



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021010898-0 A2



(22) Data do Depósito: 05/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 24/08/2021

(54) **Título:** FLOROTANINO OU MISTURA DE FLOROTANINOS, USO DE UM OU MAIS FLOROTANINOS, COMPOSIÇÃO ANTIVIRAL, USO DE UMA COMPOSIÇÃO E DE UM EXTRATO, EXTRATO OBTIDO OU OBTENÍVEL A PARTIR DE ALGA MARROM, E, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM EXTRATO

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/03; A61P 31/12.

(30) **Prioridade Unionista:** 05/12/2018 GB 1819849.9.

(71) **Depositante(es):** BYOTROL PLC.

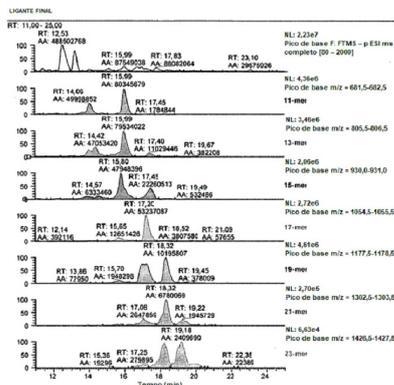
(72) **Inventor(es):** HUW EVANS; CHRISTOPHER PLUMMER; MATIAS LUCK; ROSE ELIZABETH PIERCY MCINERNEY; LAUREN MAIREAD BURNS.

(86) **Pedido PCT:** PCT GB2019053439 de 05/12/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/115489 de 11/06/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 04/06/2021

(57) **Resumo:** FLOROTANINO OU MISTURA DE FLOROTANINOS, USO DE UM OU MAIS FLOROTANINOS, COMPOSIÇÃO ANTIVIRAL, USO DE UMA COMPOSIÇÃO E DE UM EXTRATO, EXTRATO OBTIDO OU OBTENÍVEL A PARTIR DE ALGA MARROM, E, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM EXTRATO. A presente invenção refere-se a florotanos com propriedades antivirais, em particular aqueles com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol, que podem ser obtidos ou que são obtíveis como um extrato de alga marinha, incluindo o uso dos florotanos ou do extrato como um agente antiviral. Além disso, ao uso dos florotanos ou do extrato em uma composição com propriedades antivirais e ao uso da dita composição como um agente antiviral.



FLOROTANINO OU MISTURA DE FLOROTANINOS, USO DE UM OU MAIS FLOROTANINOS, COMPOSIÇÃO ANTIVIRAL, USO DE UMA COMPOSIÇÃO E DE UM EXTRATO, EXTRATO OBTIDO OU OBTENÍVEL A PARTIR DE ALGA MARROM, E, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM EXTRATO

[001] Esta invenção refere-se a florotanimos com propriedades antivirais que podem ser obtidos ou obteníveis como um extrato de algas marinhas, incluindo o uso de florotanimos ou do extrato como um agente antiviral. Além disso, ao uso dos florotanimos ou do extrato em uma composição com propriedades antivirais e o uso da dita composição como um agente antiviral.

[002] A listagem ou discussão de um documento aparentemente publicado anteriormente neste relatório descritivo não deve ser necessariamente levada como um reconhecimento de que o documento é parte do estado da técnica ou é de conhecimento geral.

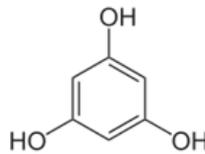
[003] Algas marinhas ou macroalgas são normalmente divididas em 3 tipos, vermelhas (*Rhodophyta*), marrons (*Phaeophyta*) e verdes (*Chlorophyta*). Existe um quarto tipo de algas, as algas azul-esverdeadas formadoras de tufos (*Cyanobacteria*) que, às vezes, é considerada uma alga marinha. Existem cerca de 10000 espécies de algas marinhas, das quais, aproximadamente, 6500 são algas vermelhas, 2000 são algas marrons e 1500 são algas verdes.

[004] As algas marrons (ou algas marinhas marrons) são o maior tipo de alga marinha. As algas marrons podem ser marrons ou amarelo-amarronzadas e são normalmente encontradas em águas temperadas ou árticas no hemisfério norte. As algas marrons normalmente têm uma estrutura semelhante a uma raiz chamada de “âncora” para ancorar as algas a uma superfície.

[005] Enquanto as algas vermelhas e marrons são quase

exclusivamente marinhas, as verdes também são comuns em situações de água doce (rios e lagos) e até mesmo em situações terrestres (pedras, paredes, casas e cascas de árvores em locais úmidos).

[006] Os compostos polifenólicos estão presentes em uma variedade de plantas terrestres e marinhas. Uma classe de polifenólicos conhecida como florotaninos são encontrados apenas em algas marinhas marrons. Os florotaninos são formados através da polimerização de unidades de floroglucinol.



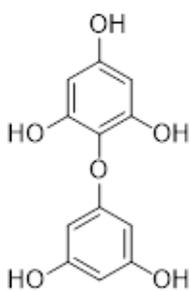
Floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno)

[007] Os florotaninos são produzidos pelas algas marinhas como metabólitos secundários e biossintetizados pela via do malonato de acetato. Eles estão presentes nas algas marinhas sob forma livre ou formando complexos com diferentes componentes da parede celular, como o ácido algínico. Os florotaninos são essenciais para a integridade fisiológica das algas marinhas e estão envolvidos em vários papéis secundários importantes, como defesa química, proteção contra danos oxidativos que ocorrem em resposta a mudanças na disponibilidade de nutrientes e radiação UV, interações com outros organismos ou ambiente abiótico, assim como os mesmos são componentes integrais da parede celular.

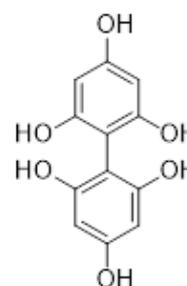
[008] Em geral, os florotaninos são separados em quatro subclasses; com base no tipo de ligação entre as unidades de floroglucinol e/ou na presença de grupos hidroxila adicionais, as subclasses são as seguintes:

1. Os florotaninos com uma ligação éter (isto é, floretóis e fuhalóis, em que os fuhalóis são construídos de unidades de floroglucinol que são conectadas com pontes de éter para e ortodispostas, contendo um grupo OH adicional em cada terceiro anel).

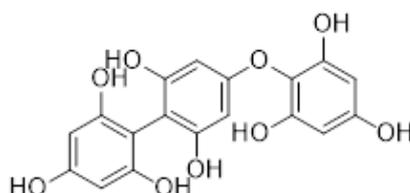
- [009] 2. Florotaninos com uma ligação fenila (isto é, fucóis).
- [0010] 3. Florotaninos com uma ligação éter e fenila (isto é, fucofloretóis)
4. Florotaninos com uma ligação dibenzodioxina. (isto é, ecóis e carmalóis)
- [0011] Exemplos dos tipos de ligação no florotanino são ilustrados abaixo:



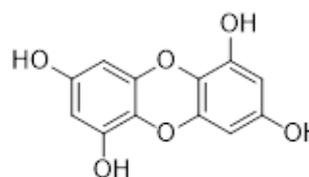
ligação éter



ligação fenila



ligação éter e fenila



ligação dibenzodioxina

o peso molecular desses compostos pode estar na faixa 126 a mais de 10^5 g/mol. A quantidade de polifenóis em uma alga marinha varia de acordo com o habitat, época de colheita, exposição à intensidade da luz e disponibilidade de nutrientes nas águas circundantes, bem como as espécies.

[0012] O teor total de compostos fenólicos, incluindo florotaninos, é normalmente medido por ensaios colorimétricos, como o método Folin-Ciocalteu e a concentração de compostos fenólicos normalmente, está na faixa de 0,1 a 20% da massa seca da alga marinha, novamente dependente dos fatores acima. Um método cromatográfico líquido combinado com espectrometria de massa, às vezes suplementado por RMN de alta resolução, pode ser usado para fornecer informações sobre a composição química do teor fenólico.

[0013] Ao usar essas técnicas, é possível obter informações como o grau de polimerização (DP) da unidade de floroglucinol, a massa molecular, o tipo de ligação entre as unidades de floroglucinol e os isômeros presentes. Devido à complexidade e grande diversidade de espécies químicas presentes, tais estudos estão longe de ser simples, exigindo um esforço significativo e técnicas experimentais para extrair e fracionar o florotanino e, posteriormente, analisar e interpretar os resultados.

[0014] É um objetivo da invenção fornecer um agente antiviral obtido ou obtível de uma fonte natural.

[0015] Os presentes inventores constataram, surpreendentemente, que os extratos obtidos ou obtíveis a partir de algas marinhas, tais como algas marinhas marrons, que compreendem polifenóis, tais como florotaninos, têm atividade antiviral.

[0016] De acordo com a presente invenção, é fornecido um florotanino ou uma mistura de florotaninos para uso como um agente antiviral. Em particular, um florotanino ou uma mistura de florotaninos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol para uso como um agente antiviral. Os florotaninos podem ser usados para tratar ou prevenir infecções virais.

[0017] Também é fornecido o uso de um ou mais florotaninos como um agente antiviral, tal como um agente para tratar ou prevenir infecções virais. Em particular, o uso de um ou mais florotaninos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol como um agente antiviral.

[0018] Também é fornecido o uso de um ou mais florotaninos na fabricação de uma composição antiviral, tal como uma composição a ser usada para tratar ou prevenir infecções virais. Em particular, o uso de um ou mais florotaninos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol na fabricação de uma composição antiviral, tal como uma

composição a ser usada para tratar ou prevenir a infecção viral.

[0019] Os florotaninos da presente invenção podem ser fornecidos como um extrato obtido ou obtenível a partir de algas marinhas.

[0020] Assim, de acordo com a presente invenção, é fornecido um extrato obtido a partir de, ou obtenível a partir de, algas marinhas, que pode ser referido a doravante como o “extrato da invenção”.

[0021] Os extratos da invenção compreendem polifenóis. Os compostos fenólicos presentes no extrato da invenção compreendem, tipicamente, oligômeros de pelo menos 2 unidades de floroglucinol, conhecidos como florotaninos. Em particular, os extratos da invenção compreendem um ou mais florotaninos.

[0022] O extrato da invenção pode ser obtido ou obtenível a partir de pelo menos uma alga marinha selecionada dentre algas marinhas marrons, verdes e vermelhas. Por exemplo, a alga marinha pode ser obtida ou obtenível a partir de uma alga marinha marrom.

[0023] Por exemplo, o extrato da invenção pode ser obtido ou obtenível a partir de pelo menos uma alga marinha das famílias de algas marinhas: *Fucaceae*, *Himanthaliaceae*, *Durvillaeaceae*, *Laminariaceae*, *Alariaceae* e/ou *Sargassaceae*.

[0024] Em particular, o extrato da invenção pode ser obtido ou obtenível a partir de pelo menos uma alga marinha selecionada dentre um ou mais dos seguintes gêneros: *Ascophyllum*, *Fucus*, *Hesperophycus*, *Pelvetia*, *Pevetiopsi* *Silvetia*, *Himanthalia*, *Durvillaea*, *Anthrothamnus*, *Costularia*, *Cymathere*, *Feditia*, *Laminaria*, *Macrocystis*, *Nereocystis*, *Pelagophycus*, *Phyllariella*, *Postelsia*, *Pseudolessonia*, *Saccharina*, *Steptophyllopsis*, *Alaria*, *Aureophycus*, *Eualaria*, *Lessoniopsis*, *Pleurophycus*, *Undaria*, *Undariella*, *Undariopsis* *Acrocarpia*, *Acystis*, *Anthophycus*, *Axillariella*, *Bifurcaria*, *Carpoglossum*, *Carpophyllum*, *Caulocystis*, *Cladophyllum*, *Coccophora*, *Cystophora*, *Cystophyllum*, *Cystoseira*, *Halidrys*, *Hizikia*, *Hormophysa*,

Landsburgia, Myagropsis, Myriodesma, Nizamuddinia, Oerstedtia,
Platythalia, Sargassum, Scaberia e/ou Turbinaria.

[0025] Por exemplo, o extrato da invenção pode ser obtido ou obtenível a partir de *Ascophyllum nodosum*.

[0026] Como será observado pela pessoa versada na técnica, tal como usado neste documento, o termo “obtenível a partir de” significa que o extrato pode ser obtido a partir de uma alga marinha ou pode ser isolado da alga marinha, ou pode ser obtido a partir de uma fonte alternativa, por exemplo, por meio de síntese química ou produção enzimática. Enquanto o termo “obtido”, conforme usado neste documento, significa que o extrato é diretamente derivado da fonte de algas marinhas.

[0027] O extrato da presente invenção pode compreender de cerca de 1% a cerca de 100% em peso, tal como de cerca de 1% a 95% em peso, ou 2 a 90% em peso, ou 2% a cerca de 80%, ou de cerca de 5% a cerca de 70% ou de cerca de 8% a cerca de 65% em peso de florotaninos com base no peso seco do extrato.

[0028] Um extrato bruto da presente invenção compreenderá tipicamente, além dos florotaninos, polissacarídeos, como fucoidanos e laminaranos, monossacarídeos, como manitol, e minerais, como cloreto de sódio. Normalmente, os florotaninos estarão presentes em um extrato bruto em uma quantidade de cerca de 1% a cerca de 20% ou cerca de 30% do extrato. As técnicas de purificação conhecidas na técnica podem ser usadas para remover materiais, tais como polissacarídeos e monossacarídeos, e, assim, aumentar a concentração de florotaninos.

[0029] As extrações da invenção que foram submetidas a uma ou mais etapas de purificação podem compreender até cerca de 100% em peso de florotaninos com base no peso seco do extrato. Por exemplo, tais extratos podem compreender pelo menos cerca de 50% em peso com base no peso seco do extrato de florotaninos. Esses extratos da invenção podem

compreender de cerca de 50% a cerca de 100% em peso com base no peso seco do extrato de florotaninos, por exemplo, de cerca de 60 a cerca de 95% ou de cerca de 70 a cerca de 90% em peso com base no peso seco do extrato.

[0030] Os florotaninos da presente invenção, tais como aqueles presentes em um extrato da invenção, podem, por exemplo, compreender uma média de pelo menos cerca de 2 ou pelo menos cerca de 10 unidades de floroglucinol, por exemplo, uma média de cerca de 10 a cerca de 50 unidades de floroglucinol, tal como uma média de cerca de 10 a cerca de 30, ou de cerca de 10 a cerca de 25 ou de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol.

[0031] Os florotaninos da presente invenção, tais como aqueles presentes em um extrato da invenção, podem compreender pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco de florotaninos com uma média de pelo menos 10 unidades de floroglucinol, tal como uma média de cerca de 10 a 23 unidades de floroglucinol. Por exemplo, de cerca de 75% a cerca de 100% ou de cerca de 80% a cerca de 95% em peso de tais florotaninos com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco.

[0032] Os florotaninos da presente invenção, tais como aqueles presentes em um extrato da invenção, podem compreender pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco, florotaninos com uma massa molecular média acima de 250 g/mol. Por exemplo, de cerca de 75% a cerca de 100% ou de cerca de 80% a cerca de 95% em peso de tais florotaninos com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco.

[0033] Os florotaninos da presente invenção, tais como aqueles presentes em um extrato da invenção, podem compreender pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco de florotaninos com uma massa molecular média acima de 1000 g/mol, tal como de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol, tal como de cerca de 1200

g/mol a cerca de 2500 g/mol. Por exemplo, de cerca de 75% a cerca de 100% ou de cerca de 80% a cerca de 95% em peso de tais florotaninos com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco com uma massa molecular média acima de 1000 g/mol, tal como de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol, tal como de cerca de 1200 g/mol a cerca de 2500 g/mol.

[0034] Os florotaninos da presente invenção, tais como aqueles presentes em um extrato da invenção, podem ter uma massa molecular média acima de 1000 g/mol, tal como de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol, tal como de cerca de 1200 g/mol a cerca de 2500 g/mol.

[0035] Por exemplo, menos de 20% em peso dos florotaninos podem ter uma massa molecular média menor que 1000 g/mol ou maior que 3000 g/mol, tal como menor que 10% ou menor que 5%. Em alguns aspectos, os florotaninos da presente invenção, tais como aqueles presentes no extrato da invenção, podem não ter uma massa molecular média menor que 1000 g/mol ou maior que 3000 g/mol.

[0036] As unidades de floroglucinol que constituem os florotaninos da presente invenção, tais como aqueles presentes em um extrato da invenção, podem ser ligadas através de pelo menos uma das ligações selecionadas a partir de um grupo que consiste em: ligação fenila, ligação éter e ligações dibenzodioxina, e combinações dos mesmos.

[0037] As unidades de floroglucinol que constituem os florotaninos da presente invenção, tais como as presentes em um extrato da invenção, podem ser ligadas para formar cadeias lineares, cadeias ramificadas ou uma mistura das mesmas.

[0038] Alguns extratos da presente invenção podem não compreender polissacarídeos derivados ou derivados de algas marinhas (isto é: ser livres de polissacarídeos) ou compreender uma pequena quantidade de polissacarídeos derivados ou derivável de algas marinhas (isto é: ser substancialmente livres de polissacarídeos), por exemplo, de cerca de 0% a cerca de 30% ou de cerca

de 0% a cerca de 20%, tal como de cerca de 0% a cerca de 10%, ou de cerca de 0% a cerca de 5% ou de cerca de 0% a cerca de 1% com base no peso seco do extrato.

[0039] Por exemplo, o extrato da invenção pode ter sido purificado com o uso de práticas conhecidas na técnica para remover polissacarídeos, como o uso de extrato de fase sólida (SPE) ou filtração de fluxo tangencial (TFF). Esse extrato pode ser referido como um extrato purificado da invenção.

[0040] Alguns extratos da presente invenção podem não compreender polissacarídeos antivirais derivados ou deriváveis de algas marinhas (isto é: ser livres de polissacarídeos antivirais) ou compreender uma pequena quantidade de polissacarídeos antivirais derivados ou deriváveis de algas marinhas (isto é: ser substancialmente livres de polissacarídeos antivirais), por exemplo, de cerca de 0% a cerca de 30% ou de cerca de 0% a cerca de 20%, tal como de cerca de 0% a cerca de 10%, ou de cerca de 0% a cerca de 5% ou de cerca de 0% a cerca de 1% com base no peso seco do extrato.

[0041] Alguns extratos da presente invenção podem não compreender fucoídano derivado ou derivável de alga marinha (isto é: ser livre de fucoídano) ou compreender uma pequena quantidade de fucoídano derivado ou derivável de alga marinha (isto é: ser substancialmente livre de fucoídano), por exemplo, de cerca de 0% a cerca de 30% ou de cerca de 0% a cerca de 20%, tal como de cerca de 0% a cerca de 10%, ou de cerca de 0% a cerca de 5% ou de cerca de 0% a cerca de 1% com base no peso seco do extrato.

[0042] Os florotaninos da presente invenção, como aqueles presentes em um extrato da invenção, podem ser obtidos por meio de extração e/ou isolamento de material biológico, como algas marinhas.

[0043] Os solventes usados para extração e/ou isolamento podem ser aquosos, alcóolicos, orgânicos ou misturas dos mesmos.

[0044] O termo “extrato aquoso”, tal como usado neste documento,

refere-se a florotaninos e/ou um extrato obtido de algas marinhas quando a extração das algas marinhas foi realizada usando-se água como o único solvente.

[0045] O termo “extrato de álcool”, tal como usado neste documento, refere-se a florotaninos e/ou um extrato obtido de algas marinhas quando a extração das algas marinhas foi realizada usando-se um álcool como solvente. O solvente de álcool pode consistir apenas em álcool (por exemplo, álcool 100%), por exemplo, etanol 100%.

[0046] O termo “extrato hidroalcólico”, tal como usado neste documento, refere-se a florotaninos e/ou um extrato obtido a partir de algas marinhas quando a extração das algas marinhas foi realizada usando-se uma mistura de um álcool e água como solvente. Por exemplo, de cerca de 1% a cerca de 99% de álcool em água. Por exemplo, uma mistura de etanol e água. Por exemplo, o solvente pode ser 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% de álcool em água, tal como 60% de álcool em água (com base na quantidade total de solvente, incluindo água presente nas algas marinhas, se forem utilizadas algas marinhas frescas). Por exemplo, o solvente pode ser de cerca de 10% de álcool (isto é, etanol) em água a cerca de 90% de álcool em água, tal como de cerca de 20% a cerca de 80%, ou de cerca de 30% a cerca de 70% ou 40% a cerca de 60%. Os álcoois que podem ser mencionados incluem etanol (EtOH, hidroetanólico) e metanol (MeOH, hidrometanólico). O uso de um solvente de extração hidroetanólico é preferido em alguns aspectos da invenção.

[0047] O termo “extrato orgânico”, tal como usado neste documento, refere-se a florotaninos e/ou um extrato obtido de algas marinhas quando a extração da planta foi realizada usando-se um solvente orgânico que não é um álcool como solvente. Por exemplo, o solvente orgânico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em ácido acético, acetona, acetonitrila, benzeno, 1-butanol, 2-butanol, 2-butanona, tetracloreto de carbono,

clorobenzeno, clorofórmio, ciclo-hexano, 1,2-dicloroetano, dietileno, glicol, éter dietílico, diglima (dietilenoglicol, éter dimetílico), 1,2-dimetozietano (glima, DME), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,4-dioxano, acetato de etila, etilenoglicol, glicerina, heptano, hexametilfosforamida (HMPA), triamida hexametilfosforosa (HMPT), hexano, metil t-butila, éter (MTBE), cloreto de metileno, N-metil-2-pirrolidinona (NMP), nitrometano, pentano, éter de petróleo (ligroína), 1-propanol, 2-propanol, piridina, tetra-hidrofurano (THF), tolueno, trietilamina, o-xileno, m-xileno e p-xileno.

[0048] Por exemplo, os florotaninos da presente invenção e/ou um extrato da invenção podem ser obtidos ou obteníveis a partir de uma alga marinha marrom usando-se um solvente de extração hidroalcólico (isto é, um extrato hidroalcólico).

[0049] O uso de um solvente hidroalcólico pode permitir a extração seletiva de compostos de baixo peso molecular e/ou mais compostos solúveis em água da alga marinha (como a alga marinha marrom). Por exemplo, quando o extrato da invenção é um extrato hidroalcólico de alga marinha marrom (isto é, um extrato hidroetanólico), o um ou mais florotaninos podem ter de cerca de 10 a cerca de 30 ou de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol e/ou uma massa molecular média de 1000 g/mol ou superior, tal como de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol ou de cerca de 12000 g/mol a cerca de 2500 g/mol.

[0050] Por exemplo, o extrato pode ser obtido ou obtenível a partir de alga marinha marrom que compreende um ou mais florotaninos, em que pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco tem uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol com base no peso seco do extrato.

[0051] Entende-se pelo termo solúvel em água que pelo menos cerca de 2% (isto é, pelo menos cerca de 2 g por 100 ml), tal como pelo menos

cerca de 5%, 10%, 20%, 40%, 60% ou 70% (isto é, pelo menos cerca de 5 g, 10 g, 20 g, 40 g, 60 g ou 70 g por 100 ml) da composição se dissolverá em água à temperatura ambiente, isto é, a uma temperatura de cerca de 25 °C.

[0052] O extrato da invenção pode ser obtido ou obténível a partir de algas marinhas marrons usando-se um solvente de extração hidroalcóolico (hidroetanólico) (isto é, um extrato hidroalcóolico (hidroetanólico)), em que o extrato compreende de cerca de 1% a cerca de 100% em peso, tal como de cerca de 1% a 95% em peso, ou 2 a 90% em peso, ou 2% a cerca de 80%, ou de cerca de 5% a cerca de 70% ou de cerca de 8% a cerca de 65% em peso de um ou mais florotaninos com base no peso seco do extrato.

[0053] O extrato da invenção pode ser obtido ou obténível a partir de algas marinhas marrons usando-se um solvente de extração hidroalcóolico (hidroetanólico) (isto é, um extrato hidroalcóolico (hidroetanólico)), em que o extrato compreende de cerca de 1% a cerca de 100% em peso, tal como de cerca de 1% a 95% em peso, ou 2 a 90% em peso, ou 2% a cerca de 80%, ou de cerca de 5% a cerca de 70% ou de cerca de 8% a cerca de 65% em peso de um ou mais florotaninos com base no peso seco do extrato, em que um ou mais florotaninos têm de cerca de 10 a cerca de 30 unidades de floroglucinol ou de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol, por exemplo, em que pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco têm de cerca de 10 a cerca de 30 unidades de floroglucinol ou de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol.

[0054] O extrato da invenção pode ser obtido ou obténível a partir de algas marinhas marrons usando-se um solvente de extração hidroalcóolico (hidroetanólico) (isto é, um extrato hidroalcóolico (hidroetanólico)), em que o extrato compreende de cerca de 1% a cerca de 100% em peso, tal como de cerca de 1% a 95% em peso, ou 2 a 90% em peso, ou 2% a cerca de 80%, ou de cerca de 5% a cerca de 70% ou de cerca de 8% a cerca de 65% em peso de um ou mais florotaninos com base no peso seco do extrato e um ou mais

florotaninos têm uma massa molecular média de 1000 g/mol ou mais, tal como de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol ou de cerca de 1200 g/mol a cerca de 2500 g/mol, por exemplo, em que pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco têm uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol com base no peso seco do extrato.

[0055] O extrato da invenção pode ser obtido ou obtenível a partir de algas marinhas marrons usando-se um solvente de extração hidroalcólico (hidroetanólico) (isto é, um extrato hidroalcólico (hidroetanólico)), em que o extrato compreende de cerca de 1% a cerca de 100% em peso, tal como de cerca de 1% a 95% em peso, ou 2 a 90% em peso, ou 2% a cerca de 80%, ou de cerca de 5% a cerca de 70% ou de cerca de 8% a cerca de 65% em peso de um ou mais florotaninos com base no peso seco do extrato, em que um ou mais florotaninos têm de cerca de 10 a cerca de 30 unidades de floroglucinol ou de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol e têm uma massa molecular média de 1000 g/mol ou superior, tal como de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol ou de cerca de 1200 g/mol a cerca de 2500 g/mol, por exemplo, em que pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco têm de cerca de 10 a cerca de 30 unidades de floroglucinol ou de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol e/ou têm uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol com base no peso seco do extrato.

[0056] O extrato purificado da invenção pode ser obtido ou obtenível a partir de algas marinhas marrons usando-se um solvente de extração hidroalcólico (hidroetanólico) (isto é, um extrato hidroalcólico (hidroetanólico)), em que o extrato compreende de cerca de 1% a cerca de 100% em peso, tal como de cerca de 1% a 95% em peso, ou 2 a 90% em peso ou 2% a cerca de 80%, ou de cerca de 5% a cerca de 70% ou de cerca de 8% a cerca de 65% em peso de um ou mais florotaninos com base no peso seco do

extrato, em que um ou mais florotaninos têm de cerca de 10 a cerca de 30 unidades de floroglucinol ou de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol e têm uma massa molecular média de 1000 g/mol ou superior, tal como de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol ou de cerca de 1200 g/mol a cerca de 2500 g/mol, por exemplo, em que pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco têm uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol com base no peso seco do extrato, e pode não compreender polissacarídeos derivados ou deriváveis de algas marinhas (isto é: ser livre de polissacarídeos) ou compreender uma pequena quantidade de polissacarídeos derivados ou deriváveis de algas marinhas (isto é: ser substancialmente livre de polissacarídeos), por exemplo, de cerca de 0% a cerca de 10%, tal como de cerca de 0% a cerca de 5%, tal como de cerca de 0% a cerca de 1% com base no peso seco do extrato.

[0057] O processo de extração usado para obter esse extrato da invenção pode compreender duas ou mais etapas de extração. Por exemplo, as algas marinhas podem ser submetidas a uma extração hidroalcóolica, como uma extração hidroetanólica para produzir um produto de extração bruto. Esse produto de extração bruto pode, em seguida, ser submetido a uma ou mais etapas de extração adicionais. Nessas etapas adicionais, o mesmo solvente hidroalcólico pode ser usado ou um solvente hidroalcólico diferente pode ser usado (por exemplo, a razão entre o álcool e a água pode ser variada) ou um solvente orgânico, como acetato de etila, pode ser usado como o solvente. Se necessário, o extrato bruto pode ser seco para remover o solvente de extração entre as etapas de extração.

[0058] Como exemplo, a extração hidroetanólica pode ser seguida pela extração com acetato de etila. O extrato bruto obtido após a extração hidroetanólica pode ser seco antes da extração com acetato de etila.

[0059] Salvo indicação em contrário neste documento, as

percentagens em peso listadas são baseadas no peso total do extrato obtido sob a forma seca. Por exemplo, em alguns aspectos, as porcentagens de peso listadas são baseadas no peso total do extrato seco. O extrato pode ser um sólido ou um líquido.

[0060] O termo “seco” usado neste documento, por exemplo, quando se refere ao extrato da invenção, refere-se a um extrato sólido ou líquido que carece de solvente, por exemplo, o solvente usado na extração, de modo que pelo menos 95% do solvente tenha sido removido, por exemplo, por evaporação.

[0061] Para evitar dúvidas, preferências, opções, características particulares e semelhantes indicadas por um determinado aspecto, característica ou parâmetro da invenção devem, a menos que o contexto indique o contrário, ser consideradas como tendo sido divulgadas em combinação com todas e quaisquer outras preferências, opções, características particulares e semelhantes, conforme indicado para o mesmo ou outros aspectos, características e parâmetros da invenção.

[0062] O termo “cerca de” usado neste documento, por exemplo, quando se refere a um valor mensurável (tal como uma quantidade ou peso de um componente particular na mistura de reação), refere-se a variações de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ ou particularmente $\pm 0,1\%$ da quantidade especificada.

[0063] A pessoa versada na técnica compreenderá que os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato da invenção (uma vez que o solvente de extração tenha sido removido) podem ser fornecidos sob a forma sólida ou sob a forma líquida, como um óleo. Na forma sólida, está incluído que os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato podem ser fornecidos como um sólido amorfo ou como um sólido cristalino ou parcialmente cristalino.

[0064] Os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato da invenção podem ser obtidos ou obteníveis a partir de pelo menos um tipo de

alga marinha por processos de extração como geralmente descrito abaixo, ou modificações de rotina dos mesmos.

[0065] O processo de extração usado para obter os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato da invenção compreende colocar a alga marinha em contato com um solvente de extração. Os solventes de extração adequados são descritos acima.

[0066] Os solventes adequados incluem água, álcool, misturas de álcool/água (solventes hidroalcolóicos), acetato de etila, acetona, hexano ou qualquer outro solvente que possa ser tipicamente usado para extração, e misturas dos mesmos. Por exemplo, o solvente pode ser 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% de álcool em água, tal como 60% de álcool em água (com base na quantidade total de solvente usada, incluindo qualquer água presente nas algas marinhas, de algas marinhas frescas, é usada). Alcoois particulares que podem ser mencionados incluem etanol (EtOH, hidroetanólico) e metanol (MeOH, hidrometanólico). Por exemplo, o solvente pode ser de cerca de 10% de álcool em água a cerca de 90% de álcool (isto é, etanol) em água, tal como de cerca de 20% a cerca de 80%, ou de cerca de 30% a cerca de 70% ou 40% a cerca de 60%.

[0067] A temperatura da etapa de colocar em contato (extração) dependerá do solvente usado e pode estar em uma faixa de cerca de 10 °C a cerca de 50 °C. Por exemplo, a temperatura para a extração pode estar em uma faixa de cerca de 20 °C a cerca de 40 °C ou de cerca de 15 °C a cerca de 25 °C, por exemplo, cerca de 20 °C.

[0068] A extração pode ser melhorada usando-se qualquer método adequado conhecido na técnica. Por exemplo, o contato (extração) das algas marinhas pode ser realizado com ou sem agitação, como por agitação, por exemplo, usando-se um agitador suspenso. Alternativamente, pode-se usar a prensagem; por exemplo, a alga marinha pode ser colocada em uma prensa.

[0069] O período de contato (extração) (isto é, o período durante o

qual o material de alga marinha é colocado em contato com o solvente) é, tipicamente, de cerca de 0,5 horas a cerca de 24 horas, tal como de cerca de 1 hora a 18, ou 12 ou 10 horas.

[0070] Por exemplo, em uma escala de laboratório, a alga marinha pode ser colocada em contato com o solvente de extração em um grande béquer opaco e agitada com o uso de um agitador suspenso por aproximadamente 5 horas à temperatura ambiente (15 a 25 °C) e à pressão atmosférica.

[0071] Como um exemplo, em uma escala maior, a alga marinha pode ser colocada em contato com o solvente de extração em um tanque de leite opaco e agitada com um agitador suspenso por aproximadamente 17 horas à temperatura ambiente (15 a 25 °C) e à pressão atmosférica.

[0072] O contato (extração) da alga marinha pode ser realizado à pressão atmosférica ou a uma pressão acima ou abaixo da pressão atmosférica. Normalmente, o contato (extração) é conduzido à pressão atmosférica.

[0073] Qualquer aparelho de extração adequado pode ser usado. O aparelho de extração pode ser opaco ou coberto, por exemplo, em folha metálica de estanho, a fim de proteger o extrato da luz, uma vez que o florotanino é conhecido por ser sensível à luz.

[0074] A razão entre o solvente e o material de algas marinhas pode variar dentro de limites amplos. Normalmente, a razão entre o solvente e o material de alga marinha usado no processo de extração está na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 10:1 em um mililitro para uma base de grama, tal como de cerca de 2:1 a 5:1, por exemplo, 3:1 em p/v.

[0075] A etapa de colocar em contato (extração) pode, em seguida, ser repetida, caso seja necessário. Por exemplo, a etapa de colocar em pode ser repetida duas, três ou quatro vezes, isto é, a etapa de colocar em contato pode ser repetida pelo menos três vezes.

[0076] Uma ou mais das seguintes etapas opcionais podem ocorrer antes que a alga marinha seja colocada em contato com o solvente de extração:

(a) lavar as algas marinhas; e/ou

(b) cortar, desigualmente, as algas marinhas em pedaços menores; e/ou

(c) picar as algas marinhas usando-se lâminas afiadas rotativas, comumente conhecidas como um misturador, em baixa velocidade e em tamanhos de partículas menores.

[0077] A alga marinha que pode ser usada para obter florotaninos da presente invenção e/ou um extrato da presente invenção pode ser congelada, liofilizada, fresca ou seca. Preferencialmente, uma alga marinha fresca é usada. Se a alga marinha foi seca ou liofilizada, a mesma é preferencialmente reidratada antes do uso.

[0078] Na etapa (a), as algas marinhas podem ser lavadas com um solvente aquoso, como água do mar, água potável e/ou água destilada, que pode remover areia e pedras, e outras sujeiras da amostra de algas marinhas. Pode-se usar a lavagem com água do mar, seguida de lavagem com água potável ou destilada.

[0079] Na etapa (b), a alga marinha pode ser cortada, desigualmente, em pedaços com o uso de um aparelho de corte, como uma tesoura, ou uma faca ou um meio de corte mecânico. A alga marinha pode ser picada em partículas dentro de uma área na faixa de cerca de 1 cm² a 5 cm².

[0080] Na etapa (c), a alga marinha pode, ainda, ser picada em partículas dentro de uma área em uma faixa de cerca de 1 mm² a 4 mm², tal como de cerca de 1,5 mm² a 3,5 mm², tal como cerca de 2 mm² a 3 mm². Qualquer prática de mescla adequada conhecida na técnica pode ser usada, tal como um misturador.

[0081] Normalmente, as etapas (b) e (c) podem ser realizadas da

seguinte forma:

Em amostras de pequena escala (por exemplo, <1 kg de algas marinhas, como algas marinhas frescas) cortando-se, primeiro, com tesouras e, em seguida, usando-se um misturador, como um misturador Waring, em baixa velocidade;

Para amostras em escala industrial maior (por exemplo, >50 kg de algas marinhas, como algas marinhas frescas) moendo-se em um moedor, como o Urschel, em duas etapas (por exemplo: moagem grossa com grade 66708, seguida de moagem fina com grade 66896).

[0082] Antes da etapa de extrair, a massa seca e o teor de água das algas marinhas podem ser determinados por meio da secagem das algas marinhas em um forno para obter um peso constante, por exemplo, por aproximadamente 24 horas e a 103 °C. Essa informação pode ser usada para determinar a quantidade de solvente necessária, por exemplo, a quantidade de água necessária em um solvente hidroalcolico.

[0083] Uma ou mais das seguintes etapas opcionais podem ocorrer após a alga marinha ter sido colocada em contato com o solvente de extração:

(e) separar as partículas de algas marinhas do solvente; e/ou

(f) evaporar o solvente; e/ou

(g) purificar o extrato bruto.

[0084] Após o contato (etapa de extração), a amostra pode ser deixada em repouso, por exemplo, por até 1 hora; por exemplo, por aproximadamente 30 minutos.

[0085] Qualquer material vegetal não dissolvido pode ser removido do solvente, por exemplo, por filtração, e redissolvido no solvente.

[0086] Na etapa (e), o solvente pode ser separado de qualquer material de alga marinha não dissolvido (por exemplo, por filtração) e, na etapa (f), o solvente (filtrado) é concentrado (isto é, o solvente é removido). Por exemplo, o solvente pode ser concentrado até que todo o solvente tenha

sido removido e apenas o extrato sólido permaneça.

[0087] Por exemplo, em escala de laboratório, a mistura é, em seguida, peneirada com o uso de um filtro Buchner. Em uma escala maior, uma peneira de 300 micro, por exemplo, SWECO, pode ser usada, por exemplo.

[0088] Na etapa (f), o solvente (filtrado) pode ser concentrado (por exemplo, por evaporação rotativa a baixa temperatura, como de cerca de 35 a cerca de 45 °C, em uma escala de laboratório ou usando-se um evaporador de processo de Brouillon em uma escala maior) a cerca de 90% a 99% de DM (material seco, matéria secada ou matéria seca).

[0089] Na etapa (g), o extrato bruto pode, ainda ser purificado para fornecer um extrato purificado da invenção. Qualquer método de purificação adequado conhecido na técnica pode ser usado. Exemplos de métodos adequados incluem técnicas de cromatografia, como cromatografia líquida de fase reversa, métodos de filtração, como filtração de fluxo tangencial (TFF) ou ultrafiltração e/ou etapas de extrações adicionais conforme discutido acima, como extração de fase sólida (SPE). Como um exemplo, passa-se o extrato bruto por uma membrana de ultrafiltração de 1000 g/mol, o que pode remover compostos com um peso molecular abaixo de 1000 g/mol.

[0090] Como um exemplo, o extrato da invenção pode ser obtido usando-se um processo, como a seguir:

- (a) lavar as algas marinhas;
- (b) opcionalmente, cortar, desigualmente, a alga marinha em pedaços menores;
- (c) opcionalmente, picar as algas marinhas usando-se lâminas afiadas rotativas, comumente conhecidas como um misturador, em baixa velocidade e em tamanhos de partículas menores;
- (d) colocar as partículas de algas marinhas em contato com um solvente;

(e) separar as partículas de algas marinhas do solvente;

(f) evaporar o solvente; e

(g) opcionalmente, purificar o extrato bruto.

[0091] Pelo processo de extração, a porcentagem de certos compostos ativos dentro do extrato é aumentada e outros compostos diminuídos quando comparados com a porcentagem de compostos ativos encontrados na planta de origem.

[0092] Os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato da invenção podem ser um extrato obtido a partir de (ou obtível por meio de) um processo da invenção, como descrito anteriormente.

[0093] O extrato da invenção pode ser liofilizado. Por exemplo, o extrato liofilizado pode ser obtido congelando-se o extrato em bandejas rasas a uma temperatura de cerca de -10 a -50 °C, tal como cerca de -36 °C, seguido por liofilização com temperatura de condensador de cerca de -50 a -100 °C, por exemplo, cerca de -87 °C e a pressão 26,66-53,32 Pa (200 a 400 mTorr) por até 3 dias, dependendo do tamanho da amostra.

[0094] Os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato podem ser moídos até a forma de pó.

[0095] Os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato da invenção podem ser armazenados de qualquer maneira adequada. Por exemplo, os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato (por exemplo, sob a forma de um pó), podem ser congelados e protegidos da umidade, calor e luz para evitar a deterioração.

[0096] Os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato da invenção podem ser fornecidos sob a forma de uma composição. Essas composições descritas neste documento podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, tal como por meio da mistura por adição dos componentes da composição.

[0097] A quantidade de florotaninos da presente invenção e/ou do

presente extrato em uma composição que compreende o extrato da invenção dependerá do uso pretendido e dos outros componentes presentes na composição.

[0098] Quando incluídos em uma composição, os florotaninos da presente invenção e/ou o extrato estão tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,01% em peso a cerca de 100% em peso, por exemplo, de cerca de 0,1% em peso a cerca de 90% em peso, ou de cerca de 10% em peso a cerca de 80% em peso, ou de cerca de 5% em peso a cerca de 70% ou de cerca de 40% em peso a cerca de 60% em peso com base no peso total da composição.

[0099] No ponto de uso ou aplicação, a concentração de florotaninos da presente invenção e/ou extrato da invenção em uma composição pode ser, por exemplo, de cerca de 0,01 a cerca de 100%; tal como de cerca de 0,1 a cerca de 50%; ou de cerca de 0,5 a cerca de 20%; ou de cerca de 1% a cerca de 10% em peso com base no peso total da composição. Uma composição poderia ser preparada em uma forma pronta para uso ou poderia ser feita em uma forma mais concentrada que seria diluída antes do uso de acordo com um fator de diluição recomendado, como 1:100, 1:50; 1:20; 1:10 ou 1:5 para alcançar a concentração necessária no ponto de uso.

[00100] Quando os florotaninos da presente invenção e/ou extrato da invenção são incluídos em uma composição, a composição compreende, tipicamente, florotaninos em uma quantidade de cerca de 0,0025% a cerca de 50% em peso da composição, tal como de 0,025 ou 0,1% a 25 % em peso da composição, por exemplo 1 a 10% em peso da composição.

[00101] No ponto de uso ou aplicação, a concentração de florotaninos em uma composição pode ser, por exemplo, de cerca de 0,0025 a cerca de 25%; tal como de cerca de 0,025 a cerca de 15%; ou de cerca de 0,1 a cerca de 5%; ou de cerca de 0,25% a cerca de 2,5% em peso com base no peso total da composição. Uma composição poderia ser preparada em uma forma pronta

para uso ou poderia ser feita em uma forma mais concentrada que seria diluída antes do uso de acordo com um fator de diluição recomendado, como 1:100, 1:50; 1:20; 1:10 ou 1:5 para alcançar a concentração necessária no ponto de uso.

[00102] A título de esclarecimento, neste relatório descritivo, quando se usa o termo “compreender” ou “compreende”, entende-se que o extrato ou a composição descrita deve conter o ingrediente listado (ou ingredientes listados), mas pode, opcionalmente, conter ingredientes adicionais. Quando se usa o termo “consistir essencialmente em” ou “consiste essencialmente em”, entende-se que o extrato ou a composição descrita deve conter o ingrediente listado (ou ingredientes listados) e também pode conter uma pequena quantidade (por exemplo, até 5% em peso, ou até 1% ou 0,1% em peso) de outros ingredientes, desde que quaisquer ingredientes adicionais não afetem as propriedades essenciais do extrato ou da composição. Quando se usa o termo “consistir em” ou “consiste em”, entende-se que o extrato ou a composição descrita deve conter apenas o ingrediente listado (ou ingredientes listados). Esses termos podem ser aplicados de maneira análoga a processos, métodos e usos.

[00103] O extrato da presente invenção e/ou as composições que compreendem o extrato da presente invenção podem ser usados como um agente antiviral.

[00104] Pelo termo “antiviral”, entende-se um composto ou composição que destrói e/ou torna o vírus inviável e/ou inibe a replicação do vírus.

[00105] Os vírus podem ser classificados com base na natureza genômica dos vírus. Esse sistema é conhecido como sistema de classificação de vírus de Baltimore. Nesse sistema, existem sete grupos:

I. VÍRUS DE DNA DE FITA DUPLA

[00106] Alguns se replicam no núcleo, por exemplo, adenovírus

usando-se proteínas celulares. Os poxvírus replicam-se no citoplasma e produzem suas próprias enzimas para a replicação do ácido nucleico, por exemplo, adenovírus; herpesvírus; poxvírus, etc.

II. VÍRUS DE DNA DE SENTIDO (+) DE FITA SIMPLES

[00107] A replicação ocorre no núcleo, envolvendo a formação de uma fita de sentido (-), que serve como molde para o RNA de fita (+) e para a síntese de DNA, por exemplo, parvovírus.

III. VÍRUS DE RNA DE FITA DUPLA

[00108] Esses vírus têm genomas segmentados. Cada segmento de genoma é transcrito separadamente para produzir mRNAs monocistrônicos. por exemplo, reovírus.

IV. VÍRUS DE RNA DE SENTIDO (+) DE FITA SIMPLES (PICORNAVÍRUS; TOGAVÍRUS, ETC.)

[00109] ▪ mRNA policistrônico: o RNA genômico pode funcionar como mRNA. Uma vez que o RNA tem o mesmo sentido que o mRNA, apenas o RNA é infeccioso, nenhuma polimerase associada a partícula de vírion. A tradução resulta na formação de um produto de poliproteína, que é, subsequentemente, clivado para formar as proteínas maduras, por exemplo, picornavírus (poliovírus, rinovírus); vírus da hepatite A

▪ Transcrição complexa: duas ou mais rodadas de tradução são necessárias para produzir o RNA genômico, por exemplo, picornavírus; vírus da hepatite A.

V. VÍRUS DE RNA DE SENTIDO (-) DE FITA SIMPLES

[00110] O vírion de RNA é de sentido negativo (complementar ao mRNA) e deve, portanto, ser copiado para o mRNA complementar de sentido positivo para produzir as proteínas. Esse grupo de vírus deve codificar a RNA polimerase dependente de RNA e também carregá-la no vírion para que possam produzir mRNAs ao infectar a célula, por exemplo, ortomixovírus, rabdovírus, etc.

[00111] ▪ Segmentado, por exemplo, ortomixovírus. A primeira etapa na replicação é a transcrição do genoma de RNA de sentido (-) por meio da RNA polimerase dependente de vírion de RNA para produzir mRNAs monocistrônicos, que também servem como molde para a replicação de genoma.

[00112] ▪ Não segmentado, por exemplo, rabdovírus. A replicação ocorre como acima e os mRNAs monocistrônicos são produzidos.

VI. VÍRUS DE RNA DE SENTIDO (+) DE FITA SIMPLES COM DNA INTERMEDIÁRIO NO CICLO DE VIDA

[00113] O genoma de RNA tem o sentido (+), mas único entre os vírus por ser DIPLOIDE e não servir como mRNA, mas como um modelo para a transcrição reversa, por exemplo, retrovírus.

[00114] Os retrovírus, portanto, codificam uma DNA polimerase dependente de RNA (transcriptase reversa) para produzir o DNA pró-vírus que é, em seguida, transcrito para RNA genômico por uma enzima hospedeira, RNA polimerase II.

VII. VÍRUS DE DNA DE FITA DUPLA COM INTERMEDIÁRIO DE RNA

[00115] Esse grupo de vírus também depende da transcrição reversa, mas, ao contrário dos retrovírus, isso ocorre dentro da partícula do vírus na maturação. Na infecção de uma nova célula, o primeiro evento a ocorrer é o reparo do genoma incompleto, seguido pela transcrição, por exemplo, hepadnavírus

[00116] Um extrato ou composição da presente invenção pode ser usado como um agente antiviral contra vírus em todos os sete grupos ou o extrato da presente invenção pode ser usado como um agente antiviral contra vírus em um ou mais grupos. Por exemplo, o extrato da invenção pode ser usado como um agente antiviral contra vírus em um ou mais dentre o grupo I (como adenovírus), grupo II (como parvovírus), grupo III (como rotavírus), grupo IV (como poliovírus e norovírus), grupo V (como vírus influenza A

H1N1), grupo VI ou grupo VII. Por exemplo, o extrato da invenção pode ser usado como um agente antiviral contra vírus de um ou mais dentre os grupos I, II, III ou V.

[00117] A extensão em que um composto ou composição destrói e/ou torna o vírus inviável pode ser medida usando-se o método de teste BS EN 14476:2013+A1:2015.

[00118] *Desinfetantes químicos e antissépticos - teste quantitativo de suspensão para avaliação da atividade viricida na área médica. O método de teste e os requisitos (Fase 2/Etapa 1)* foram definidos como um método de teste europeu padrão dentro do regulamento de produtos biocidas (BPR). Detalhes completos desse método podem ser encontrados no regulamento.

[00119] Segue-se, agora, um resumo que será compreendido por uma pessoa versada na técnica: uma amostra do composto ou composição a ser testada é adicionada a uma suspensão de teste de vírus em uma solução de uma substância interferente. A mistura é mantida em uma das temperaturas e tempos de contato especificados nas Cláusulas 4 e 5.5.1.1. Ao final desse tempo de contato, é retirada uma alíquota; a ação viricida nessa porção é, imediatamente, suprimida por um método validado (diluição da amostra em meio de manutenção de células geladas). As diluições são transferidas para unidades de cultura (placas de petri, tubos ou poços de placas de microtitulação) usando-se monocamada ou suspensão de células. Os testes de infecciosidade são feitos por meio de teste de placa ou testes quantais. Após a incubação, os títulos de infecciosidade são calculados de acordo com Spearman e Karber (testes quantais, C.1) ou por contagem de placa (teste de placa, C.2) e avaliados. A redução da infecciosidade do vírus é calculada a partir das diferenças de título em log do vírus antes (controle do vírus) e após o tratamento com o produto.

[00120] Para os fins da presente invenção, um composto ou composição é considerado para tornar um vírus inviável ou inibir a replicação

do vírus se o mesmo alcançar uma redução em log (após o tratamento vs. antes do tratamento), como descrito acima, de pelo menos 1,0; preferencialmente, em pelo menos 2,0; mais preferencialmente, pelo menos 3,0; ainda mais preferencialmente, pelo menos 4,0; ainda mais preferencialmente, para eliminar completamente o vírus.

[00121] Os florotaninos ou um extrato da presente invenção e/ou composições da presente invenção podem ser usados contra vírus envelopados e/ou não envelopados.

[00122] Por exemplo, os florotaninos ou um extrato da presente invenção e/ou composições da invenção podem ser usados para reduzir a atividade ou matar pelo menos um dos vírus envelopados selecionados dentre as famílias *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Hepadnaviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Retroviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* e *Rhabdoviridae*.

[00123] Os florotaninos ou um extrato da presente invenção e/ou composições da invenção podem ser usados para reduzir ativamente ou matar pelo menos um dos vírus envelopados selecionados dentre herpes simplex tipo 1, herpes simplex tipo 2, vírus varicela-zóster, vírus Epstein-Barr, citomegalovírus humano, herpesvírus humano tipo 8, vírus da varíola, vírus da hepatite B, vírus da síndrome respiratória aguda grave, vírus da hepatite C, vírus da febre amarela, vírus da dengue, vírus do Nilo Ocidental, vírus TBE, vírus da rubéola, vírus da imunodeficiência humana, vírus da influenza, vírus lassa, vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo, vírus hantaan, vírus ebola, vírus Marburg, vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus parainfluenza, vírus sincicial respiratório e vírus da raiva.

[00124] Os florotaninos ou um extrato da presente invenção e/ou composições da invenção podem ser usados contra pelo menos um dos vírus não envelopados selecionados dentre as famílias *Adenoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Parvoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*,

Picornaviridae, Hepeviridae e Reoviridae.

[00125] Os florotaninos ou um extrato da presente invenção e/ou composições das invenções podem ser usados contra pelo menos um dos vírus não envelopados selecionados dentre adenovírus, papilomavírus humano, vírus BK, vírus JC, parvovírus B19, astrovírus humano, coxsackievírus, vírus da hepatite A, poliovírus, rinovírus, vírus da hepatite E, rotavírus, orbivírus, coltivirus, norovírus e vírus Banna.

[00126] Assim, a presente invenção fornece um extrato ou composição, conforme previamente definido, para uso como um agente antiviral.

[00127] Os florotaninos ou um extrato da presente invenção e/ou composições das invenções podem ser usados para tratar ou prevenir infecção viral, tal como infecção viral em um animal ou planta.

[00128] Também é fornecido o uso de um extrato ou composição, conforme previamente definido, na fabricação de um medicamento para tratar ou prevenir uma infecção viral.

[00129] Também é fornecido um método de tratamento ou prevenção de uma infecção viral que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um extrato ou composição, conforme definido anteriormente, a um sujeito com necessidade do mesmo, tal como um sujeito que foi infectado com um vírus ou um sujeito que irá ou pode entrar em contato com um vírus.

[00130] Assim, também é fornecido o uso de um extrato ou composição, conforme previamente definido, como um agente antiviral.

[00131] Os vírus podem estar presentes *in vivo* ou fora de organismos vivos. A presente invenção pode ser usada para reduzir ou controlar o vírus sobre uma superfície, ou na mesma.

[00132] A presente invenção também fornece o uso de um florotanino que compreende uma média de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol como um agente antiviral.

[00133] A presente invenção também fornece um florotanino que compreende uma média de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol para uso como um agente antiviral.

[00134] A presente invenção também fornece uma composição antiviral que compreende um florotanino que compreende uma média de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol.

[00135] A presente invenção também fornece uma composição que compreende um florotanino que compreende uma média de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol para uso como um agente antiviral.

[00136] A presente invenção também fornece o uso de uma composição que compreende um florotanino que compreende uma média de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol como um agente antiviral.

[00137] Os florotanismos que compreendem uma média de cerca de 10 a cerca de 23 unidades de floroglucinol podem ser usados contra os vírus mencionados neste documento.

[00138] A presente invenção também fornece uma composição antiviral que compreende um ou mais florotanismos. Em particular, uma composição antiviral compreende um ou mais florotanismos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol.

[00139] A presente invenção também fornece uma composição que compreende um ou mais florotanismos para uso como uma composição antiviral, por exemplo, para uso no tratamento ou prevenção de infecções virais. Em particular, uma composição compreende um ou mais florotanismos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol para uso como uma composição antiviral, por exemplo, para uso no tratamento ou prevenção de uma infecção viral.

[00140] A presente invenção também fornece o uso de uma composição que compreende um ou mais florotanismos como uma composição antiviral. Em particular, o uso de uma composição que compreende um ou

mais florotaninos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol como uma composição antiviral.

[00141] Conforme detalhado acima, os florotaninos podem ser obtidos usando-se água, álcool, solventes orgânicos ou misturas dos mesmos.

[00142] Os florotaninos presentes nas composições descritas neste documento podem ser obtidos ou obteníveis a partir de algas marinhas marrons, conforme descrito anteriormente, e podem ser usados como uma composição ou agente antiviral, conforme descrito anteriormente.

[00143] Será observado que as composições da invenção podem compreender outros ingredientes comumente usados na técnica. A natureza de quaisquer outros ingredientes usados dependerá da natureza e do propósito pretendido da composição. A pessoa de habilidade comum na técnica reconhecerá que ingredientes adicionais são adequados para uso nas composições para diferentes aplicações. Ingredientes adicionais que podem ser usados nas composições da invenção incluem, porém sem limitação - agentes tamponantes, modificadores de pH, agentes complexantes, tensoativos, solventes (como água). As composições da invenção também podem conter outros ingredientes que são padrão na técnica, tais como colorantes, fragrâncias, emolientes, antioxidantes, espessantes e inibidores de corrosão, e misturas dos mesmos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

[00144] A **Figura 1a** mostra as áreas de pico de oligômeros de florotanino com um número ímpar de unidades de repetição no extrato do Exemplo 3.

[00145] A **Figura 1b** mostra as áreas de pico de oligômeros de florotanino com um número par de unidades de repetição no extrato do Exemplo 3.

[00146] A **Figura 2** mostra a distribuição de tamanhos dos oligômeros de florotanino no extrato do Exemplo 3.

- [00147] A **Figura 3** mostra a recuperação de fenólicos a partir do fracionamento de LH20 no Exemplo 5.
- [00148] A **Figura 4** mostra a composição das frações ORIGINAL, FUB e FUB no Exemplo 5.
- [00149] A **Figura 5** mostra a possível estrutura do componente em m/z 1117 no Exemplo 5.
- [00150] A **Figura 6** mostra as características de espécies de florotanino em m/z que são enriquecidas na fração LIGANTE no Exemplo 5.
- [00151] A **Figura 7** mostra o fracionamento de florotaninos em Sephadex LH20 no Exemplo 5.
- [00152] A **Figura 8** mostra os espectros de MS dos picos de florotanino nas frações LH20 no Exemplo 5.
- [00153] A **Figura 9** mostra a evidência de Orbitrap em MS para componentes de florotanino duplamente carregados no Exemplo 5.
- [00154] A **Figura 10** mostra os traços de LC-MS de modo positivo das frações original e SPE no Exemplo 5.
- [00155] A **Figura 11** mostra os espectros de MS dos 3 grupos em seus tempos de retenção específicos no Exemplo 5.
- [00156] A **Figura 12** mostra os espectros de MS em m/z 831 na amostra de lavagem de ligante no Exemplo 5.
- [00157] A **Figura 13** mostra a detecção de HPLC-SEC RI de frações de TFF >1 kDa (à esquerda) e <1 kDa (à direita) do extrato da invenção no Exemplo 6.
- [00158] A **Figura 14** mostra à esquerda: detecção de HPLC-SEC RI de fração insolúvel em MeOH a 80% (material de MW superior [isto é, tempos de retenção anteriores] foi observado). À direita: detecção de HPLC-SEC RI de fração de TFF solúvel a 80% do Exemplo 6.
- [00159] A **Figura 15** mostra a atividade antiviral das frações ligante e sem ligante no Exemplo 7.

[00160] A **Figura 16** mostra a atividade antiviral das frações <1000 g mol⁻¹; e (ii) >1000 g mol⁻¹ do Exemplo 7.

[00161] A **Figura 17** mostra uma comparação da atividade antiviral do extrato de algas marinhas e da fração enriquecida com florotanino com Epigallocatequina, um polifenol extraído do chá verde no Exemplo 8.

[00162] A invenção é ilustrada pelos exemplos não limitantes a seguir.

EXEMPLO 1 - PREPARAÇÃO EM PEQUENA ESCALA DE UM EXTRATO DA INVENÇÃO

[00163] *Ascophyllum nodosum* fresco (algas marinhas marrons), proveniente da Irlanda e que foi colhido em janeiro de 2016, foi usado.

[00164] O teor de água das algas marinhas frescas foi determinado da seguinte forma:

O teor de umidade das algas marinhas foi determinado secando-se um peso conhecido da alga marinha em um forno até peso constante por, aproximadamente, 24 horas a 103 °C.

[00165] A alga marinha foi ponderada e a massa seca da alga marinha foi determinada. A massa correspondente de água contida nas algas marinhas frescas foi determinada subtraindo-se a massa seca das algas marinhas da massa das algas marinhas frescas, a percentagem de água nas algas marinhas frescas foi, então, determinada. Para essa alga marinha, determinou-se que a alga marinha fresca era 70% de água (isto é, 1000 g de alga marinha continham 700 g de água).

[00166] Um extrato da invenção foi preparado da seguinte forma:

Foram usados 1000 g da alga marinha. Essa foi pré-lavada com água do mar para remover quaisquer detritos, como areia e pedras. A alga foi, em seguida, lavada com água doce.

[00167] A alga marinha foi cortada em pedaços de, aproximadamente, 2-3 mm de diâmetro. Isso foi feito cortando-se, primeiro, com tesouras e, em seguida, com o uso de um misturador Waring em baixa velocidade.

[00168] Uma mescla de etanol/água foi adicionada às algas marinhas. O etanol usado era 96% de etanol puro e 4% de água. A quantidade de etanol e água usada nessa mescla de etanol/água atendeu aos dois critérios a seguir:

- A razão entre as massas de etanol na mescla e a água total presente (isto é, água contida nas algas marinhas + a água na mescla + qualquer água adicional adicionada à mescla) é 60:40

- A massa total da água e do etanol era três vezes a massa da alga marinha fresca à qual a mesma foi adicionada

[00169] A massa de água adicionada como parte da mescla de etanol/água para atender aos critérios acima pode ser determinada por meio de matemática simples.

[00170] Nesse exemplo, são usados 1000 g de algas marinhas frescas e 700 g disso foi determinado como sendo água e 300 g de algas marinhas secas.

[00171] A massa total do etanol e da água é de 3000 g (isto é, 3 x 1000 g). E a mesma está em uma razão entre etanol:água de 60:40. Então, 1875 g de etanol (considerando que o etanol utilizado é 96% etanol e 4% água) e 1125 g de água. 700 g dessa água já estão contidos nas algas marinhas frescas, logo, 425 g adicionais de água devem ser adicionados como a mescla de etanol/água.

[00172] A mescla de etanol/água foi adicionada à alga marinha fresca e lavada em um grande béquer opaco. A mistura foi agitada usando-se um agitador suspenso durante, aproximadamente, 5 horas à temperatura ambiente.

[00173] Após esse tempo, a amostra foi deixada em repouso por, aproximadamente, 30 minutos.

[00174] A mistura foi, em seguida, peneirada com o uso de um filtro Buchner.

[00175] O álcool foi, em seguida, evaporado em baixa temperatura (34-45 °C) com o uso de um evaporador rotativo.

[00176] O extrato foi, em seguida, congelado a -36 °C em bandejas rasas para maximizar a área de superfície.

[00177] O extrato foi, em seguida, liofilizado com temperatura de condensador de -87 °C e a pressão de 26,66-53,32 Pa (200 a 400 mTorr) por, aproximadamente, 3 dias.

[00178] O extrato foi, em seguida, moído para formar um pó.

[00179] O extrato em pó foi, em seguida, congelado e protegido da umidade, calor e luz para evitar sua deterioração.

[00180] O mesmo foi degelado conforme necessário antes da testagem.

EXEMPLO 2 - TESTAGEM ANTIVIRAL

[00181] Extratos de algas marinhas obtidos no Exemplo 1 foram usados.

[00182] O extrato de algas marinhas degelado foi dissolvido em água desmineralizada para a concentração necessária para a testagem.

[00183] A extensão em que um composto ou composição torna o vírus inviável ou inibe a replicação do vírus foi medida usando-se o método de teste BS EN 14476:2013+A1:2015 *Desinfetantes químicos e antissépticos - teste quantitativo de suspensão para avaliação da atividade viricida na área médica. O método de teste e os requisitos (Fase 2/Etapa 1)* foram definidos como um método de teste europeu padrão dentro do regulamento de produtos biocidas (BPR). Detalhes completos desse método podem ser encontrados no regulamento.

[00184] Usando-se esse método, determinou-se o valor de redução em log para o vírus particular contra o qual a solução do extrato estava sendo testada.

[00185] O tempo de contato é o tempo em que a solução de teste esteve em contato com o vírus de teste durante o teste. Os resultados são mostrados na Tabela 1 abaixo.

TABELA 1

Exemplo (CC3687; BYO2)	Concentração de extrato testada em água	Vírus	Tempo de contato	Log ₁₀ R*
2-A	2%	Norovírus	60 min	≥4,38
2-B	2%	H1N1	60 min	≥2,63
2-C	2%	Rotavírus	60 min	≥3,75
2-D	2%	H1N1	60 min	≥4,00
2-E	2%	H1N1	2 min	≥4,00
2-F	2%	Norovírus	60 min	≥4,88
2-G	2%	Norovírus	2 min	≥4,63
2-H	2%	Rotavírus	60 min	≥5,44
2-I	2%	Rotavírus	2 min	≥5,44
2-J	2%	H1N1	60 min	≥4,00
2-K	2%	H1N1	2 min	≥4,00
2-L	2%	Poliovírus	60 min	4,67
2-M	2%	Poliovírus	2 min	4,50
2-N	2%	Adenovírus	60 min	4,83
2-O	2%	Adenovírus	2 min	4,66
2-P	2%	H1N1	60 min	≥5,00
2-Q	2%	H1N1	2 min	≥5,00
2-R	2%	Norovírus	60 min	≥4,75
2-S	2%	Norovírus	2 min	≥4,50
2-T	2%	H1N1	60 min	≥5,00
2-U	2%	H1N1	2 min	≥5,00
2-V	2%	Rotavírus	60 min	≥5,44
2-W	2%	Rotavírus	2 min	≥5,44
2-X	2%	Norovírus	60 min	≥4,85
2-Y	2%	Norovírus	2 min	≥4,60

*em que o valor de log₁₀R mostra um sinal ≥, sendo que o mesmo implica que a eliminação completa do vírus ocorreu. H1N1 indica o subtipo H1N1 do vírus influenza A.

EXEMPLO 3 - PREPARAÇÃO EM ESCALA MAIOR DE UM EXTRATO DA INVENÇÃO

[00186] *Ascophyllum nodosum* fresco (algas marinhas marrons), proveniente da Bretanha, na França, e colhido em novembro de 2017.

[00187] O teor de água das algas marinhas frescas foi determinado da seguinte forma:

O teor de umidade das algas marinhas foi determinado secando-se um peso conhecido da alga marinha em um forno até peso constante por, aproximadamente, 24 horas a 103 °C.

[00188] A alga marinha foi ponderada e a massa seca da alga marinha foi determinada. A massa correspondente de água contida nas algas marinhas frescas foi determinada subtraindo-se a massa seca das algas marinhas da massa das algas marinhas frescas, a percentagem de água nas algas marinhas frescas foi, então, determinada.

[00189] 69 kg de *Ascophyllum nodosum* fresco (algas marinhas

marrons). A alga marinha colhida foi embebida de um dia para outro com água do mar. No dia seguinte, ela foi separada à mão para remover algas marinhas epifíticas aderidas à biomassa de *Ascophyllum* e drenada por 30 minutos. Em seguida, a mesma foi enxaguada com água doce por 3 minutos e drenada novamente.

[00190] A alga marinha foi, em seguida, moída em um moedor Urschel em duas etapas (moagem grossa com grade 66708, seguida de moagem fina com grade 66896). Isso produziu partículas de 2-3 mm.

[00191] Uma mescla de etanol/água foi adicionada às algas marinhas. O etanol usado era 96% de etanol puro e 4% de água. A quantidade de etanol e água usada nessa mescla de etanol/água atendeu aos dois critérios a seguir:

A razão entre as massas de etanol na mescla e a água presente total (isto é, água contida na alga marinha + a água na mescla + qualquer água adicional adicionada à mescla) é 60:40. A massa total da água e do etanol era três vezes a massa da alga marinha fresca à qual é a mesma foi adicionada.

[00192] A massa de água adicionada à mescla de etanol/água para atender aos critérios acima é determinada por meio de matemática simples.

[00193] Nesse exemplo, 69 kg de alga marinha fresca são usados e 52 kg disso foram determinados como sendo água e 17 kg como alga marinha seca.

[00194] A massa total do etanol e da água é de 207 kg (isto é, 3 x 69 kg). E a mesma está em uma razão entre etanol:água de 60:40. Então, 129,4 kg de Etanol (considerando que o etanol utilizado é 96% etanol e 4% água) e 77,6 kg de água. 52 kg dessa água já estão contidos nas algas marinhas frescas, então 25,6 kg adicionais de água devem ser adicionados como a mescla de etanol/água.

[00195] A extração foi realizada em tanque de leite agitado por 17 horas à temperatura e pressão ambientes.

[00196] A biomassa gasta foi separada do extrato em uma peneira de

300 µm (SWECO).

[00197] O álcool foi evaporado a baixa temperatura em um evaporador de processo Brouillon (temperatura inicial de 34 °C, temperatura final de 45 °C), levando, aproximadamente, 8 horas.

[00198] O extrato foi, ainda, clarificado usando-se um auxiliar de filtração FW12 (terra de diatomáceas) e filtros KDS12 (placas de filtro de profundidade à base de celulose) montados em uma estrutura Millipore.

[00199] O extrato filtrado resultante foi transferido para bandejas de polipropileno e liofilizado usando-se um ciclo lento (25-30 kg.prg) para evitar o congelamento não homogêneo. Isso levou, aproximadamente, 3 dias.

[00200] O extrato foi, em seguida, triturado com o uso de um misturador de escala de laboratório. Resultaram 2,92 kg de extrato em pó.

[00201] O extrato em pó foi, em seguida, congelado e protegido da umidade, calor e luz para evitar sua deterioração.

[00202] O mesmo foi degelado conforme necessário antes da testagem.

[00203] A composição do extrato obtido foi analisada.

[00204] Uma pequena amostra do extrato foi adicionada ao reagente fenólico de Folin-Ciocalteu e a cor azul que se desenvolveu após a adição da solução de carbonato de sódio foi avaliada contra uma curva padrão de ácido gálico, como um composto fenólico padrão.

[00205] Essa reação positiva com o reagente fenólico de Folin-Ciocalteu indicou a presença de florotaninos.

[00206] A natureza dos florotaninos foi, em seguida, investigada usando-se técnicas de cromatografia líquida de espectrometria de massa usando-se um sistema LC com um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Uma amostra pura do extrato foi separada em uma coluna C18 de fase reversa e analisada em modo ESI negativo (o método usado é descrito em **Austin** et al. (2017) Extracts from the edible seaweed, *Ascophyllum nodosum*, inhibit lipase activity *in vitro*: Contributions of

phenolic and polysaccharide components. Food & Function, 9, 502-510 - DOI: [10.1039/C7FO01690E](https://doi.org/10.1039/C7FO01690E))

[00207] Uma série de oligômeros de florotanino foi detectada com grau aparente de polimerização (DP) de unidades de floroglucinol de 10 a 23. A detecção de florotaninos com massas indicativas de oligômeros de DP com números ímpares é mostrada na Figura 1a (por exemplo, 11-23 de DP) e DPs com números pares na Figura 1b. Geralmente, mais de um isômero estava presente para cada oligômero.

[00208] As quantidades relativas dos oligômeros PT foram avaliadas por suas áreas de pico de MS (Figura 2). Houve uma distribuição de tamanho de DP 10 a 23 com as formas mais abundantes de DP11 a 18 e uma queda acentuada na abundância de DP19 em diante.

EXEMPLO 4 - TESTAGEM ANTIVIRAL

[00209] Extratos de algas marinhas obtidos no Exemplo 3 foram usados.

[00210] O extrato de algas marinhas degelado foi dissolvido em água desmineralizada para a concentração necessária para a testagem. O método para testagem antiviral descrito foi usado para determinar o valor de redução em log para o vírus particular contra o qual a solução de extrato estava sendo testada. O tempo de contato é o tempo em que a solução de teste esteve em contato com o vírus de teste durante o teste. Os resultados são mostrados na Tabela 2 abaixo.

TABELA 2

Exemplo	Concentração de extrato testada em água	Vírus	Tempo de contato	Log ₁₀ R
4-A	2%	Norovírus	60 min	≥4,47
4-B	2%	Norovírus	2 min	≥4,35
4-C	2%	Norovírus	60 min	≥4,47
4-D	2%	Norovírus	2 min	≥4,35
4-E	2%	Norovírus	2 min	≥4,63
4-F	1%	Norovírus	2 min	3,13
4-G	2%	Norovírus	0,5 min	≥4,50
4-H	2%	Poliovírus	60 min	≥5,00
4-I	2%	Poliovírus	2 min	≥5,50
4-J	2%	Adenovírus	60 min	≥4,25
4-K	2%	Adenovírus	2 min	≥4,25

*em que o valor de $\log_{10}R$ mostra um sinal \geq , sendo que o mesmo implica que a eliminação completa do vírus ocorreu.

EXEMPLO 5 - PURIFICAÇÃO DO BRUTO (EXTRATO HIDROETANÓLICO) USANDO-SE EXTRAÇÃO DE FASE SÓLIDA (SPE) PARA SEPARAR EM DUAS FRAÇÕES (I) FRAÇÃO MAIS HIDROFÍLICA; (II) FRAÇÃO MAIS HIDROFÓBICA.

[00211] O extrato (conforme obtido a partir do Exemplo 3) era livremente solúvel em água ultra-pura (UPW) que continha 0,1% de ácido fórmico (FA) a 5% (em p/p) e uma solução de 250 ml foi preparada para uso na execução do primeiro teste (SPE-1). O tubo SPE UNIT (tubo Strata C18-E GIGA, capacidade de 50 g e volume de 150 ml; Phenomenex Ltd.) foi preparado com 2 volumes de acetonitrila (ACN) contendo 0,1% de FA e, em seguida, equilibrado com 3 volumes de UPW contendo 0,1% de FA (Nwosu et al., 2011). O extrato foi aplicado em lotes de 60 ml e a eluição acelerada com o uso de um frasco de braço lateral e linha de vácuo.

[00212] Depois que toda a solução de amostra de extrato foi aplicada, a fração SEM LIGANTE (hidrofílica) foi removida e a unidade SPE lavada com 2X volumes de UPW + FA, coletada como a fração de LAVAGEM. Em seguida, a fração LIGANTE (hidrofóbica) foi obtida por meio da eluição da unidade com 2 volumes de acetonitrila + FA. A unidade pode, então, ser reequilibrada para uso posterior, lavando-se com excesso de UPW + FA e armazenada em UPW + FA no refrigerador até que seja necessário.

[00213] Para uma segunda execução de SPE (SPE-2), foram preparados 400 ml de extrato a 5% (em p/v). O procedimento SPE foi o mesmo, exceto por duas mudanças. Como a capacidade da unidade SPE seria excedida usando-se essa quantidade de material, o procedimento SPE foi repetido para recapturar qualquer material fenólico que tivesse passado para a fração SEM LIGANTE. Portanto, a fração LIGANTE era composta por duas frações combinadas eluídas da unidade. Além disso, o material que foi eluído da unidade após a remoção da fração ligante durante a nova lavagem da

unidade SPE foi coletado.

TOTAL DE CHON E TEOR FENÓLICO DAS FRAÇÕES

[00214] O teor de carboidratos total (CHOn) das frações LIGANTE e SEM LIGANTE foram medidos usando-se o método de ácido sulfúrico-fenol e o teor de fenol total (TPC), usando-se o método de Folin-Ciocalteu (Austin et al., 2017).

[00215] Em SPE-1, a recuperação geral de CHOn foi de 46,3%, com 44,3% na fração SEM LIGANTE e 2,0% na fração LIGANTE. A recuperação geral do teor de fenol total (TPC) foi superior a 70,3% com a maior parte recuperada na fração LIGANTE (56,8%) e menor na fração SEM LIGANTE (13,7%).

[00216] Em SPE-2, a recuperação geral de CHOn foi superior a 59,1%, com 54,6% na fração SEM LIGANTE e 4,5% na fração LIGANTE. No entanto, a fração de recuperação LAVAGEM-LIGANTE continha quantidades significativas de CHOn (isto é, 10,7% do total), de modo que a recuperação geral de CHOn alcançasse 69,8%. O fato de essa fração de “retrolavagem” ser responsável por uma boa quantidade de CHOn “perdido” em SPE-1 foi inesperado, dada a química das unidades de SPE.

[00217] Para SPE-2, a quantidade de recuperação do TPC alcançou 82,1%, com a maior parte (70,0%) na fração LIGANTE e 12,1% na fração SEM LIGANTE. A fração lavagem de ligante foi responsável por mais 3,4%, de modo que a recuperação geral de TPC alcançasse 85,5%. Deve-se notar que nenhum dos dois métodos de quantificação é absolutamente específico para CHOn ou fenólicos e, portanto, outros componentes podem interferir em sua quantificação.

[00218] No geral, a fração SEM LIGANTE era rica em CHOn e era pobre em TPC, enquanto a fração LIGANTE continha sua maioria em TPC.

[00219] Expresso como uma razão de CHOn/TPC, o extrato original

tinha um valor de ~3,71, enquanto a razão de SEM LIGANTE 1 era 11,86 e de SEM LIGANTE 2 era 17,24, o que ilustra um enriquecimento considerável em CHOn. A fração LIGANTE 1 teve uma razão de 0,136 e a fração LIGANTE 2 teve uma razão de 0,255, o que mostra o enriquecimento de fenólicos e a remoção de CHOn. A fração de lavagem de ligante foi de 12,04, mostrando, também, um enriquecimento em CHOn.

FRACIONAMENTO POR SEPHADEX LH-20

[00220] Uma porção do extrato foi fracionada com o uso de Sephadex LH20 usando-se uma técnica (Pantidos et al., 2014) bem conhecida para selecionar componentes do tipo florotanino (<https://www.users.miamioh.edu/hagermae/>). Uma solução de 25 mg/ml do extrato em UPW foi produzida e, em seguida, 5 ml foram adicionados a 5 ml de etanol e bem misturados. O extrato era solúvel em 50% de etanol e, em outros testes, era totalmente solúvel em até 80% de etanol.

[00221] A solução de extrato foi adicionada a 5 ml de uma pasta fluida de Sephadex LH20 em 50% de etanol e bem misturada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 2500 g por 5 minutos a 5 °C, a fração sem ligante foi removida e 5 ml de etanol a 50% foram adicionados. O procedimento de centrifugação foi repetido para proporcionar a fração de LAVAGEM e, em seguida, de forma semelhante com 50% de acetona e, em seguida, duas lavagens com 80% de acetona. Os teores de CHOn e fenol totais foram medidos como antes e alíquotas de 2 X 1 ml de cada fração foram secas em um Speed-Vac para análise de LC-MS.

[00222] Conforme mostrado na Figura 3, a maior parte do material fenólico foi recuperada na primeira fração de acetona a 80% com mais de 80% nas frações liberadas pela acetona, que deve ser enriquecida em componentes de florotanino.

ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA (LC-MS): EVIDÊNCIA PARA

FLOROTANINOS

[00223] As amostras das frações LIGANTE e SEM LIGANTE foram analisadas usando-se um método descrito anteriormente (Pantidos et al., 2014; Nwosu et al., 2011) com o uso de MS de ionização por eletroaspersão tanto em modo positivo quanto em negativo para examinar a composição das frações. Os componentes foram separados em uma coluna de fase reversa C18 e a eluição do material fenólico monitorada a 280 nm. Os dados iniciais de LC-MS foram obtidos usando-se um Fleet MS e, em seguida, as amostras selecionadas foram reanalisadas usando-se um Orbitrap MS que proporciona uma maior sensibilidade combinada com recursos para proporcionar dados de massa exatos e discriminação de íons com carga múltipla.

[00224] Como mostrado na Figura 4, a amostra LIGANTE foi enriquecida na eluição posterior dos picos de absorção de UV, enquanto a fração SEM LIGANTE estava, essencialmente, desprovida desses picos.

[00225] Na fração LIGANTE, o conjunto de picos de 12 a 21 minutos proporcionou um conjunto de sinais em m/z em modo negativo que são característicos de florotaninos. Eles se apresentam como duas séries de valores em m/z que diferem em 124 amu, que é a massa unitária de extensão equivalente ao floroglucinol menos 2 átomos de H, que foram observadas anteriormente em nossa pesquisa (Nwosu et al., 2010; Pantidos et al., 2014; Austin et al., 2018). A série de m/z 745, 869, 993, 1117, 1241, 1365 e 1489 pode surgir de adições sucessivas de floroglucinol a um trímero com valor em m/z 373 (por exemplo, trifloreto) e sinais em m/z 621, 745 etc. podem ser pentafloroetol, hexafloroetol etc. (Martinez et al., 2013). Portanto, o pico principal em m/z 1117 poderia ser um nonafloroetol (consultar a Figura 5). É notável que os sinais de MS taninos são aprox. 4 vezes enriquecidos na fração LIGANTE (Figura 6).

[00226] Essas séries são aparentes se os espectros de MS forem calculados em média na zona de separação entre 12 e 21 minutos. Nem todos

os componentes de florotanino podem ser facilmente separados por meio de eluição em colunas C18 e a maioria elui como picos mistos. Havia também vários isômeros possíveis para cada espécie de florotanino. No entanto, certos picos pareceram representar componentes discretos de florotanino. Em particular, o pico principal em 17,4 min produziu um sinal em m/z discreto em 1117, o pico em 16,82 produz m/z 1055, 17,62 produz m/z 1179 e o pico em 16,22 produz m/z 933. No entanto, é necessário mais trabalho para definir as estruturas desses componentes.

[00227] Os picos de florotanino de eluição tardia estavam presentes apenas nas amostras ligantes liberadas de Sephadex LH20 pela acetona. O fracionamento pode ser melhorado por meio de uma lavagem mais rigorosa com 50% de etanol e, em seguida, movendo-se diretamente para a eluição com 80% de acetona, mas os resultados corroboram com o fracionamento esperado de florotanimos pela acetona (Pantidos et al., 2014), consultar a Figura 7.

[00228] Portanto, pode-se ter certeza de que a fração LIGANTE é enriquecida em florotanimos de um tipo semelhante ao observado anteriormente e com massas aparentes na faixa DP 4 - 13, com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol.

[00229] Outros estudos com o uso de Orbitrap MS forneceram mais informações.

[00230] No Orbitrap, a amostra F-LIGANTE mostrou os mesmos picos de UV de eluição tardia que antes e proporcionou espectros de MS semelhantes ao longo da zona de separação de 12-21 minutos (Figura 9).

[00231] Como antes, o pico principal de UV proporcionou um sinal de MS em m/z 1117, mas, em um exame mais atento, esse sinal tinha variantes de 0,5 amu indicativas de um íon $[M-H]^{2-}$. Como um íon duplamente carregado, a massa verdadeira seria o dobro e isso sugere que esse componente era um oligômero de 18 unidades de floroglucinol, em vez do

nonafloroetol descrito antes. Na verdade, todos os valores em m/z na série de m/z 621 para cima foram duplamente carregados, o que sugere que todos eles são maiores do que o sugerido pelos dados originais de MS. Essa faixa de DP corresponde aos relatórios anteriores de estruturas de florotanino de *Ascophyllum nodosum* (Steevensz et al., 2012).

EVIDÊNCIA DE LC-MS PARA A NATUREZA DOS COMPONENTES DE CARBOIDRATOS

[00232] No modo positivo, existem três conjuntos de espécies ionizantes na amostra original (Figura 10). Existem os componentes de florotanino de RT 12-21, componentes de eluição anteriores de RT de 2 a 3,7 minutos e outro conjunto de componentes que eluem entre 4 e 10 minutos. Os florotanismos se acumulam na amostra LIGANTE, mas os componentes de eluição anterior são enriquecidos na SEM LIGANTE, enquanto os outros componentes estão presentes na fração LIGANTE, mas enriquecidos na fração de LAVAGEM DE LIGANTE (consultar a Figura 10).

[00233] Os florotanismos proporcionaram espectros de MS característicos (consultar o traço 3, Figura 11) e, como visto anteriormente, foram enriquecidos na fração ligante. Os picos de eluição anterior também proporcionam sinais de MS específicos (consultar o traço 1, Figura 11), mas esses não são semelhantes a quaisquer componentes de algas marinhas relatados. O trabalho inicial sugere que componentes sulfatados podem estar presentes, pois esses sinais mostram perdas neutras de 80 amu, mas a identificação de sua natureza exigirá mais trabalho.

[00234] Os componentes de eluição intermediária, que também são enriquecidos na fração de lavagem de ligante, fornecem uma série interessante de sinais de MS (consultar o traço 2, Figura 9). Dado que a fração de lavagem de ligante foi enriquecida em CHOn, em comparação com a original, é possível que esses componentes sejam carboidratos por natureza. Há uma série que começa em m/z $[M+H]^+ = 831$ que difere em 162 amu.

[00235] Um padrão semelhante também pode ser visto no modo negativo, mas o modo positivo proporciona sinais mais intensos. A adição de 162 é característica da adição de grupos de açúcar hexose (por exemplo, glicose) a uma estrutura existente.

[00236] O sinal em m/z 831 corresponde ao peso molecular do laminaripentaitol (disponível em <https://secure.megazyme.com/1-3-Beta-D-Laminaripentaitol>) e os sinais em m/z 993, 1155, 1317 e 1479 podem se dar devidos à adição de hexoses à estrutura de núcleo desse oligossacarídeo de laminarina com um grupo manitol terminal. Laminarinas terminadas em manitol (M-laminarinas) são conhecidas por ocorrerem em *Ascophyllum* (Kadam et al., 2014) e esses sinais em m/z sugerem que tais oligossacarídeos estão presentes no material de extrato bruto. Esses sinais em m/z proporcionaram uma fragmentação muito fraca, de modo que as execuções fossem repetidas no Orbitrap MS. A mesma série de sinais era aparente nos dados do Orbitrap MS (Figura 12).

[00237] O penta-oligossacarídeo putativo proporcionou fragmentos de MS^2 caracterizados por perdas de 162 (perda de grupo hexosila = glicose) ou 182 (perda de manitol). Os sinais em m/z 325 e 345, respectivamente, podem ser formas protonadas de um dímero de glicose ligado a beta (MW 324) e glucosil-manitol (MW 344). Além disso, o sinal em m/z em 831 tinha uma massa exata de 831,29499 que rendeu uma fórmula prevista de $C_{30}H_{55}O_{26}$ (erro de <2 ppm) que se ajusta à fórmula para laminaripentaitol.

[00238] Espectros de MS semelhantes, e dados de fragmentação e fórmulas de massa exatas podem ser obtidos para outros membros da série em m/z 669 (DP4), 933 (DP6) e 1155 (DP7).

[00239] Em resumo, os resultados acima confirmam que o extrato bruto é enriquecido com florotaninos com um grau de polimerização de cerca de 10 a cerca de 30, correspondendo a um peso molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol.

[00240] Os resultados acima também confirmam que o extrato bruto pode ser purificado em frações enriquecidas com florotanino e enriquecidas com polissacarídeos usando-se SPE de extração em fase sólida (método cromatográfico), com os florotaninos presentes na fração ligante.

EXEMPLO 6 - SEPARAÇÃO DO BRUTO (EXTRATO HIDROETANÓLICO) USANDO-SE FILTRAÇÃO DE FLUXO TANGENCIAL TFF PARA SEPARAR EM DUAS FRAÇÕES (I) <1000 GMOL-1; E (II) >1000 GMOL-1.

A) MANUSEIO/OBSERVAÇÕES INICIAIS

[00241] O extrato foi armazenado a 2-8 °C, coberto com folha metálica, e o trabalho foi realizado protegendo-se as amostras da luz o máximo possível.

[00242] A solubilidade do extrato em água foi investigada para informar os saldos de massa subsequentes. O extrato foi feito a 2% em água, bem misturado, centrifugado e as frações insolúvel e solúvel foram liofilizadas.

B) EXPERIMENTOS DE FILTRAÇÃO DE FLUXO TANGENCIAL (TFF) PARA REMOVER SEPARAÇÃO BASEADA EM MATERIAL/TAMANHO DE BAIXO MW

[00243] Uma execução de escopo inicial foi conduzida usando-se um cartucho de fibra oca de corte MW de 1 kDa existente em um sistema Kros Flow Iii (Spectrum), com execuções subsequentes realizadas usando-se um novo cartucho com 2X a área de superfície.

[00244] As amostras de extrato foram preparadas por ressuspensão em água a 0,5%, seguido por filtração até GFC (1,2 um) (além do primeiro experimento de escopo que foi de 0,4%).

[00245] A concentração de TFF e as etapas de diafiltração foram padronizadas tanto quanto possível entre as execuções, com a separação monitorada pela condutividade do permeado.

[00246] Todas as amostras de extrato foram liofilizadas e analisadas pelo ensaio Folin-Ciocalteu e a cromatografia de exclusão por tamanho de HPLC (SEC) com detectores RI e PDA.

[00247] Após a análise e avaliação das amostras, uma execução de fracionamento adicional também foi realizada em material >1 kDa usando-se unidades de centrifugação Vivaspin (Sartorius) a 30 kDa ou 10 kDa de MW de corte, para avaliar se uma separação adicional poderia ser alcançada com o uso dessa abordagem.

[00248] Uma execução de fracionamento adicional também foi realizada usando-se uma membrana de série T de corte de MW de 5 kDa e 100 kDa em um sistema TFF de centramato PALL, para avaliar se isso poderia melhorar a separação. Isso tem uma área de superfície maior, permitindo maior carregamento de amostras, embora o volume de retenção também seja maior.

C) ABORDAGENS DE EXTRAÇÃO COM BASE NA SOLUBILIDADE/CARGA

[00249] Todos os experimentos iniciais de extração foram realizados em material de >1 kDa. O acetato de etila foi usado para extrair amostras de >1 kDa e gerar uma fração solúvel e insolúvel em acetato de etila. O acetato de etila foi removido das amostras por evaporação rotativa e as amostras foram ressuspensas e liofilizadas. Isso foi repetido em vários lotes de amostras e as frações foram analisadas pelo ensaio Folin-Ciocalteu e HPLC-SEC.

[00250] Uma extração de álcool foi realizada usando-se 80% de metanol em material de >1 kDa. O pélete insolúvel a 80% foi seco ao ar, ressuspensão e liofilizado. O metanol foi removido da fração solúvel por evaporação rotativa e o material resultante foi liofilizado. As frações foram analisadas pelo ensaio Folin-Ciocalteu e HPLC-SEC.

[00251] A cromatografia de troca iônica foi realizada em uma fração

insolúvel de acetato de etila para o escopo desse método. A amostra foi carregada em uma coluna Q-sepharose em um tampão Tris-NaCl e eluída usando-se um gradiente de NaCl. Os dois maiores picos foram coletados, dialisados e analisados.

D) DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE FOLIN-CIOCALTEAU PARA ESTIMAR O TEOR DE POLIFENÓIS

[00252] Um ensaio de Folin-Ciocalteu foi desenvolvido com base em métodos descritos na literatura e teses publicadas. O floroglucinol foi usado para gerar uma curva padrão e o método foi otimizado para tempo e temperaturas de incubação. Os resultados foram gerados em equivalentes de floroglucinol. Uma etapa de supressão de PVPP também foi introduzida para permitir a estimativa de quanto do sinal pode ser atribuído aos florotaninos e quanto pode ser outros polifenóis ou interferência de ensaio não específica.

E) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO DE HPLC, ANÁLISE DE HPLC C18 E ANÁLISE DE MONOSSACARÍDEO GC-FID

[00253] O método HPLC-SEC existente da GlycoMar foi adaptado para avaliar as frações de amostra de Byotrol. Foi utilizada uma coluna Shodex SB806M calibrada com padrões de dextrano (1-1400 kDa), com detecção de RI e PDA e fase móvel aquosa (Tris-HCl/NaCl), com amostra preparada na fase móvel.

[00254] O desenvolvimento de um método de HPLC usando-se uma coluna Kinetex XB C18 (Phenomenex) foi explorado para melhorar a avaliação de polifenóis. A fase móvel é 2% de ácido acético a 0-100% de gradiente de metanol com amostras preparadas em metanol. O floroglucinol foi usado como um controle.

[00255] A análise de monossacarídeos de amostras selecionadas foi realizada usando-se uma metanólise interna e abordagem de derivatização de TMS, seguida por análise de GC-FID.

[00256] A análise de sulfato foi realizada usando-se um método Terho

modificado internamente com base em cloreto de bário.

VISÃO GERAL DOS RESULTADOS

A) OBSERVAÇÕES INICIAIS

[00257] Os rendimentos de peso seco indicaram que apenas uma quantidade mínima da amostra original (~0,4% em p/p) era de detritos insolúveis em água, como material celular.

B) EXPERIMENTOS DE FILTRAÇÃO DE FLUXO TANGENCIAL PARA REMOVER MATERIAL DE BAIXO MW.

TABELA 3 - EXECUÇÃO DO ESCOPO USANDO-SE UNIDADE DE FIBRA OCA DE CORTE DE MW DE 1 KDA EXISTENTE, CARREGAMENTO DE AMOSTRA DE 2 G:

Execução de TFF	Fração	% de rendimento (em p/p)	Equivalentes de Folin PG ¹ em µg/ml
23 de abril de 2018*	>1 kDa	9,4	60,4
	<1 kDa	57,8	2,6

*rendimento de permeado de diafiltração não quantificado para essa execução

¹equivalentes de floroglucinol

[00258] Houve uma recuperação menor do que o esperado de material de >1 kDa dessa unidade (com base em dados CEVA anteriores) e evidências de polifenóis que aderiram às fibras. Todas as execuções subsequentes de 1 kDa foram realizadas usando-se uma nova unidade de fibra oca com maior área de superfície (Tabela 4 abaixo).

TABELA 4 - EXECUÇÕES SUBSEQUENTES USANDO-SE UMA NOVA UNIDADE DE FIBRA OCA DE CORTE DE MW DE 1 KDA COM 2X A ÁREA DE SUPERFÍCIE, CARREGAMENTO DE AMOSTRA DE 5 G:

Execução de TFF	Fração	% de rendimento (em p/p)	Equivalentes de Folin PG em µg/ml
07 de maio de 2018	>1 kDa	38,5	20,0
	<1 kDa	46,5	2,6
15 de maio de 2018*	>1 kDa	31,4	21,8
	<1 kDa	42,5	2,6
28 de maio de 2018	>1 kDa	21,1	34,9
	<1 kDa	43,2	2,6

* frações > e <1 kDa dessa execução enviadas para Byotrol.

(Execução adicional de 12 de junho de 2018 ainda a ser analisada)

[00259] A % de rendimento da fração de >1 kDa na nova unidade foi muito maior do que a execução de escopo, sob as mesmas condições de

manuseio (volumes, concentração e diafiltração). Incrustações coloridas da unidade foram, novamente, observadas, mas as verificações de desempenho indicaram que ela se recuperou bem após o uso. No entanto, o rendimento de >1 kDa reduziu ao longo do tempo, sugerindo, provavelmente, uma estabilização da unidade.

[00260] *Dados do ensaio de Folin:* Todas as frações de TFF foram testadas no ensaio de Folin-Ciocalteau e os resultados sugeriram que o polifenol foi retido na fração de >1 kDa (consultar a Tabela 1 e 2 acima). Se algum polifenol estava presente na fração de <1 kDa, estava abaixo do limite de quantificação do ensaio de Folin. As amostras também eram muito diferentes quanto à aparência, sendo que a fração de >1 kDa era marrom-escura e escamosa e a fração de <1 kDa era creme/branca, quebradiça e ligeiramente pegajosa.

[00261] *Análise de HPLC:* a análise preliminar de HPLC-SEC confirmou o perfil de baixo MW de ambas as frações, mas com diferenças claras entre as frações de >1 e <1 kDa (Figura 13 abaixo: >1 kDa à esquerda, <1 kDa à direita). O método atual não é otimizado para resolver esse material de baixo MW, mas é claro que, a partir da cromatografia, a fração de <1 kDa é compreendida de material solúvel aquoso de MW inferior (isto é, tempos de retenção posteriores) do que a fração de >1 kDa. Isso se dá, potencialmente, devido à grande quantidade de manitol presente na fração de <1 kDa (o padrão de manitol elui a RT de 21,3 min). O perfil de cromatografia de RI dessas amostras foi consistente em todos os lotes de TFF.

[00262] Um ensaio de diálise também foi realizado para avaliar o rendimento usando-se outros métodos de separação (Tabela 5 abaixo).

TABELA 5 - PROVA DE DIÁLISE:

1 kDa de MWCO	Amostra/g	>1 de % de rendimento (em p/p) de partida	Equivalentes de Folin PG em µg/ml
Diálise em 07 de maio de 2018	0,5	12,6	44,5

[00263] As conclusões do fracionamento usando-se 1 kDa TFF de

corde de MW foram que: o fracionamento separou com sucesso o material de <1 kDa da amostra. O material de >1 kDa pode conter quantidades variáveis de componentes menores, dependendo do sucesso da etapa de TFF. Os polifenóis foram retidos na fração de >1 kDa. A incrustação da membrana com material semelhante a polifenol era um problema.

C) ABORDAGENS DE EXTRAÇÃO BASEADAS NA SOLUBILIDADE E CARGA.

[00264] As tentativas de subfracionar mais frações de >1 kDa foram realizadas por extração em acetato de etila ou metanol a 80%.

TABELA 6 - FRACIONAMENTO BASEADO EM SOLUBILIDADE DE FRAÇÕES DE >1 KDA DE 17/11/21 ASCOX

Data de execução de TFF	Fração	% de rendimento (em p/p) de fração de >1 kDa	Equivalentes de Folin PG em µg/ml
23 de abril de 2018	Solúvel em EtAc	47,8	52*
	Insolúvel em EtAc	56,4	53,4*
07 de maio de 2018	Solúvel em EtAc	2,6	21
	Insolúvel em EtAc	86,8	22
		% de rendimento (em p/p) de solúvel em EtAc fração de >1 kDa	
07 de maio de 2018 (200 mg)	Solúvel em MeOH a 80%	87,1	21,5
	Insolúvel em MeOH a 80%	1,7	12

*antes do desenvolvimento final do método de ensaio de Folin.

Uma extração repetida com 80% de MeOH e carregamento superior ainda deve ser analisada

[00265] *Extração com acetato de etila:* uma pequena quantidade de material de >1 kDa era solúvel em acetato de etila, mas o rendimento era baixo e a extração não era, aparentemente, específica. Em lotes posteriores, muito do material permaneceu na fração insolúvel com o polifenol sendo detectado em ambas as frações solúvel e insolúvel (Tabela 6 acima). Na segunda prova, apenas uma pequena % da fração de >1 kDa era solúvel no acetato de etila. Essas amostras também tinham cromatografia e perfil de MW muito semelhantes, tanto quanto puderam ser distinguidos pela análise HPLC-SEC.

[00266] *Extração de 80% de metanol:* devido à falta de sucesso com a abordagem de acetato de etila, uma abordagem de Sephadex LH 20 foi

considerada. No entanto, devido a problemas com os polifenóis que aderem às resinas e aos filtros de membrana, foi decidido que essa abordagem provavelmente não resultaria em uma separação melhorada. Portanto, a solubilidade diferencial em 80% de metanol foi testada, em vez de acetato de etila. A literatura sugere que os polifenóis são mais solúveis em 80% de metanol (em vez de 100% de metanol) com uma % de metanol inferior, resultando na solubilização de carboidratos também, isto é, os carboidratos devem ser insolúveis em 80% de metanol, permitindo a separação dessas espécies.

[00267] 87,1% de uma fração de >1 kDa era solúvel em 80% de metanol (Tabela 6 acima). Houve apenas um baixo rendimento do material insolúvel em metanol (~1-2%), embora parecesse ter um teor de polifenol reduzido (Tabela 6 acima). HPLC-SEC preliminar dessas frações indicou que o material insolúvel compreendia componentes de MW mais altos, que não pareciam ser polifenol (por MW e espectro de absorvância) (Figura 14, à esquerda). O material solúvel a 80% compreendia todo o material de baixo MW (Figura 14, à direita). A análise do teor de monossacarídeo e sulfato dessas amostras sugeriu que o fucoidano estava presente no componente insolúvel a 80%, mas o mesmo foi misturado com outros compostos, incluindo alguns polifenóis (Tabela 7 abaixo). A glicose também foi detectada na fração solúvel em MeOH a 80% e a origem desse açúcar não era clara. É improvável que a laminarina seja solúvel em MeOH a 80%, embora isso deva ser avaliado posteriormente.

TABELA 5 - ANÁLISE DE MONOSSACARÍDEO E DADOS DE SULFATO PARA FRAÇÕES DE EXTRAÇÃO DE METANOL A 80%. O MATERIAL INSOLÚVEL EM MEOH A 80% CONTÉM FUCOSE E GALACTOSE, INDICATIVOS DE FUCOIDANO. O SULFATO ESTÁ PRESENTE, MAS EM QUANTIDADES MENORES DO QUE SERIA ESPERADO PARA O FUCOIDANO PURO. A GLICOSE TAMBÉM ESTÁ

PRESENTE NAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS.

Monossacarídeo	Insolúvel em MeOH a 80%	Solúvel em MeOH a 80%
Arabinose	6,21%	5,70%
Ramnose	2,23%	0,82%
Fucose	11,73%	0,00%
Xilose	4,71%	0,00%
GalA	0,00%	0,00%
Manose	1,54%	0,00%
Galactose	4,37%	1,22%
Glicose	65,19%	89,13%
Ácido glicurônico	4,02%	3,12%
N-acetil galactosamina	0,00%	0,00%
N-acetil glucosamina	0,00%	0,00%
% de recuperação	20,60%	33,70%
% de sulfato	4,2	LOD

[00268] As conclusões das abordagens de fração com base na solubilidade foram que: o acetato de etila não foi eficaz na partição de componentes nas frações de >1 kDa. Embora as frações da extração de 80% de metanol fossem diferentes na composição, o rendimento da fração insolúvel foi de apenas 1% do material de partida (em p/p), sugerindo que se esse for rico em fucoidano, logo só estará presente em níveis muito baixos. A glicose também foi detectada na fração solúvel em MeOH a 80% e a origem desse açúcar não é clara. É improvável que a laminarina seja solúvel em MeOH a 80%, embora isso deva ser avaliado posteriormente. Outras análises de monossacarídeos estão sendo realizadas em outras amostras, incorporando um controle de manitol e laminarina.

[00269] *Cromatografia de troca iônica:* apesar da falta de fracionamento com o uso de acetato de etila, a cromatografia de troca iônica de uma fração insolúvel em acetato de etila foi realizada para avaliar essa abordagem. A eluição do gradiente de cloreto de sódio resultou em vários pequenos picos em todo o gradiente, com evidências de polifenóis presos ao topo da coluna. Houve resolução mínima da linha de base e, devido ao material preso na coluna, não estava claro quanto da amostra estava sendo resolvido. No entanto, os dois maiores picos foram coletados, dialisados e liofilizados. A análise desses picos sugeriu que eles não continham polifenóis (Tabela 8 abaixo), embora a baixa recuperação possa distorcer a

quantificação. HPLCSEC preliminar também sugeriu que alguns componentes de MW mais altos estavam presentes, mas a análise de monossacarídeo sugeriu que apenas um mínimo de carboidratos estava presente (a recuperação nessa análise foi <5%). Pode ser possível separar outros componentes de polifenóis usando-se essa abordagem, mas devido aos polifenóis que aderem à coluna e à eluição de vários picos, o método é muito difícil de controlar e aumentar a escala.

TABELA 8 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DE UMA FRAÇÃO DE TFF INSOLÚVEL EM ETAC, >1 KDA DE 17/11/21 ASCOX

Execução de TFF	Fração	% de rendimento (em p/p)	Equivalentes de Folin PG µg/ml
23 de abril de 2018: fração de >1 kDa	Solúvel em EtAc	47,8	52*
	Insolúvel em EtAc	56,4	53,4*
23 abril de 2018: insolúvel em EtAc (70 mg)	Pico de QSepharose em 28-44 min	6,9	1,4
	Pico de QSepharose em 58-72 min	14,3	1,2

*antes do desenvolvimento final do método de ensaio de Folin

D) ABORDAGENS ADICIONAIS DE FRACIONAMENTO PARA TER COMO ALVO OS COMPONENTES DE CARBOIDRATOS E POLIFENÓIS.

[00270] As tentativas de fracionar amostras de >1 kDa para produzir frações enriquecidas com polifenol ou carboidrato foram amplamente malsucedidas com base na solubilidade (EtAc/MeOH a 80%), e o manuseio (como troca iônica) foi limitado pela natureza dos polifenóis e sua não adesão específica a resinas.

[00271] Embora de natureza preliminar, todos os dados de HPLC indicaram que os polifenóis são de baixo MW (amplamente <5 kDa, com a literatura indicando, talvez, <1 kDa). Portanto, com base no baixo MW previsto de polifenóis, outras provas foram realizadas usando-se separações de corte de MW, para tentar fracionar ainda mais a amostra.

[00272] *Separadores centrífugos Vivaspin*: o fracionamento adicional por MW usando-se unidades centrífugas Vivaspin foi realizado com o uso de

dois cortes diferentes de MW com duas amostras de 300 mg de >1 kDa em 17/11/21 ASCOX. Embora as frações resultantes fossem diferentes na aparência (Figura 4 abaixo), o polifenol foi detectado pelo ensaio de Folin em todas as frações, exceto a fração de <10 kDa (Tabela 7 abaixo). Essas e outras amostras confirmam que a cor das amostras parece estar correlacionada com a quantidade de polifenol presente.

TABELA 9 - SEPARAÇÃO POR VIVASPIN DE MATERIAL DE >1 KDA EM 17/11/21 ASCOX

Vivaspin MWCO/kDa	% de rendimento de partida em p/p	Descrição	Equivalentes de Folin PG µg/ml
>10	45,2	Colorido	46,4
<10	51,8	Claro	2,6
>30	35	Colorido	43,9
<30	57,5	Ligeiramente colorido	11

[00273] *TFF com o uso de membranas de corte de MW superior:* devido à dificuldade em separar polifenóis de outros componentes em 17/11/21 ASCOX, uma prova também foi realizada usando-se um sistema TFF centramato PALL e membranas da série T de 100 e 5 kDa. Esse sistema também permitiria um carregamento muito alto de amostra (20 g), a fim de gerar maiores quantidades de frações. 17/11/21 ASCOX foi solubilizado e filtrado, como descrito acima, antes do processamento em TFF. As membranas foram usadas sequencialmente, isto é, a amostra passou por 100 kDa e, em seguida, todo o permeado (incluindo da etapa de diafiltração) foi agrupado e aplicado à membrana de 5 kDa. Consultar a Tabela 10 para dados de rendimento.

TABELA 8 - PROVA DE CORTE DE MW SUPERIOR COM O USO DE MEMBRANAS DA SÉRIE T DE CENTRAMATO DE 100 E 5 KDA

	Amostra/ g	>100 kDa de % de rendimento (em p/p) de partida	5-100 kDa de % de rendimento (em p/p) de partida	<5 kDa de % de rendimento (em p/p) de partida*
04 de junho de 2018	20 g	1,4	9,8	44,4

*Rendimento de diafiltração de permeado não incluso

[00274] A análise preliminar de HPLC-SEC sugeriu que o material com maior MW em 17/11/21 ASCOX é enriquecido na fração de >100 kDa.

Um pico definido está presente na fração de 5-100 kDa, com a maior parte do material de baixo MW presente na fração de <5 kDa. Essa abordagem, com uma peneira molecular muito maior do que polifenol de MW, juntamente com as amostras de vivapsina de <30 kDa, sugeriu que os polifenóis passarão pelas membranas de filtração se o corte de MW for muito maior do que o polifenol de MW previsto. No entanto, algum polifenol ainda é retido, provavelmente devido a uma interação de membrana ou formação de grandes agregados. Pode ser possível melhorar essa separação mudando-se as condições na membrana - por exemplo, condições menos iônicas ou não polares, baixa % de álcool, para evitar a agregação e obter uma separação mais precisa dos polifenóis com base no tamanho.

[00275] As conclusões da filtração centrífuga adicional e abordagens de TFF são que: o fracionamento de membrana com base no tamanho é limitado devido à interação de membrana por polifenóis. No entanto, o uso de um corte de MW superior permite uma separação melhorada, com previsão de que fucoidano seja retido na fração de >100 kDa e que a maioria dos polifenóis passem pela membrana.

EXEMPLO 7 - ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES OBTIDAS NOS EXEMPLOS 5 E 6 ACIMA.

[00276] As frações hidrofílica, hidrofóbica, (i) de <1000 gmol⁻¹ e (ii) de >1000 gmol⁻¹ obtidas nos Exemplos 5 e 6, respectivamente, foram, em seguida, submetidas à testagem antiviral contra norovírus murino com o uso de um método conforme descrito no Exemplo 4.

[00277] Os resultados são mostrados nas Figuras 15 e 16 e confirmam que é a fração LIGANTE (hidrofóbica) e a de >1000 gmol⁻¹ que estão ativas.

EXEMPLO 8 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO DE ALGAS MARINHAS E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA COM FLOROTANINO COM EPIGALOCATEQUINA, UM POLIFENOL EXTRAÍDO DO CHÁ VERDE

[00278] Extratos de algas marinhas obtidos do Exemplo 3 (extrato bruto) e Exemplo 5 (extrato ligante) foram usados, juntamente com galato de epigallocatequina ($\geq 95\%$) obtido junto à Sigma Aldrich. As condições de teste utilizadas foram as descritas no Exemplo 7.

[00279] Os resultados mostram que a atividade antiviral tanto para os extratos brutos quanto para os ligantes exibe atividade antiviral significativa (consultar a Figura 17).

REIVINDICAÇÕES

1. Florotanino ou mistura de florotaninos caracterizada pelo fato de que tem uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol para uso como um agente antiviral.

2. Uso de um ou mais florotaninos caracterizado pelo fato de que tem uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol como um agente antiviral.

3. Uso de um ou mais florotaninos caracterizado pelo fato de que tem uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol na fabricação de uma composição antiviral.

4. Composição antiviral caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais florotaninos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol.

5. Composição caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais florotaninos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol para uso como uma composição antiviral.

6. Uso de uma composição caracterizado pelo fato de que compreende um ou mais florotaninos com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol como uma composição antiviral.

7. Florotanino ou mistura de florotaninos para uso, composição, composição para uso ou uso, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o florotanino ou a mistura de florotaninos é obtida ou é obtível a partir de alga marrom.

8. Florotanino ou mistura de florotaninos para uso, composição, composição para uso ou uso, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o florotanino ou a mistura de florotaninos é obtida ou é obtível a partir de *Ascophyllum nodosum*.

9. Florotanino ou mistura de florotaninos para uso,

composição, composição para uso ou uso, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o vírus é envelopado ou não envelopado.

10. Florotanino ou mistura de florotaninos para uso, composição, composição para uso ou uso, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o vírus é de um ou mais dentre o grupo I, II, III ou V da classificação de vírus de Baltimore.

11. Florotanino ou mistura de florotaninos para uso, composição, composição para uso ou uso, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o uso trata ou previne infecção viral.

12. Extrato obtido ou obtível a partir de alga marrom, sendo que o extrato é caracterizado pelo fato de que compreende um ou mais florotaninos e pelo menos cerca de 70% em peso com base no peso seco dos florotaninos no extrato seco que tem uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol com base no peso seco do extrato.

13. Extrato de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende de cerca de 50% a cerca de 100% em peso com base no peso seco do extrato de florotaninos, como de cerca de 60 a cerca de 95% ou de cerca de 70 a cerca de 90% em peso com base no peso seco do extrato.

14. Extrato de acordo com a reivindicação 12 ou 13, sendo que o extrato é caracterizado pelo fato de que é obtido ou é obtível a partir de *Ascophyllum nodosum*.

15. Método de obtenção de um extrato, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado pelo fato de que usa um solvente de extração hidroalcolico.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, a extração com um solvente orgânico

e/ou adicional que compreende purificar o extrato.

17. Extrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado pelo fato de que se destina ao uso como um agente antiviral.

18. Uso de um extrato, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado pelo fato de que é como um agente antiviral.

19. Composição antiviral caracterizada pelo fato de que compreende um extrato, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 12 a 14.

20. Composição caracterizada pelo fato de que compreende um extrato, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 12 a 14, para uso como um agente antiviral.

21. Extrato para uso, composição, composição para uso ou uso, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que o uso trata ou previne infecção viral.

22. Florotanino ou mistura de florotaninos para uso, composição, composição para uso ou uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que, no florotanino ou na mistura de florotaninos, está sob a forma de um extrato, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 12 a 14.

LIGANTE FINAL

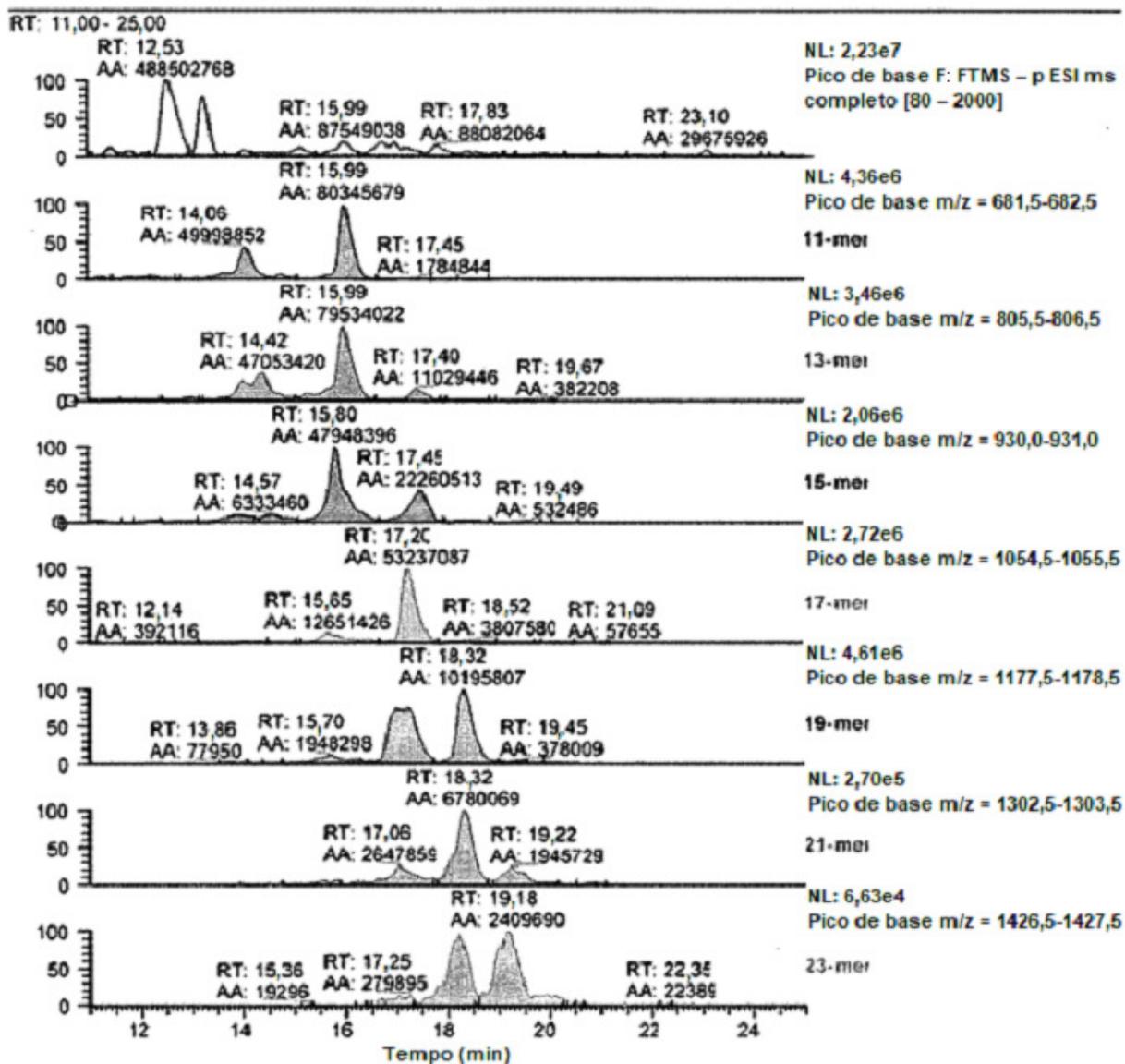


Fig 1a

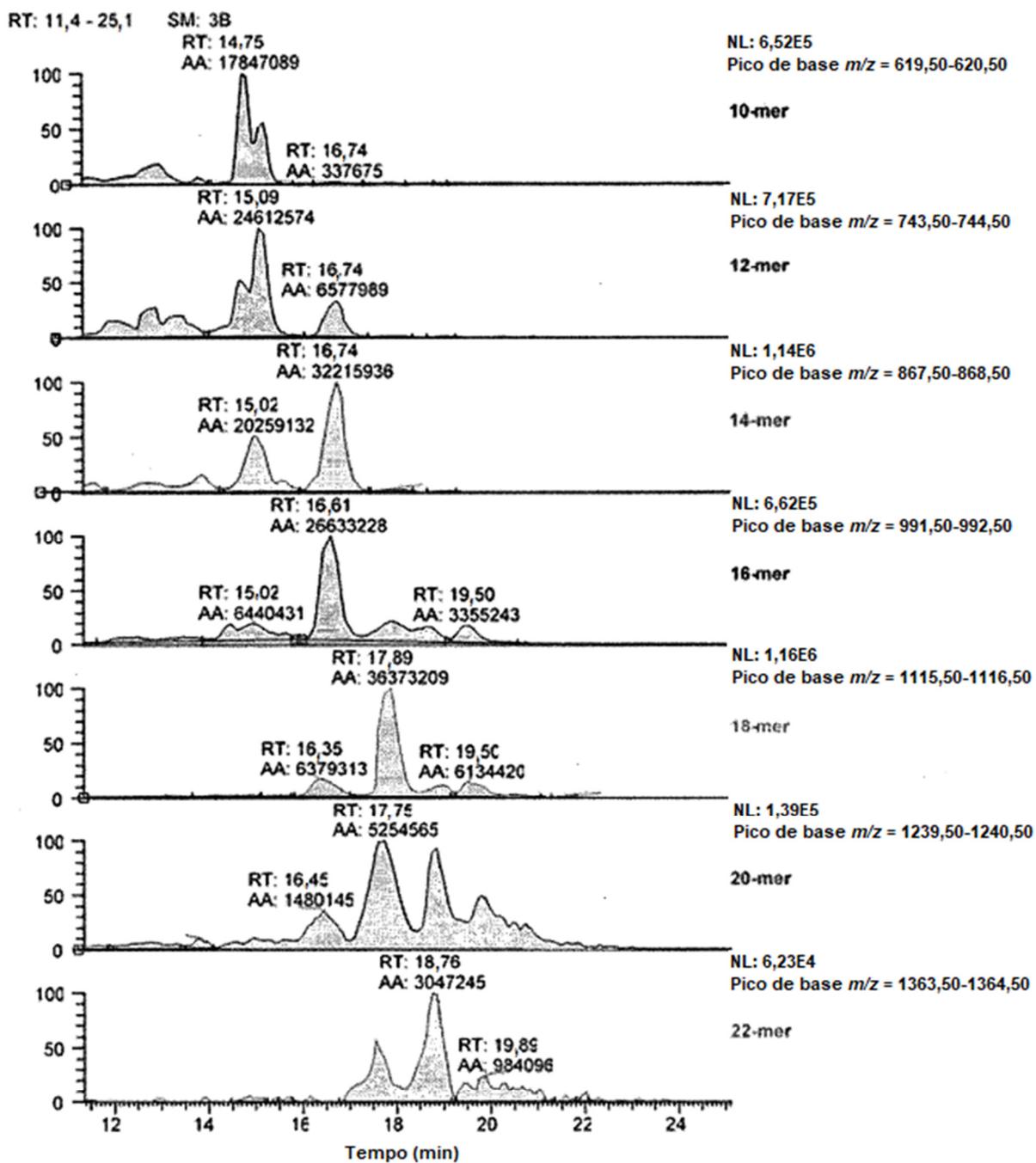


Fig 1b

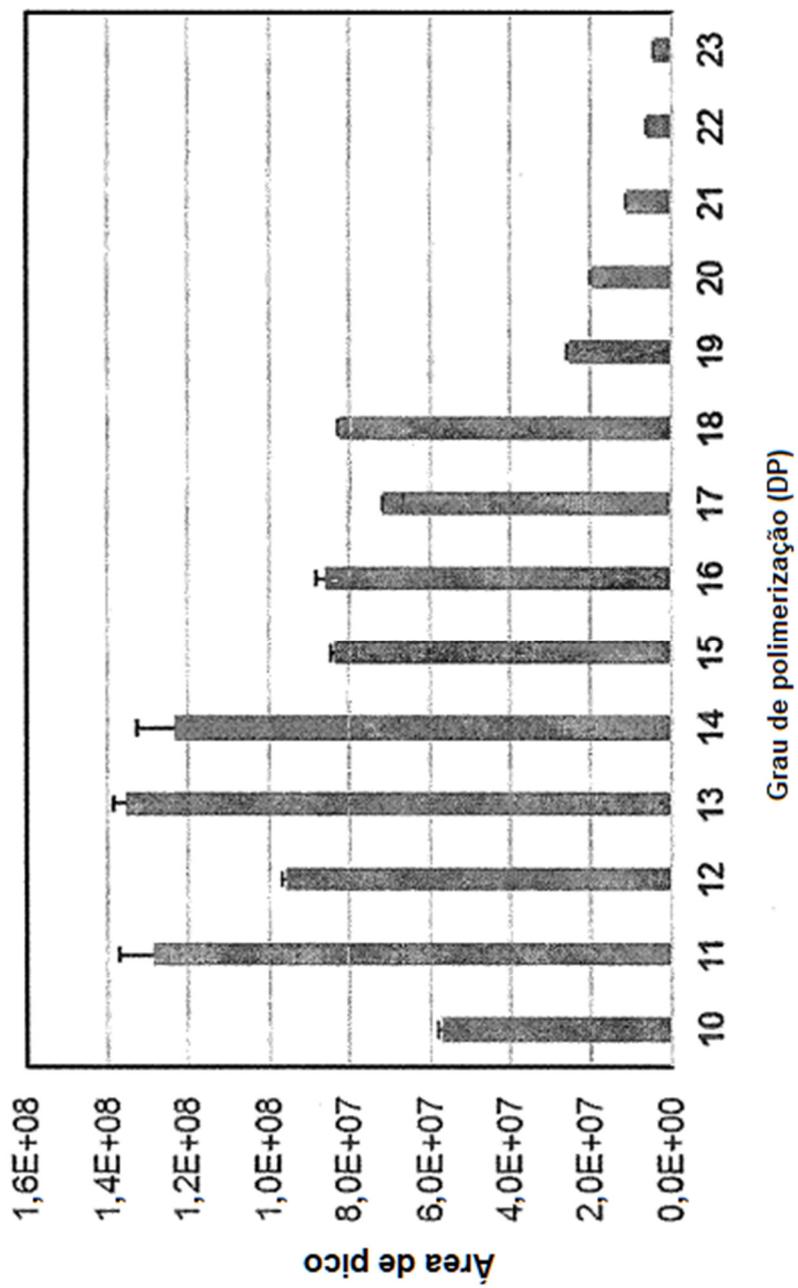


Fig 2

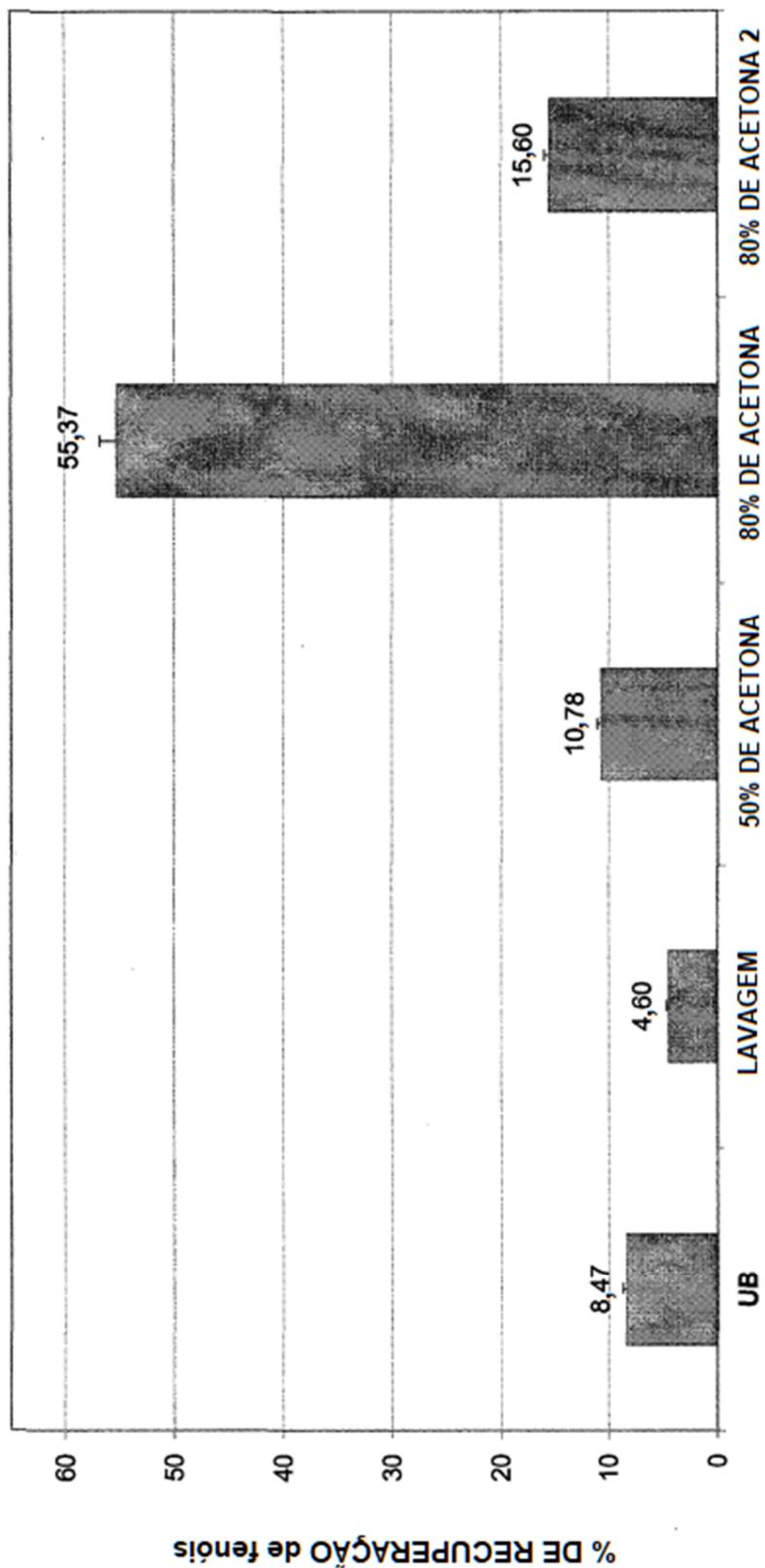


Fig 3

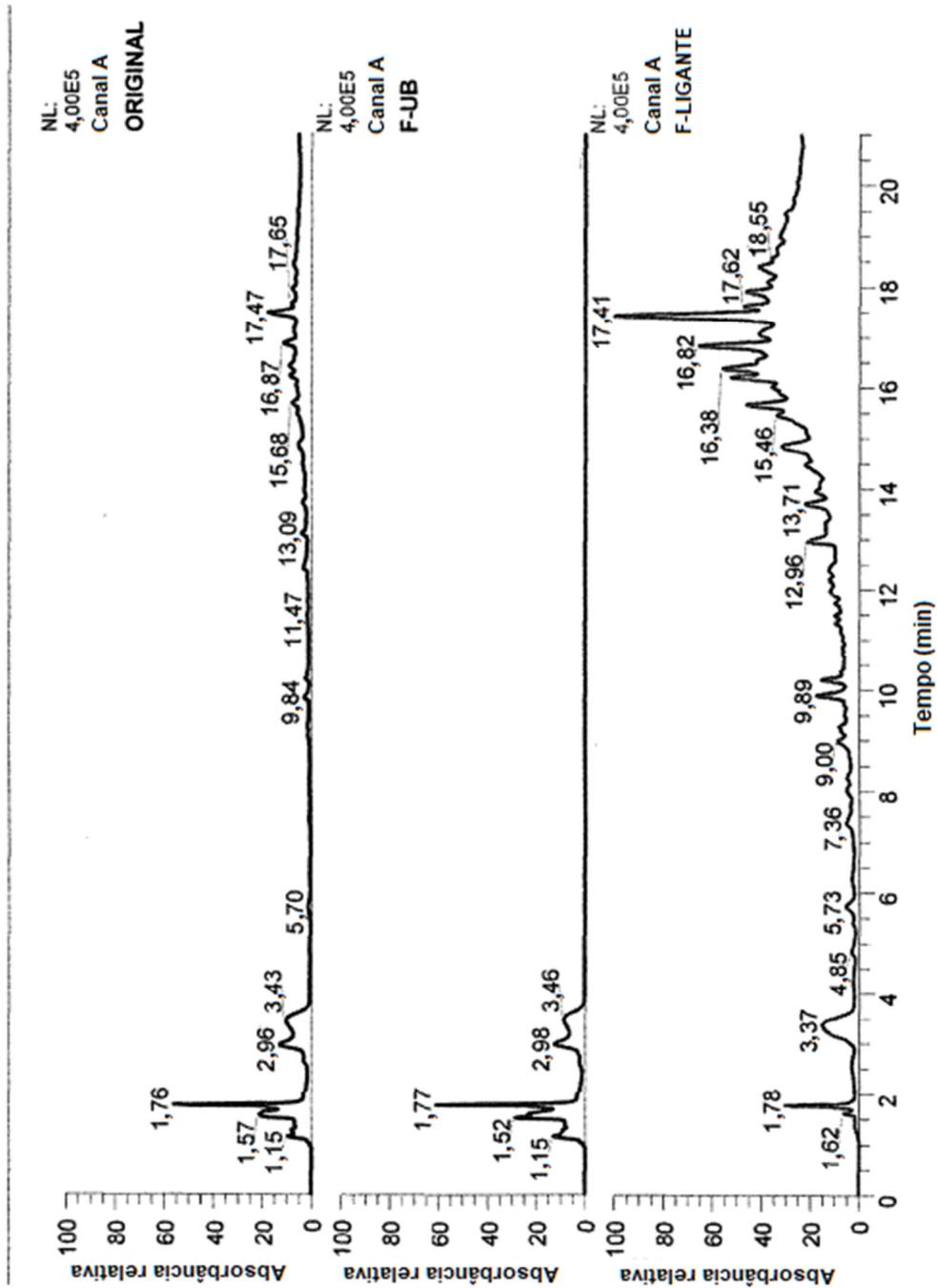
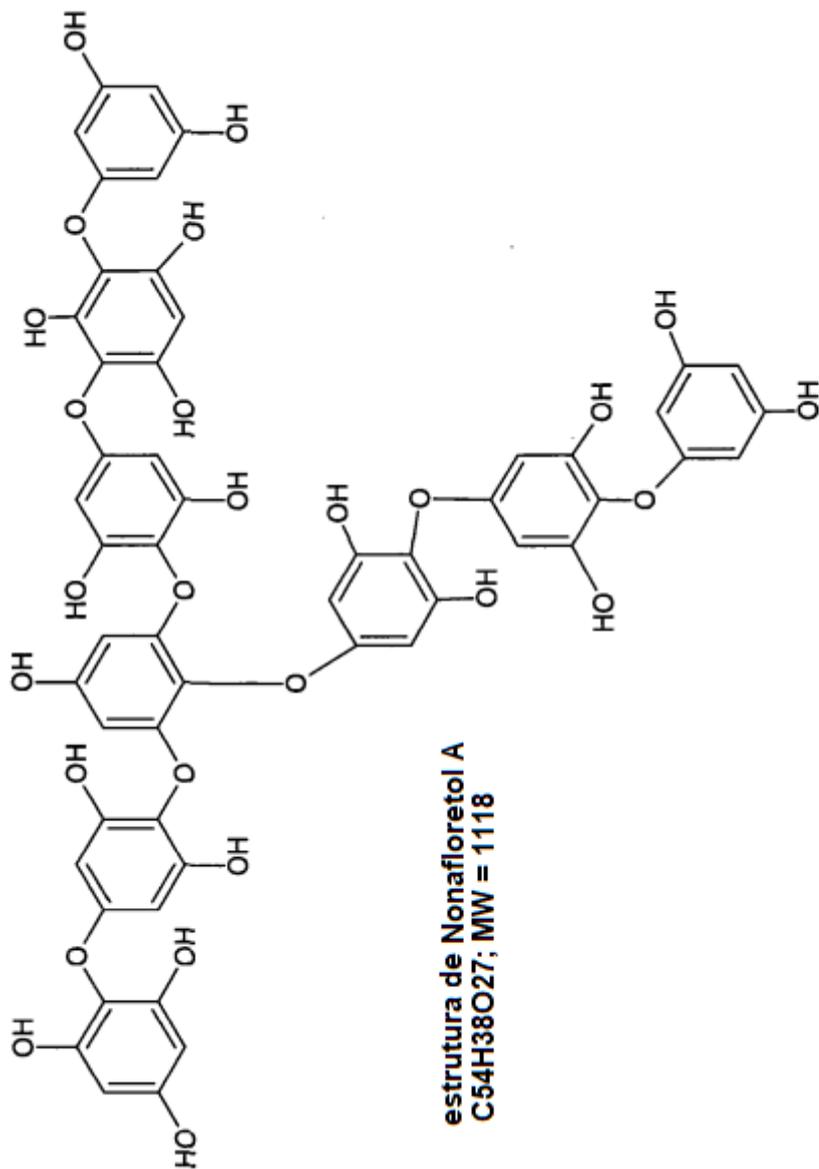


Fig 4



estrutura de Nonafloretol A
C₅₄H₃₈O₂₇; MW = 1118

Fig 5

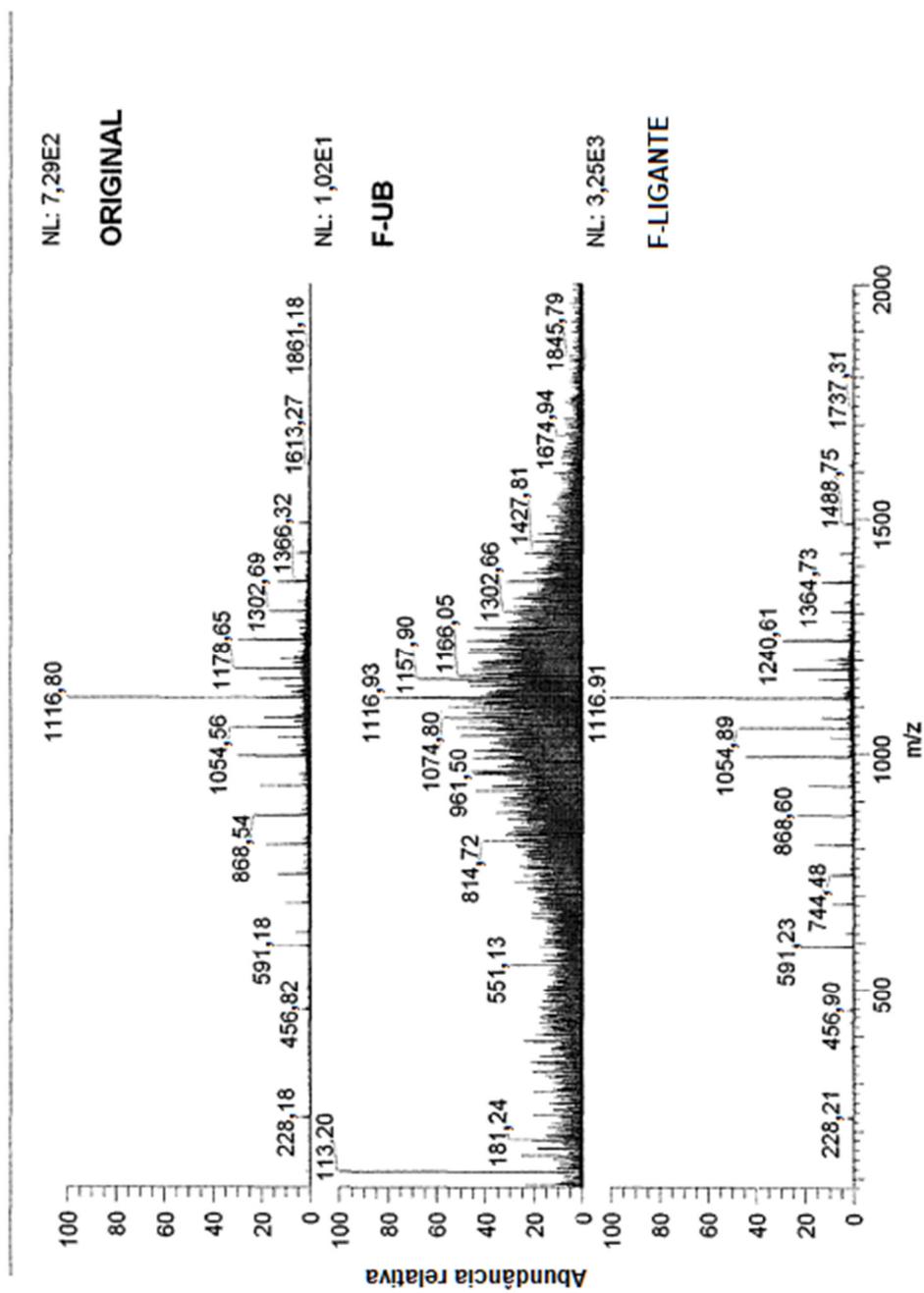


Fig 6

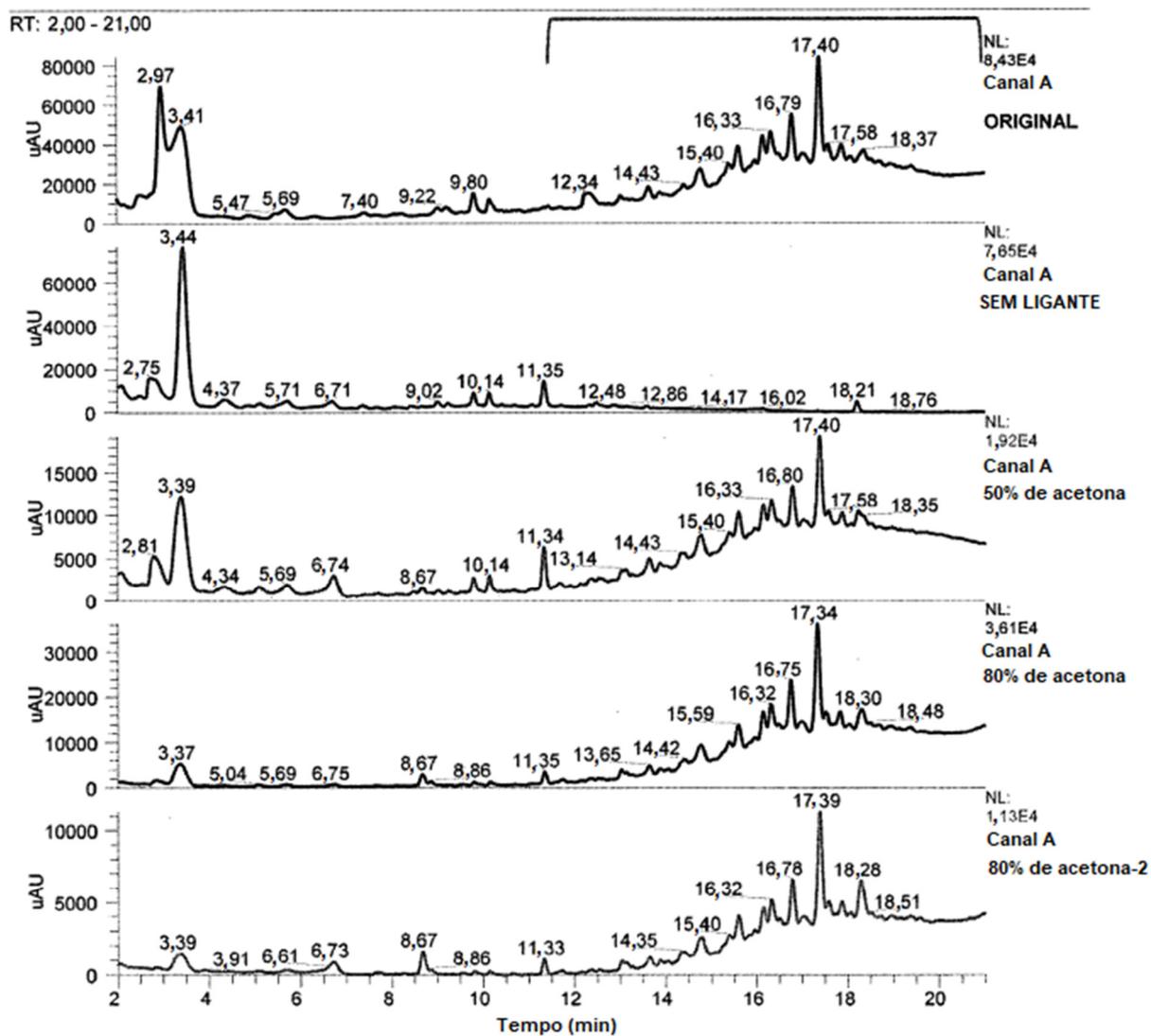


Fig 7

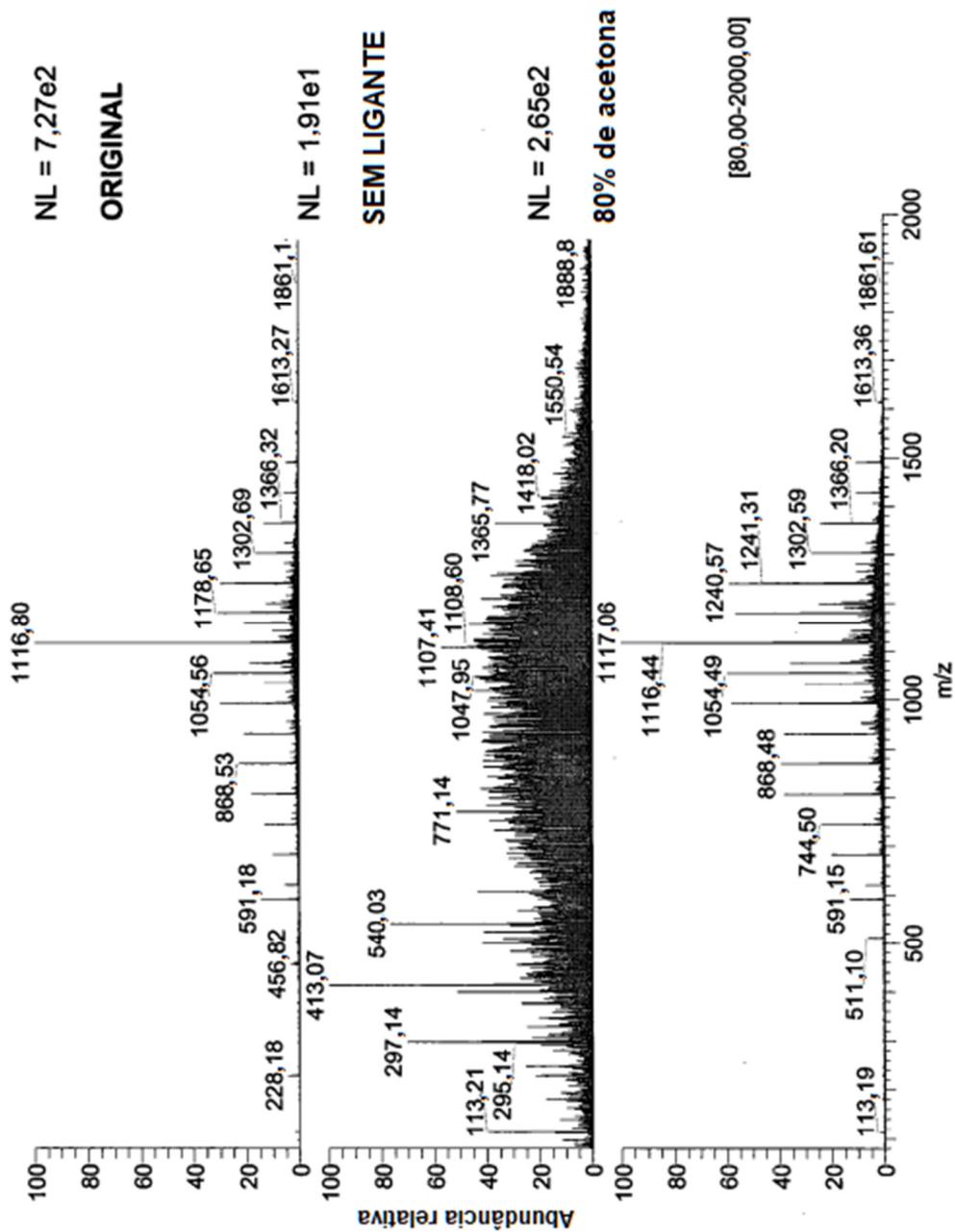
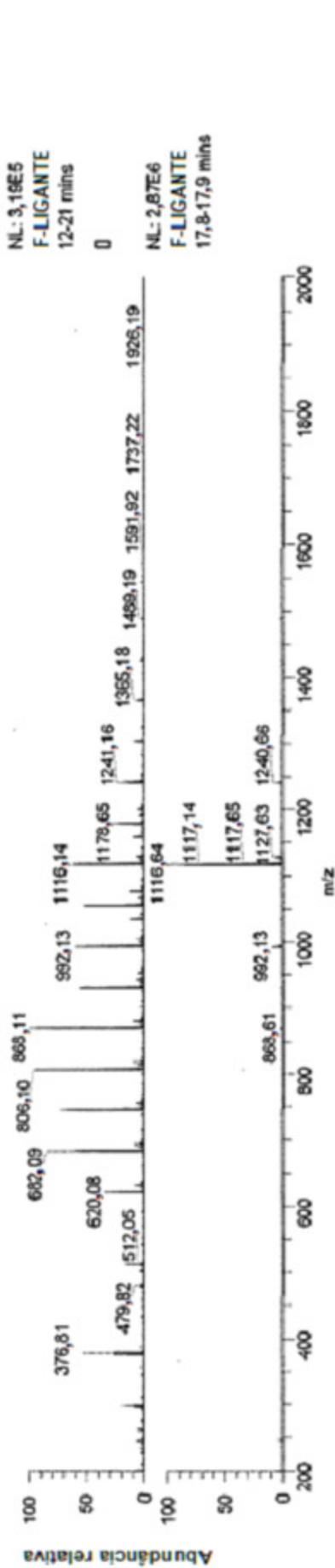


Fig 8

FMTS - p ESI MS completo 200 - 2000



FB_Neg n° 1548-1587 RT: 17,74-17,93 AV: 5 NL: 3,00E6

F: FTMS - p ESI ms completo [80,00-2000,00]

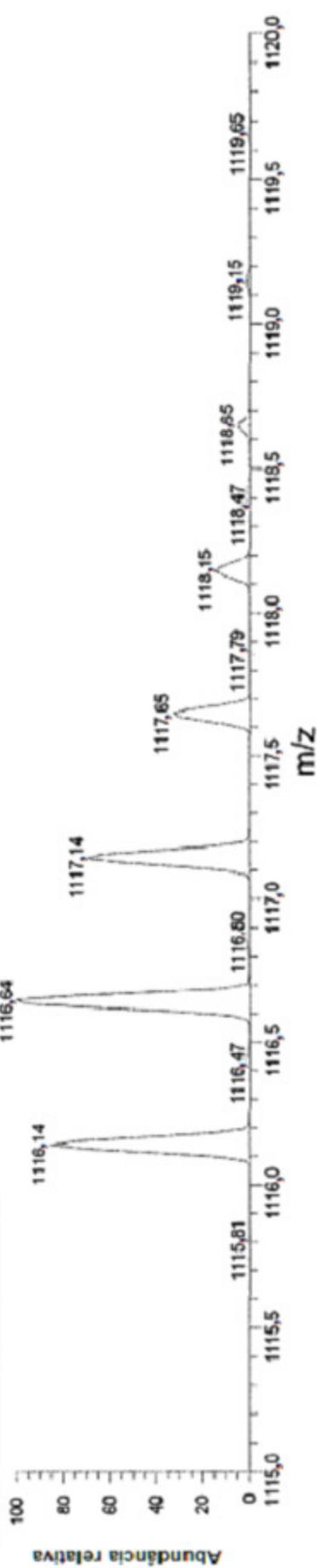


Fig 9

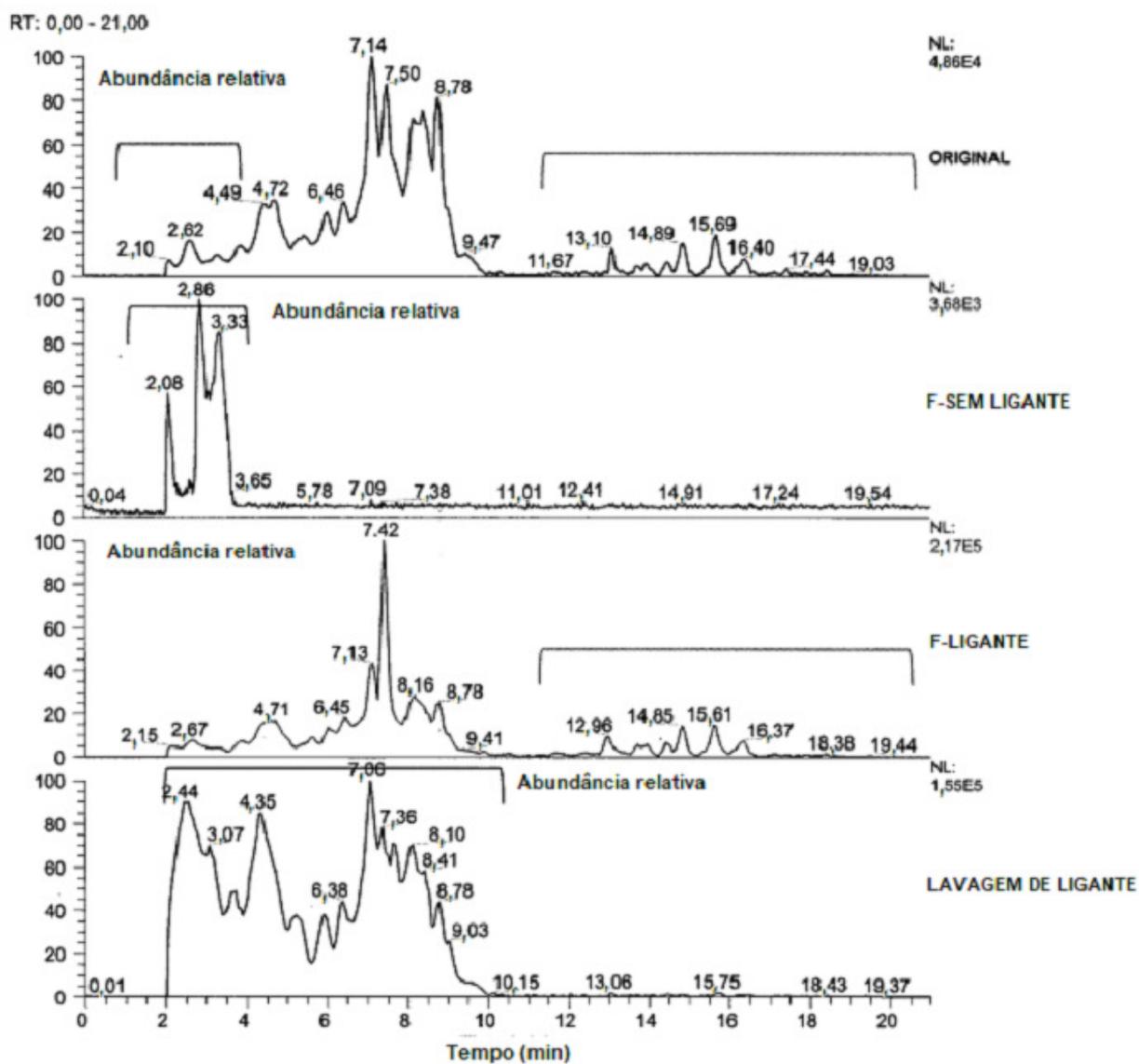


Fig 10

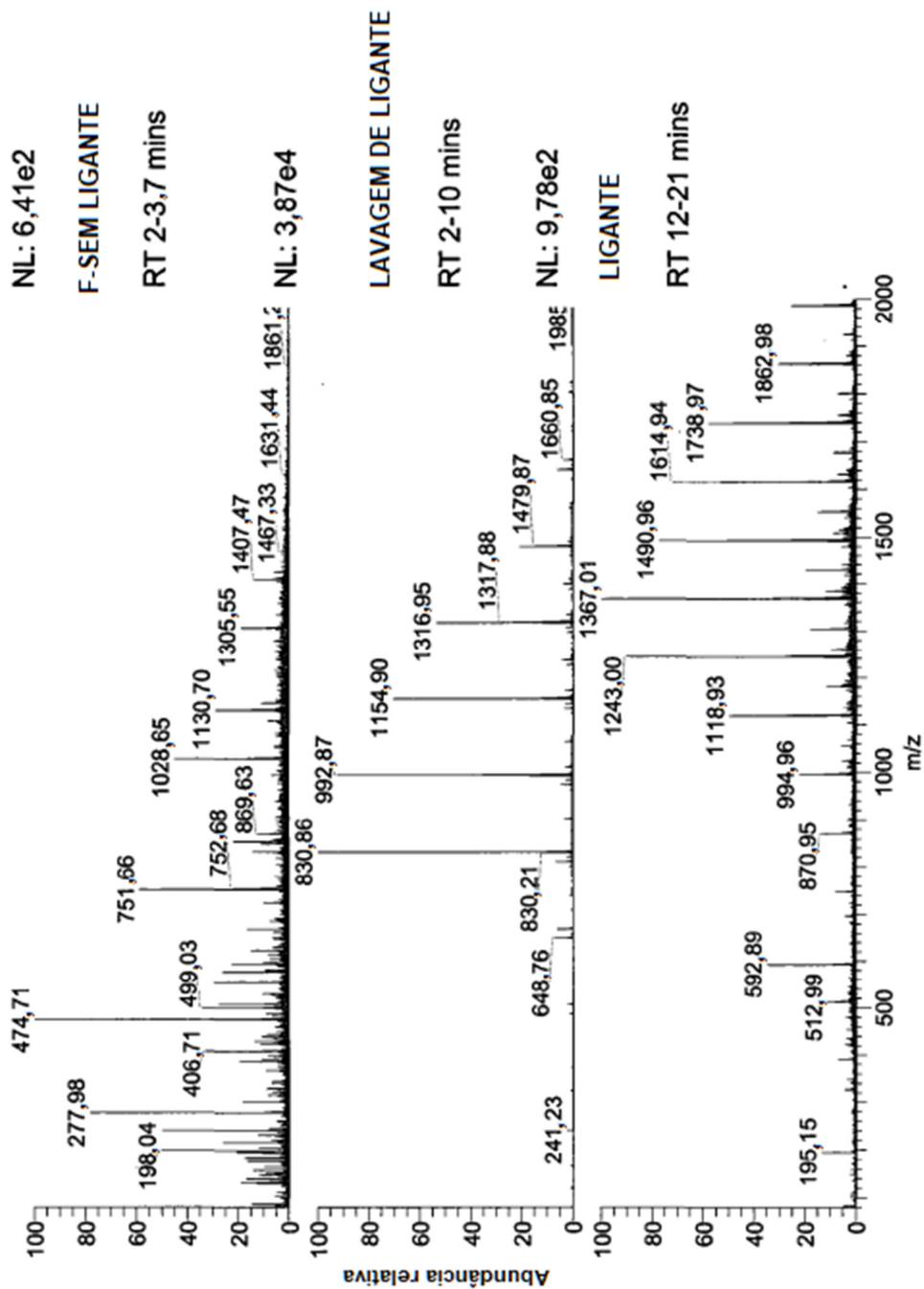


Fig 11

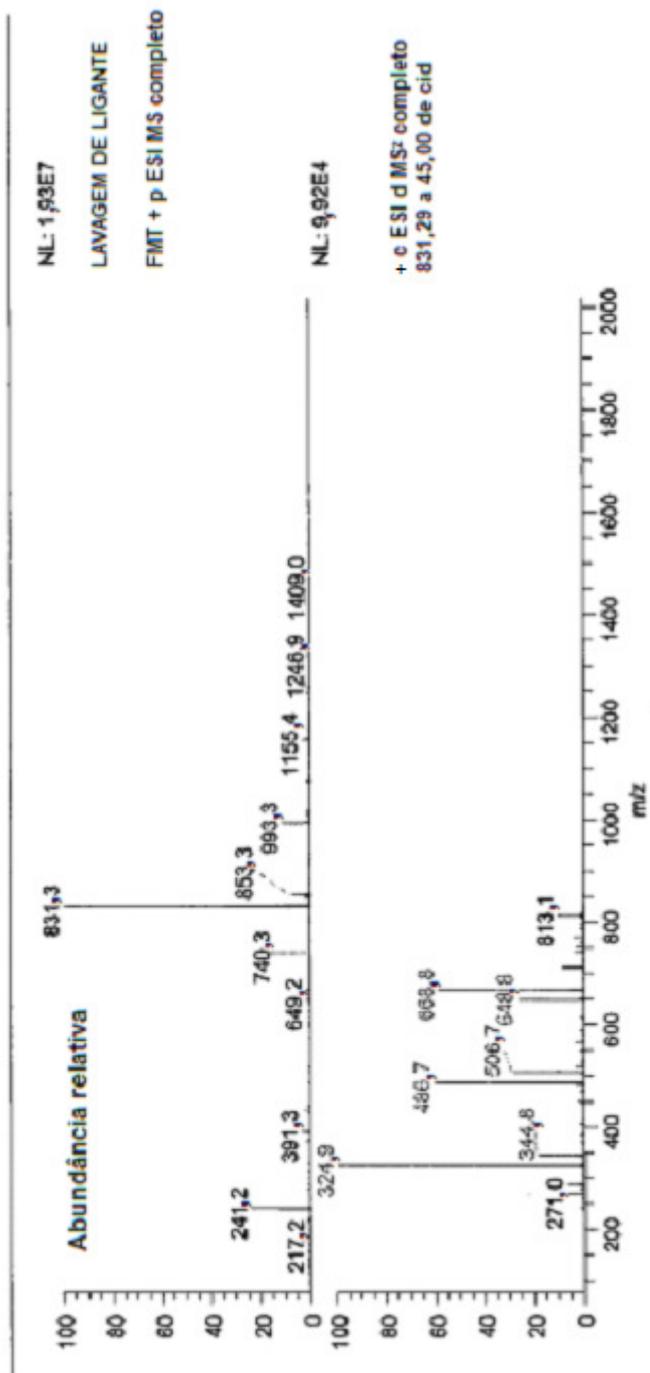


Fig 12

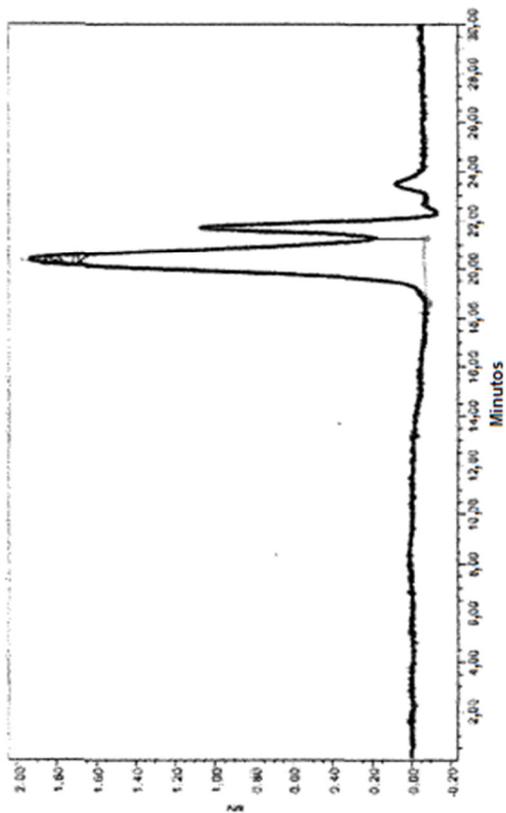
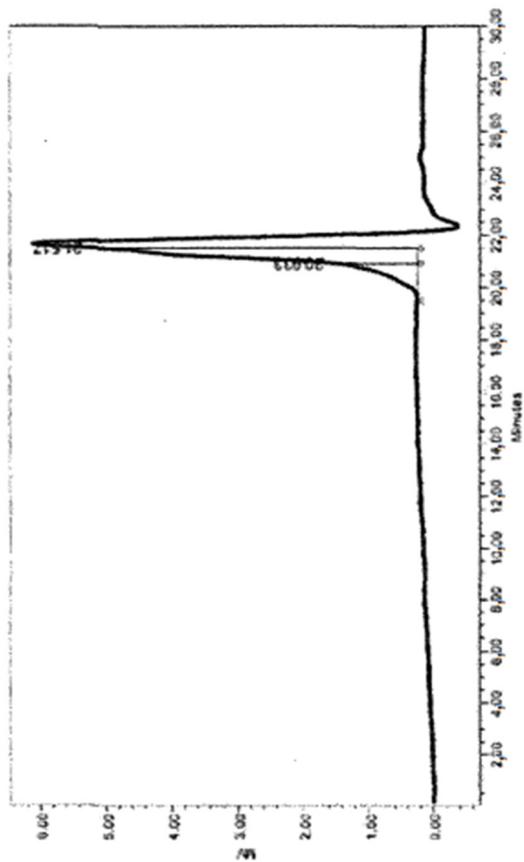


Fig 13

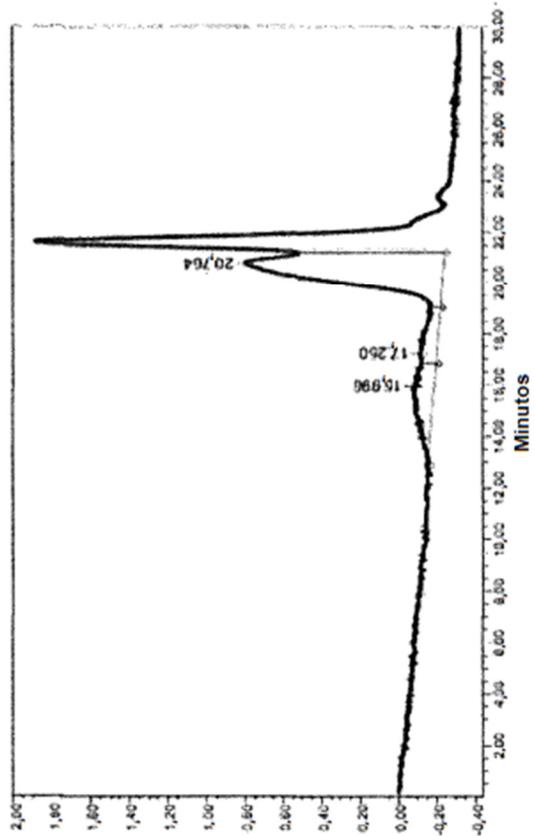
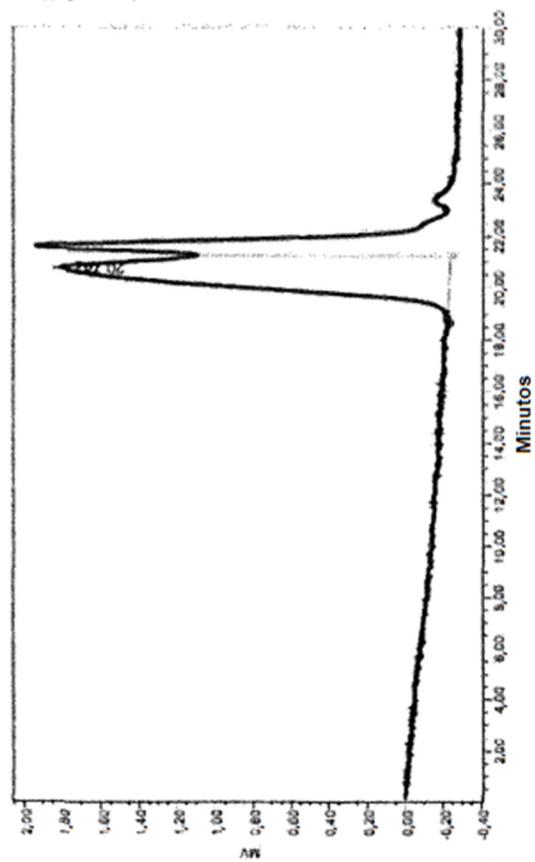


Fig 14

Eficácia antiviral contra norovírus murino com tempos de contato de (a) 2 minutos e (b) 60 minutos

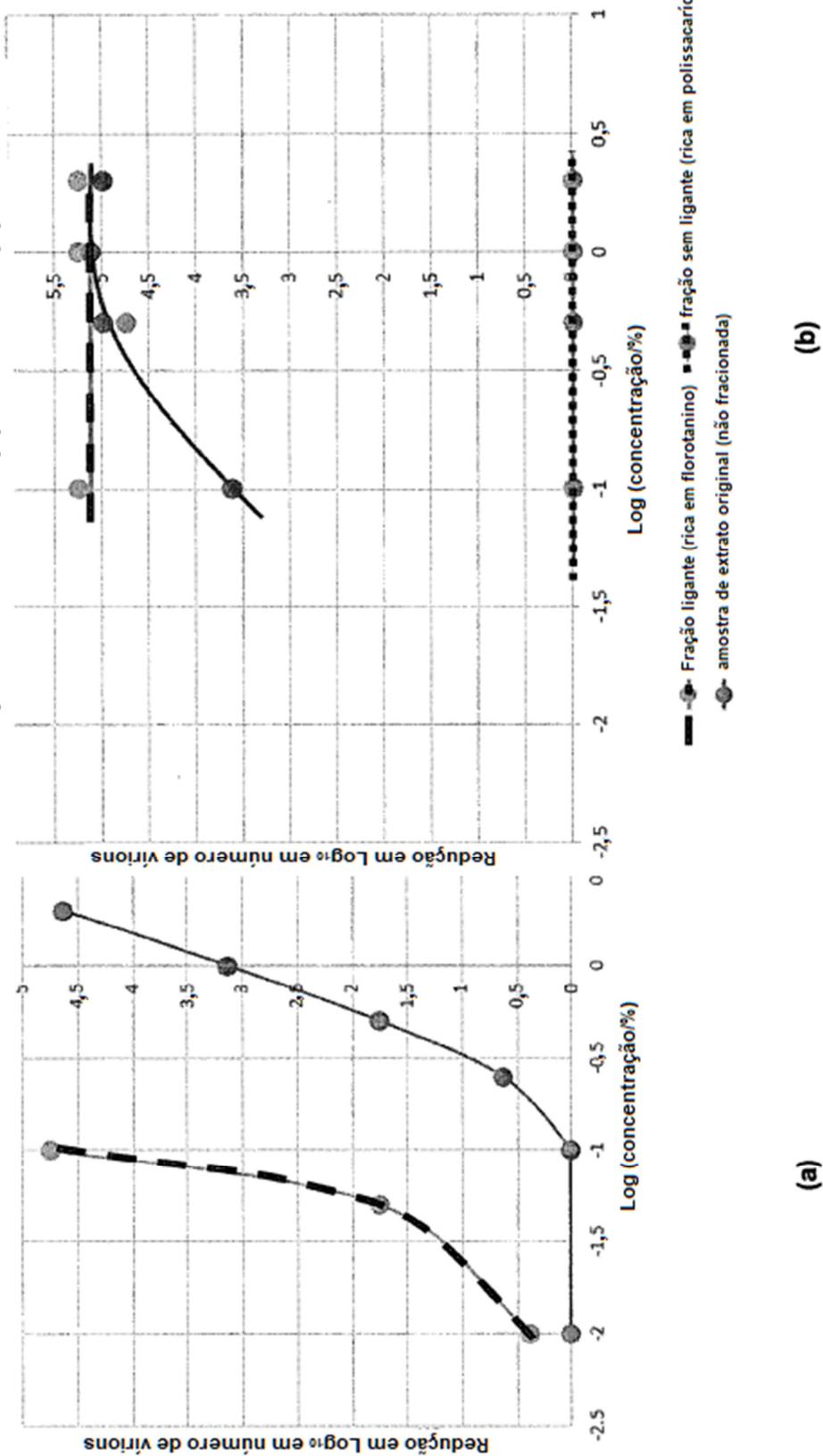


Fig 15

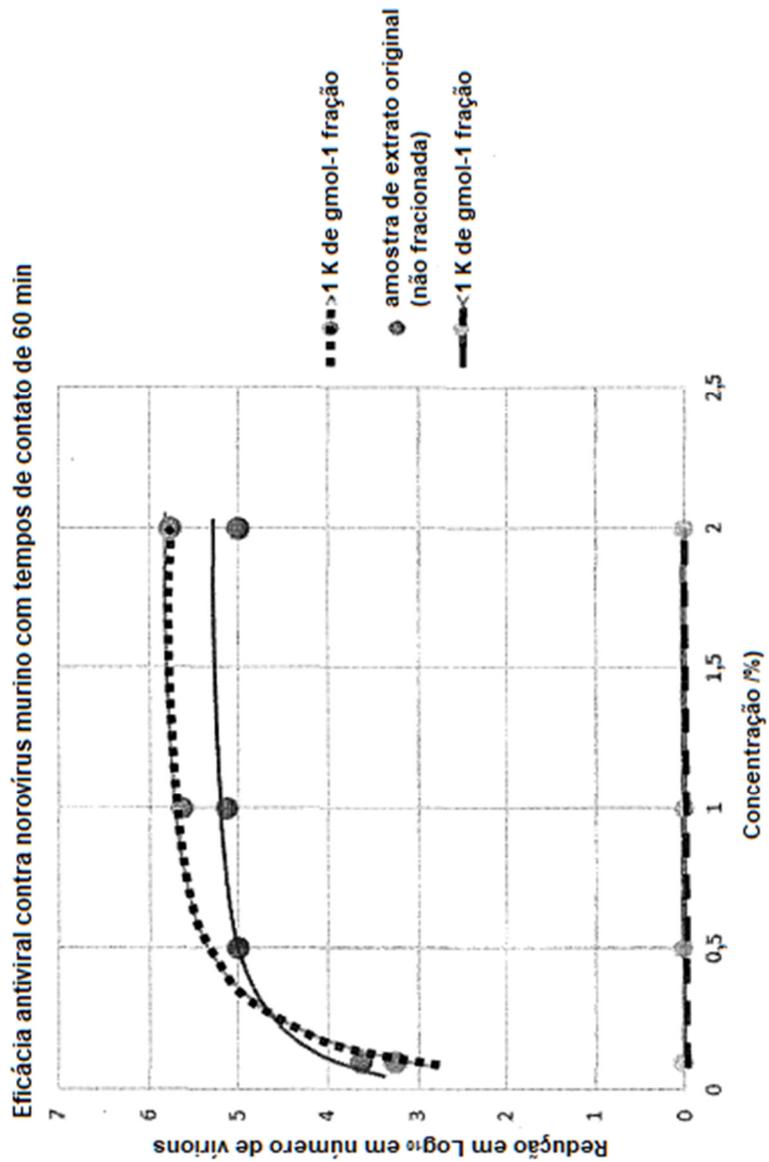
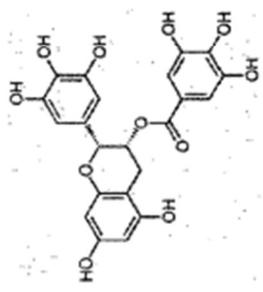


Fig 16

★ Galato de epigallocatequina (≥95%)
ex. Sigma Aldrich



● extrato de alga 'bruto' (à direita)
 - - - ● fração enriquecida com florotanino 'ligante' (à esquerda)

Eficácia antiviral contra norovirus murino com tempos de contato de 2 minutos

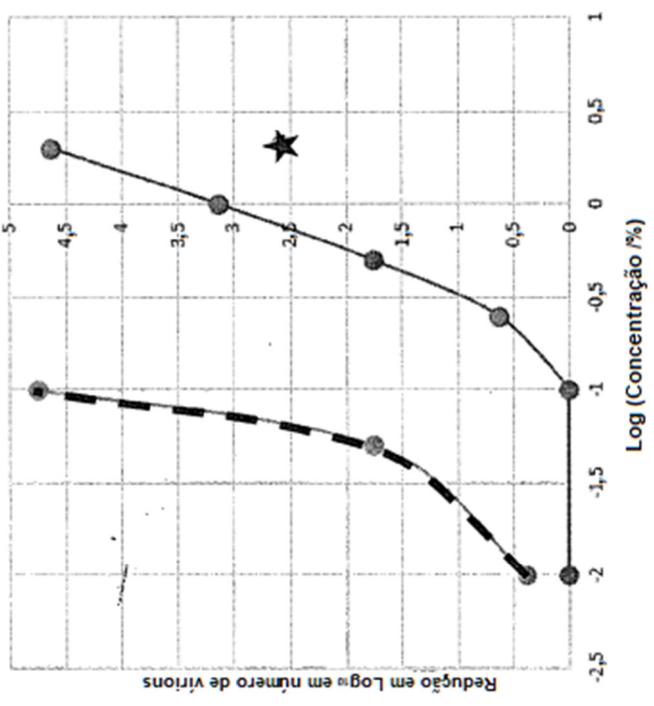


Fig 17

RESUMO

FLOROTANINO OU MISTURA DE FLOROTANINOS, USO DE UM OU MAIS FLOROTANINOS, COMPOSIÇÃO ANTIVIRAL, USO DE UMA COMPOSIÇÃO E DE UM EXTRATO, EXTRATO OBTIDO OU OBTENÍVEL A PARTIR DE ALGA MARROM, E, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM EXTRATO

A presente invenção refere-se a florotaninos com propriedades antivirais, em particular aqueles com uma massa molecular de cerca de 1000 g/mol a cerca de 3000 g/mol, que podem ser obtidos ou que são obteníveis como um extrato de alga marinha, incluindo o uso dos florotaninos ou do extrato como um agente antiviral. Além disso, ao uso dos florotaninos ou do extrato em uma composição com propriedades antivirais e ao uso da dita composição como um agente antiviral.