CC_{50} (concentração que causa citotoxicidade a 50 % das células de uma cavidade) e de CE_{50} (concentração que inibe a multiplicação viral em aproximadamente 50% das células de uma cavidade), a partir de curvas de concentração *versus* efeito.

A partir dos resultados obtidos através das curvas de concentração *versus* efeito, foi realizado o tratamento estatístico entre as três repetições de cada material-teste, tanto para o cálculo da citotoxicidade (CC_{50}), quanto para o cálculo da atividade antiviral (CE_{50}). O tratamento estatístico consistiu no cálculo do desvio padrão, já que este fornece a variação obtida em relação a média das três repetições (SOKAL; ROHLF, 1995).

O estudo de qualquer atividade farmacológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que, normalmente, é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de um material-teste, em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou replicata. Estatisticamente, esse

procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levada em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995). Por isso, foram realizados três experimentos independentes, em dias subseqüentes, o que caracteriza uma triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação dos títulos virais

Os títulos infecciosos das soluções-estoques virais foram determinados conforme as metodologias descritas no item 4.3.2 Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 7: Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Títulos
HSV-1 cepa KOS	$5 \times 10^{6,625}$ TCID ₅₀ /mL $2,6 \times 10^7$ pfu/mL
AdV-5	$1,6 \times 10^8$ pfu/mL
RV-SA-11	5×10^8 ffu/mL

5.2 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade dos extratos de esponjas e dos compostos puros frente às diferentes linhagens celulares utilizadas foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados obtidos com os extratos de esponjas estão reunidos nas Tabelas 8, 9 e 10 respectivamente, referentes às células VERO, HEp-2 e MA104. Os resultados obtidos com os compostos puros, em células VERO, estão apresentados na Tabela 11. Todos estes extratos foram testados a partir da concentração de 1.000 µg/mL e os compostos puros a partir de 175 µg/mL.

5.3 Avaliação da potencial atividade anti-herpética, antiadenovírus e anti-rotavírus

A potencial atividade antiviral dos extratos de esponjas e dos compostos puros foi avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT, com monitoramento prévio, por microscopia ótica invertida, da inibição do efeito citopático viral (ECP).

Após o período de incubação de 96 h para o HSV-1/ KOS, 128 h para o AdV-5 e 24 h para o RV-SA11, foi possível observar, na maioria dos casos, a inibição do ECP a partir da análise microscópica, comparando-a com os resultados obtidos pelo ensaio do MTT. Quando foi possível calcular os valores de CE_{50} , foram também calculados os respectivos IS (CC_{50}/CE_{50}). Quando isto não foi possível, os percentuais de inibição da infecção viral foram calculados através da fórmula citada no item 4.5.1.1. Os resultados da potencial atividade antiviral dos extratos de esponjas, obtidos quando da realização do procedimento 1 (item 4.5.1.1), para os vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11 estão reunidos nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. Os compostos puros, por serem disponíveis em quantidades muito pequenas, só foram testados com relação ao vírus HSV-1/ KOS, e os resultados estão na Tabela 11

Para os experimentos conduzidos com o vírus HSV-1/KOS, foram realizados controles positivos com o aciclovir, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O resultado de proteção obtido foi de $99,24\% \pm 8,32$ de acordo com o que é referenciado na literatura (DE JALON et al., 2003) e atestando a eficiência da metodologia empregada.

Tabela 8: Resultados da citotoxicidade (células VERO) e da triagem da potencial atividade anti-herpética (HSV-1 cepa KOS) dos extratos de esponjas, coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE).

Esponjas - local de coleta	CC ₅₀ µg/mL (Média ± DP)		CE ₅₀ µg/mL Média ± DP)	% Inibição ± DP	IS (CC ₅₀ / CE ₅₀)
	Orgânico	Aquoso			
<i>Petromica citrina</i> (SC)	NT	580 ± 60	277 ± 24	*	2,0
<i>Tedania ignis</i> (SC)	NT	370 ± 40	*	38 ± 15	*
<i>Pseudaxinella reticulata</i> (SC)	500 ± 45	NT	257 ± 20	*	2,0
<i>Pseudaxinella reticulata</i> (SC)	NT	>1000	595 ± 62	*	1,7
<i>Polymastia janeirensis</i> (SC)	>1000	NT	*	8 ± 2	*
<i>Polymastia janeirensis</i> (SC)	NT	436 ± 87	358 ± 32	*	1,2
<i>Polymastia janeirensis</i> (SC)	510 ± 33X	NT	170 ± 24	*	3,0
<i>Axinella aff corrugata</i> (SC)	NT	>1000	332 ± 26	*	3,0
<i>Axinella aff corrugata</i> (SC)	>1000	NT	*	33 ± 35	*
<i>Haliclona tubifera</i> (SC)	680 ± 130	NT	*	7 ± 1	*
<i>Mycale arcuiris</i> (SC)	NT	535 ± 42	*	37 ± 5	*
<i>Cinachyrella alloclada</i> (SC)	NT	>1000	*	38 ± 8	*
<i>Cinachyrella alloclada</i> (SC)	>1000	NT	*	11 ± 0,5	*
<i>Guitarra</i> sp.(SC)	NT	>1000	*	5,5 ± 2,5	*
<i>Guitarra</i> sp.(SC)	>1000	NT	*	3,6 ± 1,5	*
<i>Haliclona</i> sp.(SC)	NT	507 ± 126	419 ± 34	*	1,0
<i>Haliclona</i> sp.(SC)	495 ± 6	NT	*	18 ± 10	*
<i>Agelas</i> sp.(SC)	NT	>1000	*	6,5 ± 1,5	*
<i>Agelas</i> sp.(SC)	>1000	NT	*	40 ± 7	*
<i>Agelas</i> sp.2 (SC)	NT	>1000	378 ± 45	*	2,5
<i>Agelas</i> sp.2 (SC)	>1000	NT	575 ± 62	*	1,5
<i>Laxosuberites</i> sp. (SC)	NT	>1000	*	15 ± 2,5	*
<i>Laxosuberites</i> sp. (SC)	427 ± 52	NT	*	45 ± 95	*
<i>Tethya</i> sp. (SC)	NT	>1000	425 ± 85	*	2,5
<i>Cliona</i> sp.2 (SC)	NT	>1000	*	s/ inibição	*
<i>Cliona</i> sp.2 (SC)	>1000	NT	*	*	*
<i>Cliona</i> sp.(SC)	NT	>1000	136 ± 15	*	7,35
<i>Cliona</i> sp.(SC)	>1000	NT	26 ± 10	*	*
<i>Halichondria</i> sp. (SC)	NT	593 ± 200	*	25 ± 5	*
<i>Chondrosia collectrix</i> (SC)	NT	640 ± 37	334 ± 90	*	2,0
<i>Chondrosia collectrix</i> (SC)	483 ± 5,5	NT	*	39 ± 5,5	*
<i>Placospongia intermédia</i> (SC)	NT	727 ± 12	*	27 + 4	*
<i>Arenosclera</i> sp. (SC)	NT	671 ± 21	*	28 ± 13	*
<i>Raspailia elegans</i> (SC)	NT	465 ± 46	*	s/ inibição	*
<i>Suberites</i> sp. (PE)	NT	637 ± 5	*	s/ inibição	*
<i>Cinachyrella</i> sp. (PE)	NT	>1000	*	s/ inibição	*
<i>Placospongia cf. carinata</i> (PE)	NT	52 ± 12	*	37 ± 9	*
<i>Haliclona</i> sp.2 (PE)		>1000	*	s/ inibição	*
<i>Haliclona</i> sp.2 (PE)	72 0 ± 9		*	s/ inibição	*
<i>Halichondria</i> sp.2 (PE)	NT	671 ± 74	*	s/ inibição	*

Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão

* = Não foi possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS (CC₅₀/ CE₅₀)

NT = Não testado

Tabela 8: Resultados da citotoxicidade (células HEp) e da triagem da potencial atividade antiadenovirus (AdV-5) dos extratos de esponjas, coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE).

Esponjas - local de coletada	CC ₅₀ µg/mL (média ± DP)		CE ₅₀ µg/mL (média ± DP)	% Inibição ± DP	IS (CC ₅₀ / CE ₅₀)
	Orgânico	Aquoso			
<i>Petromica citrina</i> (SC)	NT	534 ± 50	117 ± 15	*	4,5
<i>Tedania ignis</i> (SC)	225 ± 60	413 ± 3,5	124 ± 6,5	*	3,3
<i>Pseudaxinella reticulata</i> (SC)	333 ± 80	714 ± 100	136 ± 15	*	1,6
<i>Polymastia janeirensis</i> (SC)	464 ± 44	380 ± 30	*	s/ inibição	*
<i>Axinella aff corrugata</i> (SC)	398 ± 95	866 ± 98	400 ± 14	*	2,0
<i>Haliclona tubifera</i> (SC)	NT	488 ± 41	*	24 ± 5	*
<i>Mycale arcuiris</i> (SC)	NT	407 ± 100	*	s/ inibição	*
<i>Cinachyrella alloclada</i> (SC)	>1000	>1000	*	10 ± 2	*
<i>Guitarra</i> sp. (SC)	NT	>1000	*	s/ inibição	*
<i>Haliclona</i> sp. (SC)	495 ± 6	>1000	*	8 ± 2	*
<i>Agelas</i> sp (SC)	>1000	>1000	225 ± 13	18 ± 3	*
<i>Agelas</i> sp.2 (SC)	810 ± 5	>1000	*	s/ inibição	4,5
<i>Laxosuberites</i> sp. (SC)	448 ± 32	>1000	*	s/ inibição	*
<i>Tethya</i> sp. (SC)	NT	415 ± 69	230 ± 25	40 ± 4	*
<i>Cliona</i> sp.2 (SC)	>1000	283 ± 20	*	s/ inibição	*
<i>Cliona</i> sp. (SC)	>1000	750 ± 85	*	20 ± 2	*
<i>Halichondria</i> sp. (SC)	NT	322 ± 38	*	12 ± 0,7	*
<i>Chondrosia collectrix</i> (SC)	586 ± 41	387 ± 31	*	4 ± 1	*
<i>Placospongia intermédia</i> (SC)	NT	481 ± 108	*	s/ inibição	*
<i>Arenosclera</i> sp. (SC)	NT	815 ± 150	*	s/ inibição	*
<i>Raspailia elegans</i> (SC)	>1000	465 ± 46	*	s/ inibição	*
<i>Suberites</i> sp (PE)	NT	478 ± 32	*	14 ± 3	*
<i>Cinachyrella</i> sp. (PE)	NT	>1000	*	3 ± 1	*
<i>Placospongia cf. carinata</i> (PE)	NT	752 ± 12	*	s/ inibição	*
<i>Haliclona</i> sp.2 (PE)	388 ± 44	>1000	637 ± 35	37 ± 9	*
<i>Halichondria</i> sp.2 (PE)	NT	388 ± 25	*	5 ± 0,8	1,5
		NT			*

Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão

* = Não foi possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS (CC₅₀/ CE₅₀)

NT = Não testado

Tabela 9: Resultados da citotoxicidade (células MA104) e da triagem da potencial atividade antirotavírus (RV-SA11) dos extratos de esponjas, coletadas em Santa Catarina (SC) e Pernambuco (PE).

Esponjas - local de coleta	CC ₅₀ µg/mL (média ± DP)		CE ₅₀ µg/mL (média ± DP)	% Inibição ± DP	IS (CC ₅₀ / CE ₅₀)
	Orgânico	Aquoso			
<i>Petromica citrina</i> (SC)	NT	>1000	*	8 ± 3	*
<i>Tedania ignis</i> (SC)	NT	>1000	*	12 ± 8	*
<i>Pseudaxinella reticulata</i> (SC)	>1000	NT	986 ± 63	*	1,3
<i>Polymastia janeirensis</i> (SC)	NT	>1000	35 ± 8	*	28,5
<i>Axinella aff corrugata</i> (SC)	>1000	>1000	973 ± 265	32 ± 9	1,0
<i>Haliclona tubifera</i> (SC)	NT	>1000	*	21 ± 5	*
<i>Mycale arcuris</i> (SC)		>1000	591 ± 200	*	1,7
<i>Cinachyrella alloclada</i> (SC)	NT	NT		s/ inibição	*
<i>Guitarra</i> sp. (SC)	NT	NT			*
<i>Haliclona</i> sp. (SC)	NT	NT			*
<i>Agelas</i> sp. (SC)	NT	NT			*
<i>Agelas</i> sp.2 (SC)	NT	NT			*
<i>Laxosuberites</i> sp. (SC)	NT	>1000	80 ± 16	*	12,5
<i>Tethya</i> sp. (SC)	NT	NT			*
<i>Cliona</i> sp.2 (SC)	>1000	NT	111,5 ± 45	*	9,0
<i>Cliona</i> sp. (SC)	>1000	100 ± 24	*	22 ± 15	*
<i>Halichondria</i> sp. (SC)	NT	NT		5 ± 1,20	*
<i>Chondrosia collectrix</i> (SC)	NT	NT			*
<i>Placospongia intermédia</i> (SC)	NT	NT			*
<i>Arenosclera</i> sp. (SC)	NT	NT			*
<i>Raspailia elegans</i> (SC)	NT	NT			*
<i>Suberites</i> sp.	NT	NT			*
<i>Cinachyrella</i> sp.	NT	NT			*
<i>Placospongia cf. carinata</i>	NT	NT			*
<i>Haliclona</i> sp.	NT	>1000	367 ± 34	*	27,0
<i>Halichondria</i> sp.2	NT	NT			*

Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão

* = Não foi possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS (CC₅₀/ CE₅₀)

NT = Não testado

Tabela 11: Resultados da citotoxicidade (células VERO) e da potencial atividade antiherpética (HSV-1, cepa KOS) de compostos puros.

Compostos	CC ₅₀ µg/mL (média ± DP)	CE ₅₀ µg/mL (média ± DP)	% Inibição ± DP
Lectina – <i>Axinella</i> aff. <i>corrugata</i>	> 100	*	21 ± 2,5
H09L2A	> 175	*	14 ± 1,2
H09L2B	325 ± 21	*	16 ± 3,0
H09L3A	> 275	*	16 ± 5,0
H09L3B	> 400	*	24 ± 3,5
H09L5B	136 ± 34	*	27 ± 1,6
H09L6D	> 160	*	18 ± 3,2
H09L7A	> 400	*	26 ± 4,0
H09L7B	> 400	*	29 ± 5,5
6HQ	> 1000	*	32 ± 7,0
ISOMERIDININA C	> 400	*	21 ± 4,0
ISOMERIDININA G	> 500	*	27 ± 7,5

Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão

Não foi possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS (CC₅₀/ CE₅₀).

Aciclovir foi utilizado como controle positivo de inibição do HSV-1/KOS na concentração de 2,5 µg/mL e atingiu uma proteção de 97,50 ± 0,98

Os materiais-testes que demonstraram atividade antiviral (IS ≥ 1,5) quando da realização do procedimento 1 (item 4.5.1.1) (= adição simultânea aos vírus) foram submetidos aos ensaios de pré- e pós-tratamento (procedimentos 2 e 3, itens 4.5.1.2 e 4.5.1.3) e estão sumarizados nas Tabelas 12, 13 e 14, respectivamente, referentes aos vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11. Deve-se mencionar que para alguns extratos, que demonstraram atividade antiviral no procedimento 1, não havia quantidade suficiente para a realização dos ensaios de pré- e pós-tratamento..

Tabela 12: Resultados obtidos através do pré- e do pós-tratamento com os extratos de esponjas marinhas (vírus herpético HSV-1/ cepa KOS).

Esponja	Extrato		CC ₅₀ (Média ± DP) (µg/mL)	Pré-tratamento CE ₅₀ (Média ± DP) (µg/mL)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)	Pós-tratamento CE ₅₀ (Média ± DP) (µg/mL)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)
	Or	Aq					
<i>Petromica citrina</i>		X	580 ± 0	195 ± 12	3,0	240 ± 30	2,4
<i>Tedania ignis</i>	X		500 ± 5	250 ± 30	2,0	s/ atividade	---
<i>Dragmacidon reticulatus</i>		x	>1000	200 ± 21	5,0	s/ atividade	---
<i>Axinella aff corrugata</i>		x	>1000	200 ± 14	5,0	s/ atividade	---
<i>Agelas sp.2</i>		x	>1000	125 ± 28	8,0	350 ± 56	2,6
<i>Tethya sp.</i>		x	>1000	200 ± 41	5,0	450 ± 85	2,2

Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão; Or= orgânico; Aq= Aquoso; Os extratos das esponjas: *Cliona* sp. (extrato aquoso), *Polymastia janeirensis* (extrato orgânico), *Agelas* sp.2 (extrato orgânico) e *Chondrosia collectrix* (extrato aquoso), apesar de terem apresentados valores de IS ≥ 1,5, não foram submetidos aos ensaios de pré- e pós-tratamento, pois não havia mais quantidades suficientes destes extratos para análise.

Tabela 13 : Resultados obtidos através do pré- e do pós-tratamento com os extratos de esponjas marinhas (adenovírus humano AdV-5).

Esponja	Extrato		CC ₅₀ (Média ± DP) (µg/mL)	Pré-tratamento CE ₅₀ Média ± DP (µg/mL)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)	Pré-tratamento CE ₅₀ Média ± DP (µg/mL)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)
	Or	Aq					
<i>Petromica citrina</i>		x	534 ± 50	198 ± 19	2,7	s/ atividade	
<i>Tedania ignis</i>		x	413 ± 3,5	167 ± 23	2,5	152 ± 21	2,8
<i>Tedania ignis</i>	X		225 ± 60	52 ± 30	4,3	50 ± 10	4,5
<i>Axinella aff. corrugata</i>		x	866 ± 98	125 ± 9	7,0	346 ± 56	2,5
<i>Agelas sp.</i>		x	>1000	100 ± 15	10	120 ± 43	8,3
<i>Tethya sp.</i>		x	415 ± 69	130 ± 11	3,2	315 ± 32	1,3

Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão; Or= Orgânico; Aq= Aquoso; o extrato da esponja *Haliclona* sp. 2 (extrato aquoso) não foi submetido aos ensaios de pré- e pós-tratamento, pois não havia mais quantidade suficiente deste extrato para análise.

Tabela 14: Resultados obtidos através do pré- e de pós-tratamento com os extratos de esponjas marinhas (rotavírus RV-SA11).

Esponja	Extrato		CC ₅₀ (Média ± DP) (µg/mL)	Pré-tratamento Inibição ± DP (%)	Pós-tratamento CE ₅₀ (Média ± DP) (µg/mL) ou Inibição ± DP	IS (CC ₅₀ / CE ₅₀)
	Or	Aq				
<i>Dragmacidon reticulatus</i>	x		>125	22,38 ± 10,0	31,0 % ± 5,6	-
<i>Cliona</i> sp.2	x		>125	31,26 ± 4,0	42,8 ± 7,4	3,0
<i>Haliclona</i> sp. (PE)		x	>250	37,48 ± 2,5	187,0 ± 34,0	1,4
<i>Protosuberites</i> sp.		x	>125	43,76 ± 11,0	31,5 % ± 9,5	-
<i>Polymastia janeirensis</i>		x	>125	48,54 ± 4,0	83,0 ± 36,0	1,7

Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão; Or= Orgânico; Aq= Aquoso; SC= Santa Catarina. O extrato aquoso de *Mycale arcuiris* (extrato aquoso) não foi submetido aos ensaios de pré- e pós-tratamento, pois não havia mais quantidade suficiente deste extrato para análise.

Com o objetivo de facilitar a análise dos resultados e também a discussão dos mesmos estão expostos nas Tabelas 14 e 15, os resultados que mais se destacaram para a avaliação da potencial atividade antiviral.

Tabela 15: Resultados mais promissores da triagem (tratamento simultâneo) das atividades anti-herpética (HSV-1/KOS), antiadenovírus (AdV-5) e antirotavírus (RV-SA11) dos extratos de esponjas marinhas coletadas na costa brasileira.

Esponja – extrato (local de coleta)	HSV-1/KOS IS	AdV-5 IS	RV-SA11 IS
<i>Petromica citrina</i> - aq	2,0	4,5	*
<i>Tedania ignis</i> - or	2,0	1,6	MI
<i>Tedania ignis</i> - aq	*	3,3	MI
<i>Dragmacidon reticulatus</i> - aq	1,7	*	*
<i>Dragmacidon reticulatus</i> - or	*	*	<1,5
<i>Axinella aff corrugata</i> - aq	3,0	2,0	<1,5
<i>Agelas</i> sp. - aq	*	4,5	*
<i>Agelas</i> sp.2 - aq	2,5	*	MI
<i>Agelas</i> sp.2 - or	1,5	*	MI
<i>Tethya</i> sp.- aq	2,5	1,8	MI
<i>Polymastia janeirensis</i> - or	3,0	*	MI
<i>Polymastia janeirensis</i> - aq	<1,5	*	28,5
<i>Cliona</i> sp. - aq	7,35	*	*
<i>Cliona</i> sp.2 - or	*-	*	9,0
<i>Chondrosia collectrix</i> - aq	2,0	*	MI
<i>Mycale arcuris</i> - aq	*	*	1,7
<i>Haliclona</i> sp. – aq (SC)	<1,5	*	MI
<i>Haliclona</i> sp. - aq (PE)	*	1,5	27,0
<i>Protosuberites</i> sp. - aq	*	*	12,5

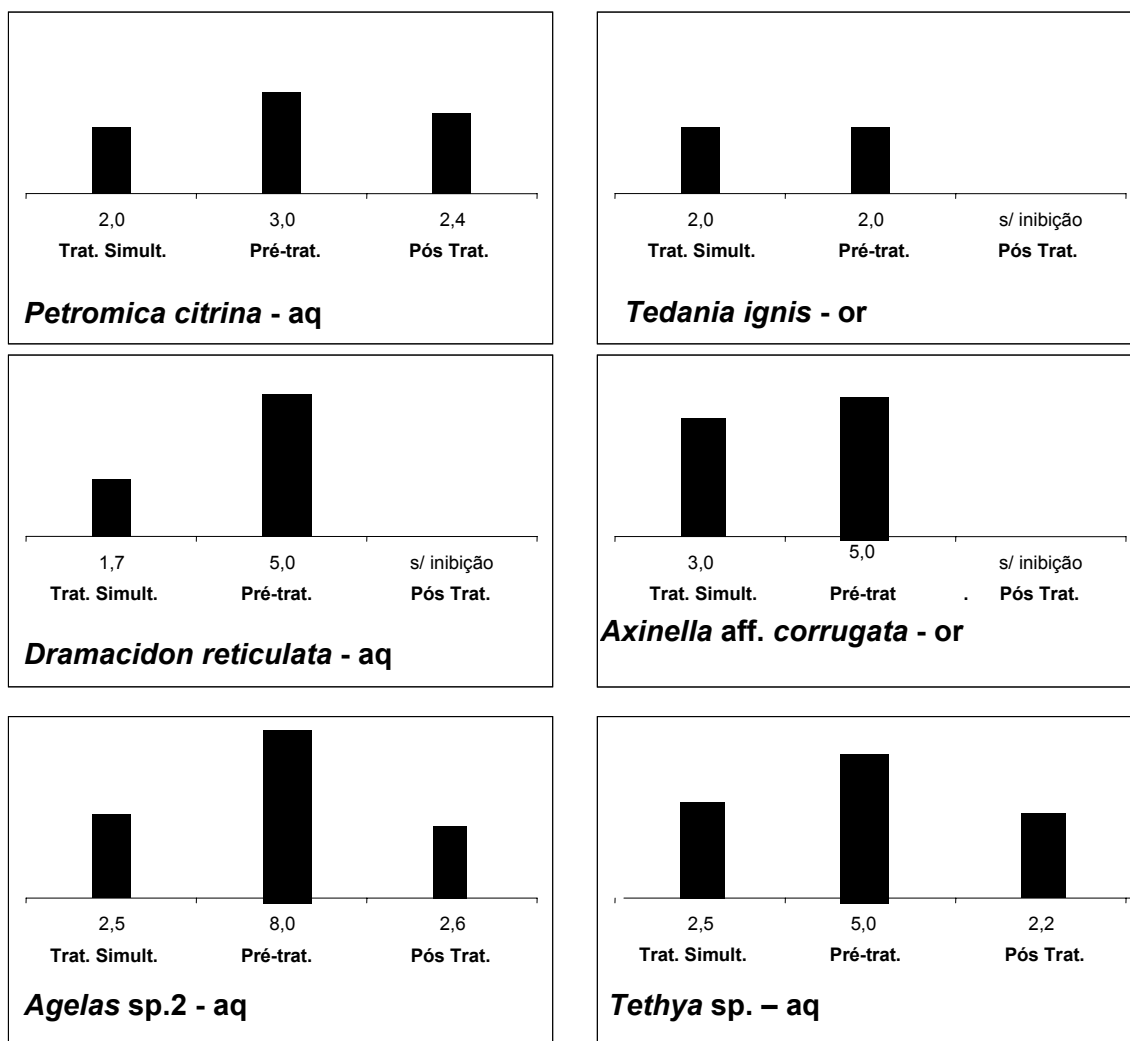
aq= Extrato aquoso ; or= Extrato orgânico; IS= CC_{50}/CE_{50} ; SC=Santa Catarina; PE= Pernambuco
 * Não foi possível calcular os valores de CE_{50} e, conseqüentemente, os valores de IS (CC_{50}/CE_{50})
 MI= Não foi testado porque não havia mais quantidade suficiente de extrato para realizar a triagem com o rotavírus.

Tabela 16: Resultados obtidos frente aos vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11 para os ensaios de pré- e pós-tratamento.

Esponja – extrato (local de coleta)	HSV-1/KOS (IS)		AdV-5 (IS)		RV-SA11 (IS)	
	Tratamento		Tratamento		Tratamento	
	Pré-	Pós-	Pré-	Pós-	Pré-	Pós-
<i>Petromica citrina</i> - aq	3,0	2,4	2,7	s/ inibição	NT	NT
<i>Tedania ignis</i> - or	2,0	s/ inibição	4,3	4,5	MI	MI
<i>Tedania ignis</i> -- aq	NT	NT	2,5	2,8	NT	NT
<i>Dragmacidon reticulatus</i> - aq	5,0	s/ inibição	NT	NT	s/ inibição	s/ inibição
<i>Axinella aff corrugata</i> –or	5,0	s/ inibição	7,0	2,5	NT	NT
<i>Agelas</i> sp. – aq	NT	NT	10,0	8,3	MI	MI
<i>Agelas</i> sp.2- aq	8,0	2,6	NT	NT	MI	MI
<i>Agelas</i> sp.2 - or	MI	MI	NT	NT	MI	MI
<i>Tethya</i> sp.- aq	5,0	2,2	3,2	1,3	MI	MI
<i>Polymastia janeirensis</i> - or	MI	MI	NT	NT	MI	MI
<i>Polymastia janeirensis</i> - aq	NT	NT	NT	NT	s/ inibição	1,7
<i>Cliona</i> sp. - aq	MI	MI	NT	NT	NT	NT
<i>Cliona</i> sp.2 – or	NT	NT	NT	NT	s/ inibição	3,0
<i>Chondrosia collectrix</i> - aq	MI	MI	NT	NT	MI	MI
<i>Mycale arcuiris</i> - aq	NT	NT	NT	NT	MI	MI
<i>Haliclona</i> sp. – aq (PE)	NT	NT	MI	MI	s/ inibição	1,4
<i>Protosuberites</i> sp. - aq	NT	NT	NT	NT	s/ inibição	s/ inibição

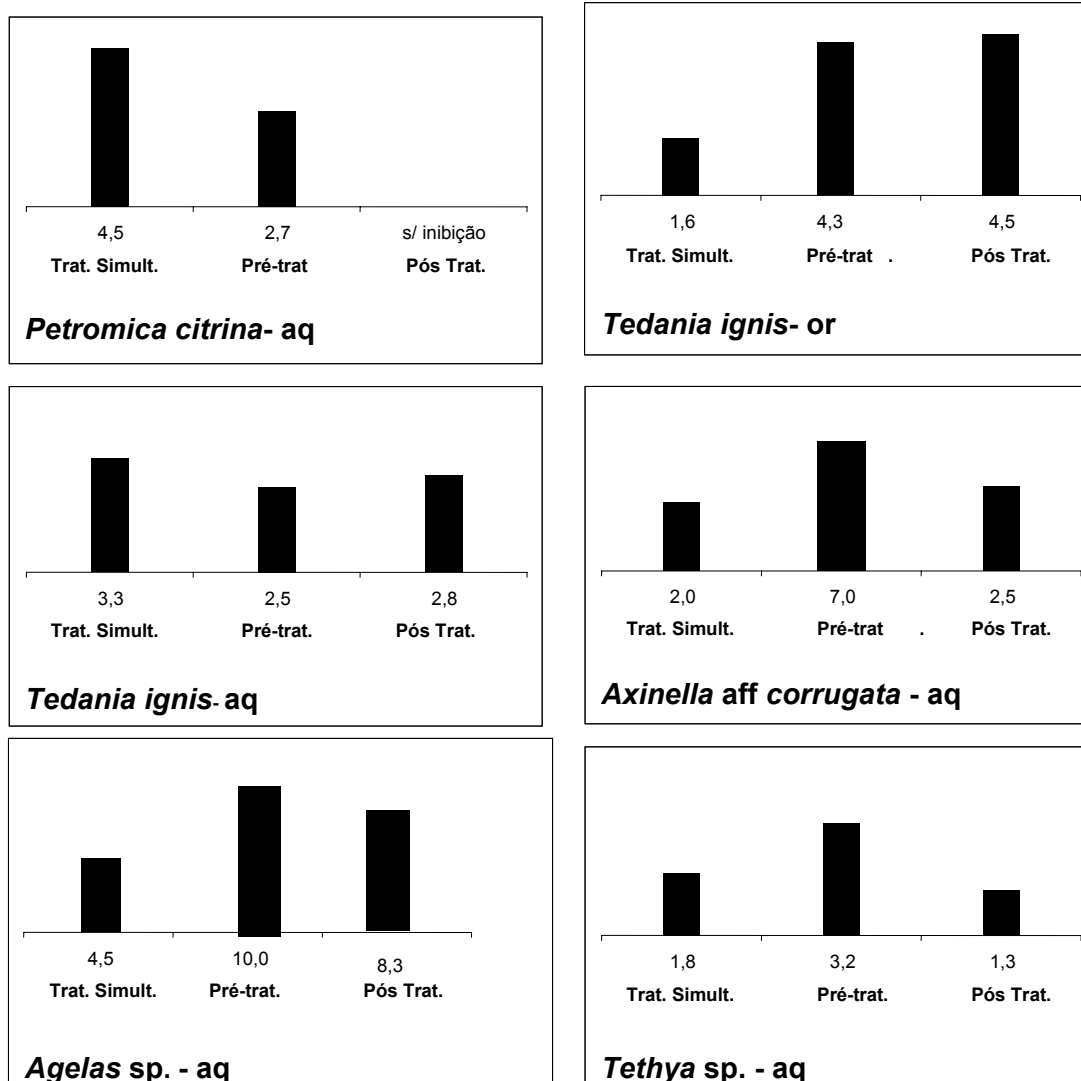
aq= extrato aquoso; or=extrato orgânico; PE= Pernambuco; IS=CC₅₀/ CE₅₀; MI= não foi testado, pois não havia mais quantidade suficiente de extrato; NT = não foi testado devido à baixa atividade antiviral (IS < 1,5).

As Figuras 2, 3 e 4 mostram a comparação dos valores de IS, obtidos nas diferentes estratégias de avaliação da atividade antiviral (tratamento simultâneo, pré- e pós-tratamento) frente aos vírus HSV-1/KOS e AdV-5. Como não houve atividade para o pré- e pós-tratamento para o vírus RV-SA11, para esse os resultados não serão apresentados em forma de figura.



aq=extrato aquoso; or= extrato orgânico;
 Trat. Simult. = Tratamento simultâneo (adição dos materiais-testes + vírus);
 Pré-trat.= Pré-tratamento (adição dos materiais-testes, antes da adição dos vírus);
 Pós-trat.= Pós-tratamento (adição dos materiais-testes, depois da adição dos vírus).

Figura 2: Resultados da avaliação da atividade antiviral em relação ao vírus herpético tipo-1, cepa KOS (HSV-1/KOS), expressos através dos valores de IS (CC₅₀/CE₅₀) dos extratos de esponjas marinhas, cujos resultados preliminares forneceram valores de IS \geq 1,5 .



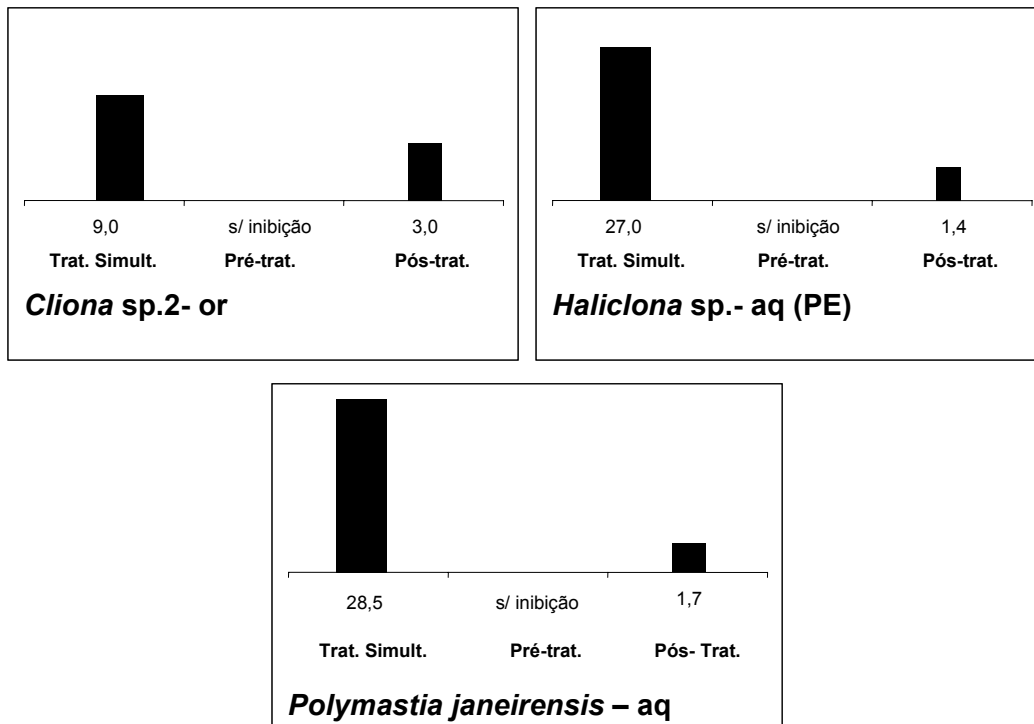
aq= extrato aquoso; or= extrato orgânico

Trat. Simult. = Tratamento simultâneo (adição dos materiais-testes + vírus)

Pré-trat.= Pré-tratamento (adição dos materiais-testes, antes da adição dos vírus)

Pós-trat.= Pós-tratamento (adição dos materiais-testes, depois da adição dos vírus)

Figura 3: Resultados da avaliação da atividade antiviral em relação ao adenovírus sorotipo-5 (AdV-5), expressos através dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) dos extratos de esponjas marinhas, cujos resultados preliminares forneceram valores de IS $\geq 1,5$.



aq= extrato aquoso; or= extrato orgânico; PE=Pernambuco
Trat. Simult. = Tratamento simultâneo (adição dos materiais-testes + vírus)
Pré-trat.= Pré-tratamento (adição dos materiais-testes, antes da adição dos vírus)
Pós-trat.= Pós-tratamento (adição dos materiais-testes, depois da adição dos vírus)

Figura 4: Resultados da avaliação da atividade antiviral (RV-SA11), expressos através dos valores de IS (CC50/CE50) dos extratos de esponjas marinhas, cujos resultados preliminares forneceram valores de $IS \geq 1,5$.

6 DISCUSSÃO

A grande diversidade dos compostos encontrados nos invertebrados marinhos, em particular as esponjas, tunicados e celenterados, ocorrem por estes carecerem de sistema imunológico e, portanto, devem biossintetizar ou incorporar na dieta suas próprias armas químicas de defesa, que permitirão sua sobrevivência em ecossistemas tão competitivos. Já foram relatados para extratos preparados com esses organismos, compostos com atividades citotóxica, antimicrobiana, antifúngica e antiviral, além de outras atividades farmacológicas diversas (FAULKNER, 1994, 1998, 2000, 2001, 2002; MAYER; HAMANN, 2002; 2004; DONIA; HAMANN, 2003; BLUNT et al., 2003; 2004). Os compostos encontrados nas esponjas incluem, majoritariamente, macrolídeos, alcalóides, peptídeos, terpenóides e sesquiterpenos (FAULKNER, 2001). Esses metabólitos, em geral, guardam pouca ou nenhuma similaridade com aqueles isolados de fontes terrestres, e é relativamente freqüente encontrar novos esqueletos carbonados e grupos funcionais pouco comuns em produtos naturais de origem terrestre. Isto levou a considerar os organismos marinhos como fontes não convencionais de substâncias bioativas, e esta variedade estrutural dos produtos naturais marinhos lhes confere um grande potencial como substâncias promissoras por si mesmas, como compostos protótipos (*leading compounds*), ou como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY, 1999)

Os resultados da triagem da potencial atividade antiviral de extratos de esponjas marinhas coletadas na costa brasileira, obtidos nesta dissertação, com os vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11, serão aqui discutidos, com ênfase naqueles que se sobressaíram (considerando-se $IS \geq 1,5$), como mostra a Tabela 14.

Como pode ser evidenciado na Tabela 4, foram testados 45 extratos, sendo que, desse total, 32 eram extratos aquosos e 13 extratos orgânicos. A Tabela 15 mostra que 19 extratos foram os mais promissores, sendo que 13 aquosos e somente seis orgânicos.

Assim, pode-se considerar que a maioria dos metabólitos, que possui atividade antiviral tem caráter hidrofílico, e esse fato é relevante para tal atividade, uma vez que tais compostos penetram com mais facilidade na membrana celular, o que poderia justificar um melhor desempenho antiviral e, além disso, são dissolvidos com mais facilidade no meio de cultura celular, utilizado nos ensaios de avaliação da potencial atividade antiviral.

Os diferentes resultados obtidos com os vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11 (Tabela 16) poderiam ser justificados por três motivos: o primeiro diz respeito à especificidade dos receptores virais aos receptores celulares, pois é provável que alguns compostos presentes nos extratos possam inibir diferentes receptores necessários à adsorção e penetração dos vírus nas células; o segundo motivo diz respeito à presença ou ausência de envelope viral, que no caso do HSV-1/KOS está presente e nos vírus AdV-5 e RV-SA11, ausente. Sabe-se que alguns compostos com atividade antiviral possuem afinidade com moléculas do envelope e que a infectividade do vírus depende da integridade do seu envelope (TANG, 1990; WHITE; FENNER, 1994). Finalmente, o último motivo está relacionado ao material genético dos vírus estudados. Os vírus HSV-1/KOS e AdV-5 têm genoma de DNA, enquanto o vírus RV-SA11 tem genoma de RNA. Mesmo sendo constituídos por genoma de DNA, a replicação dos vírus HSV-1/KOS e AdV-5 possuem suas particularidades, podendo alguns compostos interferir em uma ou mais etapas da transcrição. Sendo os rotavírus constituídos por genoma de RNA, este possui transcrição diferenciada dos vírus com genoma de DNA, fato este que poderia justificar os diferentes resultados obtidos.

De posse dos resultados, buscou-se na literatura disponível, informações sobre as esponjas que demonstraram atividade antiviral promissora, e que pudessem ser correlacionadas com os resultados obtidos frente aos vírus testados. De antemão, é importante relatar que foram encontradas poucas informações ou mesmo ausência de dados relativos a atividades farmacológicas em geral e, principalmente, no que tange à atividade antiviral das esponjas marinhas testadas nesta dissertação. Tendo em vista esta dificuldade, muitas vezes, se relatou os compostos e as atividades

farmacológicas apenas para o gênero e/ou mesmo para uma espécie diferente daquela aqui testada, já que somente tais dados foram encontrados na literatura consultada.

6.1 *Petromica citrina*

Até o momento, na literatura consultada e disponível, não foi encontrado artigo algum sobre *Petromica citrina*, que pudesse contribuir para a discussão dos resultados obtidos com os vírus HSV-1/KOS e AdV-5. Só foi encontrado um artigo no que se refere à classificação sistemática do gênero *Petromica* (MURICY et al., 2001).

6.2 *Tedania ignis*

Para a esponja *Tedania ignis*, foi relatado o isolamento de compostos dicetopiperazinas, produtos da associação simbiótica com a bactéria *Micrococcus* sp. (STIERLE; CARDELLINA II; SINGLETON, 1988). Wang e colaboradores (1999) observaram a presença dos mesmos compostos no fungo *Tyridiomyces formicarum*, associado via simbiose com outro fungo (*Cyphomyrmex minutus*). Os autores também constataram que estes compostos possuem atividade antifúngica, e que esta é a primeira evidência de metabólitos produzidos por fungos contra outros fungos competidores. Este fato reforça o fato de que vários dos compostos produzidos por organismos marinhos e, principalmente, por organismos sésseis, tais como esponjas e tunicados, são muitas vezes produzidos por organismos a eles associados, como bactérias, fungos e parasitas. Dentre os invertebrados marinhos, as esponjas são as que se encontram mais freqüentemente associadas com microorganismos marinhos (KELECOM, 2002).

Um composto (flutimida) da classe das 2,6-dicetopiperazinas foi também identificado em extratos do fungo *Delitschia confertaspera* e inibiu seletivamente a enzima transcriptase dos vírus influenza A e B, mas não outras enzimas transcriptases de outros vírus RNAs (TOMASSINI et al., 1996). Para a purificação da flutimida, utilizou-se metiletilcetona e, conseqüentemente,

poderia-se esperar que compostos deste tipo estejam presentes no extrato orgânico testado (metanol:tolueno 3:1), que inibiu a replicação do HSV-1/KOS e do AdV-5.

Também foi relatado o isolamento de um composto macrolídeo, denominado tedanolídeo, a partir desta mesma esponja, e que possui estrutura diferenciada dos demais macrolídeos encontrados em fontes marinhas (MATSUSHIMA et al., 1999).

Para compostos macrolídeos, já foram relatadas várias atividades farmacológicas, entre elas a atividade antiviral do composto roseofungina contra os vírus influenza A e B (SHNEIDER et al., 1984), e as atividades antifúngica (OVECHKINA et al., 1999) e antitumoral (BAI et al., 1995) das espongistatinas. Macrolídeos são comumente encontrados em outros gêneros de esponjas (DONIA; HAMANN, 2003) e há fortes evidências de que tais compostos sejam produzidos por microorganismos associados, uma vez que esta classe de compostos é encontrada, freqüentemente, em microorganismos marinhos em uma freqüência até seis vezes maior, quando comparada aos invertebrados marinhos (KELECOM, 2002). No entanto, como nenhuma análise microbiológicas foi realizada com a esponja testada, nada pode-se afirmar a este respeito.

6.3 *Dragmacidon reticulatus (Pseudaxinella reticulata)*

Até o momento, na literatura consultada e disponível, não foram encontradas informações sobre atividades farmacológicas e compostos isolados desta esponja, mas somente relatos sobre esponjas do mesmo gênero. Foi relatado para *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*, o isolamento de fosfolipídeos (BARNATHAN et al., 1996). Análogos de fosfolipídeos apresentaram atividade anti-HIV, através da inibição da adesão do vírus nas células CD4+ (MORRIS-NATSCHKE; ISHAQ; KUCERA, 2003). Sabe-se que moléculas pequenas de lipídeos podem influenciar a ligação de alguns vírus aos receptores celulares, a sua não fusão com a membrana celular e posterior transcrição do vírus

(RAULIN, 2000).

Relatou-se, também, a presença de esteróis na esponja *Pseudaxinella lunaecharta* (SJOSTRAND; KORNPROBST; DJERASSI, 1981). Para um esterol sulfatado, isolado de uma esponja da família Astroscleridae (YANG et al., 2003), e para esteróis de espécies do gênero *Clathria* (RUDI et al., 2001), foram demonstradas atividades antifúngica e anti-HIV, respectivamente. Para esteróis isolados de *Petrosia wienbergi* (GINER; GUNASEKERA; POMPONI, 1999) também foi demonstrada atividade antiviral contra o vírus HIV.

Assim, com base nestas informações, a esponja estudada (*Pseudaxinella reticulata*) apresenta probabilidade de também possuir entre seus metabólitos fosfolipídeos e esteróis, que estariam no extrato orgânico testado, devido à polaridade destes compostos, que, no entanto, não apresentou atividade, nas condições experimentais testadas.

6.4 *Axinella aff corrugata*

Foi relatada para a esponja *Axinella corrugata* a presença de um alcalóide, denominado estevensina, que apresentou atividade antitumoral (DUCKWORTH et al., 2003) e também atividade antimicrobiana (NEWBOLD et al., 1999).

Da esponja *Axinella brevistyla*, isolou-se dois compostos bromopirróis, que apresentaram atividade antifúngica (TSUKAMOTO et al., 2001).

Sete compostos, produtos do fracionamento de um extrato orgânico do fungo *Aspergillus niger*, associado simbioticamente à esponja *Axinella damicornis*, coletada no Mediterrâneo, demonstrou que tais compostos são oriundos do pigmento cicloleucomelona, produzido pelo fungo, e foram moderadamente citotóxicos contra células tumorais (HIORT et al., 2004). Entretanto, não há como prever que tal fungo esteja associado à esponja aqui testada, visto que essa foi coletada em local geográfico diferente e, num ecossistema também diferente.

O extrato que apresentou melhor atividade antiviral para a esponja *Axinella aff corrugata* foi o extrato aquoso, como pode ser observado na Tabela

15. O fato de já ter sido relatado o isolamento de um alcalóide (estevensina) nesta espécie de esponja, poderia nos fazer supor que ele também estivesse presente no extrato testado da esponja em questão. Alcalóides podem ser extraídos tanto a partir de extratos aquosos como de orgânicos, dependendo da forma que se encontra (HENRIQUES et al., 2003).

Também foi avaliada uma lectina purificada, obtida a partir do extrato aquoso de *Axinella aff corrugata*, em relação à sua potencial atividade antiviral. Há relatos da atividade antiparasitária de uma lectina, isolada de uma outra espécie de *Axinella*, frente ao parasita *Plasmodium knowlesi* em eritrócitos infectados (VINCENT; WILSON, 1980) e, também, da citotoxicidade de outra lectina, isolada da esponja *Haliclona cratera*, frente a duas linhagens de células tumorais (PAJIC et al., 2002). O provável mecanismo de ação antiviral das lectinas seria o impedimento da ligação das partículas virais aos receptores celulares, evitando que os vírus penetrem nas células (BALZARINI et al., 2004). Contrariando essa informação, a lectina isolada da esponja *Axinella aff corrugata*, e aqui testada frente ao vírus HSV-1/KOS, não apresentou atividade antiviral significativa, demonstrando somente uma baixa atividade inibitória na ordem de 21%, como pode ser observado na Tabela 10. No entanto, não se pode realizar outros experimentos confirmatórios e exploratórios, porque não havia material suficiente para tal.

6.5 *Agelas* sp.

Em esponjas do gênero *Agelas*, foi caracterizada a presença de compostos alcaloídicos (SHEN et al., 1998; ASSMANN; ZEA; KOCK, 2001; FUJITA et al., 2003; ENDO et al., 2004). Além disso, os alcalóides são metabólitos comumente encontrados em diferentes esponjas marinhas (FAULKNER, 1994, 1998, 2000, 2001, 2002). Também é bem conhecido que alcalóides podem apresentar atividade antiviral, independentemente de sua origem, seja ela terrestre, marinha ou síntese química (HUDSON, 1990; CHU; CUTLER, 1992; VENKATESHWAR et al., 1999; RAO et al., 2004).

Adicionalmente, a partir de fosfolipídeos bromados, obtidos de uma esponja deste mesmo gênero, foram isolados ácidos bromados tetra- e pentadienóicos (CARBALLEIRA, EMILIANO, 1993).

Com base nestas informações, poderia-se postular que a esponja testada também possui compostos semelhantes e que eles seriam os prováveis metabólitos bioativos.

6.6 *Tethya sepia*

Com relação ao gênero *Tethya*, foram encontrados alguns relatos na literatura consultada e disponível, que mostraram a predominância de compostos lipídicos. Os ácidos 2-metóxi-5-hexadecenóico e 2-metóxi-6-hexadecenóico foram identificados a partir de fosfolipídeos da esponja *Tethya crypta* (CARBALLEIRA; SEPULVEDA, 1992). Monoéteres de glicerol foram identificados a partir de fosfolipídeos da esponja *Tethya aurantia* (SMITH; DJERASSI, 1987). Dois outros compostos lipídicos (exopolifosfatases I e II) foram isolados da esponja *Tethya lyncurium* (LORENZ et al., 1995).

Adicionalmente, é bem estabelecida a ação antiviral de lipídeos (HUDSON, 1990; CHU; CUTLER, 1992; RAULIN, 2000; CARBALLEIRA, 2002; MORRIS-NATSCHKE; ISHAQ; KUCERA, 2003).

Extratos aquosos das esponjas *Tethya ingalli* e *T. hemolysin*, coletadas na Nova Zelândia, demonstraram atividade antitumoral importante e, a partir destes resultados, foram isoladas duas proteínas homólogas estruturais de outras enzimas proteases encontradas na natureza. Tais proteínas demonstraram alta citotoxicidade e seletividade para células tumorais de ovário, rins e mama (O'KEEFE et al., 1997).

Com base nestas informações, não se pode levantar hipótese alguma que relacione a atividade antiviral detectada (contra HSV-1/KOS e AdV-5) para o extrato aquoso de *Tethya sepia* e sua provável composição química, já que compostos lipídicos estariam, provavelmente, presentes em extrato orgânico; talvez as moléculas bioativas sejam de natureza protéica.

6.7 *Polymastia janeirensis*

A partir da esponja *Polymastia janeirensis* foram isolados esteróis com ação antitumoral (FAULKNER, 2001). No entanto, os mesmos extratos desta esponja aqui testados foram avaliados recentemente em relação à sua potencial atividade antitumoral e os resultados demonstraram maior atividade para o extrato aquoso do que para o orgânico (MONKS et al., 2002), indicando que os compostos bioativos poderiam ser diferentes dos esteróis, já que estes se encontram, majoritariamente, em extratos orgânicos.

De outra esponja do mesmo gênero, *Polymastia tenax*, coletada na Colômbia, também foram isolados esteróis antitumorais (SANTAFE et al., 2002). A partir da esponja *Polymastia sobustia*, coletada na China, foi isolado o composto tetrahydroxiamida (XU; ZENG, 2000), e da esponja *Polymastia gleneni*, foram isolados fosfolipídeos (AYANOGLU et al., 1985).

Também é bem conhecido que alguns esteróis, independentemente de sua origem, apresentam atividade antiviral (CHU; CUTLER, 1992; BIFULCO et al., 1994; EUGSTER et al., 1997; MOOG et al., 1998; GINER; GUNASEKERA; POMPONI, 1999). Desta forma, se esteróis estiverem presentes no espécime testado de *Polymastia janeirensis* seria no extrato orgânico, que apresentou atividade antiviral somente contra o vírus herpético testado.

É importante ressaltar que o extrato aquoso desta esponja, coletada em deverá ser melhor estudado, tanto do ponto de vista químico, quanto no que diz respeito à atividade anti-rotavírus detectada, que foi a mais promissora obtida nesta triagem (IS=28,5).

6.8 *Cliona* sp.

Foi encontrado, até o momento, na literatura consultada e disponível, o relato do isolamento de um peptídeo chamado mapacalcina, a partir da esponja *Cliona vastifica*, capaz de bloquear canais de cálcio (MOREL et al., 1997). Além disso, da esponja *Cliona nigricans*, isolou-se dois novos compostos

esteroidais, denominados clionastatinas A e B, que representam os primeiros compostos esteróides polihalogenados oriundos de uma fonte natural, sendo que tais compostos demonstraram alta citotoxicidade (FATORRUSSO et al., 2004).

Peptídeos isolados de fontes marinhas apresentam reconhecida ação anti-HIV (TZIVELEKA; VAGIAS; ROUSSIS, 2003).

Compostos esteroidais, obtidos de organismos terrestres (MICHELINI et al., 2004) e de esponjas marinhas (GINER; FARALDOS, 2002), já foram citados como detentores de atividade antiviral.

O extrato aquoso demonstrou a atividade antiviral mais promissora, para o vírus HSV-1/KOS, e o extrato orgânico demonstrou atividade promissora para o RV-SA11, mas fica difícil prever os composto bioativos responsáveis por tal atividade; talvez possam ser compostos peptídicos e esteróides, tendo em vista o relato prévio de tais compostos neste gênero.

6.9 *Chondrosia collectrix*

Até o momento, na literatura consultada e disponível, não foram encontradas informações sobre atividades farmacológicas e compostos isolados da esponja *Chondrosia collectrix*, mas somente relatos sobre esponjas do mesmo gênero.

A partir de fosfolipídeos de *Chondrosia remiformis*, foram isolados ácidos octacosadienóicos, sem nenhuma atividade farmacológica relatada, até o momento (CARBALLEIRA, REYES, SHALABI, 1993).

Da esponja *Chondrosia corticata*, isolou-se novos compostos macrolídeos, denominados neohalicondramida, halicondramida e secohalicondramida, que mostraram atividade contra *Candida albicans* e atividade antitumoral (SHIN et al., 2004).

Como já citado nessa discussão, sabe-se que lipídeos e macrolídeos possuem reconhecida atividade antiviral, mas tendo em vista que, somente o extrato aquoso de tal esponja foi testado, descarta-se a hipótese de que

fosfolipídeos estejam nele presentes, mas poderia-se acreditar que os macrolídeos sejam os compostos bioativos.

6.10 *Mycale arcuiri*

Não se encontrou, até o momento, na literatura consultada e disponível, relatos de compostos isolados e atividades farmacológicas para a esponja *Mycale arcuiri*, mas somente relatos sobre esponjas do mesmo gênero.

Da esponja *Mycale adhaerens*, foi isolado o composto exofilina A, um ácido dihidroxidecanóico, que foi ativo contra bactérias Gram+. Tal composto é produzido não pela esponja em si, mas pelo microorganismo *Exophiala pisciphila* a ela associada (DOSHIDA et al., 1996).

De *Mycale magellanica* e *M. adhaerens*, foram isolados macrolídeos, com potente atividade antitumoral (MATSUNAGA; SUGAWARA; FUSETANI, 1998; HOOD et al., 2001; MILLER et al., 2004).

Também foi relatada a presença de alcalóides em *Mycale parishii* (ZENG et al., 2003) e esteróides oligoglicosídicos em *Mycale laxissima* (ANTONOV et al., 2003). Oligoglicosídeos já foram descritos com atividade anti-HIV (ABDALLAH, 1993) e anti-HSV-1 (NOHARA, 2004). Os oligoglicosídeos, macrolídeos e alcalóides (dependendo da estrutura) poderiam ser extraídos com solventes polares e, poderiam estar presentes no extrato aquoso testado, e serem os compostos bioativos, responsáveis pela atividade anti-rotavírus detectada.

6.11 *Haliclona* sp.

Os metabólitos típicos encontrados em esponjas do gênero *Haliclona* são e aminoálcoois (FAULKNER, 2001). Esta última classe de compostos demonstrou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e ação antibacteriana contra os microrganismos *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*,

sendo que o provável mecanismo de ação é a ação detergente, que desestabiliza as membranas fúngica e bacteriana (CLARK; GARSON; HOOPER, 2001).

Há também relatos que revelam a presença de alcalóides em *Haliclona viscosa* (VOLK; KOCK, 2004) e em uma espécie não identificada de *Haliclona* (RASCHID; GUSTAFSON; BOYD, 2001); de alquilpiridinas em *Haliclona rubens*, coletada no Brasil (BERLINCK et al., 1996); de esteróides (SPERRY, CREWS, 1997) e peptídeos de espécies não identificadas de *Haliclona* (RANDAZZO et al., 2001; SERA et al., 2003); de macrolídeos numa espécie não identificada de *Haliclona* (ERICKSON et al., 1997); e de poliacetilenos em *Haliclona osiris* (FAULKNER, 2001). É reconhecida a atividade antiviral de poliacetilenos de esponjas marinhas (*Diplastrella* sp.), sendo que tais compostos foram os responsáveis pela inibição da integrase viral do vírus HIV-1 (LERCH; HARPER; FAULKNER, 2003). Este tipo particular de enzima não faz parte do maquinário enzimático dos vírus HSV-1, AdV-5 e RV-SA11, contra os quais os extratos testados de *Haliclona* sp. foram ativos. Entretanto, não é descartada a possibilidade de que compostos poliacetilênicos possam estar presentes nos extratos testados e possam inibir outras enzimas responsáveis pela replicação destes vírus. Isto pode ser justificado devido à alta seletividade enzimática de vários organismos marinhos, que são uma fonte rica de inibidores enzimáticos, inclusive enzimas virais e, desta forma, podem ser considerados fontes potenciais de novos agentes antivirais (CHE, 1991).

Conforme a Tabela 14, os resultados demonstram que o extrato orgânico testado apresentou uma baixa atividade antiviral frente ao vírus herpético. Para o extrato aquoso houve uma considerável atividade anti-rotavírus e baixa atividade antiadenovírus não significativa. Dessa forma, com base na literatura consultada, é difícil supor quais os compostos seriam os responsáveis pela atividade antiviral detectada, pois estes pertencem a distintos grupos químicos. Desta forma, de acordo com a triagem realizada, o extrato aquoso de *Haliclona* sp.2, coletada em Pernambuco, deverá ser aquele cujos estudos merecem ser aprofundados, pois foi o que apresentou um dos maiores valores de IS (27) frente ao rotavírus testado.

6.12 *Laxosuberites* sp. (Protosuberites sp.)

Até o momento, foi encontrado na literatura consultada e disponível, somente o isolamento de compostos nitrogenados para uma espécie não identificada de *Laxosuberites* (FLEMING, 1999) e nenhuma atividade farmacológica. No entanto, sabe-se que compostos nitrogenados, isolados de esponjas, possuem atividade anti-herpética, como as acarnidinas, isoladas da esponja *Acarnus erithacus* (CARTER; RINEHART, 1978), e as topsentinas, obtidas de uma esponja do gênero *Spongosorites* (GUNASEKERA et al., 1989). Embora os compostos nitrogenados possam estar presentes no extrato aquoso testado, este não demonstrou atividade anti-herpética, mas sim significativa atividade anti-rotavírus.

6.13 Resultados do pré- e do pós-tratamento, realizados com os vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11.

Os ensaios de pré- e pós-tratamento foram realizados com aqueles extratos que obtiveram valores de IS $\geq 1,5$, quando da adição simultânea dos materiais-teste + vírus (Tabela 15).

6.13.1 Pré-tratamento

Comparando-se os resultados do tratamento simultâneo com aqueles do pré-tratamento, pode-se constatar que quando houve material suficiente para se conduzir os ensaios de pré-tratamento para os vírus HSV-1/KOS e AdV-5 esses obtiveram, na maioria das vezes, resultados mais promissores (Tabelas 15 e 16 e Figuras 2 e 3, respectivamente).

O ensaio de pré-tratamento foi realizado objetivando-se identificar possíveis extratos que atuam no bloqueio da adsorção viral à célula e, conseqüentemente, a penetração do vírus (CHOU; TALALAY, 1984; HUDSON,

1990). Dessa forma, os extratos que demonstraram resultados promissores no ensaio de pré-tratamento possuíam a capacidade de bloquear a interação entre determinados receptores virais e os receptores situados nas membranas celulares. O aumento de atividade, quando comparado com o tratamento simultâneo e com o pós-tratamento, pode ser explicado pela provável presença de determinados compostos que, reconhecidamente, impedem a adsorção e a penetração de vírus na célula, tais como (a) peptídeos, (b) alcalóides e (c) lipídeos. Conforme citado nos itens anteriores, as esponjas com as quais obteve-se os melhores resultados foram aquelas ricas nestes três grupos de metabólitos.

(a) É reconhecida a capacidade de peptídeos, obtidos de várias fontes, em inibir a adsorção e a penetração, por exemplo do vírus HIV (SRINIVAS et al., 1990; DAMONTE, 1996; CASTILLA et al., 1998; PEREIRA et al., 2004) e do vírus HSV-1 (BELAID et al., 2002). Determinadas proteínas e peptídeos possuem atividade antiviral, e isso se deve à capacidade de ligar-se a determinadas glicoproteínas existentes nas membranas celulares. Assim, quando as células ficaram previamente expostas aos extratos, pode ter havido a interação de proteínas e/ou peptídeos com a glicoproteína de membrana, impedindo a adsorção viral (HUDSON, 1990; BELAIB et al., 2002).

(b) Essa mesma capacidade também é atribuída a alguns alcalóides de origem terrestre (HUDSON, 1990; WITTELS; SPEAR, 1991). Ainda, no que diz respeito à inibição da adsorção viral, Taraporewala e colaboradores (1992) relataram dois mecanismos distintos para a ação anti-HIV da dercitina, um alcalóide de origem marinha: o bloqueio da ligação entre os receptores virais e celulares, impedindo a adsorção viral, e a intercalação do composto no material genético do vírus, impossibilitando a transcrição de proteínas virais.

(c) Os lipídeos possuem a capacidade de inibir várias etapas da replicação viral, tais como adsorção e penetração, no caso do vírus HIV. (RAULIN, 2000; MORRIS-NATSCHKE; ISHAQ; KUCERA, 2003).

O ensaio do pré-tratamento realizado com o vírus RV-SA11 apresentou atividade antiviral não significativa, e não foi possível calcular os valores de IS, já que obteve-se percentuais de inibição inferiores a 50% (Tabelas 15 e 16,

Figura 4). Isto demonstra que, no caso deste vírus, a adsorção viral não foi alterada.

6.13.2 Pós-tratamento

De maneira geral, o pós-tratamento com o vírus HSV-1/KOS não mostrou resultados mais promissores, quando comparado com o tratamento simultâneo e o pré-tratamento (Tabelas 15 e 16, Figura 2).

Do total dos extratos submetidos ao pós-tratamento frente ao vírus AdV-5, metade deles demonstrou resultados mais promissores, quando comparado ao tratamento simultâneo (Tabela 15 e 16, Figura 3). Esse fato sugere que, alguns compostos presentes nos extratos, que demonstraram atividade durante o pós-tratamento, poderiam inibir as etapas mais tardias da replicação viral, como por exemplo, a transcrição de proteínas virais. De forma geral, quando comparado com os resultados do pré-tratamento, aqueles do pós-tratamento com o vírus AdV-5 não foram melhores.

O ensaio do pós-tratamento realizado com o vírus RV-SA11 apresentou IS bem inferiores se comprado ao ensaio simultâneo (Tabela 15 e 16 e Figura 4), o que indica que os compostos presentes em tais extratos possuem pouca capacidade de inibir as etapas da replicação do vírus RV-SA11, como por exemplo, a transcrição de proteínas. Entretanto, tais extratos que demonstraram atividade antiviral para o pós-tratamento não apresentaram esta atividade para os vírus HSV-1/KOS e AdV-5, e essa discordância nos resultados poderia ser explicado pela diferença nos processos de replicação destes virus.

7 CONCLUSÕES

- Dos 45 extratos testados frente aos vírus HSV-1/KOS e AdV-5, 10 e 7 extratos, respectivamente, apresentaram valores de $IS \geq 1,5$.
- Dos 13 extratos testados frente ao vírus RV-SA11, cinco deles apresentaram valores de $IS \geq 1,5$.
- Os resultados mais promissores, para cada vírus, foram obtidos com os extratos: HSV-1/KOS - extrato aquoso de *Cliona* sp. ($IS=7,35$); AdV-5 – extratos aquosos de *Petromica citrina* e de *Agelas* sp. ($IS=4,5$); RV-SA11- extratos aquosos de *Polymastia janeirensis* (28,5), de *Haliclona* sp.2 (27,0) e de *Protosuberites* sp.(12,5) e extrato orgânico de *Cliona* sp.2 (9,0).
- Observou-se que três extratos seguiram a mesma tendência, isto é, houve aumento do IS, quando da realização dos ensaios de pré- e pós-tratamento frente aos vírus HSV-1/KOS e AdV-5, sendo que dois destes extratos eram de esponjas do mesmo gênero (*Agelas* sp.2, *Agelas* sp.) e o outro do gênero (*Tethya* sepia).
- Dos seis extratos submetidos ao ensaio de pré-tratamento com o vírus HSV-1/KOS, cinco deles apresentaram valores de IS maiores, quando comparados com o tratamento simultâneo, sendo que o resultado mais promissor foi o do extrato aquoso de *Agelas* sp.2 ($IS=8,0$). Isso não se observou no pós-tratamento, quando somente dois extratos apresentaram valores superiores de IS, quando comparados com o tratamento simultâneo, e novamente o resultado mais promissor foi o do extrato aquoso de *Agelas* sp.2 ($IS=2,8$).

- Dos seis extratos submetidos ao ensaio de pré-tratamento com o vírus AdV-5, quatro deles apresentaram valores superiores de IS, quando comparados com o tratamento simultâneo, sendo que o resultado mais promissor foi novamente o do extrato aquoso de *Agelas* sp. (IS=10,0). No pós-tratamento, foram três extratos que apresentaram valores de IS mais promissores, quando comparados com o tratamento simultâneo, sendo que o resultado mais promissor foi novamente obtido com o extrato aquoso de *Agelas* sp. (IS=8,3).
- Como os extratos do gênero *Agelas* foram os que apresentaram melhores resultados no pré- e pós-tratamento, para os vírus HSV-1/KOS e AdV-5, seus componentes merecem atenção especial no que diz respeito a estudos antivirais posteriores, com foco no seu mecanismo de ação.
- Em geral, os resultados mais promissores se apresentaram para ensaio do pré-tratamento frente aos vírus HSV-1/KOS e AdV-5, em relação aos demais ensaios, o que poderiam indicar a presença de compostos com capacidade de inibir a adsorção viral.
- Os extratos aquosos foram, majoritariamente, os que apresentaram atividade anti-herpética e antiadenovírus, e também atividade anti-rotavírus, mesmo tendo sido testados em um menor número com este último vírus.
- Os compostos oriundos de organismos marinhos, cedidos pelo Prof. Dr. Jorge Palermo, e a lectina isolada de *Axinella* aff. *corrugata*, cedida pela Profa. Dra. Amélia T. Henriques não mostraram resultados antivirais significativos (< 50% de inibição).

8 PERSPECTIVAS

- A partir da análise de todos os resultados obtidos, os extratos que apresentaram os resultados mais promissores foram: **HSV-1/KOS** - extratos aquosos de *Cliona* sp, *Agelas* sp.2 e *Tethya* sp.; **AdV-5** – extratos aquosos de *Agelas* sp. e *Axinella* aff *corrugata* e o extrato orgânico de *Tedania ignis*; **RV-SA11** – os extratos aquosos de *Haliclona* sp.2, *Polymastia janeirensis* e *Laxosuberites* sp. Assim, esses são os extratos que merecem uma atenção especial para estudos posteriores.
- Identificar os possíveis compostos responsáveis pela atividade antiviral detectada, a partir dos extratos que forneceram os melhores resultados.
- Isolar tais compostos e realizar ensaios antivirais confirmatórios.
- Realizar a síntese química dos compostos que apresentaram atividade antiviral, bem como de seus análogos, com os objetivos de disponibilizar maior quantidade de material para os ensaios, e de melhorar a atividade antiviral detectada, respectivamente. Essa ação também diminui a necessidade de coletas de esponjas marinhas, não acarretando maiores impactos ao meio ambiente marinho.
- Realizar estudos de relação estrutura-atividade com estes análogos.
- Selecionar os compostos com índices de seletividade elevados para estudos complementares de atividade anti-herpética, com cepas resistentes ao aciclovir e em outros modelos virais.
- Estudar o mecanismo da ação antiviral de tais compostos.
- Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade destes compostos, em outros tipos celulares.
- Realizar novas coletas de esponjas e outros organismos marinhos na costa brasileira e de Santa Catarina, objetivando sedimentar esta linha de pesquisa na UFSC.

REFERÊNCIAS

ABAD, M.J.; GUERRA, J.A.; BERMEJO, P.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Search antiviral activity in higher plant extracts. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 604-607, 2000.

ABDALLAH, R.M.; GHAZY, N.M.; EL-SEBAKHY, N.A.; PIRILLO, A.; VEROTTA, L. Astragalosides from Egyptian *Astragalus spinosus* Vahl. **Pharmazie**, v. 48, p. 452-454, 1993.

ALLARD, A.; KAJON, A.; WADELL, G. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 44, p. 250-257, 1994.

ALONSO, D.; KHALIL, Z.; SATKUNANTHAN, N.; LIVETT, B.G. Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neuropathic pain and other neurological conditions. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 785-787, 2003.

ANTONOV, A.S.; AFIYATULLOV, S.; KALINOVSKY, A.I.; PONOMARENKO, L.P.; DMITRENOK, P.S.; AMININ, D.L.; AGAFONOVA, I.G.; STONIK, V.A. Mycalosides B-I, eight new spermostatic steroid oligoglycosides from the sponge *Mycale laxissima*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1082-1088, 2003.

ASSMANN, M.; ZEA, S.; KOCK, M. Sventrin, a new bromopyrrole alkaloid from the Caribbean sponge *Agelas sventres*. **Journal of Natural Product**, v. 64, p. 1593-1595, 2001.

AYANOGLU, E.; KURTZ, K.; KORNPROBST, J.M.; DJERASSI, C. New natural 2-acetoxy fatty acids using chemical ionization and electron impact mass spectrometry. **Lipids**, v. 20, p. 141-144, 1985.

BAI, R.; TAYLOR, G.F.; CICHACZ, Z.A.; HERALD, C.L.; KEPLER, J.A.; PETTIT, G.R.; HAMEL, E. The spongistatins, potently cytotoxic inhibitors of tubulin polymerization, bind in a distinct region of the vinca domain. **Biochemistry**, v. 34, p. 9714-9721, 1995.

BALZARINI, J.; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; PRINCEN, K.; AQUARO, S.; PERNO, C. F.; DE CLERCQ, E.; EGBERINK, H.; VANDEN MOOTER, G.; PEUMANS, W.; VAN DAMME, E.; SCHOLS, D. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 3858-3870, 2004.

BARARDI, C.R.M.; EMSLIE, K.R.; VESEY, G.; WILLIAMS, K.L. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **Journal of Virological Methods**, v. 74, p. 31-37, 1998.

BARNATHAN, G.; KORNPROBST, J.M.; DOUMENQ, P.; MIRALLES, J. New unsaturated long-chain fatty acids in the phospholipids from the Axinellida sponges *Trikenetion loeve* and *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*. **Lipids**, v. 31, p. 193-200, 1996.

BELAID, A.; AOUNI, M.; KHELIFA, R.; TRABELSI, A.; JEMMALI, M.; HANI, K. *In vitro* antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 229-234, 2002.

BELARBI EL, H.; CONTRERAS GOMEZ, A.; CHISTI, Y.; GARCIA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E. Producing drugs from marine sponges. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 585-98, 2003.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. Contributions to the study of marine products: the nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, p. 981-987, 1951.

BERLINCK, R.G.; OGAWA, C.A.; ALMEIDA, A.M.; SANCHEZ, M.A.; MALPEZZI, E.L.; COSTA, L.V.; HAJDU, E.; DE FREITAS, J.C. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, v. 115, p. 155-163, 1996.

BERLINCK, R.G.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 510-522, 2004.

BERNAN, V.S.; GREENSTEIN, M.; MAIESE, W.M. Marine microorganisms as a source of new natural products. **Advances in Applied Microbiology**, v. 43, p. 57-90, 1997.
BEWLEY, C.A.; RAY, S.; COHEN, F.; COLLINS, S.K.; OVERMAN, L.E. Inhibition of HIV-1 envelope-mediated fusion by synthetic batzelladine analogues. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1319-1324, 2004.

BIFULCO, G.; BRUNO, I.; MINALE, L.; RICCIO, R. Novel HIV-inhibitory halistanol sulfates F-H from a marine sponge, *Pseudoaxinissa digitata*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 164-167, 1994.

BLUNDEN, G. Biologically active compounds from marine organisms. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 89-94, 2001.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 1-48, 2003.

Marine

natural products. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 1-49, 2004.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.J. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, p 73-81, 2004.

BRESEE, J.S.; GLASS, R.I.; IVANOFF, B.; GENTSCH, J.R. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. **Vaccine**, v. 17, p. 2207-2222, 1999.

BURLESON, F.G.; CHAMBERTS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. **Virology**: a laboratory manual. San Diego: Academic, 1992. 250 p.

CAPON, R.J.; BARROW, R.A.; ROCHFORT, S. Marine nematodes: tetrahydrofurans from a Southern Australian brown alga *Notheia anomala*. **Tetrahedron**, v. 54, p. 2227-2242, 1998.

CARBALLEIRA, N.M.; SEPULVEDA, J.A. Two novel naturally occurring alpha-methoxy acids from the phospholipids of two Caribbean sponges. **Lipids**, v. 27, p. 72-74, 1992.

CARBALLEIRA, N.M.; REYES, E.D.; SHALABI, F. Identification of novel iso/anteiso nonacosadienoic acids from the phospholipids of the sponges *Chondrosia remiformis* and *Myrmekioderma styx*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1850-1855, 1993.

_____ EMILIANO, A. Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Agelas* sp. **Lipids**, v. 28, p. 763-766, 1993.

_____ New advances in the chemistry of methoxylated lipids. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 437-456, 2002.

CARTER, G.T.; RINEHART, J.K.L. Acarnidines, novel antiviral and antimicrobial compounds from the sponge *Acarnus erithacus* (de Laubenfels). **Journal of American Chemistry Society**, v. 100, p. 4302-4304, 1978.

CASSADY, K.A.; WHITLEY, R.J. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 119-128, 1997.

CASTILLA, V.; BARQUERO, A.A.; MERSICH, S.E.; COTO, C.E. *In vitro* anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. Leaves. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 10, p. 37-75, 1998.

CHAPRON, C.D.; BALLESTER, N.A.; FONTAINE, J.H.; FRADES, C.N.; MARGOLIN, A.B. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2520-2525, 2000.

CHARAN, R.D.; MCKEE, T.C.; BOYD, M.R. Cytotoxic alkaloids from the marine sponge *Thorectandra* sp. **Natural Product Research**, v. 18, p. 225-229, 2004.

CHATTERJI, A.; ANSARI, Z.A.; INGOLE, B.S.; BICHURINA, M.A.; SOVETOVA, M.; BOIKOV, Y.A. Indian marine bivalves: potencial source of antiviral drugs. **Current Science**, v. 82, p. 1279-1282, 2002.

CHE, C. Marine Products as a source of antiviral drug leads. **Drug Development Research**, v. 23, p. 201-218, 1991.

CHOU, T.C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CHU, C.K.; CUTLER, H.G. **Natural products as antiviral agents**. Plenum Press. New York and London, 1992, 279 p.

CLARK, R.J.; GARSON, M.J.; HOOPER, J.N. Antifungal alkyl amino alcohols from the tropical marine sponge *Haliclona* sp. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1568-1571, 2001.

CLEMENTS, J.B.; TIMBURY, M.C.; GRIFFITHS, P.D. Herpesviridae. In: COLLIER, L.H.; TIMBURY, M.C. (eds.) **Topley & Wilson's. Principles of bacteriology, virology and immunity**, 8 ed., v. 4. p. 415-429, London: Edward Arnold, 1990.

COUTINHO, A.F.; CHANAS, R.; SOUZA, T.M. L.; FRUGRULHETTI, I. C.P.P.; EPIFÂNIO, R.A. Anti HSV-1 Alkaloids from a Feeding Deterrent Marine Sponge of the Genus *Aaptos*. **Heterocycles**, v. 57, p. 1265-1272, 2002.

COVAL, S.J.; CROSS, S.; BERNADINELLI, G.; JEFFORD, C.W. Brianthein V, a new cytotoxic and antiviral diterpene isolated from *Briareum asbestinum*. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 981-984, 1988.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CREWS, P.; MANES, L.V.; BOEHLER, M. Jasplakinolide, a Cyclodepsipeptide from the Marine Sponge, *Jaspis* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 2797-2800, 1986.

DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Org.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**, p. 1-14, Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

DAMONTE, E.B. Antiviral agents that act in the early phases of the viral cycle. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 28, p. 204-216, 1996.

DAYLE, J.W. Marine toxins and nonmarine toxins: convergence or symbiotic organisms? **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1211-1215, 2004.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. **Journal of Clinical Virology**, v. 22, p. 73-89, 2001.

DE JALON, E.G.; BLANCO-PRIETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 183-187, 2003.

DE ROSA, S.; DE CARO, S.; IODICE, C.; TOMMONARO, G.; STEFANOV, K.; POPOV, S. Development in primary cell culture of demosponges. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 119-125, 2003.

DONIA, M.; HAMANN M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 338-348, 2003.

DOSHIDA, J.; HASEGAWA, H.; ONUKI, H.; SHIMIDZU, N. Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*. **Japan Antibiotic**, v. 49, p. 1105-1109, 1996.

DUCKWORTH, A.R.; SAMPLES, G.A.; WRIGHT, A.E.; POMPONI, S.A. *In vitro* culture of the tropical sponge *Axinella corrugata* (Demospongiae): effect of food cell concentration on growth, clearance rate, and biosynthesis of stevensine. **Marine Biotechnology**, v. 5, p. 519-527, 2003.

EL SAYED, K.A.; HAMANN, M.T.; HASHISH, N.E.; SHIER, W.T.; KELLY, M.; KHAN, A.A. Antimalarial, antiviral, and antitoxoplasmosis norsessterterpene peroxide acids from the Red Sea sponge *Diacarnus erythraeanus*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 522-524, 2001.

EL SAYED, K.A.; YOUSAF, M.; HAMANN, M.T.; AVERY, M.A.; KELLY, M.; WIPF, P. Microbial and chemical transformation studies of the bioactive marine sesquiterpenes (S)-(+)-curcuphenol and-curcudiol isolated from a deep reef collection of the Jamaican sponge *Didiscus oxeata*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1547-1553, 2002.

ENDO, T.; TSUDA, M.; OKADA, T.; MITSUHASHI, S.; SHIMA, H.; KIKUCHI, K.; MIKAMI, Y.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Nagelamides A-H, new dimeric bromopyrrole alkaloids from marine sponge *Agelas* species. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1262-1267, 2004.

ENRIQUEZ, C.E.; HURST, C.J.; GERBA, C.P. Survival of enteric adenovirus 40 and 41 in Tap, sea, and wast water. **Water Research**, v. 29, p. 2548-2553, 1995.

EPIFÂNIO, R.A.; MARTINS, D.L.; VILLACA, R.; GABRIEL, R.J. Chemical Defenses Against Fish Predation in Three Brazilian Octocorals: 11 β ,12 β -Epoxyypukalide as a Feeding Deterrent in *Phyllogorgia dilatata*. **Journal of Chemistry Ecology**, v. 25, p. 2255-2265, 1999.

EPIFÂNIO, R.A.; MAIA, L.F.; FENICAL, W. Chemical defenses of the endemic Brazilian gorgonian *Lophogorgia violacea* Pallas (Octocorallia, Gorgonacea). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 11, p. 584-591, 2000.

ERICKSON, K.L.; BEUTLER, J.A.; CARDELLINA, I.J.; BOYD, M.R. Salicylihalamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Marine Sponge *Haliclona* sp. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 8188-8192, 1997.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication In: **Fields Virology**. Philadelphia. Lippicort-Raven Publishers, p.1625-1708, 1996.

EUGSTER, C.; RIVARA, G.; BIGLINO, A.; CAVALLO, R.; GIOANNINI, P.; FORNO, B.; MACARIO, M.; POLLONO, A. M. Phytosterol compounds having antiviral efficacy. **Panminerva Medica**, v. 39, p. 12-20, 1997.

FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; PETRUCCI, F.; BAVESTRELLO, G.; CALCINAI, B.; CERRANO, C.; DI MEGLIO, P.; IANARO, A. Polychlorinated androstanes from the burrowing sponge *Clytia nigricans*. **Organic Letters**, v. 6, p. 1633-1635, 2004.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 11, p. 355-394, 1994.

_____ Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 15, p. 113-158, 1998.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 7-55, 2000.

_____ Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 1-49, 2001.

_____ Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 1-48, 2002.

FIELD, A.K.; BIRON, K.K. The end of innocence revisited: Resistance of herpesviruses to antiviral drugs. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 1-13, 1994.

_____ KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Adenoviruses. In: **Virology**, Philadelphia. Lippicort-Raven Publishers, p. 2149-2171, 1996.

FLEMING, F.F. Nitrile-containing natural products. **Natural Product Reports**, v. 16, p. 597-606, 1999.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. **Principles of virology**: molecular, biology, pathogenesis and control. Washington: ASM, p.662-714, 2000.

FONTANA, A.; CAVALIERE, P.; WAHIDULLA, S.; NAIK, C.G.; CIMINO, G. A new antitumor isoquinoline alkaloid from the marine nudibranch *Jorunna funebris* **Tetrahedron**, v. 56, p. 7305-7308, 2000.

FORD, P.W.; GUSTAFSON, K.R.; MCKEE, T.C.; SHIGEMATSU, N.; MAURIZI, L. K.; PANNELL, L.K.; WILLIAMS, D.E.; DE SILVA, E.D.; LASSOTA, P.; ALLEN, T. M.; VAN SOEST, R.; ANDERSEN, R.J.; BOYD, M.R. Papuamides A-D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the sponges *Theonella mirabilis* and *Theonella swinhoei* collected in Papua New Guinea. **Journal of the American Chemical Society**, v. 21, p. 5899-5909, 1999.

FUJITA, M.; NAKAO, Y.; MATSUNAGA, S.; SEIKI, M.; ITOH, Y.; YAMASHITA, J.; VAN SOEST, R.W.; FUSETANI, N. Ageladine A: an antiangiogenic matrixmetalloproteinase inhibitor from the marine sponge *Agelas nakamurai*. **Journal of American Chemistry Society**, v. 125, p. 15700-15701, 2003.

GAJARDO, R.; BOUCHRITI, N.; PINTO, R.M.; BOSCH, A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3460-3462, 1995.

GERARD, J.M.; HADEN, P.; KELLY, M.T.; ANDERSEN, R.J. Loloatins A-D, cyclic decapeptide antibiotics produced in culture by a tropical marine bacterium. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 80-85, 1999.

GILGER, M.A.; MATSON, D.O.; CONNER, M.E.; ROSENBLATT, H.M.; FINEGOLD, M.J.; ESTES, M.K. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **The Journal of Pediatrics**, v. 120, p. 912-917, 1992.

GINER, J.L.; GUNASEKERA, S.P.; POMPONI, S.A. Sterols of the marine sponge *Petrosia weinbergi*: implications for the absolute configurations of the antiviral orthoesterols and weinbersterols. **Steroids**, v. 64, p. 820-824, 1999.

GINER, J.L.; FARALDOS, J.A. A biomimetic approach to the synthesis of an antiviral marine steroidal orthoester. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 2717-2720, 2002.

GIRAD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moléculaire**. ed. 2. Paris: Doin, 1989. 617 p.

GLASS, R.I.; ING, D.J.; STOLL, B.J.; ING, R.T. Immune response to rotavirus vaccines among breast-fed and nonbreast-fed children. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 310, p. 249-254, 1991.

GUNASEKERA, S.P.; CROSS, S.S.; KASHMAN, Y.; LUI, M.S.; RINEHART, K.L.; TSUJII, S. **Topsentin compounds effective against viruses and certain tumors**. U.S. Patent No. 4.866., 12 set. 1989, Chemical Abstract, n. 112: 185775d.

GUSTAFSON, K.R.; CARDELLINA, J.H.; FULLER, R.W.; WEISLOW, O.S.; KISERS, R.F.; SNADER, K.M.; PATTERSON, G.M. L.; BOYD, M.R. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 81, p. 1254-1258, 1989.

HALLOCK, Y.F.; CARDELLINA, J.H.; SCHAFFER, M.; BRINGMANN, G.; FRANCOIS, G.; BOYD, M.R. Korundamine A, a novel HIV-inhibitory and antimalarial "hybrid" naphthylisoquinoline alkaloid heterodimer from *Ancistrocladus korupensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 1729-1734, 1998.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, p.196-198, 1999.

HENRIQUES, A.T. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 765-791, 2003.

HENTSCHEL, U. Natural products from marine microorganisms. **Chembiochem**, v. 3, p. 1151-1154, 2002.

HIORT, J.; MAKSIMENKA, K.; REICHERT, M.; PEROVIC-OTTSTADT, S.; LIN, W.H.; WRAY, V.; STEUBE, K.; SCHAUMANN, K.; WEBER, H.; PROKSCH, P.; EBEL, R.; MULLER, W.E.; BRINGMANN, G. New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1532-1543, 2004.

HIRSCH, S.; RUDI, A.; KASHMAN, Y.; LOYA, Y. New avarone and avarol derivatives from the marine sponge *Dysidea cinerea*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 92-97, 1991.

HOOD, K.A.; BACKSTROM, B.T.; WEST, L.M.; NORTHCOTE, P.T.; BERRIDGE, M.V.; MILLER, J.H. The novel cytotoxic sponge metabolite peloruside A, structurally similar to bryostatin-1, has unique bioactivity independent of protein kinase C. **Anticancer Drug Designer**, v. 16, p. 155-166, 2001.

HOUGHTON, P.J. Medicinal plants and the control of parasites: compounds with anti-HIV activity from plants. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 601-604, 1996.

HOUGHTON, P.J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 419-423, 2000.

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990. 200 p.

_____ TOWERS, G.H.N. Phytochemicals as antivirals, **Drugs of the Future**, v. 24, p. 295-320, 1999.

KAISER, C.R.; PITOMBO, L.F.; PINTO, A.C. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of chamigrenes from *Aplysia dactylomela*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, p. 147-149, 2001.

KELECOM, A. Marine natural products in Brazil. Part 1. Isolation and structure determination. **Ciência e Cultura**, v. 49, p. 321-338, 1997.

_____. Marine natural products in Brazil. part 2. Synthesis of marine natural products in Brazil. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 9, p. 101-118, 1998.

_____. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 151-170, 2002.

KIDD, A.H.; JONSSON, M.; GARWICZ, D.; KAJON, A.E.; WERMENBOL, A.G.; VERWEIJ, M.W.; DE JONG, J.C. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 622-627, 1996.

KIRSCH, G.; KONG, G.M.; WRIGHT, A.D.; KAMINSKY, R.A. A new bioactive sesterterpene and antiplasmodial alkaloids from the marine sponge *Hyrtios cf. erecta*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 825-829, 2000.

KOHMOTO, S.; MCCONNELL, O.J.; WRIGHT, A.; KOEHN, F.; THOMPSON, W.; LUI, M.; SNADER, K.M. Puupehenone, a cytotoxic metabolite from a deep water marine sponge, *Stronglyophora hartmani*. **Journal of Natural Products**, v.50, p. 336, 1987.

KONIG, G.K.M.; WRIGHT A.D. Marine natural products research: current directions and future potential. **Planta Medica**, v. 62, p. 193-211, 1996.

LERCH, M.L.; HARPER, M.K.; FAULKNER, D.J. Brominated polyacetylenes from the Philippines sponge *Diplastrella* sp. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 667-670, 2003.

LJUNGMAN, P. Treatment of adenovirus infections in the immunocompromised host. **European Journal of Clinical Microbiology & infectious Diseases**, v. 23, p. 583-588, 2004.

LORENZ, B.; BATEL, R.; BACHINSKI, N.; MULLER, W.E.; SCHRODER, H.C. Purification and characterization of two exopolyphosphatases from the marine sponge *Tethya lyncurium*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1245, p. 17-28, 1995.

LUPI, O.; PEREIRA JR, A.C. Herpes simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; FERREIRA JR, A.C. **Herpes - clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 43-70, 2000.

MAIA, L.F.; EPIFÂNIO, R.A.; EVE, T.; FENICAL, W. New Fish Feeding Deterrents, Including a Novel Sesquiterpenoid Heterogorgiolide, from the Brazilian Gorgonian *Heterogorgia uatumani* (Octocorallia, Gorgonacea). **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1322-1324, 1999.

MAIA, L.F.; EPIFÂNIO, R.A.; FENICAL, W. New cytotoxic sterol glycosides from the octocoral *Carijoa* (Telesto) *riisei*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1427-1430, 2000.

MARTINS, D.L.; EPIFÂNIO, R.A. New germacrane sesquiterpene from the brazilian endemic gorgonian *Phyllogorgia dilatata* Esper. **Journal Brazilian of Chemistry Society**, v. 9, p. 586-590, 1998.

MATSUNAGA, S.; SUGAWARA, T.; FUSETANI, N. New mycalolides from the marine sponge *Mycale magellanica* and their interconversion. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1164-1167, 1998.

MAYER, A.M.; HAMANN, M.T. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antihelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**. v. 132, p.315-339, 2002.

MAYER, A.M.; HAMANN, M.T. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antihelmintic, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Biotechnology**, v. 6, p. 37-52, 2004.

MICHELINI, F.M.; RAMIREZ, J.A.; BERRA, A.; GALAGOVSKY, L.R.; ALCHE, L.E. *In vitro* and *in vivo* antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. **Steroids**, v. 69, p. 713-720, 2004.

MIERZWA, R.; KING, A.; CONOVER, M.A.; TOZZI, S.; PUAR, M.S.; PATEL, M.; COVAL, S.J.; POMPONI, S.A. Verongamine, a novel bromotyrosine-derived histamine H3-antagonist from the marine sponge *Verongula gigantea*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 175-177, 1994.

MILLER, J.H.; ROUWE, B.; GAITANOS, T.N.; HOOD, K.A.; CRUME, K.P.; BACKSTROM, B.T.; LA FLAMME, A.C.; BERRIDGE, M.V.; NORTHCOTE, P.T. Peloruside A enhances apoptosis in H-ras-transformed cells and is cytotoxic to proliferating T cells. **Apoptosis**, v. 9, p. 785-796, 2004.

MONKS, N.R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A.T.; FARIAS, F.M.; SHAPOVAL, E.E. S.; SUYENAGA, E.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHES, B. Anticancer, antichemotatic and antimicrobial activities of marine sponges collected of the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 281, p. 1-12, 2002.

MOOG, C.; AUBERTIN, A.M.; KIRN, A.; LUU, B. Oxysterols, but not cholesterol, inhibit human immunodeficiency virus replication in vitro. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 9, p. 491-496, 1998.

MOREL, J.L.; DROBECQ, H.; SAUTIERE, P.; TARTAR, A.; MIRONNEAU, J.; QAR, J.; LAVIE, J.L.; HUGUES, M. Purification of a new dimeric protein from *Cliona vastifica* sponge, which

specifically blocks a non-L-type calcium channel in mouse duodenal myocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 51, p. 1042-1052, 1997.

MORRIS-NATSCHKE, S. L.; ISHAQ, K.S.; KUCERA, L.S. Phospholipid analogs against HIV-1 infection and disease. **Current pharmaceutical design**, v. 9, p. 1441-1451, 2003.

MUNRO, M.H.G.; LEIBRAND, R.T.; BLUNT, J.W. The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. In Scheuer, P.J. (ed). **Biorganic Marine Chemistry**, v. 1, Springer-Verlag, 1987.

MURICY, G.; HADJU, E.; MINERVINO, J.V.; MADEIRA, A. V.; PEIXINHO, S. Systematic revision of the genus *Petromica* Topsent (Demospongiae: *Halichondrida*), with a new species from the southwestern Atlantic. **Hydrobiologia**, v. 443, p. 103-128, 2001.

NAGAI, H.; MIKAMI, Y.; YAZAWA, K.; GONOI, T.; YASUMOTO, T. Biological activities of novel polyether antifungals, gambieric acids A and B from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, p. 520-522, 1993.

NEWBOLD, R.W.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W.; PAWLIK, J.R.; Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 19, p. 279-284, 1999.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. SANDER M.K. Natural products as sources over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, n. 66, p. 1022-1037, 2003.

Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. **Current Medical Chemical**, n. 11, p. 1693-713, 2004.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 297-305, 2002.

NOHARA, T. Search for functions of natural oligoglycosides-Solanaceae and Leguminosae origin glycosides. **Yakugaku Zasshi**, v. 124, p. 183-205, 2004.

O'KEEFE, B.R.; BEUTLER, J.A.; CARDELLINA, J.H.; PRATHER, T.R.; SHOEMAKER, R.H.; SOWDER, R.C.; HENDERSON, L.E.; PANNELL, L.K.; BOYD, M.R. Isolation of a novel Kunitz family protease inhibitor in association with *Tethya hemolysin* from the sponge *Tethya ingalli*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1094-1099, 1997.

O'KEEFE, B.R.; ERIM, T.; BEUTLER, J.A.; CARDELLINA, J.H.; GULAKOWSKI, R. J.; KREPPS, B.L.; MCMAHON, J.B.; SOWDER, R.C.; JOHNSON, D.G.; BUCKHEIT, R.W.JR.; HALLIDAY, S.; BOYD, M.R. Isolation and characterization of adociavirin, a novel HIV-inhibitory protein from the sponge *Adocia* sp. **FEBS Lett**, v. 431, p. 85-90, 1998.

OKU, N.; GUSTAFSON, K.R.; CARTNER, L.K.; WILSON, J.A.; SHIGEMATSU, N.; HESS, S.; PANNELL, L.K.; BOYD, M.R.; MCMAHON, J.B. Neamphamide A, a new HIV-inhibitory depsipeptide from the Papua New Guinea marine sponge *Neamphius huxleyi*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1407-1411, 2004.

OSTERHAGE, C.; KAMINSKY, R.; KONIG, G.M.; WRIGHT, A.D. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 6412-6417, 2000.

OVECHKINA, Y.Y.; PETTIT, R.K.; CICHACZ, Z.A.; PETTIT, G.R.; OAKLEY, B.R. Unusual antimicrotubule activity of the antifungal agent spongistatin 1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, p. 1993-1999, 1999.

PALERMO, J.A.; BRASCO, M.F.; SPAGNUOLO, C.; SELDES, A.M. Illudalane sesquiterpenoids from the soft coral *Alcyonium paessleri*: the first natural nitrate esters. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 4482-4486, 2000.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M.J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 132, p. 213-221, 2002.

PEREIRA, H.S.; LEAO-FERREIRA, L. R.; MOUSSATCHE, N.; TEIXEIRA, V.L.; CAVALCANTI, D.N.; COSTA, L.J.; DIAZ, R.; FRUGULHETTI, I.C. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral Research**, v. 64, p. 69-76, 2004.

PERRY, N.B.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G.; PANNEL, L.K. Mycalamide A an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, p. 4850-4851, 1988.

_____. THOMPSON, A.M. Antiviral and antitumor agents from a New Zealand sponge *Mycale* sp 2: structures and solution conformations of mycalamides A and B. **Journal of Organic Chemistry**, v. 55, p. 223-227, 1990.

PINA, S.; PUIG, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied Environment Microbiology**, v. 64, p. 3376-3382, 1998.

PINTO, A.C.; REZENDE, C.M.; GARCEZ, F.R. An overview of the Brazilian natural product community. **Química Nova**, v. 26, p. 966-971, 2003.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A.; EBEL, R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, p. 125-134, 2002.

RANDAZZO, A.; BIFULCO, G.; GIANNINI, C.; BUCCI, M.; DEBITUS, C.; CIRINO, G.; GOMEZ-PALOMA, L. Halipeptins A and B: two novel potent anti-inflammatory cyclic depsipeptides from the Vanuatu marine sponge *Haliclona* species. **Journal of American Chemical Society**, v. 123, p. 10870-10876, 2001.

RAO, K.V.; KASANA, N.; WAHYUONO, S.; TEKWANI, B.L.; SCHINAZI, R.F.; HAMANN, M.T. Three new manzamine alkaloids from a common Indonesian sponge and their activity against infectious and tropical parasitic diseases. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1314-1318, 2004.

RASHID, M.A.; GUSTAFSON, K.R.; BOYD, M.R. HIV-inhibitory cembrane derivatives from a Philippines collection of the soft coral *Lobophytum* species. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 531-533, 2000.

RASHID, M.A.; GUSTAFSON, K.R.; BOYD, M.R. A new isoquinoline alkaloid from the marine sponge *Haliclona* species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1249-1250, 2001.

RAULIN, J. Lipids and retroviruses. **Lipids**, v. 35, p. 123-130, 2000.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; ABBASZADEGAN, M.; PEPPER, I.L. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A environment samples. **Canadian journal of microbiology**, v. 47, p. 153-157, 2001.

RICHARDS, J.T.; KERN, E.R.; GLASGOW, L.A.; OVERALL, J.C.Jr.; DEIG, E.F.; HATCH, M.T. Antiviral activity of extracts from marine algae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 14, p. 24-30, 1978.

RINEHART, K.L.; KOBAYASHI, J.; HARBOUR, G.C.; HUGHES, R.G.JR.; MIZSAK, S.A.; SCAHILL, T.A. Eudistomins C E K and L potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. **Journal of American Chemical Society**, v. 106, p. 1524-1526, 1984.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 337p.

RODRIGUEZ, A.D.; RAMIREZ, C. Novel antimycobacterial benzoxazole alkaloids, from the West Indian Sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. **Organic letters**, v. 1, p. 527-530, 1999.

Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 100-102, 2001.

ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: FIELDS, B.N.; KNIFE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.) **Fields Virology**. 3 ed. v. 2. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 2221-2341.

RUDI, A.; YOSIEF, T.; LOYA, S.; HIZI, A.; SCHLEYER, M.; KASHMAN, Y. Clathsterol, a novel anti-HIV-1 RT sulfated sterol from the sponge *Clathria* species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1451-1453, 2001.

SAKEMI, S.; HIGA, T.; JEFFORD, C.W.; BERNARDINELLI, G. Venustatriol, a new antiviral triterpene tetracyclic ether from *Laurencia venusta*. **Tetrahedron letters**, v. 27, p. 4287-4290, 1986.

SANTAFE, G.; PAZ, V.; RODRIGUEZ, J.; JIMENEZ, C. Novel cytotoxic oxygenated C29 sterols from the Colombian marine sponge *Polymastia tenax*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1161-1164, 2002.

SARIN, P. S.; SUN, D.; THORNTON, A.; MULLER, W. E. Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 78, p. 663-666, 1987.

SERA, Y.; ADACHI, K.; FUJII, K.; SHIZURI, Y. A new antifouling hexapeptide from a Palauan sponge, *Haliclona* sp. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 719-721, 2003.

SERKEDJIEVA, J. Antitherpes virus effect of the red marine alga *Polysiphonia denudata*. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 55, p. 830-835, 2000.

SHEN, X.; PERRY, T.L.; DUNBAR, C.D.; KELLY-BORGES, M.; HAMANN, M.T. Debromosceptrin, an alkaloid from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1302-1303, 1998.

SHNEIDER, M.A.; SHTIL'BANS, E.B.; RACHKOVSKAIA, L.A.; VETLUGINA, L.A.; NIKITINA, E. T. Virus-inhibiting properties of the carbonyl-conjugated pentaene roseofungin. **Antibiotiki**, v. 29, p. 344-349, 1984.

SHIN, J.; LEE, H.S.; KIM, J.Y.; SHIN, H.J.; AHN, J.W.; PAUL, V.J. New macrolides from the sponge *Chondrosia corticata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1889-1892, 2004.

SIEUWERTS, A.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ – values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SIPKEMA, D.; HEILIG, H.G.; AKKERMANS, A.D.; OSINGA, R.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Sponge-cell culture? A molecular identification method for sponge cells. **Marine biotechnology**, v. 5, p. 443-449, 2003.

SJOSTRAND, U.; KORNPORST, J.M.; DJERASSI, C. Minor and trace sterols from marine invertebrates 29. (22E)-ergosta-5,22,25-trien-3 beta-ol and (22E,24R)-24,26-dimethylcholesta-5,22,25(27)-trien-3 beta-ol. Two new marine sterols from the sponge *Pseudaxinella lunacharta*. **Steroids**, v. 38, p. 355-364, 1981.

SMITH, G.M.; DJERASSI, C. Phospholipid studies of marine organisms: 14. Ether lipids of the sponge *Tethya aurantia*. **Lipids**, v. 22, p. 236-240, 1987.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3rd. ed. New York: W. H. Freeman, 1995, 850 p.

SPERRY, S; CREWS, P. Haliclostano sulfato and halistanol sulfato from an Indo-Pacific *Haliclona* sponge. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 29-32, 1997.

SRINIVAS, R.V.; BIRKEDAL, B.; OWENS, R.J.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; SEGREST, J.P.; COMPANS, R.W. Antiviral effects of apolipoprotein A-I and its synthetic amphipathic peptide analogs. **Virology**, v. 176, p. 48-57, 1990.

STIERLE, A.C.; CARDELLINA II, J.H.; SINGLETON, F.L. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. **Experientia**, v. 44, p. 1021, 1988.

STORER, I.T.; USINGER, L.R.; STEBBINS C.R.; NYBAKKEN W.J.; **Zoologia Geral**. 6 ed., São Paulo: Editora Nacional, 1991. 816 p, 1991.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 39-41, 2000.

TAKEUCHI, H.; BABA M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.

TARAPOREWALA, I.B.; CESSAC, J.W.; CHANH, T.C.; DELGADO, A.V.; SCHINAZI, R.F. HIV-1 neutralization and tumor cell proliferation inhibition *in vitro* by simplified analogues of pyrido[4,3,2-mn]thiazolo[5,4-b]acridine marine alkaloids. **Journal of Medical Chemistry**, v. 35, p.2744-2752, 1992.

TANG, J.; COLACINO, J.M.; LARSEN, S.H.; SPITZER, W. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 13, p. 313-325, 1990.

TOMASSINI, J.E.; DAVIES, M.E.; HASTINGS, J.C.; LINGHAM, R.; MOJENA, M.; RAGHOOBAR, S.L.; SINGH, S.B.; TKACZ, J.S.; GOETZ, M.A. A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1189-1193, 1996.

TORRES, Y.R.; BERLINCK, R.G.; NASCIMENTO, G.G.; FORTIER, S.C.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Toxicon**, v. 40, p. 885-891, 2002.

TSUKAMOTO, S.; TANE, K.; OHTA, T.; MATSUNAGA, S.; FUSETANI, N.; VAN SOEST, R.W. Four new bioactive pyrrole-derived alkaloids from the marine sponge *Axinella brevistyla*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1576-1578, 2001.

TZIVELEKA, L.A.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 1512-1535, 2003.

VENKATESHWAR, Y.; REDDY, M.V.R.; RAMESH, P.; RAO, J.V. Neofolispates, pentacyclic guanidine alkaloids from the sponge *Neofolitispa dianchora*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 38, p. 254-256, 1999.

VERA, M.D.; JOULLIE, M.M. Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, p. 102-145, 2002.

VERVOORT, H.; FENICAL, W.; EPIFÂNIO, R.A. Tamandarins A and B: new cytotoxic depsipeptides from a brazilian ascidian of the Family Didemnidae. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 782-792, 2000.

VINCENT, H.M.; WILSON, R.J. Reduced lectin binding on erythrocytes of monkeys infected with malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 449-451, 1980.

VOLK, C.A.; KOCK, M. Viscosaline: new 3-alkyl pyridinium alkaloid from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 2, p. 1827-1830, 2004.

VOYLES, B.A. The biology of viruses. St Louis: Mosby-Year Book, 1993. p. 386.

WANG, Y.; MUELLER, U.G.; CLARDY, J. Antifungal Diketopiperazines from Symbiotic Fungus of Fungus-Growing Ant *Cyphomyrmex minutus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, p. 935-941, 1999.

WEHRLI, S.L.; MOORE, K.S.; RODER, H.; DURELL, S.; ZASLOFF, M. Structure of the novel steroidal antibiotic squalamine determined by two-dimensional NMR spectroscopy. **Steroids**, v. 58, p. 370-378, 1993.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4th. ed., San Diego: Academic, 1994. 603 p.

WIEDBRAUK, D.L.; JOHNSTON, S.L.G. **Manual of clinical virology**. New York: Rave, 1992. 275 p.

WITTELS, M.; SPEAR, P.G. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. **Virus Research**, v. 18, p. 271-290, 1991.

WRIGHT, A.E.; RUETH, S.A.; CROSS, S.S. An antiviral sesquiterpene hydroquinone from the marine sponge *Strongylophora hartmani*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1108-1111, 1999.

XU, S.; ZENG, L. Isolation and identification of a new long-chain tetrahydroxyamide. **Zhong Yao Cai**, v. 23, p. 533-535. 2000.

YANG, S.W.; CHAN, T.M.; POMPONI, S.A.; CHEN, G.; LOEBENBERG, D.; WRIGHT, A.; PATEL, M.; GULLO, V.; PRAMANIK, B.; CHU, M. Structure elucidation of a new antifungal sterol sulfate, Sch 575867, from a deep-water marine sponge (Family: Astroscleridae). **Japan Antibiotic**, v. 56, p. 186-189, 2003.

ZAMPELLA, A.; D'AURIA, M.V.; PALOMA, L.G.; CASAPULLO, C.; MINALE, L.; DEBITUS, C.; HENIN, Y. Callipeltin A, an Anti-HIV Cyclic Depsipeptide from the New Caledonian Lithistida Sponge *Callipelta* sp. **American Chemical Society**, v. 118, p. 6202-6209, 1996.

ZENG, X.; XU, S.; YANG, K.; HE, H. Study on chemical constituents from *Mycale parishi*. **Zhong Yao Cai**, v. 26, p. 715-718, 2003.

Alonso, D., Z. Khalil, et al. (2003). "Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neuropathic pain and other neurological conditions." Mini Rev Med Chem **3**(7): 785-7.

Faulkner, D. J. (2001). "Marine natural products." Nat Prod Rep **18**(1): 1-49.

Proksch, P., R. A. Edrada, et al. (2002). "Drugs from the seas - current status and microbiological implications." Appl Microbiol Biotechnol **59**(2-3): 125-34.