



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELLE CRISTINA CALEGARI

**SULFATAÇÕES REGIOSSELETIVAS EM
BOTRIOSFERANA:
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO DE
PRODUTO ANTI-HERPÉTICO**

Londrina
2024

GABRIELLE CRISTINA CALEGARI

SULFATAÇÕES REGIOSSELETIVAS EM BOTRIOSFERANA:
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO
ANTI-HERPÉTICO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lígia Carla Faccin Galhardi

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G118s Calegari, Gabrielle Cristina.
SULFATAÇÕES REGIOSSELETIVAS EM BOTRIOSFERANA : AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO ANTI-HERPÉTICO / Gabrielle Cristina Calegari. - Londrina, 2024.
175 f. : il.

Orientador: Alexandre Orsato.
Coorientador: Lígia Carla Faccin Galhardi.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.
Inclui bibliografia.

1. antiviral - Tese. 2. derivatização química - Tese. 3. glucanas - Tese. 4. hidrogéis - Tese. I. Orsato, Alexandre . II. Galhardi, Lígia Carla Faccin . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

GABRIELLE CRISTINA CALEGARI

**SULFATAÇÕES REGIOSSELETIVAS EM BOTRIOSFERANA:
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO
ANTI-HERPÉTICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana
Universidade Estadual de Ponta Grossa -
UEPG

Prof^a. Dr^a. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a. Anna Paola Butera
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 03 de abril de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora, que mesmo me faltando fé em alguns momentos, jamais soltaram a minha mão e não permitiram que eu desistisse. Obrigada pela força e por caminharem junto comigo sempre.

A minha família, que é minha base, meu porto seguro e meu coração fora de mim. Aos meus pais, Celso Calegari (em memória) e Izabel Cristina Calegari que nunca mediram esforços para dar toda educação necessária e oportunidades a mim e aos meus irmãos. Aos meus irmãos, Matheus e Marcelle, que são minha inspiração. Vocês são os amores da minha vida e sempre serão. É clichê falar, mas sim, é tudo por vocês. Aos meus cunhados Rodrigo e Nathalie, obrigada pelo apoio, ajuda em todos os momentos e por estarem sempre presentes.

Às minhas amigas de vida Jéssica Carra e Marciéli Fabris, obrigada pela amizade e companheirismo no dia a dia. Com vocês essa jornada foi mais leve e feliz. Nunca terei palavras para agradecer o que vivemos durante esse período.

Aos meus amigos (as) de Londrina, sem vocês nada disso seria possível, Gabriel Félix, Keoma Cavalcante, Fábio Abrantes, Karoline Leite, Ana Heloísa Ayala, Anna Ferrari, Ana Carolina Ramos, Débora Dahmer, Marina Luiza, Briani Bigotto, Beatriz Ticiani, Ricardo Matos. Ao Matheus Neves, por todo carinho e suporte nos últimos meses. A Maria Júlia, Luís Henrique e Arthur Bellini. Muito obrigada pela amizade e pelo apoio durante esse período.

Às minhas amigas de vida que mesmo de longe se fazem presentes, Àckilis Oriana e Raquel Klipel. Obrigada pelo apoio e por entenderem a minha falta em alguns momentos.

Às minhas amigas Carlise Ferreira, Larissa Luz, Giulia Caroline, Carolyne Braga, obrigada pelo apoio e por sempre estarem presentes mesmo distantes.

Obrigada ao meu orientador Dr. Alexandre Orsato, por toda a orientação durante esse período. Por sua determinação em acompanhar cada etapa do meu trabalho e a estar sempre disposto a me ajudar a superar os desafios que surgiram durante a nossa pesquisa. Agradeço imensamente, pela sua humanidade e paciência comigo quando mais precisei. Agradeço também a minha coorientadora Dr^a. Ligia Carla Faccin Galhardi e à Dr^a. Cátia Cristina Capêlo Ornelas Megiatto pela

orientação.

Agradeço aos laboratórios parceiros pela colaboração na pesquisa, Beta-Glucan Eireli (pela Dra. Aneli de Melo Barbosa-Dekker), à Unicamp, Laboratório de Química Prebiótica - UEL, Laboratório Multiusuário ESPEC - UEL, Laboratório Institucional de Microscopia – Unicamp, Laboratório De Microscopia Eletrônica e de Microanálise – LMEM, UEL, Laboratório de Inovação e Tecnologia Cosmecêutica – UEL, Laboratório de Virologia – UEL, Laboratório de Patologia Animal – UEL e Laboratório de Hematologia HU-UEL.

Aos professores Dr. Adriano Gonçalves Viana, Dr^a. Rubia Casagrande, Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi e a Dr^a. Anna Paola Butera pela disponibilidade de serem a minha banca avaliadora. Por corrigirem e contribuírem na melhoria desta pesquisa e também para a minha formação.

Agradeço à UEL, ao Programa de Pós-Graduação em Química e a CNPq pela concessão da bolsa (141740/2020-5).

*“Os outros... Os que amaram sem pedir compensações,
os que não lhe exigiram nada e lhe deram tudo.”
Olhai os lírios do campo
Érico Veríssimo*

RESUMO

CALEGARI, Gabrielle Cristina. **Sulfatações Regiosseletivas em Botriosferana: avaliação biológica e desenvolvimento de produto anti-herpético**. 2024. 175 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A botriosferana é uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana fúngica que apresenta diferentes funcionalidades biológicas, incluindo atividades antioxidante e imunomoduladora. Suas propriedades biológicas podem ser potencializadas por meio de modificações químicas na estrutura da macromolécula, como por exemplo, a sulfatação. Dessa forma, o presente trabalho tem como primeiro objetivo sintetizar derivados sulfatados deste exopolissacarídeo por diferentes rotas sintéticas que incluem a proteção seletiva das suas hidroxilas. Neste estudo, a sulfatação regiosseletiva foi realizada por três métodos diferentes: sulfatação branda (SB), via éster de pivaloíla (SP) e via acetonídeo (SA), a fim de comparar a atividade antiviral dos respectivos derivados. As primeiras duas metodologias produziram dois derivados sulfatados com graus de substituição de 0,82 (SB) e 0,49 (SP), com padrões de substituição nas posições C-6 e, C-2/C-4 das unidades de glucose, respectivamente. A última via, entretanto, não obteve sucesso em produzir um derivado regiosseletivamente sulfatado. Todos os derivados foram caracterizados quimicamente e avaliados quanto à atividade antiviral contra o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa KOS e dengue tipo 2 (DENV-2). A amostra sulfatada nas posições C-6 (SB) apresentou notável efeito antiviral sobre o HSV-1 (IC_{50} de $4,4 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto o derivado SP apresentou-se quase inativo. Ambos foram inativos para o vírus da dengue. Este estudo demonstrou que a presença de grupos sulfato, especialmente na posição C-6, aumentou consideravelmente a atividade antiviral da botriosferana em relação ao HSV-1, estabelecendo-se assim uma relação estrutura-atividade. O segundo objetivo deste estudo foi desenvolver produtos anti-herpéticos com a amostra antiviral mais potente obtida na etapa anterior (SB). Uma nova produção foi realizada (SB*), na qual obteve-se uma amostra com um DS (grau de substituição) um pouco superior (1,1) e com um IC_{50} de $2,52 \mu\text{g mL}^{-1}$, confirmando dessa vez, que maiores DSs contribuem para maiores atividades anti-herpéticas. O mecanismo de ação antiviral, avaliado com SB*, mostrou efeito virucida, alcançando uma inibição viral de 93% na maior concentração

testada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). A mesma amostra também demonstrou atividade anticoagulante (APTT = 1,65 (R) e t = 48 s) somente na maior concentração testada. Na sequência foram desenvolvidas duas formulações, uma contendo Laponita e outra LECIGEL®, acrescidas de SB* (na concentração de $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$), para o tratamento de lesões cutâneas causadas pela infecção por herpesvírus. As formulações foram caracterizadas por técnicas físico-químicas apropriadas, além de serem avaliadas pela sua estabilidade preliminar. Também, foram submetidos à avaliação de perfil antiviral frente ao HSV-1 (cepa KOS), desde a sua citotoxicidade, atividade antiviral *in vitro* e *in vivo*. Ambas as amostras se mostraram mais estáveis termicamente após a incorporação do ativo sulfatado (SB*). Em relação à pré-estabilidade, ambas as formulações permaneceram estáveis após estresse térmico, entretanto aquele desenvolvido a base de LECIGEL® apresentou melhor espalhabilidade. Tais materiais não apresentaram citotoxicidade em células Vero. A atividade antiviral *in vitro* demonstrou maior inibição viral com o hidrogel produzido com Laponita (68,8%). Nos testes *in vivo*, diferenças estatísticas entre o controle viral e os tratamentos foram observadas no terceiro e sexto dias pós-infecção, sugerindo uma melhora qualitativa no tratamento das lesões herpéticas para ambas as formulações. Este resultado corroborou com a avaliação a nível celular, apresentando discreta redução nas alterações morfológicas para o hidrogel de Laponita e a Base de LECIGEL®.

Palavras-chave: antiviral; derivatização química; glucanas; hidrogéis.

ABSTRACT

CALEGARI, Gabrielle Cristina. **Regioselective Sulfonation of Botryosphaeran: biological assessment and development of an antiherpetic product**. 2024. 175 f. Doctoral Thesis (Doctorate in Chemistry) – Exact Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2023.

Botryosphaeran is a fungal (1→3)(1→6)-β-D-glucan with different biological functionalities, including antioxidant and immunomodulatory. Its biological properties can be enhanced through chemical modifications in the structure of the macromolecule, such as sulfonation. In this context, the first objective of the present work was to synthesize sulfonated derivatives of this exopolysaccharide by different synthetic routes that include the selective protection of its hydroxyl groups. In this study, regioselective sulfonation was performed by three different methods: mild sulfonation (SB), via pivaloyl ester (SP), and acetonide (SA), in order to compare the antiviral activity of the respective derivatives. The first two methodologies produced two sulfonated derivatives with degrees of substitution of 0.82 (SB) and 0.49 (SP), with substitution patterns in the C-6 and C-2/C-4 positions of the glucose units, respectively. The latter route, however, was unsuccessful in producing a regioselectively sulfonated derivative. All derivatives were chemically characterized and evaluated for antiviral activity against Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain KOS and dengue fever type 2 (DENV-2). The sulfonated sample at positions C-6 (SB) showed a remarkable antiviral effect on HSV-1 (IC_{50} of $4.4 \mu\text{g mL}^{-1}$), while the SP derivative was almost inactive. Both were inactive against the dengue virus. This study demonstrated that the presence of sulfate groups, especially in the C-6 position, considerably increased the antiviral activity of botryosphaeran against HSV-1, thus establishing a structure-activity relationship. The second objective of this study was to develop antiherpetic products with the most potent antiviral sample obtained in the previous stage (SB). A new production of SB was carried out, in which a sample (SB*) was obtained with a slightly higher DS (1.1) and an IC_{50} of $2.52 \mu\text{g mL}^{-1}$, confirming that higher DSs contribute to higher antiherpetic activities. The antiviral mechanism of action, assessed with SB*, showed a virucidal effect, achieving a viral inhibition of 93% at the highest tested concentration ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). The same sample also demonstrated anticoagulant activity (APTT = 1.65 (R) and t = 48 s) only in the highest concentration tested.

Subsequently, we developed two formulations, one containing Laponite and the other LECIGEL®, both incorporating SB* (at a concentration of 1.25 mg mL⁻¹), for treating skin lesions caused by herpesvirus infection. The formulations were characterized using appropriate physicochemical techniques, and evaluated for their preliminary stability. They were also subjected to antiviral profile evaluation against HSV-1 (strain KOS), including cytotoxicity, in vitro and in vivo antiviral activity. Both samples showed greater thermal stability after the incorporation of sulfonated active ingredient (SB*). Regarding pre-stability, both formulations remained stable after thermal stress; however, the LECIGEL®-based hydrogel showed better spreadability. Such materials did not show cytotoxicity in Vero cells. In vitro antiviral activity demonstrated higher viral inhibition with the hydrogel produced with Laponite (68.8%). In in vivo tests, statistical differences between viral control and treatments were observed on the third and sixth days post-infection, suggesting a qualitative improvement in the treatment of herpetic lesions for both formulations. This result was corroborated by cellular-level evaluation, showing a slight reduction in morphological changes for the Laponite hydrogel and the LECIGEL®-based hydrogel.

Key-words: antiviral activity; chemical derivatization; glucans; hydrogels.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Representação da formação do dissacarídeo maltose (α -D-glucopiranosil-(1,4)- β -D-glucopiranoose), por meio da ligação glicosídica entre os monossacarídeos α -glucose e β -glucose. 18
- Figura 2-** Representação básica de uma parede fúngica. 23
- Figura 3-** Estrutura química da botriosferana, uma (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. 25
- Figura 4 -** Representação estrutural de β -glucanas modificadas por: (a) sulfatação, (b) carboximetilação, (c) fosforilação, (d) acetilação, (e) selenização e (f) alquilação. 27
- Figura 5-** Representação esquemática da (a) interação eletrostática entre heparan sulfato (HS) da célula hospedeira e a glicoproteína C viral (gC), e (b) interações entre os grupos sulfato do polissacarídeo sulfatado (PS) e a glicoproteína C viral (gC). 35
- Figura 6-** Representação do (a) cristal de Laponita e sua dimensão (b) da estrutura com seus respectivos átomos; (c) formação de “camadas/pilhas” dos cristais e (d) da formação do “House of Cards”. 41
- Figura 7-** Representação esquemática do processo de produção e recuperação da botriosferana nativa (BOT). 46
- Figura 8-** Fluxogramas das atividades realizadas, desde produção biotecnológica, sulfatação, caracterização química, produção das formulações, estudo de estabilidade preliminar e bioatividades. 62
- Figura 9-** Esquema geral da síntese da botriosferana sulfatada via branda (SB) e seu respectivo mecanismo de reação. 63
- Figura 10-** Cálculo da proporção de C-6 livres e ramificados na botriosferana. 64
- Figura 11-** Espectros FT-IR de BOT nativa (linha azul) e BOT sulfatada via branda (SB – linha vermelha). 66
- Figura 12-** Espectro ^1H - ^{13}C HSQC da botriosferana sulfatada SB. As regiões C6/H6 sulfatadas são indicadas, não apresentando sinais espectrais de C6/H6 com grupos OH livres. 67
- Figura 13-** Esquema geral da síntese do derivado de botriosferana SP, com as etapas de I) proteção, II) sulfatação e III) desproteção, e seus respectivos

mecanismos de reação.	69
Figura 14- Espectros FT-IR de BOT e seus derivados produzidos pela rota sintética via éster de pivaloíla (etapas de: proteção – SP-P, sulfatação – SP-S e desproteção – SP).....	70
Figura 15- Espectro de HSQC (¹ H- ¹³ C) do derivado de botriosferana SP, obtido por sulfatação pela rota via éster de pivaloíla, após a etapa de desproteção.	71
Figura 16- Espectro de RMN de ¹³ C de SP (A), obtido por sulfatação via pivaloíla, em comparação com o espectro de RMN de ¹³ C DEPT da BOT (B). C2/3/4/5/6 representam os sinais da cadeia principal dos polissacarídeos, C3'/6' representam os sinais das posições envolvidas em ramificações e C2S/4S de posições sulfatadas.	72
Figura 17- Esquema geral da síntese do derivado de botriosferana SA, com as etapas de I) proteção, II) sulfatação e III) desproteção, e seus respectivos mecanismos de reação.	75
Figura 18- Espectros FT-IR de BOT e seus derivados sulfatados pela rota sintética via acetonídeo (etapas de: proteção – SA-P, sulfatação – SA-S e desproteção – SA).....	76
Figura 19- Espectro de HSQC (¹ H- ¹³ C) do derivado de botriosferana SA, obtido por sulfatação pela rota via acetonídeo, após a etapa de desproteção.	77
Figura 20- Atividade anti-herpética, em células Vero, dos derivados sulfatados de botriosferana, SB e SP, adicionados simultaneamente à infecção por HSV-1.	79
Figura 21- Espectros FT-IR de BOT e seu derivado sulfatado pela rota sintética via branda SB* (com DS de 1,1).	84
Figura 22- Atividade anti-herpética do derivado sulfatado de botriosferana, SB* (DS: 1,1) frente a HSV-1.....	85
Figura 23- Efeito inibitório da SB* contra HSV-1 KOS em diferentes estágios da infecção viral: atividade virucida (AV) e tempos variados de adição de SB* no pré (-3 h), durante (0 h) e pós (+3 h) infecção. As letras (a, b, c, d, e, f, g e h) representam as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas para cada ensaio (p<0,05).	87
Figura 24- Espectros FT-IR de BOT e seu derivado exaustivamente sulfatado pela rota sintética via persulfatação SPer (com DS de 1,2).	89
Figura 25- Aspecto das formulações a base de (a) Laponita e (b) LECIGEL®.	91

Figura 26- Micrografias da BOT (a, b, c) e da amostra sulfatada SB* (d, e, f) por MEV.	93
Figura 27- Micrografias (MEV) das formulações a base de Laponita (a, b), e LECIGEL® (c, d), com o ativo SB* incorporado.	95
Figura 28- Curvas dos perfis térmicos (TGA e DTG) das amostras de BOT nativa (a) e sulfatada SB* (b).	97
Figura 29- Curvas dos perfis térmicos (DSC) das formulações nas faixas de (a) -20 a 200 °C e (b) 25 a 100 °C.	99
Figura 30- Resultados do teste de centrifugação (a) pré-estabilidade e (b) após 15 dias.....	101
Figura 31- Perfil de espalhabilidade das amostras (Base LECI, HID LECI, Base LAP e HID LAP) (a) pré e (b) pós estresse térmico de 15 dias.	103
Figura 32- Embalagem para comercialização futura das formulações, como produtos antivirais.	104
Figura 33- Atividade citotóxica das formulações desenvolvidos (HID LECI, Base LECI, HID LAP e Base LAP).	106
Figura 34- Citotoxicidade (% de células viáveis) em células Vero, após 72 h de contato com as formulações, nas diluições (1/10 e 1/100).....	107
Figura 35- Atividade antiviral in vitro das formulações desenvolvidos (HID LECI, Base LECI, HID LAP e Base LAP).....	108
Figura 36- Resultados da irritação dérmica após sete dias de observação (a) grupo controle e (b) aplicação das formulações teste.	110
Figura 37- Resultados de escore da análise in vivo, referentes a todos os dias de experimento, aplicando as formulações testadas.	112
Figura 38- Resultado da atividade antiviral in vivo do (a) terceiro e (b) sexto dia, aplicando as formulações testadas.	112
Figura 39- Resultados da análise in vivo durante todos os dias de aplicação das formulações testadas (Base LAP, HID LAP, HID LECI e Base LECI) em feridas geradas pela infecção pelo HSV-1 (KOS).....	113
Figura 40 - Resultados dos controles (a) negativo e (b) positivo da análise antiviral in vivo.	114
Figura 41- Fotomicrografias das lesões observadas. a) Grupo escarificação, sem alterações histopatológicas. b) Grupo controle viral, há moderada hiperqueratose, hiperplasia epidérmica e necrose epidérmica. O infiltrado	

inflamatório é moderado a acentuado e composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raros neutrófilos que expandem a derme e invadem a epiderme. c) Grupo base LAP, observa-se alterações proliferativas moderadas (hiperceratose e hiperplasia epidérmica) com discreta espongiose e infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos na derme. d) Grupo HID-LAP, há discreta hiperkeratose, inflamação em derme, necrose epidérmica e espongiose.

.....116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras produzidas com a sulfatação via branda.....	47
Tabela 2- Formulação do hidrogel à base de Laponita.	50
Tabela 3- Formulação do gel-creme à base de LECIGEL®.....	50
Tabela 4- Grupos de animais, vírus inoculado e respectivos tratamentos.	58
Tabela 5- Atribuição de RMN de ^{13}C de botriosferanas (nativa e sulfatada - SB) em D_2O ($0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$).	67
Tabela 6- Atribuição dos espectros de RMN de ^{13}C de botriosferanas (nativa e sulfatada - SP) em D_2O ($0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$).	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

%IV	Inibição viral
ADE	Aumento dependente de anticorpos
anti-DENV-2	Atividade antiviral frente dengue tipo 2
anti-HSV-1	Atividade antiviral frente herpes simplex tipo 1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Base LAP	Base do hidrogel de Laponita
Base LECI	Base do gel-creme de LECIGEL®
BOT	Botriosferana nativa
C	Capsídeo
CC	Controle celular
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50%
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
CTMS	Clorometilsilano
CV	Controle viral
CV%	Porcentagem de viabilidade celular
d	Densidade
DENV	Dengue
DENV-2	Dengue tipo 2
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMEM-SF	Meio de Eagle modificado por Dulbecco sem soro fetal bovino
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT-CI	Cloreto de 4,4'-dimetoxitritilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D-PBS	Tampão fosfato salino de Dulbecco
DS	Grau de substituição
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
DTG	Análise de Termogravimetria Derivada
E	Proteína de envelope

EPS	Exopolissacarídeos
Et ₃ N	Trietilamina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHD	Dengue febre hemorrágica
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GACVS	<i>Global Advisory Committee on Vaccine Safety</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
GalNAc	N-acetilgalactosamina
gE	Glicoproteínas E
HCISO ₃	Ácido clorossulfônico
HID LAP	Hidrogel de Laponita
HID LECI	Gel-creme de LECIGEL®
HMDS	Hexametildissilazano
HS	Heparan sulfato
HS3ST3a1	Sulfotransferase
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSV-1	Herpes simplex tipo 1
HSV-1 KOS	Herpes simplex tipo 1 cepa KOS
HSV-2	herpes simplex tipo 2
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50%
M	Proteína de membrana
m	Massa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Mieloma múltiplo
MMV	Meio mínimo de Vogel
MOI 1	Multiplicidade de infecção 1
MTSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,6-difeniltetrazólio
MWCO	Molecular weight cut-off
Na ₂ HPO ₄	Solução de tampão fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato de salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pH	Potencial hidrogeniônico
PivCl	Cloreto de pivaloila
PN2TA	Linha celular normal da próstata humana
PS	Polissacarídeos sulfatados
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluenosulfônico
PVP-PA	Poli(N-vinil pirrolidona)-b-poli(D,L-alanina)
Py	Piridina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN 2D	Ressonância magnética nuclear bidimensional
rpm	Rotações por minuto
SA	Sulfatação via acetonídeo
SAGE	<i>Strategic Advisory Group of Experts</i>
SA-P	Sulfatação via acetonídeo - proteção
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2
SA-S	Sulfatação via acetonídeo - sulfatação
SB	Sulfatação branda
SB*	Sulfatação via branda (DS 1,1)
SPer	Sulfatação através da persulfatação
SCD	Síndrome do choque da dengue
SDC-1	Sindecin-1
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SI	Índice de seletividade
Sk-Mel-28	Célula de melanoma maligno
SN2	Substituição nucleofílica bimolecular
SO ₃ -DMF	Complexo de trióxido de enxofre N,N-dimetilformamida
SO ₃ -Py	Complexo trióxido de enxofre-piridina
SP	Sulfatação via éster de pivaloíla
SP-P	Sulfatação via pivaloíla - proteção
SP-S	Sulfatação via pivaloíla - sulfatação
SU-DHL-8	Linfoma difuso de células B
TCA	Ácido tricloroacético

TCID50	50% da dose infecciosa de cultura de tecidos
TGA	Análise Termogravimétrica
TV	Títulos virais
v	Volume
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1	POLISSACARÍDEOS	18
3.1.1	POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS	20
3.1.2	EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS).....	21
3.2	GLUCANAS	22
3.2.1	BOTRIOSFERANA (BOT)	24
3.3	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS	26
3.3.1	SULFATAÇÃO	28
3.3.1.1	REAÇÕES DE SULFATAÇÃO REGIOSSELETIVA	30
3.3.1.2	REAÇÕES DE DESSULFATAÇÃO REGIOSSELETIVA.....	31
3.3.1.3	REAÇÕES COM INSERÇÃO REGIOSSELETIVA DE GRUPOS SULFATO MULTIETAPAS	31
3.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS À SULFATAÇÃO.....	32
3.4.1	HERPESVIRUS.....	34
3.4.2	DENGUE.....	36
3.5	HIDROGÉIS	39
3.5.1	LAPONITA.....	40
3.5.2	LECIGEL ®.....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	PRODUÇÃO DA BOTRIOSFERANA NATIVA.....	45
4.2	DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS DA BOTRIOSFERANA POR SULFATAÇÃO	46
4.2.1	SULFATAÇÃO BRANDA	46
4.2.2	SULFATAÇÃO VIA ÉSTER DE PIVALÓILA.....	47
4.2.3	SULFATAÇÃO VIA ACETONÍDEO	48
4.3	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS).....	49

4.4	PREPARAÇÃO DO HIDROGEL COM LAPONITA.....	49
4.5	PREPARAÇÃO DO GEL-CREME COM LECIGEL®.....	50
4.6	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	50
4.7	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	51
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	51
4.9	ANÁLISE TÉRMICA.....	51
4.10	ESTABILIDADE PRELIMINAR DAS FORMULAÇÕES	52
4.10.1	DENSIDADE	52
4.10.2	ESPALHABILIDADE.....	53
4.10.3	TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO.....	53
4.11	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	54
4.11.1	CÉLULAS E VÍRUS.....	54
4.11.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	54
4.11.3	ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	55
4.11.4	INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	56
4.11.4.1	ENSAIO VIRUCIDA	56
4.11.4.2	TEMPO DE ADIÇÃO.....	57
4.11.5	AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO DÉRMICA E EFICÁCIA ANTIVIRAL <i>IN VIVO</i>	58
4.11.6	HISTOLOGIA.....	59
4.11.7	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	60
4.11.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1	FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	61
5.2	SULFATAÇÃO BRANDA (SB) E CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS	62
5.3	SULFATAÇÃO VIA ÉSTER DE PIVALOÍLA E CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS	67
5.4	SULFATAÇÃO VIA ACETONÍDEO E CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS	73
5.5	CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DOS DERIVADOS SULFATADOS DE BOTRIOSFERANA	77
5.6	OBTENÇÃO DE AMOSTRA SULFATADA (SB*) E CARACTERIZAÇÃO PARA PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	82
5.6.1	PERSULFATAÇÃO	88
5.7	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA BOTRIOSFERANA NATIVA E SULFATADA.....	90

5.8	OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE BOT SULFATADA A BASE DE LAPONITA E LECIGEL®.....	91
5.8.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES	92
5.8.1.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	92
5.8.1.2	ANÁLISE TÉRMICA	96
5.8.2	ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	100
5.9	ANÁLISES BIOLÓGICAS DAS FORMULAÇÕES	104
5.9.1	CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DAS FORMULAÇÕES	104
5.9.2	AVALIAÇÃO ANTIVIRAL <i>IN VIVO</i> DAS FORMULAÇÕES	109
5.9.3	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	115
6	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	121
	ANEXOS.....	138
	ANEXO A - ESPECTRO DE HSQC (¹ H- ¹³ C) DE BOTRIOSFERANA NATIVA (BOT).	138
	ANEXO B – PATENTE: BR 10 2024 004565 3.....	139

1 INTRODUÇÃO

As doenças virais são uma ameaça constante à população mundial, como as causadas por Herpes e Dengue vírus, com grande impacto especialmente no Brasil, atingindo boa parcela da população. Diversos estudos têm demonstrado a atividade antiviral de polissacarídeos, obtidos a partir de fontes naturais, destacando-se os naturalmente sulfatados ou modificados quimicamente, como os estudados neste trabalho.

Os polissacarídeos microbianos são uma classe de biomacromoléculas que possuem uma variedade diversificada de características estruturais químicas e físicas. É importante mencionar que as diferenças estruturais e conformacionais interferem diretamente nas funcionalidades biológicas que estas macromoléculas podem apresentar. Neste contexto, é estratégica a busca por novas glucanas, incluindo a obtenção de derivados quimicamente modificados, os quais podem apresentar novas funcionalidades biotecnológicas ou ainda terem suas propriedades de interesse potencializadas.

As β -D-glucanas (polímeros de β -D-glucopirranose) são um grupo de polissacarídeos que ganharam destaque na literatura nas últimas décadas, e que são obtidos pela extração do material da parede celular (fungos, algas e cereais) ou ainda como exopolissacarídeos (EPS). Entre estes últimos está o EPS fúngico denominado botriosferana, uma β -D-glucana ramificada do tipo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6), produzida pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, que apresenta diversas bioatividades, como atividade antitumoral, antimutagênica, antioxidante, imunomodulatória, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, dentre várias outras (BARBOSA et al., 2003).

Dentre as modificações químicas que podem potencializar as funcionalidades biológicas dos polissacarídeos, é destacada a sulfatação. A sulfatação é uma reação que envolve a substituição nucleofílica nos grupos hidroxila presentes nas unidades monoméricas, por grupamentos sulfônicos (-SO₃H) (SACCHELLI et al., 2019). Tais derivatizações têm se destacado por conferir principalmente atividades antivirais e anticoagulantes às moléculas.

Essas derivatizações químicas, quando não direcionadas, ocorrem de forma aleatória na estrutura do polissacarídeo, e são criados padrões estruturais que levam em conta apenas as características intrínsecas de cada molécula, como o tipo de ligação glicosídica e a liberdade rotacional. Modificações químicas, como a

sulfatação, no entanto, podem ser impostas para ocorrer regioseletivamente usando a estratégia de proteção-sulfatação-desproteção (BEDINI et al., 2017). Nesse processo, são realizadas várias etapas de semissínteses envolvendo o uso de grupos protetores adequados, nas quais, ao final da rota sintética, são obtidos derivados sulfatados previstos e direcionados, possibilitando assim um entendimento mais profundo da relação estrutura-atividade.

Na primeira parte deste estudo, o objetivo foi produzir derivados regioseletivamente sulfatados de botriosferana ((1→3)(1→6)-β-D-glucana), a fim de se verificar qual padrão de sulfatação apresenta melhor atividade antiviral frente a dois vírus envelopados (Dengue e Herpes). Três rotas sintéticas foram consideradas: sulfatação branda (SB), sulfatação via éster de pivaloíla (SP) e a sulfatação via acetônio (SA), tais reações foram avaliadas para a preparação das botriosferanas substituídas regioseletivamente. Todas as botriosferanas sulfatadas foram caracterizadas estruturalmente por RMN 1D e 2D (HSQC), FT-IR e foi determinado seu grau de substituição. Adicionalmente, a citotoxicidade, a atividade antiviral (anti-HSV-1 cepa KOS e anti-DENV-2), atividade anticoagulante e o mecanismo de ação dos derivados foram avaliados *in vitro*, a partir dos quais foi possível propor uma relação estrutura-atividade.

A atividade antiviral das botriosferanas sulfatadas, com diferentes sequências reacionais, foi atestada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa contra herpes e dengue vírus, bem como a sua ausência de citotoxicidade. A botriosferana nativa exerceu uma inibição moderada para ambos os vírus, entretanto, os seus derivados sulfatados foram consideravelmente mais potentes. SACHELLI e colaboradores (2019) sulfataram aleatoriamente a botriosferana com um DS de 1,1, que apresentou IC₅₀ de 2,4 µg mL⁻¹ (HSV-1). Quando a botriosferana foi primeiramente carboximetilada e posteriormente sulfatada (LOPES et al., 2021), o derivado apresentou um IC₅₀ de 12,4 µg mL⁻¹ (HSV-1), com um DS de 0,1. Quando submetida à oxidação e posteriormente à sulfatação (Flávia Deduch, artigo para publicação sendo redigido), o respectivo derivado da botriosferana apresentou IC₅₀ de 10,2 µg mL⁻¹ (HSV-1), com um DS de 0,3. A presença dos grupos sulfato mostrou-se imprescindível para o aumento da atividade antiviral, a qual resultou ser diretamente proporcional ao grau de sulfatação, mas também influenciada, em menor grau, pela presença de outros grupos aniônicos (carboxilatos).

Em um segundo momento, com a relação estrutura-atividade de botriosferanas sulfatadas já definida, procedeu-se com o desenvolvimento de um produto antiviral. Propõe-se o uso destas substâncias ativas para o tratamento das lesões cutâneas causadas pela replicação do vírus herpes simples. Para isso, duas formulações de géis (uma contendo Laponita e outra LECIGEL®) contendo um derivado sulfatado de botriosferana foram preparadas. Estes géis foram caracterizados por técnicas físico-químicas apropriadas, além de serem avaliados pela estabilidade preliminar e requisitos como espalhabilidade, pH, densidade e pelo teste de centrifugação. Por fim foram caracterizados por sua citotoxicidade e seu perfil antiviral frente ao HSV-1, cepa KOS, considerando a atividade antiviral *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo sulfatar a botriosferana regioseletivamente, caracterizar os derivados e avaliar sua atividade antiviral, a fim de propor uma relação estrutura-atividade, para então desenvolver produto tópico biotecnológico para o tratamento de lesões cutâneas causadas pela replicação do herpes simplex vírus.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar a botriosferana quimicamente por sulfatação regioseletiva, gerando três padrões distintos de sulfatação;
- Determinar o padrão de substituição dos derivados por técnicas químicas e espectroscópicas;
- Avaliar o potencial citotóxico e a atividade antiviral *in vitro* dos derivados frente aos vírus da Dengue e da Herpes simples;
- Avaliar a atividade anticoagulante dos derivados;
- Estabelecer a relação estrutura-atividade antiviral dos compostos ativos;
- Avaliar o mecanismo de ação antiviral (HSV-1 KOS) da amostra de botriosferana sulfatada mais ativa;
- Desenvolver duas formulações, uma a base de Laponita e outra à base de LECIGEL®;
- Caracterizar estas duas formulações por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por análise térmica (DSC);
- Avaliar a estabilidade preliminar das formulações através das características organolépticas, além dos requisitos de espalhabilidade, pH, densidade e pelo teste de centrifugação;
- Avaliar as formulações pela citotoxicidade e eficácia da atividade antiviral *in vitro* e *in vivo*;
- Confirmar a avaliação antiviral *in vivo* através da análise histológica.

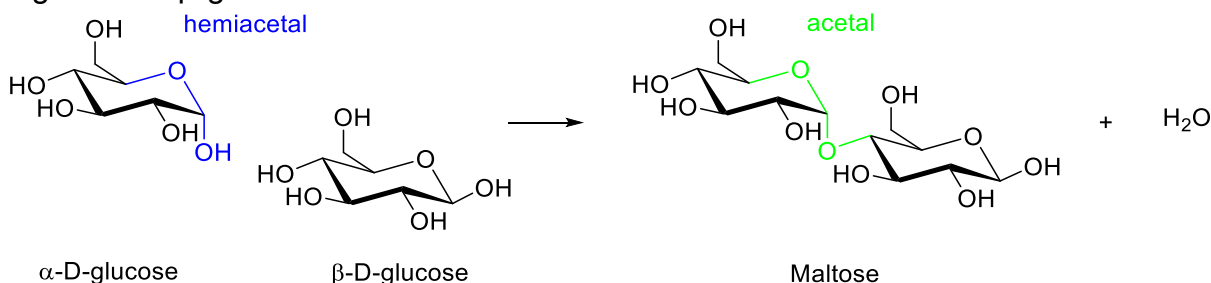
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são carboidratos poliméricos que podem ser encontrados de diversas formas na natureza. Presentes em plantas e vegetais, células animais, fungos, bactérias e algas, e ainda em sementes e exsudados de árvores, podem desempenhar diferentes papéis nesses organismos, como componentes estruturais, armazenamento de energia, lubrificação e transdução de sinal celular, por exemplo (XIAO; GRINSTAFF, 2017; ZHANG et al., 2022b).

Tais estruturas são formadas pela condensação de monossacarídeos, como ribose, glucose e frutose, que são unidas por ligações O-glicosídicas. Essas ligações são formadas pela condensação ou desidratação do grupo hidroxila hemiacetal de um monossacarídeo e um grupo hidroxila de outra unidade, como mostrado na Figura 1.

Figura 1- Representação da formação do dissacarídeo maltose (α -D-glucopiranosil-(1,4)- β -D-glucopiranosose), por meio da ligação glicosídica entre os monossacarídeos α -glucose e β -glucose.



Fonte: o próprio autor

Os polissacarídeos podem se diferenciar pela configuração espacial (α ou β), pela região de ligação ((1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6)), pelo grau de ramificação, peso molecular, tamanho de suas cadeias, composição monossacarídica (homo ou heteropolissacarídeos) e presença ou não de grupos funcionais além das hidroxilas (XIAO; GRINSTAFF, 2017; ZHANG et al., 2022b). A forma específica como são formados confere características de estrutura-atividade específicas também, de forma que, qualquer mudança alteraria também aspectos funcionais das moléculas. Tais aspectos serão discutidos com mais atenção neste trabalho.

Como citado anteriormente, os polissacarídeos são componentes das mais diversas formas de vida na Terra. Macromoléculas de origem vegetal, por exemplo, têm se destacado tanto na literatura científica quanto nas aplicações industriais, como materiais com propriedades biotecnológicas (DANGI et al., 2022).

A curdlana é uma glucana do tipo β -(1→3) linear, produzida extracelularmente por bactérias, principalmente pela Gram-negativa não patogênica *Agrobacterium* sp. (PRZEKORA et al., 2022). Além das diversas aplicações industriais descritas na literatura (estabilizantes e transportadores de drogas, por exemplo), Przekora et al., (2022) relataram o uso deste biopolímero em um termogel para implementação em remodelação óssea após implante. Da mesma forma Perveen et al., (2021) relataram a produção de uma (1→3)- β -glucana, extraída de uma alga denominada *Euglena gracilis*. Tal glucana, apesar de possuir a mesma constituição estrutural ((1→3)- β -glucana) da curdlana, provém de uma fonte diferente, o que altera consideravelmente suas propriedades biológicas. Isso porque é preciso levar em conta, além da fonte de extração, o processo de purificação e peso molecular do polissacarídeo, por exemplo. Tais autores relataram propriedades como imunomoduladoras, nas quais atuaram ainda como antioxidantes e antiparasitárias contra *Mesanothryx* sp.

As galactomananas são extraídas de endosperma de sementes de plantas, e são constituídas por uma cadeia principal linear de β -(1→4)-D-manana, com resíduos D-galactose na posição do C-6 (DANGI et al., 2022). Tais moléculas, por serem resistentes às secreções digestivas humanas do intestino e ao suco gástrico, podem ser utilizadas como fibras alimentares e prebióticos, além de serem utilizados como sistema de liberação de fármacos (DANGI et al., 2022).

A goma arábica é produzida a partir do exsudado da árvore *Acacia senegal* e é constituída por unidades de β -(1→3)-D-galactopiranosil, com cadeias laterais de duas a cinco unidades β -(1→3)-D-galactopiranosil, unidas à cadeia principal por ligações (1→6) (ALI; ZIADA; BLUNDEN, 2009). Possui aplicações em diversas áreas, como alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxteis (PRASAD et al., 2022). Nyaguthii; Omwamba; Nduko, (2023) investigaram a introdução de goma arábica e de concentrado de proteína de soja como agentes ligantes, em análogos de salsicha à base de cogumelos. Neste estudos foram investigadas as características de qualidade e propriedades nutricionais desses produtos (salsichas), nos quais

obtiveram resultados promissores como: composição centesimal (teor de proteína, gordura, cinzas e fibras) significativamente elevada; encolhimento de diâmetro e comprimento por cozimento em tempos menores; rendimento, retenção de água e óleo superiores; melhores propriedades antimicrobianas; melhores escores sensoriais, demonstrando que tais agentes ligantes, quando adicionados em formulações alimentícias, podem otimizar as propriedades funcionais dos produtos.

Além disso, polissacarídeos oriundos de células animais também são largamente utilizados. A quitina é um dos biopolímeros naturais mais abundantes no planeta, a qual é extraída principalmente de crustáceos e insetos, entretanto, por não ser solúvel em água e em outros solventes orgânicos, é limitada quanto a suas aplicações. Já a sua forma desacetilada, conhecida como quitosana, por ser mais solúvel em água, apresenta mais aplicações em indústrias agrícolas, alimentícias e cosméticas (MOHAN et al., 2022). Loron et al., (2023) avaliaram o uso da quitosana como biofungicida contra o crescimento de *Fusarium graminearum*. Neste estudo, os autores verificaram que a quitosana levou à diminuição da produção de micotoxinas por *F. graminearum*, e a capacidade de formação de filme da quitosana, quando pulverizada na planta, levou à inibição do crescimento do micélio fúngico.

3.1.1 Polissacarídeos microbianos

Além dos polissacarídeos de origem celular e de células animais, os de origem microbiana vêm ganhando espaço no mercado mundial. São promissores tanto no mercado industrial, alimentício e têxtil, como espessantes, umectantes e texturizantes, por exemplo, quanto na indústria farmacêutica e cosmética, demonstrando capacidade no tratamento de importantes doenças e outras bioatividades como antioxidantes e antimicrobianas.

A produção dos polissacarídeos microbianos pode ser considerada mais vantajosa quando comparada com aquela proveniente de fontes vegetais e animais. Sua produção, quando monitorada em laboratório, pode ser facilmente controlada quanto a parâmetros fermentativos, levando a um produto mais uniforme em relação às propriedades físico-químicas, além de um crescimento mais rápido, produção e isolamento também mais efetivos, evitando dessa forma interferências externas e sazonalidades (ZHANG et al., 2022b). Entretanto, vale ressaltar que

diferentes parâmetros de produção podem levar a produtos com características diferentes.

Os microrganismos são capazes de sintetizar polissacarídeos com uma estrutura química regular, composta de duas a oito unidades de repetição de açúcar, com conformação estereoregular e de forma helicoidal (XU et al., 2019). Além disso, os substituintes afetam as interações inter e/ou intracadeia, entretanto, tal assunto será discutido com mais atenção adiante.

3.1.2 Exopolissacarídeos (EPS)

Os polissacarídeos microbianos podem ser classificados de acordo com a sua disposição celular. Podem ser divididos em polissacarídeos extracelulares, polissacarídeos de parede celular e polissacarídeos intracelulares (ZHANG et al., 2022b).

Os exopolissacarídeos (EPS) são aqueles que são secretados para fora da célula durante o crescimento e metabolismo dos microrganismos, formando uma camada sobre a superfície do organismo, podendo atuar como uma barreira física, a qual impede o acesso de substâncias nocivas, ou ainda pode evitar uma desidratação quando presentes em ambientes não favoráveis (LEI; EDMUND, 2019; ZHANG et al., 2022b). Dessa forma, a biossíntese dessas macromoléculas pode estar relacionada tanto a capacidade de sobrevivência em condições adversas, quanto em condições ótimas de incubação, onde produzem essas biomoléculas como reserva energética.

A produção dos EPS pode se dar por bactérias (tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas), algumas algas e fungos, quando cultivados em condições de fermentação submersa (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Sua extração é consideravelmente mais vantajosa quando comparada com polissacarídeos intracelulares e de parede celular, sendo mais fácil seu isolamento e purificação. Além disso tendem a apresentar maior produtividade, pois alguns EPS são sintetizados durante todo crescimento microbiano, enquanto outros são produzidos somente durante a fase estacionária (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

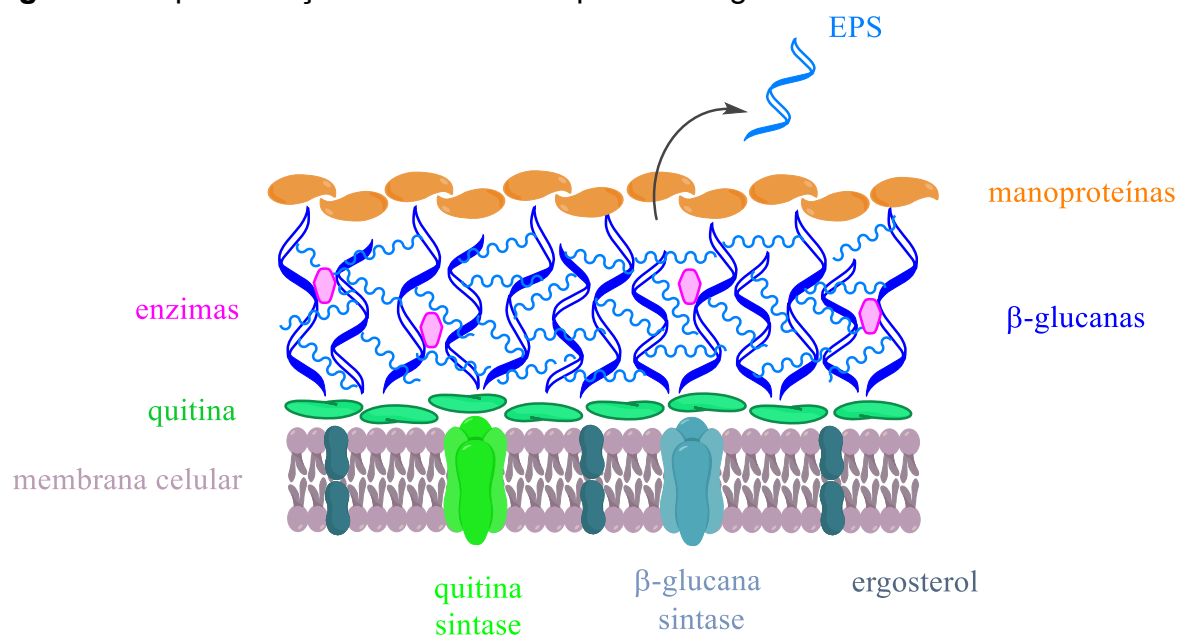
Parâmetros fermentativos como tempo de cultivo, fontes de carbono e nitrogênio, pH e aeração são importantes aspectos a serem avaliados durante a produção dos EPS, pois é através deles que propriedades e características são determinadas. Nesse sentido, Cunha et al., (2012) avaliou a produção de uma (1→6)- β -D-glucana fúngica (*Lasiodiplodana*) sob os efeitos de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e meios de produção. Maiores rendimentos foram obtidos quando a fermentação foi conduzida em frascos sob agitação (*shaker*), utilizando-se glucose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Além disso, tais macromoléculas têm a possibilidade de serem produzidas a partir de resíduos agroindustriais como matéria-prima. Acosta et al., (2020) avaliaram pela primeira vez a produção de *Lasiodiplodana* fúngica, utilizando melaço de soja como matéria prima, no qual a *Lasiodiplodia theobromae* foi capaz de assimilar os açúcares do melaço em 98,3%, com um rendimento de 0,01 g L⁻¹. Abdeshahian et al., (2020), estudaram a utilização da palha de cana-de-açúcar, uma fonte alternativa, para a produção de um EPS β -glucana fúngica, gerando um rendimento de 0,014 g L⁻¹.

3.2 GLUCANAS

As β -glucanas são polímeros de glucose encontradas nas paredes celulares de microrganismos, como leveduras, bactérias e fungos, além de algas e plantas, como aveia e cevada, ou ainda como exopolissacarídeos (EPS). A composição polissacarídica da parede celular fúngica típica está apresentada na Figura 2. Apesar de serem compostas por apenas um tipo de monossacarídeo, a diversidade estrutural é vislumbrada pelas diferentes configurações (α ou β), ramificações (ou linear) e tamanho das cadeias (KAGIMURA et al., 2015a).

Figura 2- Representação básica de uma parede fúngica.



Fonte: Adaptado de Geoghegan; Steinberg; Gurr, (2017)

As β -glucanas são polissacarídeos constituídos por unidades de D-glucose, unidos por ligações beta-glicosídicas. Podem se diferenciar estruturalmente, dependendo da fonte, na qual aquelas de origem vegetal encontram-se geralmente sob a forma de cadeias lineares unidas por ligações glicosídicas (1→4) com algumas ligações (1→3). Já as obtidas de algas e bactérias comumente apresentam cadeias lineares do tipo (1→3), enquanto as de origem fúngica apresentam ligações do tipo (1→3) com ramificações curtas em (1→6). Por fim, aquelas produzidas por leveduras tendem a produzir ligações do tipo (1→3) com ramificações mais longas em (1→6) (MORENO-MENDIETA et al., 2017; VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008).

Além disso, diferenciam-se estruturalmente pelo tamanho das cadeias poliméricas, lineares ou ramificadas, peso molecular e conformação estrutural (única hélice, tripla hélice e hélice aleatória). Tais diferenças estruturais influenciam principalmente as propriedades físico-químicas e biológicas que essas macromoléculas podem apresentar (HAN et al., 2022).

Destacam-se nos setores farmacêutico e biotecnológico por atuarem como modificadores de resposta biológica (RIZZI et al., 2023; XIN et al., 2022), apresentarem capacidade antioxidante e anti-idade (MA et al., 2022), antimicrobiana (ZHANG et al., 2022a), antiviral (KRISHNAN; JANG; OH, 2022), antidiabética (GUO et al., 2023; LI et al., 2023b; ZANG et al., 2023), dentre várias outras.

Além disso, em estudo desenvolvido recentemente por Liao et al.,

(2022), pesquisadores verificaram que uma β -glucana fúngica (*Aureobasidium pullulans*) foi eficiente contra um linfoma difuso de grandes células B, células SU-DHL-8 (linfoma difuso de células B), *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que o EPS aumentou a inibição da SU-DHL-8, teve efeitos antitumorais *in vivo* e melhorou a resposta do sistema imunológico do hospedeiro.

As glucanas também são largamente utilizadas nas indústrias alimentícias como espessantes, estabilizantes, emulsificantes e gelificantes (CUI et al., 2023). Sarteshnizi et al., (2014) estudaram a formulação de salsicha prebiótica contendo amido, β -glucana de aveia e amido resistente, avaliando as interações entre tais macromoléculas na salsicha. No embutido, a β -glucana exerceu no que se refere a padrões tecnológicos, efeitos positivos em relação a dureza, cor e suculência. Atuam como parabióticos (YUAN et al., 2023), podem ser utilizadas como aditivos em rações (DOU et al., 2023; REIS et al., 2022) e também em vacinas para animais (HUO et al., 2023).

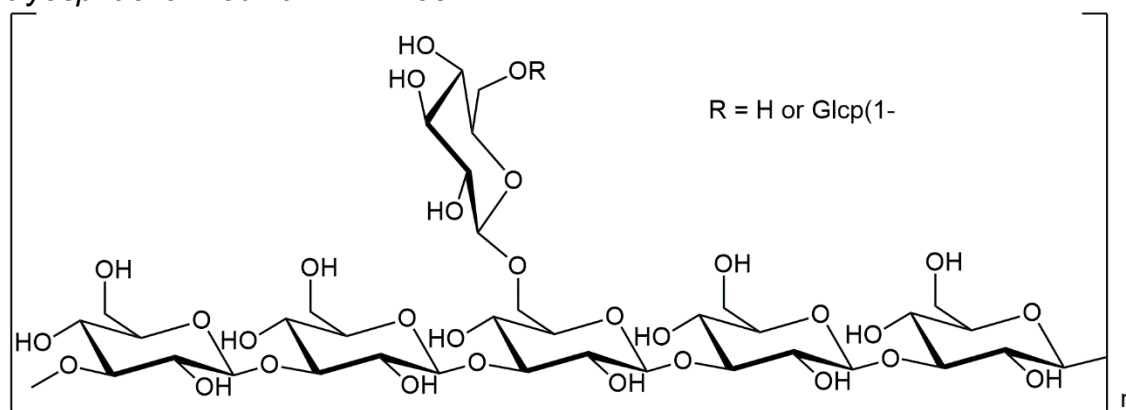
3.2.1 Botriosferana (BOT)

A botriosferana é uma $(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ - β -D-glucana extracelular, conforme ilustrado na Figura 3, sintetizada pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-05) quando cultivado em meio submerso enriquecido com glucose e sacarose (BARBOSA et al., 2003; DE LOURDES CORRADI DA SILVA et al., 2005). Este homopolissacarídeo é composto exclusivamente por unidades de glucose, sendo suas cadeias conectadas por ligações glicosídicas, onde a cadeia principal é unida por ligações nas posições $(1\rightarrow3)$, e as ramificações ocorrem em $(1\rightarrow6)$. A botriosferana é caracterizada como um polissacarídeo ramificado, apresentando resíduos de glucose ou gentiobiose (β -D-glucopiranosil- $(1\rightarrow6)$ - β -D-glucopiranosose) a cada aproximadamente cinco unidades monossacarídicas da cadeia principal. As unidades da cadeia principal contêm três regiões potenciais para substituição, localizadas em C-2, C-4 e C-6. Quando essas unidades são ramificadas, os pontos disponíveis para conexão são C-2 e C-4, devido à ramificação presente na posição C-6. Essas características estruturais foram consideradas nos processos de modificação investigados neste estudo.

Além de ser facilmente recuperada do caldo de cultivo, pelo processo

de precipitação em etanol 95% (v/v), sua produção pode ser considerada mais simples, econômica, ambientalmente menos agressiva quando comparada com processos de produção de polissacarídeos intracelulares de origem microbiana e vegetal, por exemplo.

Figura 3- Estrutura química da botriosferana, uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.



Fonte: Sacchelli et al., (2019)

Esta macromolécula vem se destacando por apresentar diversas funções biológicas. Estudos destacaram que a botriosferana tem uma capacidade significativa de reduzir tumores (GERALDELLI et al., 2020); reduzir a obesidade, esteatose hepática e dislipidemia (SILVA et al., 2018). Possui as seguintes atividades: antimutagenicidade, antiaterogenicidade (MIRANDA-NANTES et al., 2011; SILVA-SENA et al., 2018); atividade antioxidante (GIESE et al., 2015); imunomodulação (MALINI et al., 2015); hipoglicemia (antidiabético) e hipocolesterolemia (MIRANDA-NANTES et al., 2011); e atividade antiproliferativa de câncer de mama (QUEIROZ et al., 2015).

A botriosferana nativa é um polissacarídeo neutro, cujas propriedades biológicas, citadas acima, são justificadas pelo sinergismo das características estruturais básicas (WANG et al., 2023), como a constituição da cadeia principal e das cadeias ramificadas, o peso molecular e tipo de ligação (WANG et al., 2023).

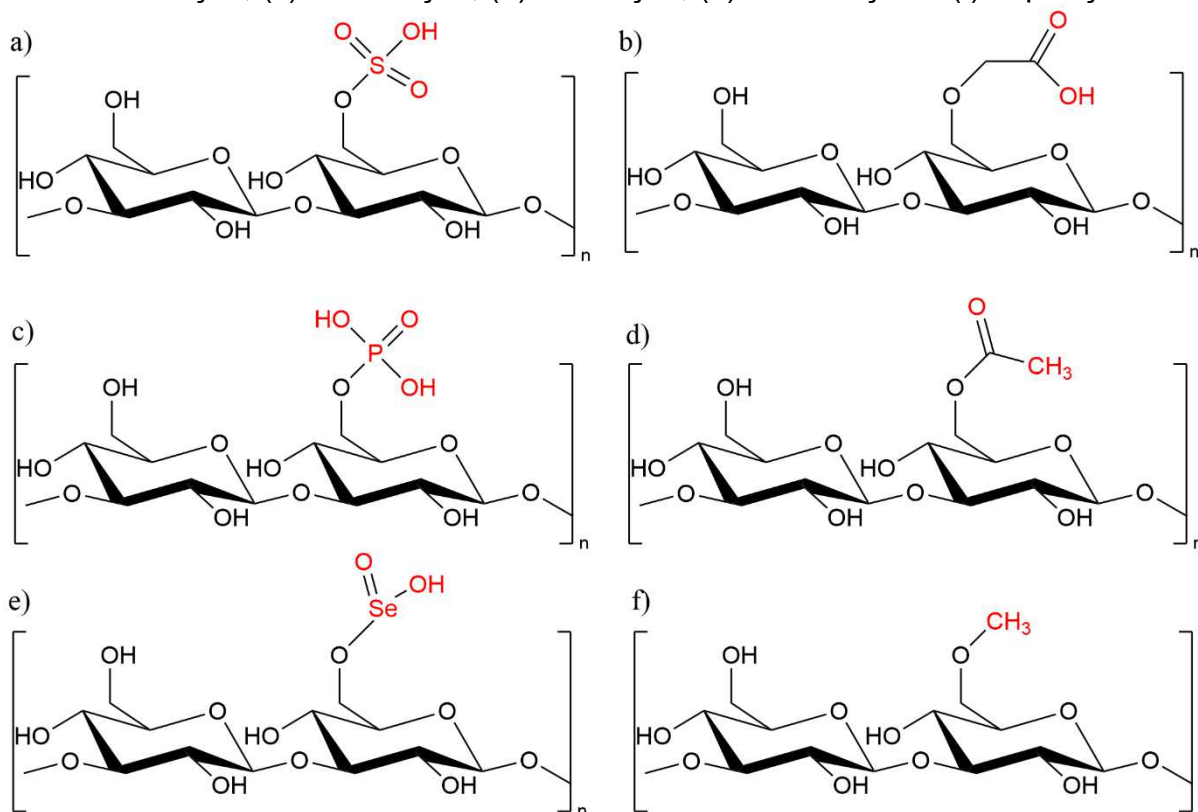
Além disso, também é utilizada na pesquisa de fabricação de biossensores para imobilização de lacases (MATTOS et al., 2019) e para determinação eletroanalítica de ciclobenzaprina (SCREMIN et al., 2021).

3.3 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

Os polissacarídeos por si só possuem uma propriedade típica inerente de polivalência, isso significa que possuem ao longo de sua cadeia diversos locais de contato, que tem a capacidade de se conectar simultaneamente com alvos biológicos (MUKHERJEE et al., 2022). Entretanto, polissacarídeos naturais podem possuir diversas limitações intrínsecas, como toxicidade, insolubilidade, alto peso molecular, além da baixa bioatividade que não compensa seu uso industrial e farmacêutico. Dessa forma, processos semissintéticos como derivatizações químicas e modificações enzimáticas estão sendo uma importante ferramenta a fim de contornar tais questões, visto que as propriedades biológicas estão diretamente ligadas, também, à estrutura molecular que os polissacarídeos apresentam (LI; DAI; SHAH, 2017; MUKHERJEE et al., 2022).

As modificações químicas de polissacarídeos ocorrem geralmente nos grupos mais reativos presentes na molécula, como grupos hidroxila, carboxila e amino, sendo que essa reatividade depende muito do tipo e condições reacionais (MUKHERJEE et al., 2022). Baseiam-se em reações de substituição, que comumente envolvem a inclusão de grupamentos iônicos como grupos sulfônicos ($-\text{SO}_3\text{H}$) na sulfatação, carboximetílicos ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) na carboximetilação, fosfônicos ($-\text{PO}_3\text{H}_2$) na fosforilação, acetila ($\text{CH}_3\text{CO}-$) na acetilação, grupos $-\text{SeO}_2\text{H}$ na selenização e grupos alquila ($-\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$) na alquilação (JI et al., 2013; KAGIMURA et al., 2015a; LI et al., 2016), conforme mostra a Figura 4.

Figura 4 - Representação estrutural de β -glucanas modificadas por: (a) sulfatação, (b) carboximetilação, (c) fosforilação, (d) acetilação, (e) selenização e (f) alquilação.



Fonte: o próprio autor

As principais atividades biológicas reportadas na literatura, em relação à sulfatação (Figura 4a) de polissacarídeos, incluem as atividades anticoagulante (VASCONCELOS; et al., 2013), antiviral (TONG et al., 2010) e antimicrobiana (ZHANG et al., 2016). Já em relação à carboximetilação (Figura 4b) têm sido descritos que tal derivatização química contribui para o aumento da solubilidade e potencialização da atividade antioxidante (KAGIMURA et al., 2015b; WANG et al., 2016). A fosforilação (Figura 4c) contribui para a potencialização da capacidade antitumoral, aumento da solubilidade e atividade antioxidante (DENG et al., 2015; YE et al., 2013). A modificação por acetilação (Figura 4d) tem a capacidade de melhorar a atuação antioxidante de alguns polissacarídeos (SONG et al., 2013). A selenização (Figura 4e) auxilia na melhora da atividade imunológica (QIN et al., 2013) e a alquilação (Figura 4f) demonstra potencializar atividades antimicrobianas (XIE et al., 2002).

Vale ressaltar que existem polissacarídeos naturalmente derivatizados, dos quais os organismos marinhos, como as algas, são as principais fontes. Aluta et al., (2023) avaliaram um polissacarídeo naturalmente sulfatado,

extraído da alga marinha *Centroceras clavulatum* (CCSP). Tais autores verificaram a composição química da macromolécula, na qual a sulfatação mostrou-se predominante em C-4 da galactose. Também avaliaram a capacidade antioxidante, que se mostrou dose-dependente, e ainda apresentou efeito imunestimulatório, podendo ter aplicações nutracêuticas. Rodrigues-Souza et al., (2022) avaliaram uma heterofucana naturalmente sulfatada, proveniente da alga marrom *Spatoglossum schröederi*, e uma galactana sulfatada extraída da alga verde *Codium isthmocladum*. Os resultados apontaram que ambas as macromoléculas sulfatadas não eram genotóxicas, apresentando redução de danos ao DNA e atividade antioxidante.

Além disso, existem também as modificações enzimáticas (por meio das sulfotransferases) e as físicas (LI et al., 2016).

Em estudo *in vivo* com camundongos, Baert et al., (2023), identificaram uma superpopulação celular associada ao fator de sobrevivência do mieloma múltiplo (MM). Tais autores descobriram que uma sulfatação realizada por uma sulfotransferase (HS3ST3a1) em SDC-1 (Sindecan), a qual adiciona um resíduo de sulfato na posição 3 no resíduo de glucosamina, modula o comportamento do MM, controlando dessa forma, a sua resistência aos medicamentos.

Já no caso das modificações físicas, tais alterações não inserem grupamentos na estrutura primária da macromolécula, no caso podem até remover, mas ainda assim, em alguns casos, influenciam grandemente nas bioatividades que a macromolécula pode apresentar. Tais modificações atuam principalmente na degradação do polissacarídeo, com alta especificidade e poucas reações secundárias, gerando produtos com massas moleculares uniformes, peso molecular e viscosidade reduzidas. Alguns exemplos de métodos de modificações físicas são com utilização do ultrassom, radiação e exposição por micro-ondas (LI et al., 2016).

3.3.1 Sulfatação

Polissacarídeos sulfatados podem ser naturalmente encontrados como componente de parede celular de algas marinhas, ou obtidos por reações de derivatização química (KRICHEN et al., 2015; PEASURA et al., 2015; SUN et al., 2016). A sulfatação consiste em uma substituição nucleofílica nos grupos hidroxila por grupamentos sulfônicos ($-\text{SO}_3\text{H}$) e tem sido realizada em diversos tipos de

polissacarídeos como glucanas, pectinas e quitosanas (LI; DAI; SHAH, 2017; WANG et al., 2015b).

Existem diversos métodos para derivatização química por sulfatação, sendo os mais comuns os métodos do ácido clorossulfônico-piridina, do ácido sulfúrico e do trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$). Tais métodos ainda podem ser separados em reações de sulfatação aleatórias, sulfatação regioseletiva e reações com inserção regioseletiva de grupos sulfato através de várias etapas (BEDINI et al., 2017).

Na sulfatação utiliza-se um solvente orgânico e um agente sulfatante, sendo empregados como agentes sulfatantes o ácido sulfúrico, trióxido de enxofre-piridina, ácido clorossulfônico-piridina ou trióxido de enxofre-dimetilacetamida e dimetilsulfóxido (DMSO), a dimetilformamida e a formamida têm sido utilizadas como solventes (LU et al., 2008). Já a eficiência da reação, ou seja, o número de hidroxilas do polissacarídeo substituídas por grupos sulfônicos, é avaliada pelo grau de substituição (DS), o qual é influenciado principalmente por parâmetros como temperatura, tempo de reação, concentração do agente derivatizante e proporção entre agente sulfatante e solvente orgânico (LI; DAI; SHAH, 2017; LU et al., 2008).

A sulfatação comumente é feita pela solubilização ou suspensão do polissacarídeo em DMSO, formamida ou dimetilformamida, sendo adicionado na sequência o catalisador, geralmente piridina, e então, o agente sulfatante. O catalisador e o agente sulfatante podem ser adicionados separadamente ou em conjunto, formando um complexo catalisador-agente sulfatante (VASCONCELOS et al., 2013; ZHANG et al., 2011). A reação é então neutralizada, com bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio e a mistura reacional é submetida a intensa diálise para pré-purificação e seleção de massa molecular desejada (LI; DAI; SHAH, 2017).

O grau de substituição (DS), que representa o número de sítios (grupos hidroxila ou amino) substituídos por unidade de monômero do polímero sulfatado, é avaliado pela determinação do conteúdo de enxofre inserido na macromolécula, sendo comumente empregado o método cloreto de bário-gelatina ou avaliação instrumental por análise elementar (VASCONCELOS et al., 2013; WAN-MOHTAR et al., 2016).

3.3.1.1 Reações de sulfatação regioseletiva

Reações de sulfatação regioseletivas são aquelas que podem ou não depender apenas da estrutura intrínseca do polissacarídeo, como impedimento estérico e estrutura conformacional. O polissacarídeo pode apresentar posições preferidas para sulfatação, ou seja, sítios mais acessíveis para a substituição. Não necessariamente utilizam reagentes de proteção e desproteção (BEDINI et al., 2017).

Sahraneshin-Samani et al., (2022) sintetizaram uma quitosana 6-O-sulfatada via modificação regioseletiva. O agente sulfatante utilizado foi uma mistura de ácido sulfúrico com ácido clorossulfônico. A unidade de glucosamina da estrutura química da quitosana possui três posições disponíveis para sulfatação, um grupo amina, na posição 2, e dois grupos hidroxila nos carbonos 3 e 6 do anel; por essa razão, e pela quitosana ser um polímero linear, a posição no C-6 é mais disponível para ocorrer a sulfatação, por ser um álcool primário mais exposto.

Yuan et al., (2009) sulfataram regioseletivamente uma quitosana a fim de investigar o possível mecanismo entre a lisozima (enzima) e as quitosanas sulfatadas. Tais autores obtiveram três quitosanas: 6-O-sulfatada (C6S), 2-N-6-O-sulfatada (C26S) e 3,6-O-sulfatada (C36S). Para a primeira amostra (C6S), foi utilizada uma mistura de ácido sulfúrico e ácido clorossulfônico para sulfatação, já na amostra C26S foi adicionado carbonato de sódio e complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$, para a amostra C36S foi utilizado o agente sulfatante que consistia na mistura reacional entre o ácido clorossulfônico e DMF. Foi observado que os grupos 6-O-sulfato são os responsáveis pela alta afinidade e interação específica entre a quitosana sulfatada com a lisozima.

A botriosferana, o polissacarídeo explorado neste estudo, apresenta uma ligação glicosídica em $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$, onde os grupos hidroxila primários na posição C-6 são os mais acessíveis para a sulfatação do que os grupos OH secundários nas posições 2 e 4 (DEKKER et al., 2019). Isso se deve à existência do impedimento estérico em torno das hidroxilas secundárias, que as torna menos reativas para as substituições. Além disso, a botriosferana, por ser ramificada com ligações em $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$, tem um número reduzido de grupos OH primários disponíveis para sulfatação na cadeia principal (DEKKER et al., 2019). No entanto, devido à adição de mais monossacarídeos na ramificação, a unidade sempre oferece uma hidroxila em posição C-6 para substituição, garantindo assim a mesma proporção de OH primárias em C-6, com a diferença de agora estar em ramificações.

3.3.1.2 Reações de dessulfatação regioseletiva

Nas reações de dessulfatação regioseletiva ocorre a clivagem seletiva de grupos sulfato. Podem permitir a preparação de polissacarídeos com o padrão oposto de sulfatação – isto é, um álcool primário livre e secundários sulfatados – em relação àqueles geralmente alcançáveis por sulfatação química regioseletiva (BEDINI et al., 2017). Tais reações de dessulfatação podem ser aplicadas para melhorar, por exemplo, atividades biológicas específicas em determinadas amostras, que requerem um menor grau de substituição.

Han et al., (2018) avaliaram a dessulfatação de um sulfato de condroitina, polissacarídeo encontrado em vertebrados e invertebrados, em estudo oriundo de suínos. Os grupos sulfato foram removidos seletivamente da posição C-4 (4-O-S) da *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) pelo método DMSO-MeOH, e o sulfato na posição C-6 (6-O-S) também presente na GalNAc, foi removido pelo método da *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida.

Kolender; Matulewicz, (2004) desenvolveram um método de dessulfatação utilizando clorometilsilano (CTMS) para galactanas e carregenas. Neste estudo foram feitos vários testes, visando além do baixo teor de sulfato, alta recuperação e baixa degradação.

3.3.1.3 Reações com inserção regioseletiva de grupos sulfato multietapas

As reações com inserção regioseletiva de grupos sulfato em etapas são baseadas em estratégias de proteção-sulfatação-desproteção. Ou seja, as etapas além da reação de sulfatação, podem ser destinadas ou a proteger algumas das hidroxilas para permitir um maior controle na regioseletividade do padrão de sulfatação do polissacarídeo, ou ainda para converter as porções alcoólicas do polissacarídeo em grupos mais lipofílicos (BEDINI et al., 2017).

A seletividade dessas ligações é influenciada por muitos fatores como os grupos de saída, solventes, sistemas de ativação, aditivos, e principalmente nesse tipo de reação, os grupos protetores. Tais grupos servem para mascarar

temporariamente um grupo funcional que não sobreviveria aos reagentes e ao ambiente químico, ou ainda protegem durante determinada etapa um local na estrutura da molécula. Além disso, conferem outros efeitos, podendo aumentar ou diminuir a reatividade da molécula, participando ou não das reações e alterando dessa forma os seus efeitos estereoquímicos (GUO; YE, 2010).

Zhang et al., (2020) sulfataram por este método uma β -glucana oriunda de um cogumelo, chamado *Ganoderma lucidum*, muito popular na medicina tradicional asiática. Tais autores, a fim de aumentar a solubilidade e as atividades biológicas deste polissacarídeo, neste caso a atividade anticoagulante, utilizaram cloreto de 4,4'-dimetoxitritilo (DMT-Cl) e hexametildissilazano (HMDS) como grupos protetores, para produzir amostras sulfatadas nas regiões C-2/C-4 e C-6, respectivamente. Como agentes sulfatantes utilizaram o método do complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$ para ambas as sínteses.

Zhang et al., (2010) avaliaram a sulfatação regioseletiva multietapas em uma porfirana, polissacarídeo extraído da alga vermelha *Porphyra haitanensis*. Como grupo protetor utilizaram o DMT-Cl (cloreto de 4,4'-dimetoxitritil) e como agente sulfatante $\text{SO}_3\text{-DMF}$. Como produtos reacionais, tais autores obtiveram um porfirana 6-O-sulfatado. Em outra rota sintética, grupos hidroxila primários foram protegidos com DMT-Cl, mas utilizaram como agente sulfatante o HClSO_3 (ácido clorossulfônico), gerando como produto um porfirana 2,2',4-O-sulfatado. Em relação às bioatividades testadas neste estudo, o derivado 6-O-sulfatado apresentou melhor atividade antioxidante, enquanto o derivado 2,2',4-O-sulfatado apresentou melhores resultados para a atividade anticoagulante.

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS À SULFATAÇÃO

A sulfatação tem sido amplamente utilizada para potencializar propriedades biológicas, principalmente as propriedades anticoagulante, antiviral, antitrombótica e antimicrobiana (VASCONCELOS; et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

Buddana; Varanasi; Shetty, (2015) analisaram as atividades biológicas de uma α -(1 \rightarrow 3)-glucana extraída de *Streptococcus mutans* e derivatizada por sulfatação. Os autores verificaram que a amostra derivatizada com DS de 1,19 apresentou aumento nas atividades biológicas, incluindo maior efeito antimicrobiano

frente a bactérias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 6458, *Stenotrophomonas mutans* MTCC 497 e *Escherichia coli* MTCC 1680. Além disso, também verificaram atividade anti-inflamatória e fibrinolítica na glucana sulfatada.

Li; Shah, (2014) avaliaram os efeitos antimicrobianos e antioxidantes de polissacarídeos obtidos de *Streptococcus thermophilus* e *Pleurotus eryngii* após sulfatação, com DS de 0,31 e 0,69, respectivamente. Tais autores reportaram que a sulfatação potencializou a atividade antioxidante, a qual foi avaliada por diferentes protocolos (DPPH, superóxido, radical hidroxila e FRAP). Similarmente, após a sulfatação os polissacarídeos demonstraram atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Vasconcelos et al., (2013) modificaram quimicamente por sulfatação uma (1→6)-β-D-glucana, produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMRL. Os autores obtiveram um derivado com DS de 0,95 e verificaram que o polissacarídeo exibiu atividade anticoagulante.

Liang et al., (2018) descreveram um polissacarídeo sulfatado com características anticoagulantes similares às das heparinas, atuando através de cargas negativas de grupos sulfato, que neutralizam os resíduos de aminoácidos carregados positivamente por ligações eletrostáticas à antitrombina, melhorando assim a atividade anticoagulante.

Sun et al., (2009) estudaram a atividade antitumoral após sulfatar a glucana ((1→3)-β-D-glucana) extraída de corpos de frutificação do basidiomiceto *Russula virescens*. Tais autores descreveram que todos os derivados sulfatados (um total de cinco derivados) exibiram atividade antitumoral aprimorada contra Sarcoma 180. Além disso, este estudo revelou que os derivados apresentaram toxicidade menor que o 5-Fluorouracil (agente anticancerígeno conhecido), atuando apenas nas células doentes e não nas células saudáveis, estimulando assim o mecanismo de resposta imune do organismo. Como descrito por Shi, (2016) os polissacarídeos atuam ativando o sistema imunológico de um organismo, ou seja, promovendo a maturação, diferenciação e reprodução de três tipos de células: os linfócitos, macrófagos e as células NK (*Natural Killer*), porém, o mecanismo de ação da atividade antitumoral por estas células ainda não está completamente esclarecido.

3.4.1 Herpesvirus

Atualmente, existem oito tipos de herpesvirus que afetam o ser humano (ORTEGA, 2019). Os vírus herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) pertencem à família *Herpesviridae*, os quais constituem-se por vírus de DNA. Tais vírus são considerados dentre os mais comuns e endêmicos do mundo, causando lesões faciais e genitais (HANTZ; ALAIN, 2018). Segundo a OMS, estima-se que em 2016 quase 4 bilhões de pessoas possuíam a infecção por vírus Herpes simplex ao redor do mundo, sendo 3,7 bilhões com HSV-1 e 491 milhões com HSV-2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

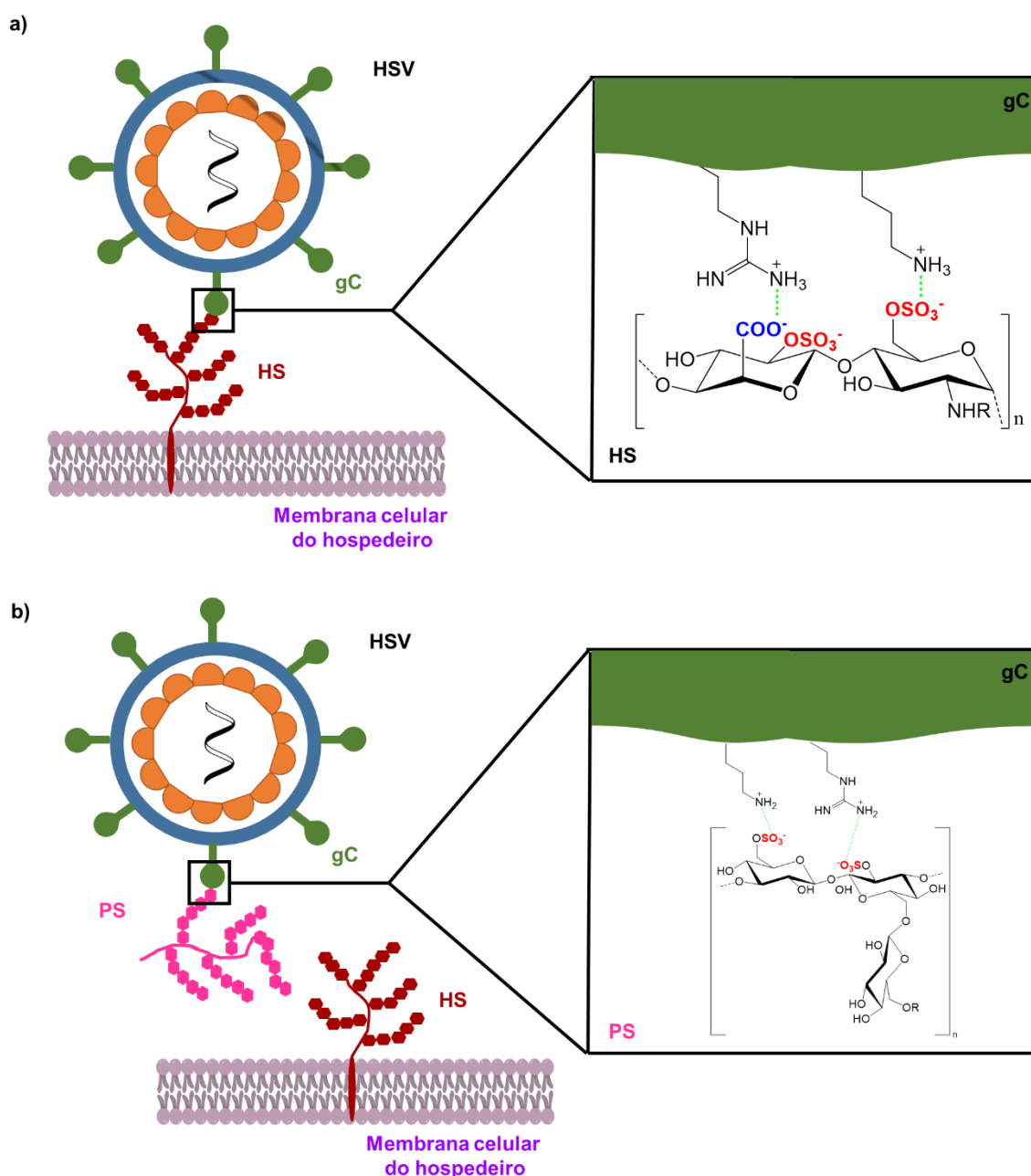
Apesar da infecção por herpes vírus não possuir cura, pode ser controlada com antivirais específicos. Atualmente existem fármacos anti-herpéticos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration, EUA), sendo o aciclovir, o de referência e juntamente com seus análogos, valaciclovir e fanciclovir, os quais atuam inibindo a replicação do DNA viral (ORTEGA, 2019). Além disso, há diversos estudos recentes em relação ao desenvolvimento de vacinas contra o herpes que apresentam resultados promissores. No entanto, essas pesquisas ainda não foram concluídas e não chegaram ao estágio de finalização para comercialização.

Como receptores primários, os herpesvirus utilizam moléculas que apresentam grupos sulfato em sua estrutura, como por exemplo, os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) – heparan sulfato (HS). O HS é um copolímero linear carregado negativamente, composto de ácido urônico e aminoaçúcar sulfatados. Dessa forma, os grupos sulfato interagem com a superfície do vírion por interações eletrostáticas através dos resíduos básicos presentes na glicoproteína C (Figura 5a). Isso permite que a glicoproteína C do vírus se ligue à célula hospedeira, desencadeando a fusão do envelope viral do HSV com a membrana plasmática. Essa fusão possibilita que o capsídeo e as proteínas do tegumento viral sejam liberadas no citoplasma (O'DONNELL et al., 2010).

Portanto, a inibição da adsorção ou entrada do vírus nas células hospedeiras é um meio eficaz de prevenir a infecção viral. Como descrito anteriormente, a glicoproteína C, presente em HSV, apresenta em sua superfície resíduos de grupos de aminoácidos básicos, que fornecem cargas positivas. Essas cargas positivas facilitam a forte interação eletrostática com os GAGs extracelulares da célula hospedeira, pelos grupos funcionais sulfatados (que fornecem cargas

negativas). Quando produtos como os polissacarídeos sulfatados (PS), que possuem em sua estrutura também esses grupos sulfato, são utilizados como antivirais, o acoplamento eletrostático entre o sítio de ligação da glicoproteína C é feito com os sulfatos presentes no composto, dessa forma a infecção viral é bloqueada (Figura 5b) (O'DONNELL et al., 2010). Todavia, outros mecanismos podem participar na inibição da infecção viral.

Figura 5- Representação esquemática da (a) interação eletrostática entre heparan sulfato (HS) da célula hospedeira e a glicoproteína C viral (gC), e (b) interações entre os grupos sulfato do polissacarídeo sulfatado (PS) e a glicoproteína C viral (gC).



Fonte: Adaptado de Castillo-Macías; Salinas-Carmona; Torres-López, (2018)

Murry et al., (2014) avaliaram os inibidores químicos via sulfatação contra o HIV-1. Neste estudo, os autores verificaram que esses tipos de inibidores bloqueiam eficientemente a iniciação da transcrição do vírus, durante a reativação da latência.

Estudos desenvolvidos por Zhu et al., (2006), demonstraram a avaliação anti-herpética (HSV-1) frente a cepas sensíveis e resistentes ao aciclovir de um polissacarídeo sulfatado extraído da alga marrom *Sargassum patens Agardh* (*Sargassaceae*). Tais autores verificaram apenas a atividade virucida contra as cepas sensíveis ao aciclovir, no qual o modo de ação antiviral observado foi a inibição da ligação do vírus às células hospedeiras.

Lopes et al., (2017) avaliaram a atividade anti-herpética de ulvanas, heteroglicanos quimicamente sulfatados, extraídos de algas verdes (*Enteromorpha compressa*). Apenas uma das amostras extraídas e sulfatadas (22%) apresentou atividade satisfatória com alto índice de seletividade. Como mecanismo de ação, tais autores apontaram que esta amostra atuou fortemente na inibição e transcrição do DNA com regulação negativa da síntese de proteínas.

3.4.2 Dengue

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das doenças virais com maior letalidade atualmente e uma das de maior disseminação no mundo é a dengue (SWAMINATHAN; KHANNA, 2019). A dengue é classificada como uma arbovirose, ou seja, são doenças cujos vírus são transmitidos pela picada de artrópodes infectados, como mosquitos. Seu vírus, que pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, é do tipo envelopado e de RNA, sendo classificado em quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Em 2013 foi proposto um novo sorotipo, DENV-5, identificado na Malásia (JING; WANG, 2019).

A dengue tem como seu principal vetor de transmissão o mosquito *Aedes aegypti*. Entretanto, existem atualmente 13 subespécies que possuem essa capacidade de transmissão, como é o caso do *Aedes albopictus*, também conhecido como mosquito-tigre-asiático, o qual também foi responsável por causar grandes

surtos mundiais (JING; WANG, 2019).

Em consequência desta disseminação rápida, a dengue é considerada hoje uma endemia, a qual atinge principalmente países de regiões tropicais e subtropicais, como nas Américas, Ásia e Pacífico Ocidental (DIGHE et al., 2019). Nosso país infelizmente contribui com o maior número de casos de dengue das Américas (LUPPE et al., 2019). Além disso, a Índia, por ser um país em desenvolvimento e o segundo mais populoso do mundo, enfrenta um alto risco de contaminação por dengue (SWAMINATHAN; KHANNA, 2019). Mesmo sendo majoritariamente sintomática, a dengue pode evoluir para febre hemorrágica (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD), podendo levar à morte (SWAMINATHAN; KHANNA, 2019).

A infecção com um sorotipo da dengue resulta em uma imunidade de longo prazo contra esse específico sorotipo, mas apenas imunidade de curta duração contra os outros sorotipos (ANGELIN et al., 2023). Uma segunda infecção por dengue caracteriza um maior fator de risco para a evolução à doença grave, entretanto esse risco não ocorre para infecções subsequentes. Segundo Guzman; Alvarez; Halstead, (2013), isso ocorre devido ao fato do aumento dependente de anticorpos (ADE), onde indivíduos com, por exemplo, mais de um ano com infecções primárias, possuem anticorpos de reação cruzada, os quais formam complexos imunes, ou seja, em vez de neutralizarem o vírus, formam complexos que favorecem a infecção, especialmente em células de defesa. Esse mecanismo aumenta a replicação viral e causa aumento da quantidade de vírus no sangue (viremia) e assim, uma doença mais grave. Dessa forma, qualquer candidato à vacina deve levar isso em consideração e preferencialmente induzir a imunidade de longo prazo contra todos os sorotipos da dengue.

Apesar de existirem vacinas contra alguns sorotipos da dengue, como é o caso da Dengvaxia e TAK-003 (QDenga), estas ainda apresentam limitações e restrições quanto à sua aplicação (HALSTEAD; DANS, 2019). Dengvaxia incorpora os genes estruturais de quatro sorotipos de dengue (1, 2, 3 e 4) no genoma do vírus da febre amarela. Entretanto, em 2016, órgãos como SAGE (*Strategic Advisory Group of Experts*, Genebra, Suíça), GACVS (*Global Advisory Committee on Vaccine Safety*) e o Grupo de Trabalho de Vacinas contra a Dengue da OMS, passaram a recomendar a vacina apenas para crianças acima de 9 anos de idade, em países que considerem a vacinação como parte de seu controle viral, e apenas em pessoas que apresentam

evidências (testes clínicos) de uma infecção passada (HALSTEAD; DANS, 2019). A vacina TAK-003 ou QDenga foi aprovada para utilização no Brasil em março de 2023 pela Anvisa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Essa vacina é produzida pela empresa Takeda Pharma Ltda., é do tipo vírus atenuado e é indicada para prevenção de dengue causada pelos 4 sorotipos (1, 2, 3 e 4) do vírus da dengue em indivíduos de 4 a 60 anos de idade, a qual deve ser administrada em duas doses, com intervalo de 3 meses. É contraindicada para pacientes imunocomprometidos, mulheres grávidas e lactantes. Na avaliação da vacina, foi observada uma eficácia geral de 80,2% contra a dengue causada pelos sorotipos combinados em questão (ANGELIN et al., 2023).

Em relação à estrutura do vírus da dengue, o genoma do DENV é de fita simples de RNA que codifica três proteínas estruturais, o capsídeo (C), a proteína de membrana (M) e a glicoproteína de envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). Durante a infecção viral, a glicoproteína E contribui para a adsorção do vírus aos receptores celulares e/ou fatores de ligação presentes na membrana da célula hospedeira, seguida da fusão da membrana vírus-hospedeiro (HIDARI et al., 2012; MODHIRAN et al., 2019).

A infecção viral pelo dengue vírus ocorre de maneira semelhante como citado anteriormente para o HSV, inclusive o bloqueio da infecção pelos grupos sulfato de polissacarídeos ocorre de modo similar.

A entrada do DENV na célula é impulsionada pelas interações eletrostáticas entre os grupos sulfato (HS), presentes na superfície da célula hospedeira e as glicoproteínas E (gE), carregadas positivamente e presentes na superfície do vírion. Isso permite que a gE do vírus se ligue à célula hospedeira, desencadeando a fusão do envelope viral do DENV com a membrana plasmática (HIDARI et al., 2012; MODHIRAN et al., 2019).

Estudos desenvolvidos por Tong et al., (2010) avaliaram a atividade antiviral de uma α -D-glucana sulfatada frente à infecção do vírus do dengue sorotipo 2 (DENV-2), incluindo a infecção inicial e a replicação intracelular. Os resultados revelaram que a glucana sulfatada exerceu efeito inibitório potente sobre o DENV-2, através da interferência na interação do vírus com as células alvo.

Sousa et al., (2022) avaliaram a eficácia de uma (1 \rightarrow 6,1 \rightarrow 3)- β -D-glucana, isolada de corpos frutíferos do cogumelo *Agaricus subrufescens*, frente ao DENV e ao Zika vírus (ZIKV). Neste estudo, os autores também derivatizaram a glucana por sulfatação, aplicando o método ácido clorossulfônico-piridina, gerando

uma amostra sulfatada nas posições C-4 e C-6. O derivado sulfatado inibiu significativamente a replicação do DENV-2 e ZIKV, quando adicionado simultaneamente com infecção, indicando que o mecanismo de ação é do tipo inibição de entrada viral.

Muschin et al., (2016) avaliaram diversas galactomananas sulfatadas, com diferentes graus de substituição (0,7-1,4), frente à atividade anticoagulante, anti-HIV e anti-DENV. Tais resultados demonstraram que estas moléculas apresentaram atividade anticoagulante moderada a alta (13,4 - 36,6 unidades/mg), altas atividades anti-HIV (0,04 - 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e anti-DENV (0,2 - 1,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e baixa citotoxicidade. Neste estudo, também foi verificado que as galactomananas sulfatadas apresentaram forte interação eletrostática dos grupos sulfato com os grupos amino presentes nas proteínas de superfície do vírus.

Para viabilizar o uso desses polissacarídeos sulfatados como medicamentos ou em aplicações em seres humanos, é necessário conduzir estudos que otimizem suas propriedades físico-químicas. Isso inclui investigações para reduzir o peso molecular, bem como avaliar a farmacodinâmica e a farmacocinética das amostras. Essas análises são fundamentais para tornar esses compostos mais práticos e seguros para possíveis aplicações terapêuticas. Além disso, a sua incorporação em formas farmacêuticas apropriadas e o estudo destas formulações é um passo crucial para o seu uso como medicamentos antivirais.

3.5 HIDROGÉIS

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica e medicinal vem desenvolvendo pesquisas em materiais que auxiliam no processo de tratamento e/ou cura de doenças. A pesquisa nessa área vem recebendo grande atenção, para solucionar problemas de entrega de fármacos no organismo, prospecção de novos materiais, melhora na aplicação de produtos, ou ainda torná-los mais acessíveis.

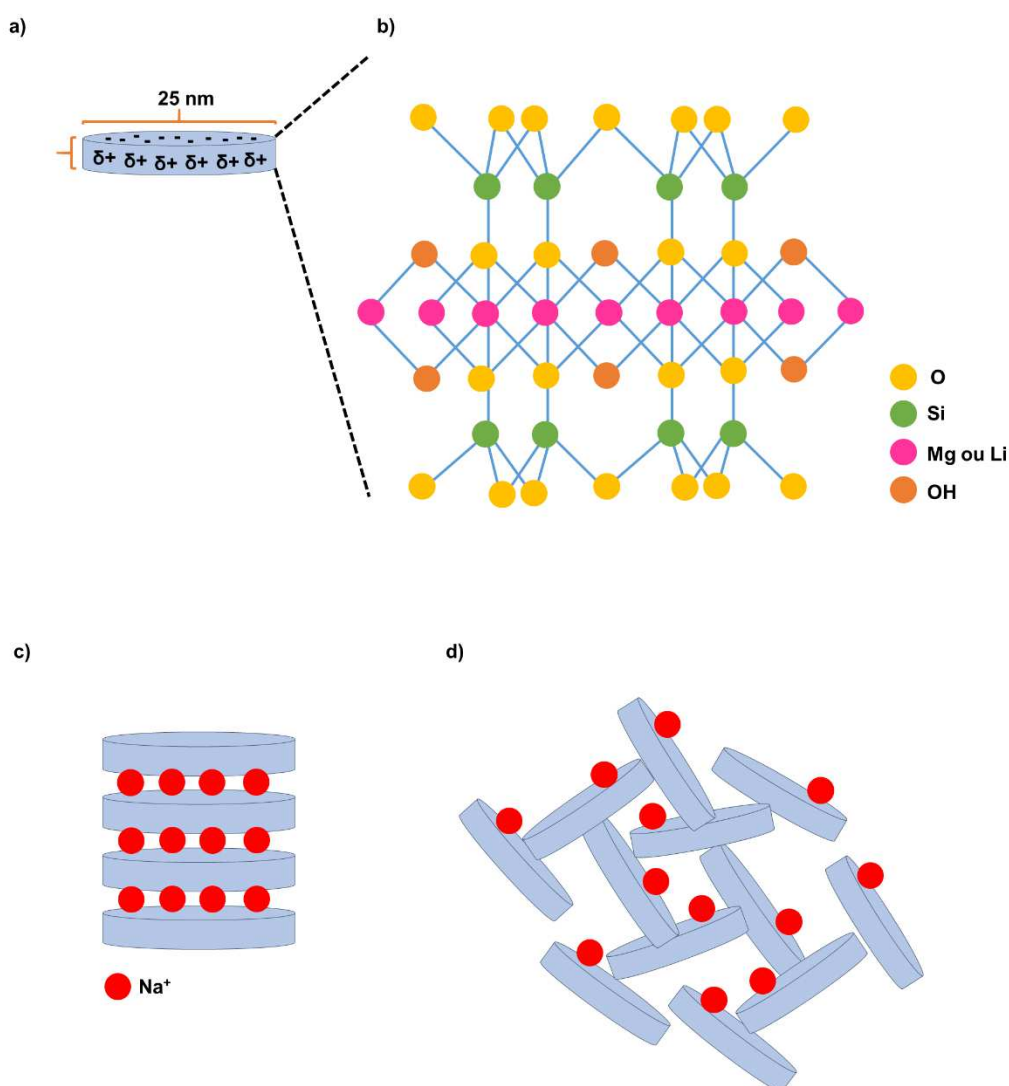
Alguns exemplos de materiais em foco nessa área são as nanopartículas, polímeros e hidrogéis. Os hidrogéis são materiais a base de água estruturados por uma rede tridimensional, constituída por ligações covalentes ou não covalentes (BECHER; ORNELAS, 2017).

3.5.1 Laponita

A Laponita, com composição $\text{Na}_{0.7}[(\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.4})\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$, é uma argila sintética que pertence ao grupo esmectita de filossilicatos, com fórmula química bem definida em comparação com argilas naturais, a qual forma dispersões coloidais transparentes. Os cristais de Laponita se encontram na forma de discos com diâmetros em torno de 25 nm e espessura de 0,92 nm, 2,53 g/cm³ de densidade, e podem ser estimados $5,2 \times 10^{17}$ discos/g de Laponita (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018; XU; ERDEM; EISER, 2018) (Figura 6a).

Tem se tornado um excelente material funcional para uso biotecnológico pois sua superfície apresenta grupos funcionais (como grupos hidroxila e silanol) os quais tornam as superfícies planas carregadas negativamente e as bordas carregadas positivamente, levando este material a apresentar uma alta capacidade de troca catiônica, capacidade de formar dispersões aquosas, aumento na solubilidade de compostos e controle na liberação destes, além de possuir uma excelente estabilidade (XIAO et al., 2016; XU; ERDEM; EISER, 2018).

Figura 6- Representação do (a) cristal de Laponita e sua dimensão (b) da estrutura com seus respectivos átomos; (c) formação de “camadas/pilhas” dos cristais e (d) da formação do “House of Cards”.



Fonte: Adaptado de (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018)

De modo a entender a estrutura da Laponita, quando em pó as suas partículas são encontradas dentro de estruturas em formas de pilhas onde íons de sódio ocupam as galerias intercalares para neutralizar a carga superficial negativa (SHAHIN; JOSHI, 2010). Já em meio aquoso, os íons de sódio se dissociam (Figura 6b), e as faces dos discos adquirem uma carga líquida negativa, devido à presença dos oxigênios da estrutura. Tais cargas podem ser equilibradas pelas moléculas de água do ambiente circundante (pode ainda absorver, por ser uma argila de expansão), ou ainda pelos reagentes utilizados na preparação do hidrogel (poliacrilato, utilizado neste estudo), resultando em interações eletrostáticas entre estes componentes, e

levando à formação de “camadas/pilhas” de cristais (Figura 6c). Por outro lado, as bordas dos discos de Laponita são compostas por óxidos hidratados de Mg-OH e Si-OH, os quais podem ser protonados em pH reduzido, gerando uma carga positiva na borda ($-\text{OH}_2^+$), que podem interagir com o poliacrilato na preparação do hidrogel deste estudo (SHAHIN; JOSHI, 2010; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018). Além disso, em um nanodisco, o número de cargas positivas das bordas é cerca de 10% o número de cargas negativas das faces, que acaba gerando uma rede global negativa de cargas (BECHER et al., 2019).

Quando as bordas carregadas positivamente dos discos de Laponita interagem com cargas negativas de outros cristais, ocorre o que a literatura chama de efeito “*House of Cards*” para dar origem a uma fase sólida-mole ou gel de automontagem (Figura 6d). Essas dispersões de Laponita podem levar à formação de diferentes estados, como o ordenado e o desordenado (BECHER et al., 2019).

É importante ressaltar que a Laponita por si só é capaz de formar tais dispersões coloidais, ou seja, ela é capaz de ser um agente formador de gel. Entretanto, existem parâmetros que podem influenciar o processo de preparação dessas dispersões, como a filtração da amostra, pH, concentração, atmosfera controlada, umidade no pó, e presença ou não de adição de sais e de polímeros (CUMMINS, 2007). Com a adição de polímeros, como por exemplo o poliacrilato de sódio utilizado neste trabalho, as suspensões de Laponita aumentam a capacidade de gelificação e a sua viscosidade, além disso, afetam também propriedades como o envelhecimento cinético (CUMMINS, 2007). Esse envelhecimento cinético é a transição líquido-sólido, e a mudança das propriedades físicas do sistema ao longo de um período de tempo, ou seja, à medida que o tempo passa, a viscosidade do sistema aumenta, e a mobilidade das partículas diminui (JABBARI-FAROUJI et al., 2008).

Quando os poliacrilatos são adicionados a dispersões de Laponita, acelera-se o processo de formação do gel a partir da mesma dispersão de Laponita. Os polímeros aniônicos têm uma forte afinidade por interações eletrostáticas com as cargas presentes na superfície das partículas de argila, o que amplifica a repulsão elétrica entre essas camadas (CUMMINS, 2007).

O gel de Laponita não apresenta citotoxicidade (MAGALHÃES et al., 2022) e se degrada lentamente em componentes não tóxicos em pH inferior a 7,0 (Na^+ , Mg^{2+} , Li^+ e $\text{Si}(\text{OH})_4$), portanto é considerado biodegradável (BECHER et al.,

2019). É importante citar que a Laponita apresenta um pH de 8,5, quando disperso (2% p/v) em água, entretanto, quando necessário para aplicações cosméticas ou farmacêuticas, esse parâmetro é ajustado (DAS et al., 2019).

Como dito anteriormente, a Laponita vem sendo utilizada cada vez mais nos últimos anos como um biomaterial promissor. Magalhães et al., (2022) produziram um hidrogel nanocompósito utilizando Laponita e polietilenoglicol diacrilato para regeneração de tecido ósseo. Neste estudo, os pesquisadores verificaram que o hidrogel tinha capacidade de regenerar ossos em modelo *in vivo* de defeito ósseo de tíbias de ratas osteopênicas, além da formação de osso intramembranoso no calo mole em mais de 66,7% dos animais.

Suterio et al., (2022) desenvolveram um hidrogel de Laponita contendo o medicamento sinvastatina para tratamento tópico de melanoma. Tais autores verificaram boa permeação, estabilidade e viscosidade, além de atividades antimicrobianas e antitumorais que demonstraram que o hidrogel desenvolvido acrescido do medicamento foi efetivo para o tratamento tópico de melanoma.

Gu et al., (2023) estudaram para aplicação em medicina regenerativa um hidrogel composto de Laponita e poli(*N*-vinil pirrolidona)-*b*-poli(D,L-alanina) (PVP-PA) não termogelável. Neste estudo, o sistema de nanocompósito bioativo e funcional mostrou-se promissor para a homeostasia rápida de feridas e reparo acelerado de feridas em tecidos, evitando assim infecções.

Na indústria cosmética, a empresa ECKART® desenvolveu uma Laponita própria para utilização em formulações cosméticas, a chamada LAPONITE-XLG XR (ALTANA, 2021). Segundo a descrição do fabricante, são capazes de construir géis fortes e transparentes, capazes de manter partículas, pigmentos e princípios ativos em suspensão. Além disso, ainda podem ser utilizados como *sprays* e pulverização de aerossóis para melhorar a espalhabilidade de determinados cremes e loções, conferindo uma textura leve e não pegajosa para os produtos de higiene (ALTANA, 2021).

3.5.2 LECIGEL®

O LECIGEL® é um copolímero de acrilato de sódio constituído de lecitina, um fosfolípido, que combina as propriedades emulsificantes da lecitina, e as

propriedades de espessamento e texturização de um polímero (LUCAS MEYER COSMETICS, 2023). Este ingrediente é extremamente versátil, de modo que realiza dispersões tanto em fases aquosas quanto em fases oleosas, pode ser adicionado em diferentes etapas do processo, além de se manter estável em largas faixas de temperatura e pH (LUCAS MEYER COSMETICS, 2023).

Ao desenvolver um produto utilizando o LECIGEL®, na faixa de concentração geralmente utilizada (1-2% p/v), é obtido um gel-creme. Alguns trabalhos vêm utilizando este ingrediente em suas formulações. Casarini et al., (2021) prepararam uma formulação de uso tópico utilizando LECIGEL® (1%), a fim de avaliar os efeitos antitumorais em melanomas e a segurança de nanocápsulas poliméricas contendo o fármaco phloretin. Neste estudo, os autores verificaram que a formulação incorporada com o ativo apresentou um efeito citotóxico frente a células Sk-Mel-28 (célula de melanoma maligno), e o tempo de duplicação da população foi aumentado após tratamento.

Ioannou; Labrou, (2022) produziram uma formulação com um cosmeceútico à base de enzimas, com potencial aplicação como agente esfoliante tópico. Neste, os pesquisadores incorporaram o extrato de *Arthrospira platensis*, que possui duas enzimas proteolíticas principais que ajudaram a melhorar significativamente a estabilidade do produto.

Dessa forma, o desenvolvimento de novos produtos utilizando tais materiais como a Laponita e o LECIGEL® acrescidos do polissacarídeo botriosferana sulfatada, seria de descrição inédita na literatura científica. Estes classificariam-se como produtos biodegradáveis e seriam utilizados para o tratamento de lesões cutâneas antivirais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

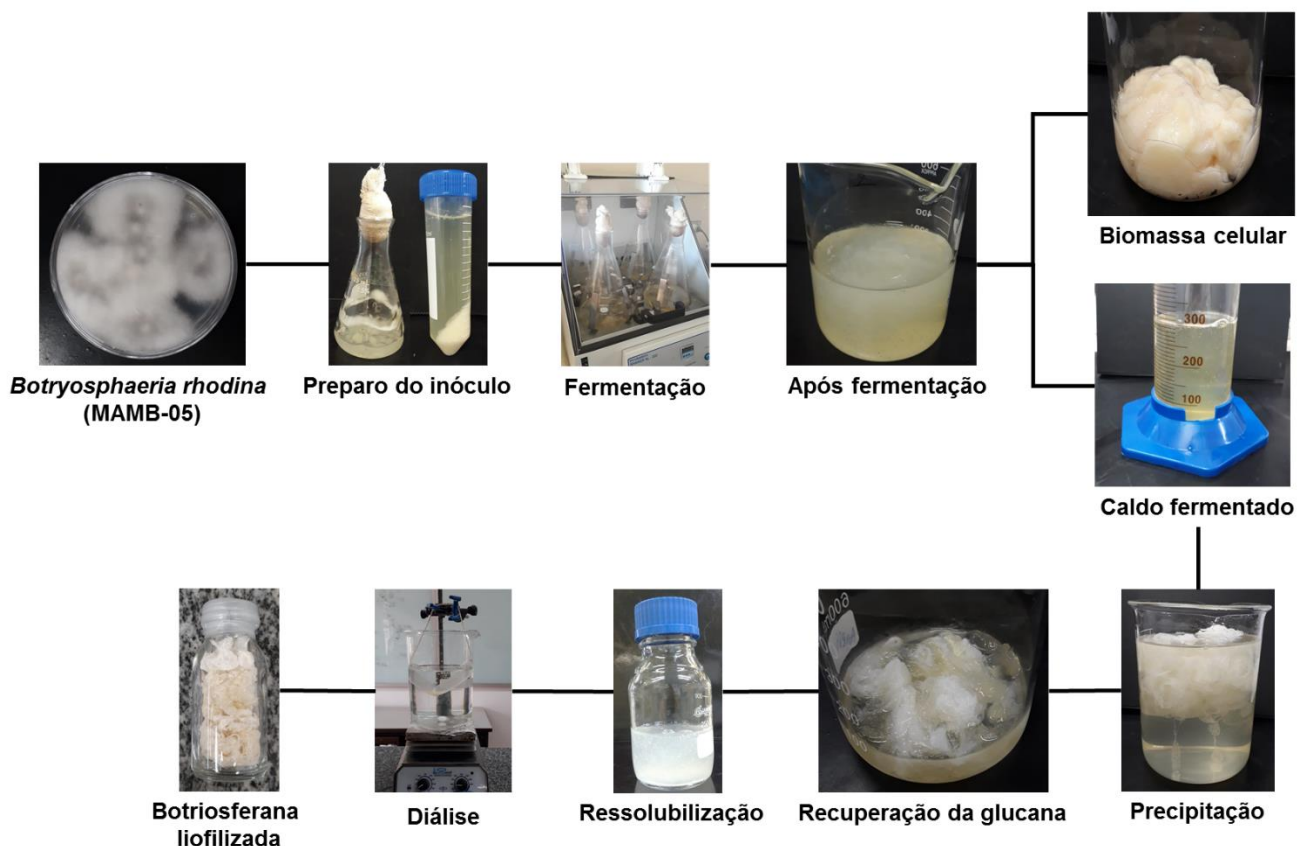
4.1 PRODUÇÃO DA BOTRIOSFERANA NATIVA

Apesar da botriosferana ter sido cedida gentilmente pela Dra. Aneli de Melo Barbosa-Dekker (Beta-Glucan Eireli), sua bioprodução está descrita abaixo e ilustrada na Figura 7.

A botriosferana foi produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Inicialmente, um inóculo foi preparado a fim de se adaptar o microrganismo ao meio. Uma porção do micélio fúngico, já desenvolvido em placas de Petri (meio contendo ágar, glucose e meio mínimo de Vogel – MMV- (VOGEL, 1956)) foi transferida assepticamente para frascos Erlenmeyer (25 mL MMV, 5 g L⁻¹ de glucose), os quais foram incubados a 28 °C, sob agitação de 180 rpm por 48 horas. Esta pré-cultura foi centrifugada a fim de se recuperar o micélio fúngico e então, os *pellets* de biomassa foram homogeneizados e ressuspensos em solução salina fisiológica estéril para obtenção de um inóculo padronizado com leitura de absorção entre 0,4 e 0,5 a 400 nm (BARBOSA et al., 2003).

Em seguida, foi realizada a produção da botriosferana. Os cultivos foram desenvolvidos em agitador orbital (*shaker*), onde cada frasco Erlenmeyer continha 16 mL de inóculo previamente padronizado, 400 mL de MMV e 50 g L⁻¹ de glucose. Os frascos foram incubados sob agitação de 180 rpm, a 28 °C por 72 horas (BARBOSA et al., 2003). Após este tempo, o meio de cultivo foi centrifugado (7000 x g/ 10 min) a 4 °C, o sobrenadante (solução aquosa de botriosferana) foi coletado em banho de gelo e submetido a intensa diálise (MWCO 14000 Da) contra água destilada. Em seguida, a botriosferana foi precipitada em 3 volumes de etanol absoluto resfriado (2 h), separada e então foi ressolubilizada em água destilada, e novamente submetida a intensa diálise contra água destilada para remoção de todo o etanol remanescente, e por fim, liofilizada (BARBOSA et al., 2003). A amostra foi nomeada como BOT e armazenada em dessecador para as caracterizações futuras.

Figura 7- Representação esquemática do processo de produção e recuperação da botriosferana nativa (BOT).



Fonte: o próprio autor

4.2 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS DA BOTRIOSFERANA POR SULFATAÇÃO

4.2.1 Sulfatação branda

Foram realizadas algumas sínteses utilizando esta via de sulfatação, nas quais o procedimento geral está descrito abaixo, e as amostras obtidas estão descritas na Tabela 1.

Inicialmente, a BOT foi solubilizada em dimetilformamida anidra (DMF) sob uma atmosfera inerte (nitrogênio) por 48 h. Foram adicionados o complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$) (X equivalentes/unidade de glucose) e a trietilamina (Et_3N), que foram agitados a temperatura ambiente durante um determinado tempo, de acordo com cada reação. Após este tempo, a mistura foi neutralizada com a adição de bicarbonato de sódio saturado, seguida pela adição de solução de tampão fosfato $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (Na_2HPO_4 , pH 7,0). A mistura foi dialisada contra solução de $\text{NaCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ (24 h) e água destilada (96 h) e então liofilizada

(ARAÚJO et al., 2013). As amostras foram armazenadas em dessecador para as caracterizações químicas.

Tabela 1. Amostras produzidas com a sulfatação via branda.

Amostra	BOT (mg)	DMF	SO ₃ -Py (eq)	Et ₃ N	T (°C)	t (h)	Ciclos	DS	Rendimento (%)
SB	100	50	8	0,22	t.a	07	1	0,82	40
SB*	100	50	24	0,22	t.a	07	1	1,1	106
SBP	300	150	48	0,66	40	14	2	1,2	75,7

Fonte: o próprio autor

4.2.2 Sulfatação via éster de pivaloíla

Esta derivatização ocorreu em três etapas: proteção, sulfatação e desproteção, para então se obter no final da rota sintética o produto nomeado como SP.

Inicialmente, 0,216 g de BOT foram dissolvidos em 30,8 mL de DMF anidro e 7,7 mL de piridina (Py) por 48 h sob uma atmosfera inerte (nitrogênio). Em seguida, foram adicionados 0,26 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 13,8 mL de solução de cloreto de pivaloíla (PivCl) e 0,62 g de dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura foi agitada por 24 h à temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 15 mL de tampão fosfato 0,025 mol L⁻¹ (pH 7,0) e a mistura foi dialisada contra solução de NaCl 1 mol L⁻¹ (24 h) seguida de água destilada (96 h). A mistura resultante foi concentrada sob pressão reduzida e seca por liofilização. Após a etapa de proteção, a amostra foi chamada de SP-P.

Ainda na sequência (etapa de sulfatação), o produto (SP-P) obtido na etapa anterior (0,1 g) foi dissolvido em DMF (17,6 mL), a seguir 2,9 mL de piridina e 1,92 g de complexo SO₃-Py (20 equivalentes/unidade de glucose) foram adicionados, e a mistura foi agitada por 17 h à temperatura ambiente. A mistura foi então neutralizada com solução saturada de bicarbonato de sódio (24 h), dialisada contra água destilada (96 h), concentrada sob pressão reduzida e liofilizada. Após a etapa de sulfatação, a amostra foi denominada SP-S (ARAÚJO et al., 2013).

Na etapa de desproteção, o material resultante (SP-S: 0,073 g) foi dissolvido em solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (10,5 mL) sob agitação por 4 h a 20 °C. A solução resultante foi então neutralizada com solução de HCl 1 mol L⁻¹, dialisada contra água destilada (96 h) e liofilizada (ARAÚJO et al., 2013). A amostra resultante

foi referida como SP, a qual foi armazenada em dessecador para as caracterizações químicas.

4.2.3 Sulfatação via acetonídeo

Foram solubilizados 0,3 g de BOT em 112,5 mL de dimetilformamida anidro (DMF), sob atmosfera inerte (nitrogênio) a temperatura ambiente, durante 24 h. Em seguida, foi adicionada uma mistura de 150 mL de acetona e 0,17 g de ácido canforsulfônico (0,4 equivalente/unidade de glucose), onde permaneceu aquecida sob refluxo a uma temperatura de 50-70 °C, durante 24 h. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida pela adição de solução saturada de bicarbonato de sódio até neutralização. A mistura foi purificada por diálise contra solução de NaCl 1 mol L⁻¹ (24 h) e água destilada (96 h), e então concentrada por evaporação rotativa e seca por liofilização (ARAÚJO et al., 2013). Após a etapa de proteção, a amostra foi chamada de SA-P.

O produto remanescente da etapa anterior (SA-P: 0,158 g) foi solubilizado em 79,25 mL de DMF anidro sob atmosfera inerte. Então foram adicionados 1,21 g do complexo SO₃-Py (8 equivalentes/unidade de glucose) e 0,35 mL de Et₃N, no qual foram agitados a temperatura ambiente durante 7 h. Após este tempo, a mistura foi neutralizada com a adição de bicarbonato de sódio saturado e adicionados 52,8 mL de solução de tampão fosfato 0,025 mol L⁻¹ (pH 7,0). Posteriormente, a mistura foi dialisada contra solução de NaCl 1 mol L⁻¹ (24 h) e água destilada (96 h). Após a purificação por diálise, como nos itens anteriores, a solução foi concentrada em evaporador rotativo e seco por liofilização. Após a etapa de sulfatação, a amostra foi chamada de SA-S.

Na etapa de desproteção, o material resultante (SA-S: 0,21 g) foi dissolvido em 140 mL de solução de ácido *p*-toluenossulfônico 1 mol L⁻¹ durante 48 h à temperatura ambiente. Após este tempo, a solução resultante foi neutralizada com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ e purificada por diálise como nos itens anteriores. A amostra então foi nomeada como SA, a qual foi armazenada em dessecador para caracterizações químicas.

4.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS)

Para a determinação do grau de substituição dos derivados, foi utilizado protocolo turbidimétrico descrito por Dodgson; Price, (1962). Amostras sulfatadas (1 mg) foram submetidas a hidrólise com HCl concentrado (1 mL), em banho termostatizado à 100 °C por 5 h. Para determinar o DS, 0,2 mL dos hidrolisados foram adicionados em tubos de ensaio contendo 3,8 mL de ácido tricloroacético (TCA, 3% m.v⁻¹), e 1,0 mL de solução gelatina-bário (gelatina Oxoid 5 mg mL⁻¹, BaCl₂ 5 mg mL⁻¹). Após a mistura ser agitada por um minuto, foi deixada em repouso por 15 minutos. O sulfato de bário resultante foi quantificado por leitura turbidimétrica à 360 nm. Para preparo da curva analítica, foi utilizado Na₂SO₄ em massas que variaram de 10-350 µg. O DS que designa o número médio de grupos sulfato em cada resíduo de açúcar foi estabelecido a partir do conteúdo de enxofre, tomando como base as equações 1 e 2, onde S = % enxofre:

$$S(\%) = \frac{BaSO_4(\mu g) * 0,1374 * 100}{amostra (\mu g)} \quad \text{Equação 1}$$

$$DS = \frac{162 * S}{3200 - 102 * S} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: 162 representa o peso molecular médio dos resíduos de glicosil (hexose) do polissacarídeo, 3200 representa a massa atômica do enxofre vezes 100, 102 representa um mol do grupo sulfato, após a sulfatação (SO₃Na).

4.4 PREPARAÇÃO DO HIDROGEL COM LAPONITA

O hidrogel foi obtido segundo metodologia descrita por Becher; Ornelas, (2017), no qual foi adicionado um conservante na formulação (NEOLONE™ PE - 0,5%), como descrito na Tabela 2. Posteriormente foi incorporado 0,03-1,25% (p/p) do princípio ativo (botriosferana sulfatada – SB*– ou nativa). Em seguida, o pH foi ajustado com uma solução de ácido cítrico a 20%. Foram geradas duas amostras, HID LAP (hidrogel de Laponita já com o ativo incorporado) e a Base LAP (base do hidrogel de Laponita, sem ativo).

Tabela 2- Formulação do hidrogel à base de Laponita.

Formulação	Quantidade
Laponita	5%
Poliacrilato de sódio	0,05%
Água ultrapura	QSP 100%
PBS (10x)	10%
Neolone	0,5%
BOT (sulfatada ou nativa)	0,03-1,25%

PBS: tampão salino de fosfato concentrado em 10x

Fonte: o próprio autor

4.5 PREPARAÇÃO DO GEL-CREME COM LECIGEL®

Para a produção deste gel-creme foram utilizados LECIGEL® (2%), glicerina (1%) como umectante, silicone volátil como emoliente (1%), e NEOLONE™ PE (0,5%) como conservante. Além disso, foram incorporados 0,03-1,25% (p/p) do princípio ativo (botriosferana sulfatada – SB* – ou nativa), como descrito na Tabela 3. Foram geradas duas amostras, HID LECI (gel-creme de LECIGEL® já com o ativo incorporado) e a Base LECI (base do gel-creme de LECIGEL®, sem ativo).

Tabela 3- Formulação do gel-creme à base de LECIGEL®.

Formulação	Quantidade
Água destilada	QSP 100%
LECIGEL®	2%
Glicerina	1%
Silicone volátil	1%
Neolone	0,5%
BOT (sulfatada ou nativa)	0,03-1,25%

Fonte: o próprio autor

4.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros de infravermelho das amostras derivatizadas de botriosferana foram obtidos em espectrômetro FTIR Bruker modelo Vertex 70, com acessório de refletância Platinum ATR no Laboratório de Química Prebiótica (LQP) do Departamento de Química da UEL, na faixa espectral compreendida entre 400 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} , número de acumulações de 16 varreduras para cada

espectro. A análise dos espectros foi realizada no programa Origin 8.5 SR1 (© OriginLab Corporation, EUA).

4.7 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de RMN 1D e 2D foram realizados em um espectrômetro de RMN Bruker (Avance III, Laboratório Multiusuário ESPEC - UEL) equipado com uma sonda de diâmetro de 5 mm, operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . As técnicas 2D utilizadas foram a *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy* ^1H - ^{13}C (HSQC) e *Corellation Spectroscopy* ^1H - ^1H (COSY). As amostras foram dissolvidas em três ciclos de água deuterada (D_2O) via etapas de solubilização/liofilização. Os experimentos foram realizados utilizando os programas de pulso padrão do equipamento. Os deslocamentos químicos foram medidos usando acetona como padrão interno ($\delta = 2,22$ ppm para ^1H e $\delta = 30,89$ ppm para ^{13}C). As análises dos espectros foram realizadas usando o programa de *software* MestreNova 6.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Espanha).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias das amostras de BOT e BOT sulfatada foram adquiridas em Microscópio eletrônico de Varredura Quanta FEG 250 – FEI (Laboratório Institucional de Microscopia – Unicamp). As amostras liofilizadas foram fixadas em fita de carbono para que as leituras nas amplitudes necessárias fossem realizadas.

Já as micrografias das formulações foram obtidas em Microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 (Laboratório De Microscopia Eletrônica e de Microanálise – LMEM, UEL). As amostras foram secas por liofilização e metalizadas com banho de ouro, para então serem adquiridas as imagens necessárias.

4.9 ANÁLISE TÉRMICA

As amostras liofilizadas de BOT e da botriosferana sulfatada (SB*)

foram submetidas à Análise Termogravimétrica (TGA) e à Análise de Termogravimetria Derivada (DTG), já as formulações foram analisadas por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC). As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu modelo TGA-50 (Laboratório de Espectroscopia – ESPEC, UEL).

4.10 ESTABILIDADE PRELIMINAR DAS FORMULAÇÕES

A estabilidade preliminar das formulações foi avaliada em um período de 15 dias, onde aproximadamente 10 g de cada amostra (Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI) em triplicata foram submetidos a condições de estresse para acelerar o aparecimento de possíveis sinais de instabilidade na formulação. As amostras, acondicionadas em frascos brancos opacos, foram submetidas a ciclos de 24 horas de aquecimento em estufa a 45 °C e resfriamento a 4°C (ANVISA, 2004). As formulações foram avaliadas segundo as características organolépticas de aparência, cor e odor, sendo classificadas como: nenhuma mudança, ligeiramente modificado, modificado ou fortemente modificado, tanto no início quanto ao final do tempo de experimento. Vale ressaltar que estas avaliações são apenas qualitativas. Além disso, propriedades como densidade, espalhabilidade, pH (pHmetro modelo Luca-210) e teste de centrifugação também foram realizados. Todos esses testes foram aplicados antes e após os 15 dias, no Laboratório de Inovação e Tecnologia Cosmecêutica (CCS – UEL).

4.10.1 Densidade

A densidade (d) foi determinada a 25 °C em picnômetro (10 mL). Para esta aferição, 5 g de cada formulação (Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI) foi primeiramente diluída em 45 mL de água destilada, em seguida essa solução foi vertida em picnômetro até transbordar, seco e pesado (em triplicata), segundo cálculo de densidade descrito nas equações abaixo (equação 3 e 4):

$$d = \frac{m}{v} \quad \text{Equação 3}$$

$$d = \frac{\text{peso}_{\text{balão cheio}} - \text{peso}_{\text{balão vazio}}}{10} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: m: massa; v: volume. Após o cálculo, o resultado é multiplicado pela diluição feita durante o teste (1:10).

4.10.2 Espalhabilidade

Este teste é baseado na capacidade de espalhabilidade da amostra quando submetida a uma pressão, de acordo com Borghetti; Knorst, (2006). Essa análise foi realizada em placas de vidro, onde 0,5 g das diferentes formulações (Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI) foi colocado sobre uma placa de vidro sob um papel milimetrado, onde um outro pedaço de placa de vidro menor (23 g) foi depositado em cima da amostra e contabilizado o tempo de 1 minuto, e após esse tempo, foi medido o diâmetro da distribuição da formulação. Em seguida, pesos de 2, 5 e 10 g foram colocados acima da placa menor de vidro e mais 1 minuto entre cada medição foi contabilizado para a aferição do diâmetro de espalhamento das amostras. Os resultados foram expressos em mm².

4.10.3 Teste de centrifugação

Neste teste o objetivo é determinar se não ocorrem modificações macroscópicas na amostra quando submetidas a elevadas rotações, ou seja, se a formulação se mantém íntegra sem separação de fases. Foram pesados 5 g de cada formulação (Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI) em um tubo de centrífuga, e submetidos a rotações de 3000 rpm durante 30 minutos (Centrífuga Baby® Modelo 206, Fanem® - São Paulo, Brasil).

4.11 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia da UEL.

4.11.1 Células e vírus

Células Vero (ATCC CCL 81, EUA; células epiteliais do rim de macaco verde africano) e clones celulares C6/36 do mosquito *Aedes albopictus* (ATCC CRL-1660, EUA) foram cultivados em meio de *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) (Gibco BRL, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA), 2 mM de glutamina, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco BRL), 100 UI mL^{-1} de penicilina (Novafarma, Brasil) e Anfotericina B 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Meizler Biopharma, Brasil) e mantidos, respectivamente, a 37 °C e 28 °C, sob 5% de CO_2 . Estoques de vírus: Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) cepa KOS (Aciclovir - sensível) e vírus da dengue sorotipo 2 (DENV-2), do biobanco do Laboratório de Virologia (LAVIR), Universidade Estadual de Londrina (Brasil), inoculados respectivamente em clones de células Vero e mosquito C6/36, até obter um efeito citopático (~90%), e então mantidas sob glicerol (10%) a -80 °C. Os títulos virais (TV) foram analisados usando o procedimento de ensaio TCID_{50} (50% da dose infecciosa de cultura de tecidos) (LOPES et al., 2021; REED; MUENCH, 1938).

4.11.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos derivados de BOT sulfatados foi determinada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,6-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Culturas confluentes de células Vero foram cultivadas em microplacas de 96 poços (1×10^4 células mL^{-1}) e então expostas a diferentes concentrações (15,6 - 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) das botriosferanas sulfatadas (SB, SB* e SP). Em seguida, o reagente MTT (1,25 mg mL^{-1}) foi adicionado às células (10 μL) e incubadas por 2 h a 37 °C. Em seguida, foi adicionado o agente solubilizante MTT (90 μL) e a mistura foi agitada por 15 min. A absorbância foi determinada usando um leitor de microplacas (570 e 690 nm, Bio-Tek Instruments, ELX800, EUA).

A porcentagem de viabilidade celular (CV%) foi calculada a partir da equação 5:

$$CV\% = [100 - (A_t/A_c) \times 100] \quad \text{Equação 5}$$

Onde A_t e A_c referem-se à absorbância das respectivas amostras de BOT sulfatadas testadas e ao controle (células não tratadas, contendo apenas meio de cultivo), respectivamente. A concentração citotóxica a 50% (CC_{50}) foi calculada por análise de regressão linear como a concentração das amostras de BOT sulfatadas necessárias para reduzir a viabilidade das células Vero em 50%.

As amostras Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI também foram submetidas a estas análises.

4.11.3 Atividade antiviral *in vitro*

Para avaliar a atividade contra as cepas HSV-1 KOS e DENV-2, as células Vero foram previamente cultivadas em microplacas de 96 poços a 37 °C, sob 5% de CO_2 , até a confluência (1×10^4 células mL^{-1}). Posteriormente, o meio de manutenção foi substituído por uma solução contendo HSV-1 ou DENV-2 e diferentes concentrações de SB, SB* ou SP (1,5 a 400 $\mu g mL^{-1}$) e adicionadas simultaneamente às células (multiplicidade de infecção 1, MOI 1). O controle viral (CV) e o controle celular (CC) foram analisados pela adição de DMEM (100 μL) contendo suspensões virais na ausência das substâncias teste, ou apenas DMEM, respectivamente. As microplacas foram então reincubadas nas mesmas condições de temperatura e CO_2 .

A atividade anti-DENV-2 foi avaliada reduzindo o TV (título viral) pelo $TCID_{50}$ (50% da dose infecciosa de cultura de tecidos), em relação ao CV usando o cálculo de Reed; Muench, (1938) e o algoritmo de Spearman & Kärber conforme descrito por Hierholzer; Killington, (1996). A atividade anti-herpética foi avaliada pelo procedimento de ensaio MTT, conforme descrito na Seção 4.11.2 e de acordo com Takeuchi; Baba; Shigeta, (1991). A porcentagem de inibição viral (%IV) foi determinada a partir da equação 6 abaixo:

$$IV(\%) = \left[(A_{t_{570nm}} / A_{t_{690nm}}) / \frac{(A_{cv_{570nm}} / A_{cv_{690nm}})}{(A_{cc_{570nm}} / A_{cc_{690nm}})} - (A_{CV_{570nm}} - A_{CV_{690nm}}) \right] \times 100$$

Equação 6

Onde A_t refere-se à absorvância média das células inoculadas com vírus e tratadas com SB, SB* e SP, e A_{cv} e A_{cc} referem-se às respectivas absorvâncias médias de CV e CC.

A concentração capaz de reduzir a infecção viral em 50% (IC_{50}) foi determinada por análise de regressão linear e o índice de seletividade (SI) pela razão: CC_{50}/IC_{50} .

Aciclovir (ACV — Novafarma Ind. Farmac., Brasil, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizado como controle positivo para HSV-1.

As amostras Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI também foram submetidas a estas análises, porém através do ensaio virucida. Para isso, as formulações (900 μL) foram inicialmente colocadas em contato com vírus (100 μL) por 1 h na concentração de uso. Em seguida, foi realizada a diluição até concentração não citotóxica (diluição 1/100) e então inoculadas em células Vero para realização das análises.

Vale ressaltar que os testes com os vírus da Dengue foram realizados também em células Vero. As células de clones celulares C6/36 do mosquito *Aedes albopictus* foram utilizadas apenas para a replicação do vírus.

4.11.4 Investigação do mecanismo de ação antiviral *in vitro*

A investigação do possível mecanismo de ação da amostra SB*, utilizada para incorporação nas formulações, na infecção por HSV-1 foi realizada por meio de $TCID_{50}$, seguindo o protocolo de Reed; Muench, (1938), associado à redução de MTT, mencionado anteriormente.

4.11.4.1 Ensaio Virucida

O ensaio virucida foi realizado com o objetivo de identificar a capacidade de destruição e/ou inativação da partícula viral, na ausência de célula,

com diminuição da infectividade viral, decorrente do contato direto entre vírus e compostos testes. Concentrações 50, 25, 12,5 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do SB*, diluídas em DMEM-SF (DMEM sem soro fetal bovino), foram incubadas com HSV-1 (10 μL), em um volume final de 100 μL , pelo período de 1 hora. Em seguida, esta suspensão foi novamente diluída (1:100) em meio DMEM-SF, para inoculação em células. Para isto, células Vero (3×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO_2 , previamente por 24 horas. As suspensões diluídas foram então aplicadas sobre as monocamadas celulares, com um volume final de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Uma alíquota pura de HSV-1 com CV (em contato com DMEM-SF, na ausência dos compostos) e CC (células tratadas apenas com DMEM-SF) foi mantida nas mesmas condições do teste como controle positivo e negativo, respectivamente. A placa foi incubada em estufa por 72 horas. A revelação pelo teste de redução de MTT e TCID_{50} foi realizada como descrito anteriormente (REED; MUENCH, 1938).

4.11.4.2 Tempo de adição

A variação no tempo de administração do composto (50, 25, 12,5 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em meio DMEM-SF, com um volume final de 100 $\mu\text{L/poço}$, foi avaliada antes (-3 h), durante (0 h) e após (+3 h) a infecção viral, e foi utilizada para identificar em quais possíveis etapas do ciclo replicativo o composto exercia efeito inibitório. Com tal objetivo, células Vero (3×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO_2 por 24 horas. No ensaio do *pré-tratamento*, a monocamada celular foi exposta ao SB* previamente durante 3 horas (-3 h). Após esse período, o SB* foi removido, as células lavadas com D-PBS (tampão fosfato salino de Dulbecco) e inoculadas com HSV-1 (MOI 1), com posterior incubação por 72 horas. Para avaliação da ação de SB* no momento da infecção (*efeito simultâneo* - tempo 0 h) o composto sulfatado foi adicionado ao vírus (HSV-1 KOS) simultaneamente à infecção nas células Vero. Para avaliação da ação de SB* como tratamento 3 h *pós-infecção* (+3 h), as monocamadas celulares foram inicialmente infectadas com HSV-1 (MOI 1) por 1 hora para adsorção viral. Após, os poços foram lavados com D-PBS, seguido de adição de meio de manutenção celular (DMEM-SF) por mais 2h. Após 3 h de infecção, o meio de manutenção da monocamada celular foi

substituído pelas concentrações testes de SB*, seguido de incubação por 72 h, a 37 °C e 5% CO₂. Poços infectados e não tratados, e poços não infectados e não tratados foram mantidos como controle viral (CV) e celular (CC), respectivamente, em todos os ensaios e nas mesmas condições supracitadas. A revelação pelo teste de redução de MTT e TCID₅₀ foi realizada como descrito anteriormente.

4.11.5 Avaliação da irritação dérmica e eficácia antiviral *in vivo*

Camundongos BALB/c (17,8 - 25,5 g), foram ambientados no biotério (2 dias), após o transporte, com ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura constante 22±2 °C e dieta *ad libitum*. Para os ensaios, os animais foram previamente submetidos a depilação da região dorsal, sendo anestesiados com ketamina (100 mg/kg) via intraperitoneal. Foram utilizados 6 camundongos por grupo de experimento, conforme Cardozo et al., (2013), sendo organizados em: 1) Grupo controle escarificação; 2) Grupo Laponita teste – irritação dérmica; 3) Grupo Laponita base – irritação dérmica; 4) Grupo LECIGEL® teste – irritação dérmica; 5) Grupo LECIGEL® base – irritação dérmica; 6) Controle positivo; 7) Controle negativo; 8) Grupo Laponita base – KOS ; 9) Grupo Laponita teste – KOS; 10) Grupo LECIGEL® base – KOS; e 11) Grupo LECIGEL® teste – KOS. Inicialmente, a toxicidade das formulações foi avaliada através do ensaio de irritação dérmica, de acordo com a norma descrita no guia OECD nº 404 (2002). Diariamente, cerca de 100 mg dos produtos eram aplicados na região dorsal, três vezes ao dia, com intervalo de 5 h, durante 7 dias. Após, os animais foram eutanasiados e submetidos a análise histológica.

Para o ensaio antiviral, os animais também foram submetidos a depilação e após 24 h, realizou-se a escarificação como porta de entrada para os vírus, na qual a pele foi riscada (n= 10) com o auxílio de uma agulha de calibre 27, obtendo-se uma área aproximada de 2 cm², seguida da inoculação viral (HSV-1 KOS, 50 µL, 1,33x10⁸ TCID₅₀/mL). Os camundongos foram alocados em diferentes grupos (Tabela 4), iniciando-se o tratamento 4 h após a inoculação viral, durante 7 dias, 3 vezes ao dia, como demonstrado abaixo:

Tabela 4- Grupos de animais, vírus inoculado e respectivos tratamentos.

Grupos	Vírus	Tratamento	Nº de animais
--------	-------	------------	---------------

01	Controle escarificação	-	-	04
02	Controle positivo	KOS	-	06
03	Controle negativo	KOS	Aciclovir	06
04	Formulação base	KOS	Formulação base Laponita	06
05	Formulação teste	KOS	Formulação teste Laponita	06
06	Formulação base	KOS	Formulação base LECIGEL™	06
07	Formulação teste	KOS	Formulação teste LECIGEL™	06

Fonte: o próprio autor

As alterações foram observadas diariamente de acordo com o desenvolvimento das lesões na pele, sendo classificadas como: 0 - sem lesões visíveis; 1 – presença de vesículas; 2 - erosão ou ulceração da vesícula; 3 - lesões zosteriformes leves; 4 - lesões zosteriformes moderadas; 5 - lesões zosteriformes severas (CARDOZO et al., 2013).

Ao final do experimento (7° dia) os camundongos foram pesados e eutanasiados por meio de inalação com isoflurano e deslocamento cervical, com posterior remoção da área da pele, para avaliação histológica descritiva. Animais que apresentaram outras alterações gerais (físicas, comportamentais, etc) não relacionadas a infecção herpética cutânea foram imediatamente eutanasiados, evitando sofrimento. Os experimentos *in vivo* foram realizados com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (053.2022). Os experimentos foram conduzidos no biotério localizado no CCB da UEL.

4.11.6 Histologia

Amostras de pele dos camundongos foram coletadas e submersas em solução de formalina tamponada a 10% para a fixação do tecido. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processamento histológico padrão e embebidas em parafina. Foram realizadas secções de 5 µm a partir dos blocos de parafina e coradas em hematoxilina e eosina (H.E.).

Os critérios selecionados para a realização do escore tecidual foram: hiperkeratose; hiperplasia epidérmica; espongiose; inflamação epidérmica; inflamação dérmica; inflamação hipodérmica; necrose epidérmica e necrose dérmica.

Cada critério foi avaliado de acordo com sua intensidade e extensão com valores atribuídos de 0 (ausente), 1 (discreto), 2 (moderado) e 3 (severo). Esses valores foram multiplicados pelo fator de severidade atribuído a cada critério, sendo o fator multiplicador de 1 para hiperkeratose, hiperplasia epidérmica e espongirose; fator 2 para inflamação epidérmica, dérmica e hipodérmica; e fator 3 para necrose epidérmica e dérmica. A soma dos valores multiplicados consiste no resultado individual. O resultado do escore variou de 0 (mínimo) a 45 (máximo).

4.11.7 Atividade anticoagulante

A atividade anticoagulante da botriosferana (BOT) e das amostras sulfatadas foi avaliada de acordo com o protocolo descrito por Vasconcelos et al., (2013), com modificações. O tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) foram realizados em sistema automático de análise de coagulação do sangue (Sysmex CS-2500 System, Siemes Healthineers, DE). As concentrações testadas foram de 50 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o pool de soros foi preparado com 15 de amostras, com os parâmetros de TP e APTT normais da rotina do Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL). Para o teste, 50 μL de cada amostra foram solubilizadas em 450 μL do pool de soros e para o controle, 50 μL do tampão OVB (diluyente de fibrinogênio) foi misturado em 450 μL do pool de soros. As análises foram preparadas em duplicatas.

4.11.8 Análise estatística

Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram avaliadas pelo teste ANOVA de uma via (*one-way*), seguido do teste de Tukey para comparação múltipla utilizando o software GraphPad Prism (versão 7.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

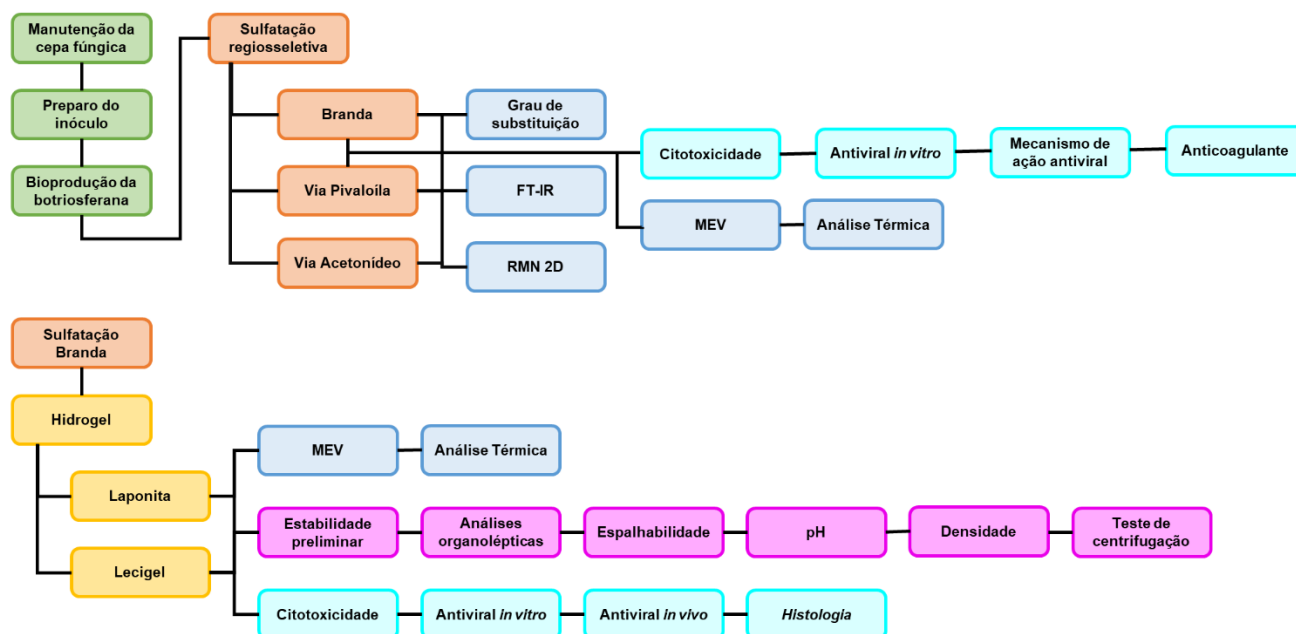
Na Figura 8 estão descritos os fluxogramas esquemáticos das atividades realizadas.

O processo deu-se início pela bioprodução da botriosferana (BOT), a qual foi cedida gentilmente pela Dra. Aneli de Melo Barbosa-Dekker (Beta-Glucan Eireli) (BARBOSA et al., 2003). Na sequência, sulfatamos regioseletivamente a botriosferana pelas três vias reacionais propostas. Tais amostras foram caracterizadas quimicamente e avaliadas quanto a suas capacidades citotóxicas e atividades antivirais *in vitro*, a fim de se estabelecer uma relação estrutura-atividade.

Já com essa relação estrutura-atividade estabelecida, foi possível passar para o desenvolvimento do produto anti-herpético. Foram desenvolvidas duas formulações, as quais foram caracterizadas por parâmetros físico-químicos, de pré-estabilidade e por fim, quanto a sua capacidade citotóxica e atividade antiviral *in vitro* e *in vivo*.

Não foi desenvolvido nenhum produto para combater o vírus da dengue pois as amostras desenvolvidas nesse estudo não apresentaram atividade antiviral frente a este vírus.

Figura 8- Fluxogramas das atividades realizadas, desde produção biotecnológica, sulfatação, caracterização química, produção das formulações, estudo de estabilidade preliminar e bioatividades.



Fonte: o próprio autor

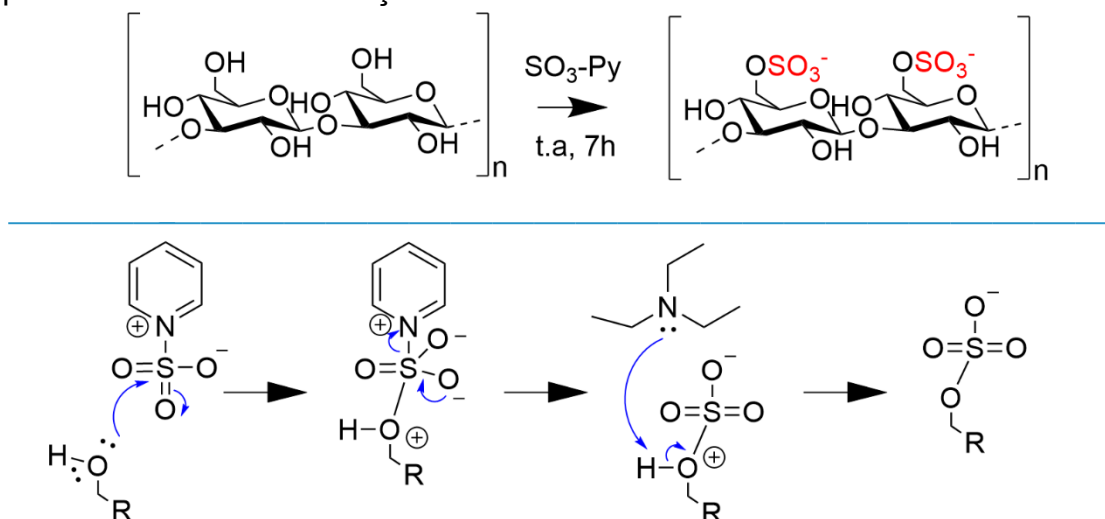
5.2 SULFATAÇÃO BRANDA (SB) E CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS

Na reação por sulfatação branda, não há etapas sequenciais e nem proteção de grupos hidroxila específicos, ou seja, as condições reacionais são planejadas para que os grupos sulfônicos sejam inseridos nas funções alcoólicas mais reativas do polissacarídeo. Segundo a literatura, o átomo de O do grupo OH-6 é mais suscetível à substituição, por ser um álcool primário, mais exposto e reativo (ARLOV et al., 2021) do que os outros grupos hidroxila, dessa forma o mecanismo reacional de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (KAZACHENKO et al., 2021) se inicia deste ponto, como mostrado na Figura 9. Vale ressaltar que solventes apróticos são facilitadores de reações que procedem por este mecanismo e álcoois primários tendem a reagir via S_N2 (KAZACHENKO et al., 2021).

O átomo de oxigênio mais nucleofílico ataca o átomo de enxofre presente no agente derivatizante ($SO_3\text{-Py}$), o qual se encontra com densidade eletrônica positiva. Neste ponto, uma das duplas ligações presentes no complexo $SO_3\text{-Py}$ é desfeita e o átomo de oxigênio desta ligação adquire carga parcial negativa. Na

sequência, esta dupla ligação é reestabelecida, e neste momento a piridina presente no complexo é despreendida da estrutura para o meio, a qual passa a atuar como um catalisador. Por fim, a amina (Et_3N) também presente no meio age como um agente neutralizador, capturando os prótons liberados durante a reação (ARAÚJO et al., 2013; BEDINI et al., 2017; GREEN; GARNEAU-TSODIKOVA, 2020). Além disso, nossa intenção nessa reação era usar um número limitado de equivalentes do complexo reagente $\text{SO}_3\text{-Py}$ (8 equivalentes/unidade de glucose) para minimizar a probabilidade de ocorrência de sulfatação nas posições hidroxila de álcool secundário no polissacarídeo.

Figura 9- Esquema geral da síntese da botriosferana sulfatada via branda (SB) e seu respectivo mecanismo de reação.



Onde: R= C5 das unidades de Glc da BOT

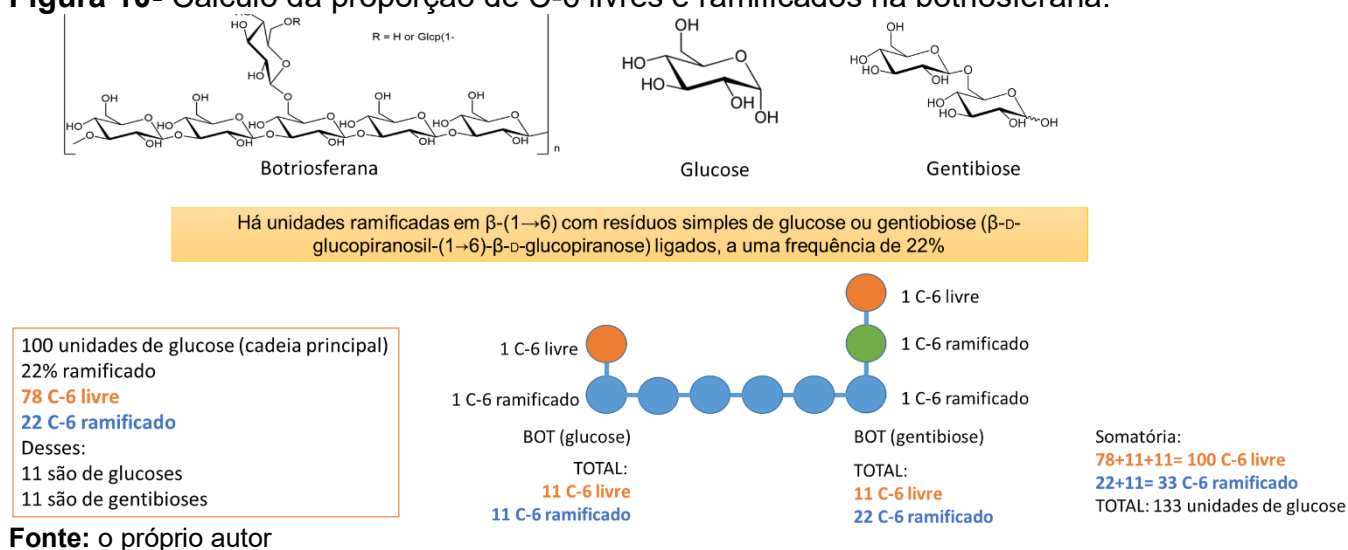
Fonte: baseada em Araújo et al., (2013); Bedini et al., (2017); Green; Garneau-Tsodikova, (2020).

A presença dos grupos sulfônicos foi quantificada por turbidimetria e resultou em um DS de 0,82, o que significa que 82% das unidades de glucose foram sulfatadas. A botriosferana é uma β -D-glucana compreendendo uma estrutura repetitiva de unidades de glucose ao longo da cadeia principal β -(1 \rightarrow 3). Além disso, há unidades ramificadas em β -(1 \rightarrow 6) com resíduos simples de glucose ou gentiobiose (β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosose) ligados, a uma frequência de 21% ou 22% para BOT produzido por *B. rhodina* MAMB-05 quando cultivado em sacarose e glucose, respectivamente (BARBOSA et al., 2003; DE LOURDES CORRADI DA SILVA et al., 2005).

Analisando a estrutura por outra perspectiva, para cada 100 unidades

de glucose na cadeia principal, onde 22% das unidades são ramificadas em uma ou duas unidades de comprimento, existem na cadeia principal 78 unidades de C-6 livre e 22 unidades de C-6 ocupadas por ramificações. Destas 22 ramificações, em média, 11 são ramificações de uma unidade glicosídica de comprimento, e as outras 11 unidades são gentibioses, com duas unidades de comprimento (Figura 10). Dessa forma, tem-se 133 unidades de glucose no total, sendo 100 unidades com C-6 livre e 33 unidades ramificadas em C-6. Em suma, 75% das unidades totais de glucose possuem C-6 livre, disponível para substituição, portanto, todas as posições C-6 podem ser consideradas sulfatadas com apenas um ciclo de derivatização. Obteve-se um rendimento de 40% em massa do polissacarídeo para esta reação, as perdas podem ser resultantes da degradação do polissacarídeo e remoção de fragmentos por diálise.

Figura 10- Cálculo da proporção de C-6 livres e ramificados na botriosferana.



Fonte: o próprio autor

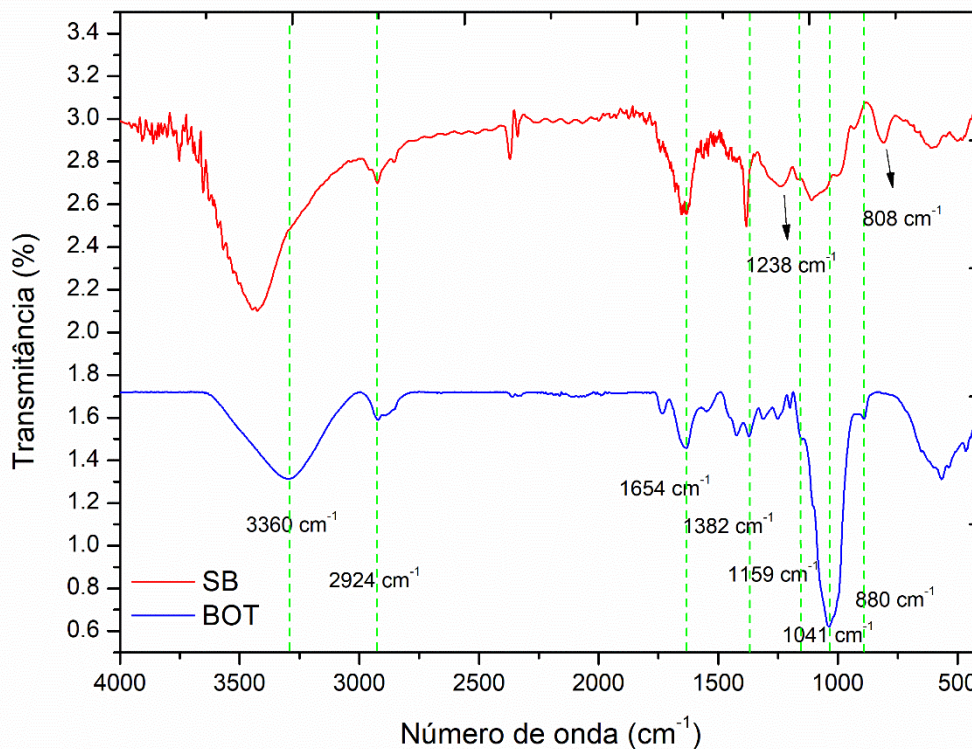
Os espectros FT-IR das amostras de BOT e SB gerados entre 4000 e 400 cm^{-1} apresentaram sinais típicos de polissacarídeos com bandas características de glucanas, como mostra a Figura 11. As bandas largas de intensidade forte na região de 3360 a 3414 cm^{-1} presentes nos espectros foram atribuídas à vibração de estiramento do grupo hidroxila. A vibração de estiramento C-H sp^3 foi identificada na região de 2924 cm^{-1} (BUDDANA; VARANASI; SHETTY, 2015; MA et al., 2012). Bandas de média intensidade presentes na região de 1654 cm^{-1} indicam estiramento do anel de glucose, característico em polissacarídeos (XU et al., 2009). Na região de 1382 cm^{-1} aparecem bandas características de vibrações assimétricas dos grupos

CH₂ e C-O-H (WANG; ZHANG, 2009). Uma banda com dois picos na região de 1159 a 1041 cm⁻¹ é característica do estiramento C-O do álcool e do anel de glucose, em que as últimas são vibrações específicas de ligações glicosídicas do tipo (1→3) presentes na estrutura da botriosferana nativa e seus derivados (HUSSAIN; RATHER; SURADKAR, 2017; JAYAMANO HAR et al., 2018; SACCHELLI et al., 2019). A absorção na região de 880 cm⁻¹ indica a configuração do tipo β neste polissacarídeo, sendo enfraquecida nos derivados sulfatados ou mesmo encoberta por outras bandas (WAN-MOHTAR et al., 2016).

No espectro do derivado sulfatado SB, ainda na Figura 11, novas bandas apareceram nas regiões de 808 cm⁻¹ e 1238 cm⁻¹ que são características de dobramento assimétrico do grupo C-O-S e fortes vibrações assimétricas da ligação S=O, respectivamente, confirmando a sulfatação (SACCHELLI et al., 2019).

Liu et al., (2017) produziram um derivado sulfatado com alto DS (1,6) a partir da glucana extraída do basidiomiceto *Phellinus ribis*, utilizando formamida e ácido clorossulfônico como agente sulfatante. Tais autores também confirmaram a sulfatação da amostra pelas bandas características nas regiões em 1251 cm⁻¹ (vibração assimétrica S=O) e 808 cm⁻¹ (dobramento das ligações C-O-S associadas ao grupo C-O-SO₃⁻).

Figura 11- Espectros FT-IR de BOT nativa (linha azul) e BOT sulfatada via branda (SB – linha vermelha).

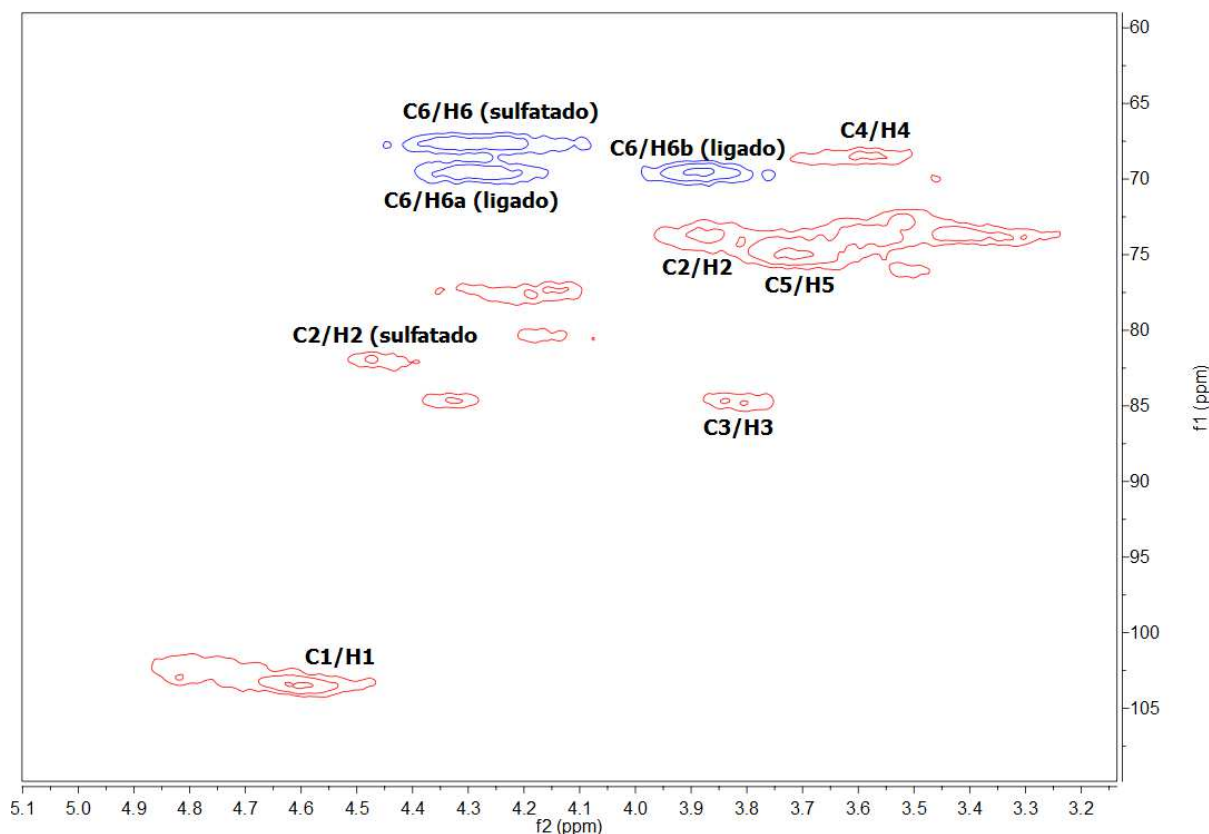


Fonte: o próprio autor

Em relação à caracterização por RMN, o espectro HSQC do derivado SB (Figura 12) mostra que não há sinais de C6-OH livre na região de 60/61 ppm, característicos da BOT nativa. Por outro lado, há sinais de posições C-6 substituídas, tanto por ligações glicosídicas (69,6/3,8 e 69,5/4,3 ppm) quanto por grupos sulfônicos (67,7/4,3 ppm), conforme descrito na Tabela 5. Além disso, é possível verificar sinais nas regiões de 77,6/4,1 ppm e 81,9/4,5 ppm, que não são característicos de BOT (BARBOSA et al., 2003). Tais sinais podem indicar sulfatação em C-4 e/ou C-2, porém menor, já que a sulfatação ocorreu principalmente em C-6. Portanto, a geração do derivado botriosferana 6-O-sulfatado foi confirmada. O espectro de HSQC da BOT pode ser visualizado na seção Anexos (Anexo A).

Zhang et al., (2020) sulfatou regioselectivamente uma β -glucana de *Ganoderma lucidum* nas posições C-6, corroborando os sinais de carbono substituído em 67,1 e 66,5 ppm. Sun et al., (2016), também sulfatou um exopolissacarídeo fúngico, na posição C-6, confirmando o deslocamento químico em 65,5 ppm.

Figura 12- Espectro ^1H - ^{13}C HSQC da botriosferana sulfatada SB. As regiões C6/H6 sulfatadas são indicadas, não apresentando sinais espectrais de C6/H6 com grupos OH livres.



Fonte: o próprio autor

Tabela 5- Atribuição de RMN de ^{13}C de botriosferanas (nativa e sulfatada - SB) em D_2O ($0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$).

Amostra	Deslocamentos químicos (ppm)							
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6g	C-6s	C-6 _{OH}
BOT	103,4	73,4	87,3	70,0	75,5	69,0	-	61,0
SB	103,4	73,6	84,8	68,5	75,0	69,5	67,6	-

BOT: sinais descritos por Sacchelli et al. (2019);

C-6s: C-6 ligados a grupos sulfato;

C-6g: C-6 unidos por ligações glicosídicas;

C-6_{OH}: C6-OH livre;

- : Não observado.

Fonte: o próprio autor

5.3 SULFATAÇÃO VIA ÉSTER DE PIVALOÍLA E CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS

Neste estudo, utilizamos a rota sintética de sulfatação via éster de pivaloíla que é classificada como uma síntese sequencial envolvendo três etapas:

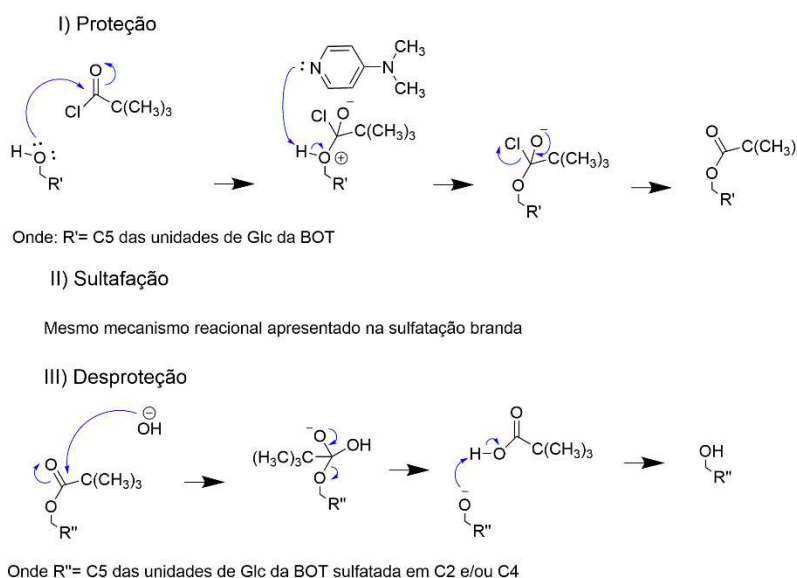
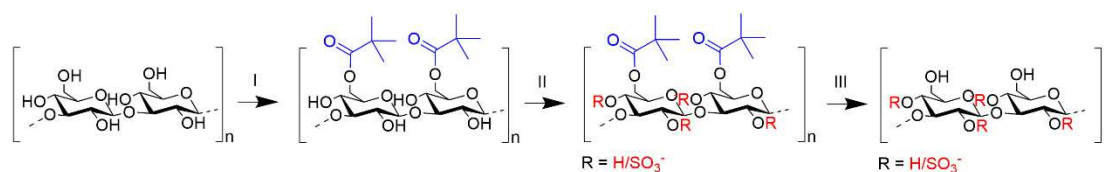
proteção-sulfatação-desproteção. Tal sequência de reações permite a proteção de determinados grupos hidroxila no polissacarídeo, permitindo assim maior controle na regioseletividade da sulfatação (BEDINI et al., 2017).

Na rota sintética, a primeira etapa é a proteção da posição C-6, utilizando o cloreto de pivaloíla, como mostrado na Figura 13 (I). A esterificação ocorre entre o grupo hidroxila do polissacarídeo localizado em C-6, mais disponível para substituição, reagindo com um agente acilante, neste caso o cloreto de pivaloíla. Os ésteres de pivaloíla são grupos funcionais bastante volumosos que podem ser inseridos seletivamente nos grupos hidroxila primários de polissacarídeos (OH-6 em glucanas), permitindo assim uma reação de sulfatação altamente regioseletiva subsequente nos grupos hidroxila secundários livres (BEDINI et al., 2017). Na reação de proteção por éster de pivaloíla, piridina e 4-dimetilaminopiridina foram usados como base e catalisador, e DMF como solvente.

A segunda etapa da reação é a sulfatação propriamente dita (Figura 13 II), que ocorre da mesma forma como descrito no item anterior (5.2) da sulfatação branda, entretanto, as posições disponíveis, neste caso, nas quais podem ocorrer as substituições nucleofílicas são as posições C-2 e C-4. O átomo nucleofílico de oxigênio ataca o átomo de enxofre do agente derivatizante ($\text{SO}_3\text{-Py}$), que possui densidade eletrônica positiva. Isso resulta na quebra de uma das ligações duplas no complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$, enquanto outro átomo de oxigênio na estrutura adquire carga parcial negativa. Em seguida, a ligação dupla é restabelecida, e a piridina (catalisador) no meio age como agente neutralizador, capturando os prótons liberados durante a reação.

Em seguida, ocorreu a desproteção e última etapa da síntese (Figura 13 III), na qual o grupo protetor pivaloíla é retirado da estrutura pela ação de uma base forte (NaOH), uma hidrólise em meio básico.

Figura 13- Esquema geral da síntese do derivado de botriosferana SP, com as etapas de I) proteção, II) sulfatação e III) desproteção, e seus respectivos mecanismos de reação.



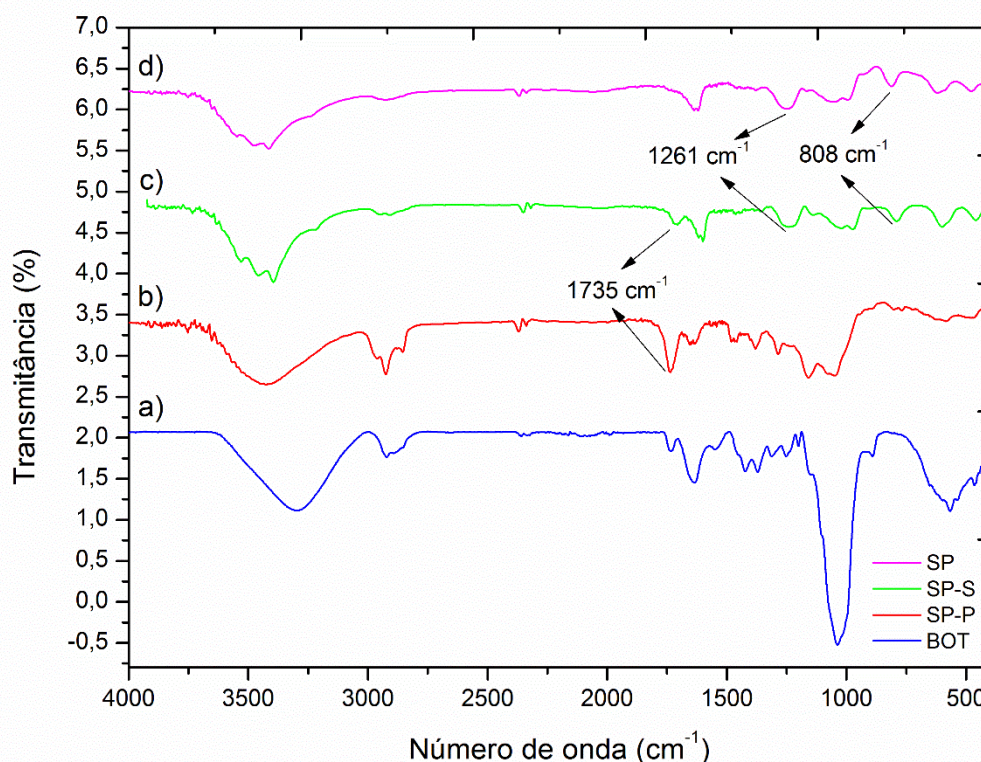
Fonte: o próprio autor

Segundo a literatura, a proporção de agente derivatizante (complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$, por exemplo), temperatura e tempo de reação são os principais fatores que afetam a eficiência da sulfatação (LI; DAI; SHAH, 2017; LU et al., 2008). A rota sintética via éster de pivaloíla resultou em DS de 0,49, o que significa uma média de aproximadamente um grupo sulfato a cada duas unidades de glucose, com conseqüente menor rendimento da reação (33,8%) em relação à massa obtida. Um número maior de equivalentes por unidade de glucose (20 equivalentes) e três ciclos da reação de sulfatação foram usados para esse fim. A reação foi conduzida em meio heterogêneo, o que pode ter tornado o polissacarídeo menos reativo. Também, grupos com grande impedimento estérico, como o volumoso grupo pivaloíla, podem ter dificultado o acesso aos grupos hidroxila pelo eletrófilo SO_3 . Além disso, três ciclos de sulfatação podem ter levado à hidrólise parcial do polissacarídeo e conseqüente perda da amostra durante as diálises. Estes são alguns dos fatores que podem ter contribuído para os resultados obtidos, apesar de a síntese de SP ter sido concluída com sucesso. Assim, destaca-se a relevância da derivatização via pivaloíla, uma reação que produz satisfatoriamente os derivados esperados. Apenas em nossa

pesquisa, enfrentamos algumas dificuldades devido às características intrínsecas da amostra, como a baixa solubilidade.

Na primeira etapa da rota sintética (Figura 13 I), a proteção regioseletiva na posição C-6 pelo grupo pivaloíla foi confirmada pelo espectro FT-IR (Figura 14 b) pela presença de uma banda na região de 1735 cm^{-1} que é característica de uma função éster (estiramento C=O). Em seguida, foi realizada a etapa de inserção dos grupos sulfônicos. Neste caso, a sulfatação foi direcionada para as posições C-2 e C-4, e foi confirmada pela presença de bandas características em 808 cm^{-1} e 1261 cm^{-1} no respectivo espectro (Figura 14 c). Na etapa de desproteção, a banda em 1735 cm^{-1} anteriormente presente e característica da função éster desapareceu (Figura 14 d), confirmando que todas as etapas de proteção-sulfatação-desproteção foram concluídas com sucesso.

Figura 14- Espectros FT-IR de BOT e seus derivados produzidos pela rota sintética via éster de pivaloíla (etapas de: proteção – SP-P, sulfatação – SP-S e desproteção – SP).



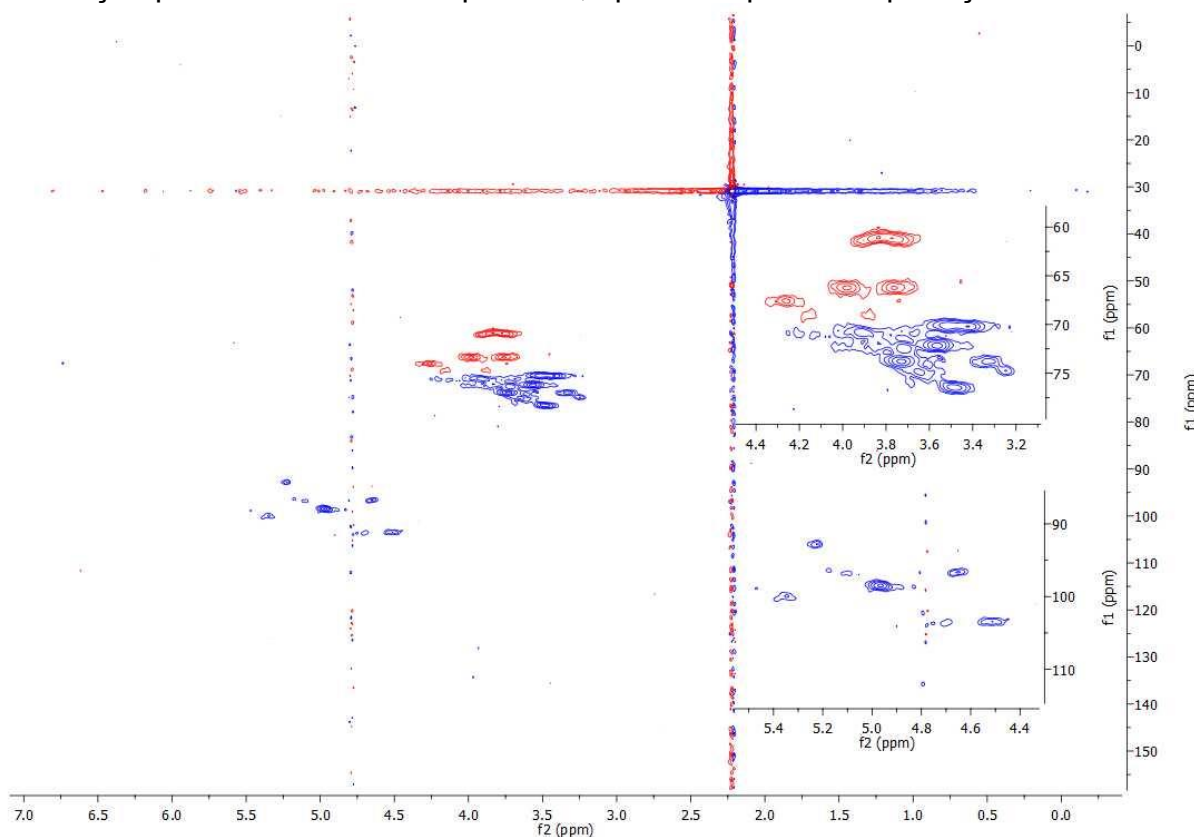
Fonte: o próprio autor

Na rota sintética via éster de pivaloíla, apesar dos ciclos sequenciais de sulfatação (3 repetições), o volumoso grupo protetor inserido na posição C-6 possivelmente impediu estericamente as outras posições nas unidades de glucose,

levando a um grau moderado de substituição por grupos sulfônicos (DS = 0,49). No entanto, com a posição C-6 ocupada pelo grupo protetor, as posições C-2 e C-4 ficaram livres para derivatização nesta etapa.

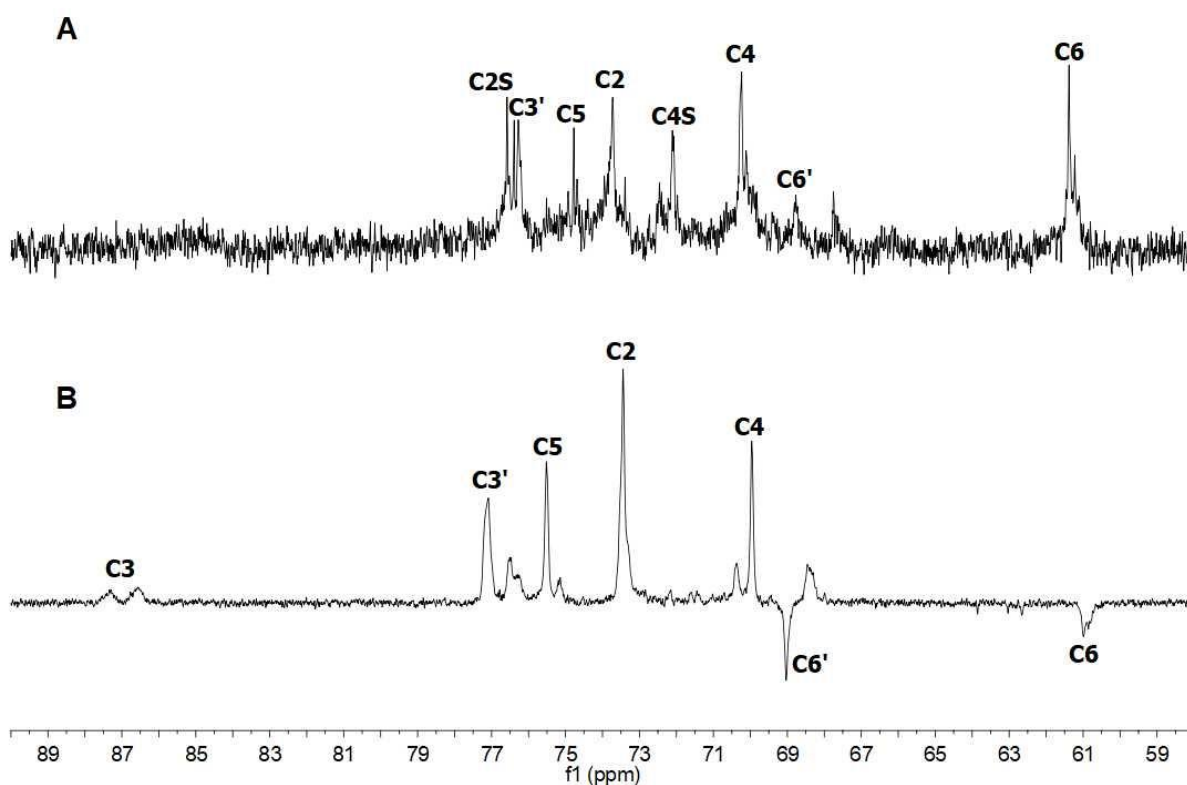
Na etapa final da sequência sintética, ou seja, desproteção da molécula, o grupo pivaloila foi removido da estrutura. O espectro de HSQC (^1H - ^{13}C) do produto SP (Figura 15) tornou-se mais complicado que o espectro 2D de SB. A fim de confirmar a sulfatação regioseletiva do SP, foram realizadas análises adicionais de RMN, tais como RMN de ^{13}C e COSY. Em comparação com o espectro de RMN de ^{13}C da botriosferana nativa, o espectro de RMN de ^{13}C de SP (Figura 16) mostrou um perfil semelhante. Conforme observado, o sinal intenso em 61,4 ppm, atribuído ao C6-OH livre, indica que a proteção desta posição foi bem-sucedida. Além disso, houve sinais claros de sulfatação regioseletiva, com aparecimento de novos sinais em 76,6 e 72,1 ppm, correspondentes à sulfatação em C-2 e C-4, respectivamente (Tabela 6).

Figura 15- Espectro de HSQC (^1H - ^{13}C) do derivado de botriosferana SP, obtido por sulfatação pela rota via éster de pivaloila, após a etapa de desproteção.



Fonte: o próprio autor

Figura 16- Espectro de RMN de ^{13}C de SP (A), obtido por sulfatação via pivaloíla, em comparação com o espectro de RMN de ^{13}C DEPT da BOT (B). C2/3/4/5/6 representam os sinais da cadeia principal dos polissacarídeos, C3'/6' representam os sinais das posições envolvidas em ramificações e C2S/4S de posições sulfatadas.



Fonte: o próprio autor

Tabela 6- Atribuição dos espectros de RMN de ^{13}C de botriosferanas (nativa e sulfatada - SP) em D_2O ($0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$).

Amostra	Deslocamentos químicos (ppm)									
	C-1	C-2	C-2s	C-3	C-4	C-4s	C-5	C-6g	C-6s	C-6OH
BOT	103,4	73,4	-	87,3	70,0	-	75,5	69,0	-	61,0
SP	103,4	73,7	76,6	-	70,2	72,1	74,8	68,8	67,8	61,4

BOT: sinais descritos por Sacchelli et al., (2019);

C-Xs: átomos de carbono ligados a grupos sulfato;

C-6g: C-6 unidos por ligações glicosídicas;

C-6OH: C6-OH livre;

- : Não observado.

Fonte: o próprio autor

Zhang et al., (2020) sulfataram regioseletivamente uma (1→3)(1→6)- β -D-glucana ramificada de *Ganoderma lucidum*, estruturalmente semelhante à botriosferana, nas posições C-2 e C-4. Os autores encontraram deslocamentos químicos de 73,7 e 69,4 ppm para C-2 e C-4 não substituídos, e 77,4 e 74,9 ppm para C-2 e C-4 sulfatados, respectivamente. Observamos o mesmo

comportamento encontrando sinais em 73,7 e 70,2 ppm, típicos de C-2 e C-4 não substituídos, e sinais em 76,6 e 72,1 ppm, para C-2 e C-4 sulfatados, respectivamente. Além disso, para a β -glucana de *G. lucidum*, um sinal a 60,8 ppm indicou C-6 não substituído, como em SP (61,4 ppm).

Da mesma forma, Wang et al., (2015a), sulfataram regioseletivamente (em C-2 e C-3) um polissacarídeo de *Artemisia sphaerocephala*, no qual não foram observadas substituições em posições C-6 na região característica de 65 a 70 ppm. No presente trabalho, a sulfatação das posições C-6 da botriosferana pode estar envolvida, porém em menor proporção, devido ao sinal fraco em 67,8 ppm. A atribuição dos sinais de RMN de SP também é apoiada pelos experimentos HSQC e COSY. Nossas descobertas indicam que a rota sintética para SP não proporcionou uma sulfatação regioespecífica das posições C-2/C-4, mas sim uma sulfatação regioseletiva dessas posições, assim como descrito por Zhang et al., (2020).

O DS de 0,49 para a amostra SP significa que existe, aproximadamente, um grupo sulfato para cada duas unidades de glucose do derivado. Concluimos que SP é um derivado de botriosferana sulfatado regioseletivamente em C-2 e C-4, com a grande maioria de suas posições C-6 não sulfatadas. A sulfatação em C-2 é provavelmente mais frequente que a sulfatação em C-4, devido à maior intensidade do sinal de C-2 sulfatado, e também por causa do melhor acesso ao átomo O-2, menos impedido pelo grupo pivaloila do que para o átomo O-4.

5.4 SULFATAÇÃO VIA ACETONÍDEO E CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS

A sulfatação via acetonídeo também ocorre em três etapas: proteção, sulfatação e desproteção. Nesta rota sintética, o objetivo é inserir os grupos sulfônicos nas posições C-2 da estrutura através do bloqueio das demais posições (C-4/C-6) por grupos protetores do tipo cetel – um acetonídeo.

Na reação de proteção por acetonídeo (Figura 17 I), o próton doado pelo ácido canforsulfônico torna a acetona mais reativa, assim favorecendo o ataque pelo grupo hidroxila menos impedido estericamente (OH-6) e, sequencialmente, a hidroxila secundária na posição 4 (OH-4), promovendo o fechamento do anel de 6 átomos para a formação de um cetel.

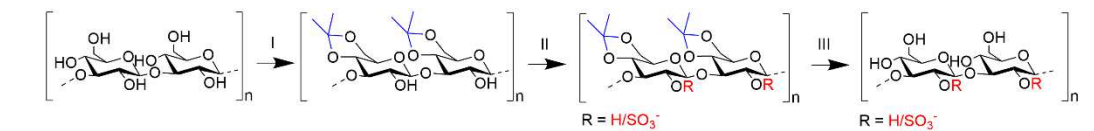
A etapa de sulfatação ocorre da mesma forma como descrito no item

5.2, na preparação da amostra SB. Neste caso, somente a hidroxila desprotegida (OH-2) pode atacar o SO_3 , levando à formação de um polissacarídeo protegido na forma de acetonídeo, e sulfatado regiosseletivamente na posição OH-2 (Figura 17 II).

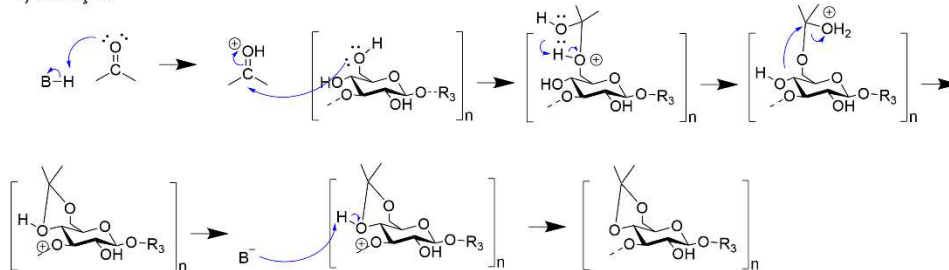
Na última etapa, de desproteção (Figura 17 III), ocorre uma hidrólise de cetel. Inicialmente um dos oxigênios do acetonídeo será protonado pelo ácido *p*-toluenosulfônico, na sequência ocorrerá uma quebra do anel na ligação entre C-O intermediada pela formação de uma dupla ligação entre C=O com o outro oxigênio do acetonídeo. Na sequência, a água atacará o carbono proveniente da acetona, a água será desprotonada e a base conjugada do ácido *p*-toluenosulfônico volta a protonar o outro oxigênio. A ligação dupla da acetona é restituída, e a acetona protonada se desprende da estrutura do botriosferana. Dessa forma, ocorre a reestruturação inicial da botriosferana, porém agora sulfatada na posição C-2.

A sulfatação via acetonídeo resultou em um DS de 0,65, o que significa uma média de aproximadamente 6-7 grupos sulfato a cada 10 unidades de glucose, com um bom rendimento de reação (70%) em relação a massa obtida. Nesta rota, foram utilizados 8 equivalentes por unidade de glucose em relação ao agente derivatizante ($\text{SO}_3\text{-Py}$) e apenas um ciclo de reação de sulfatação, ou seja, as mesmas proporções reacionais aplicadas na via branda.

Figura 17- Esquema geral da síntese do derivado de botriosferana SA, com as etapas de I) proteção, II) sulfatação e III) desproteção, e seus respectivos mecanismos de reação.



I) Proteção



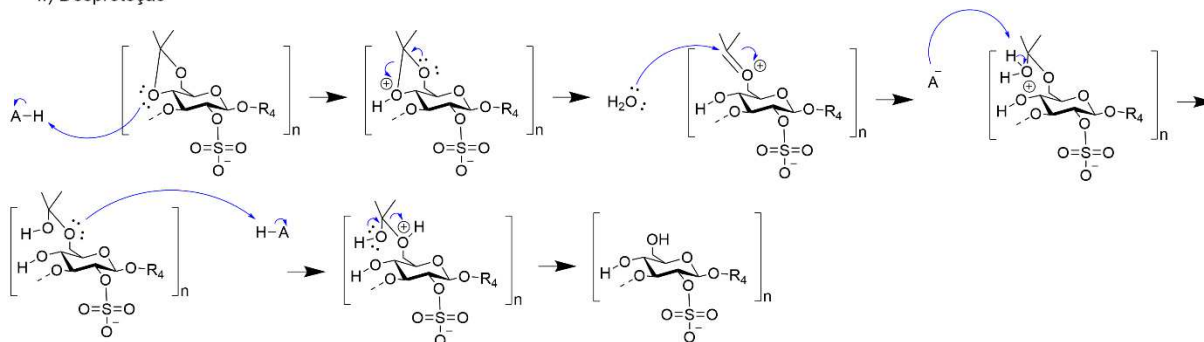
Onde: B é o ácido canforsulfônico

R₃ C3 da ligação glicosídica da unidade de Glc da BOT

II) Sulfatação

Mesmo mecanismo reacional apresentado na sulfatação branda.

III) Desproteção



Onde: A é o ácido p-toluenosulfônico

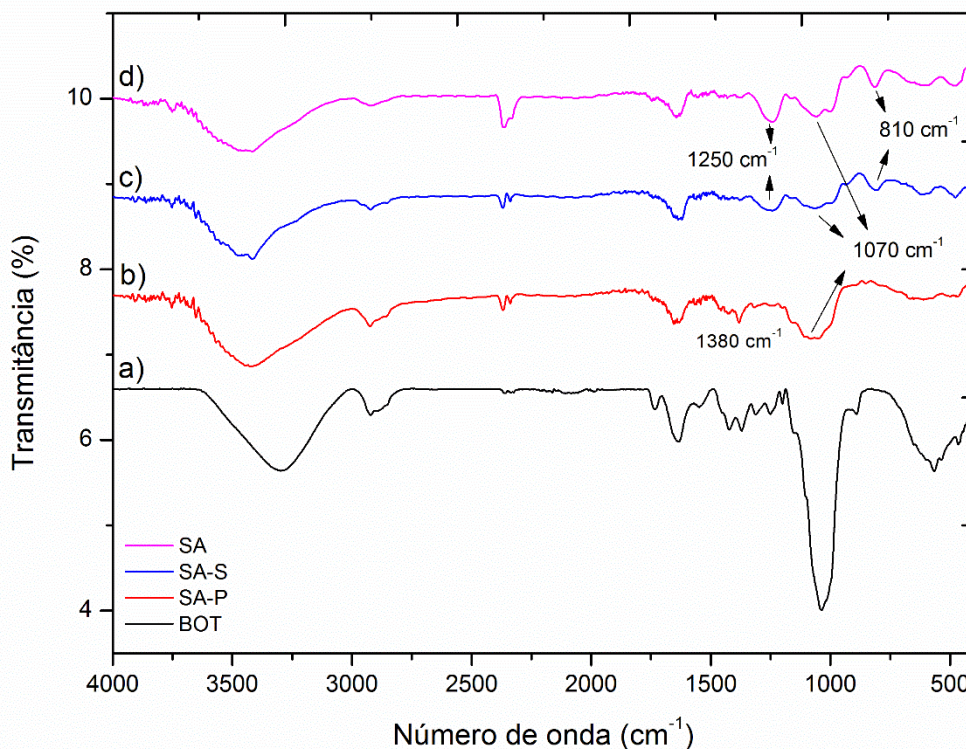
R₄ C3 da ligação glicosídica da unidade de Glc da BOT sulfatada na posição C2

Fonte: o próprio autor

A partir dos espectros de FT-IR, apresentados na Figura 18 abaixo, é possível dar início à verificação da efetividade das etapas da reação. A presença da banda de fraca intensidade na região de 1380 cm⁻¹ (Figura 18 b) característica da ligação C-H em metilas, indica a presença da acetona na etapa de proteção (WANG; ZHANG, 2009). Já as bandas 1070 cm⁻¹, em todas as etapas (Figura 18 b, c, d) são características da ligação entre C-O do grupo O-C-O (WANG; ZHANG, 2009). As bandas características da sulfatação são confirmadas nas etapas de sulfatação e proteção (Figura 18 c, d) pelas bandas características nas regiões em 1250 cm⁻¹ (vibração assimétrica S=O) e 810 cm⁻¹ (simétrica das ligações C-O-S associada ao

grupo C-O-SO₃⁻) (SACHELLI et al., 2019).

Figura 18- Espectros FT-IR de BOT e seus derivados sulfatados pela rota sintética via acetonídeo (etapas de: proteção – SA-P, sulfatação – SA-S e desproteção – SA).

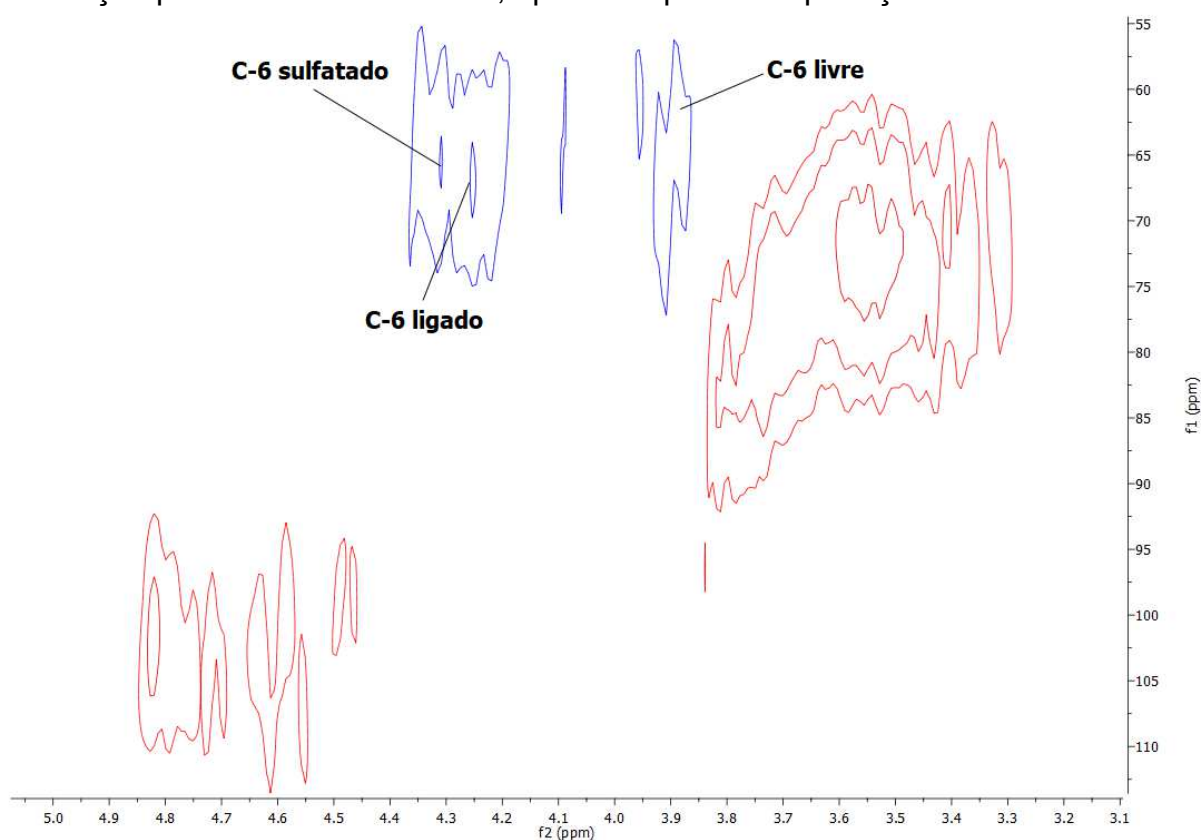


Fonte: o próprio autor

O espectro de HSQC do produto final da via acetonídeo (SA) é apresentado na Figura 19. É possível verificar que esta síntese não ocorreu de forma efetiva no que diz respeito à regioselectividade esperada. Na molécula final sulfatada e desprotegida, apesar de serem visualizados sinais que indicam a sulfatação na posição C-2 (77,9 ppm), há sinais característicos que indicam também uma possível substituição na posição C-6 (69,3 ppm). É provável que a etapa de proteção tenha sido efetiva em um primeiro momento, entretanto em algum ponto na etapa de sulfatação, o grupo protetor não resistiu e liberou parcialmente as posições antes protegidas. A molécula final pode ter gerado um padrão de sulfatação em C-2 e C-6, entretanto, nada garante que a posição em C-4 também não sofreu substituição, visto que os sinais de deslocamento para a posição sulfatada ou não, poderiam ser muito próximos (com base nos deslocamentos da amostra SP).

Dessa forma, como a sulfatação regioselectiva via acetonídeo não foi efetiva, os testes de avaliação de atividade biológica foram executados sem esta amostra.

Figura 19- Espectro de HSQC (^1H - ^{13}C) do derivado de botriosferana SA, obtido por sulfatação pela rota via acetonídeo, após a etapa de desproteção.



Fonte: o próprio autor

5.5 CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DOS DERIVADOS SULFATADOS DE BOTRIOSFERANA

O teste de citotoxicidade serve para avaliar a capacidade das substâncias em causar danos às células. O ensaio de MTT é um desses indicadores de citotoxicidade, ou seja, de viabilidade celular após a exposição a substâncias possivelmente tóxicas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). É um ensaio colorimétrico baseado na redução do sal brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, amarelado e solúvel) para cristais de formazan (roxo e insolúvel), por células ativas metabolicamente, no qual essa conversão ocorre pela clivagem do anel de tetrazólio pela succinato desidrogenase dentro da mitocôndria. Esse produto, formazan, é impermeável às membranas celulares e, portanto, se acumula dentro das células saudáveis (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

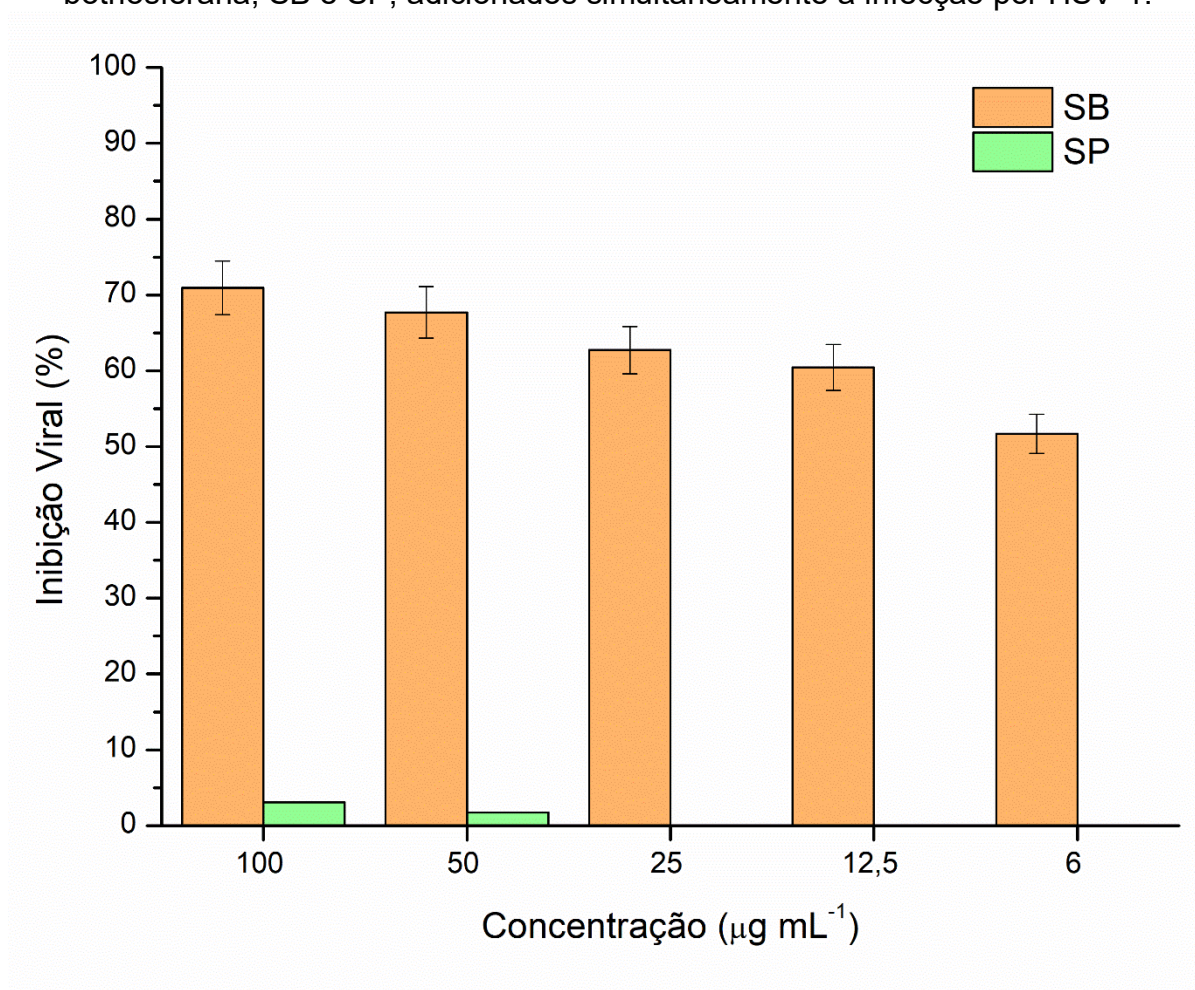
O teste de citotoxicidade MTT revelou que o derivado SP reduziu a

viabilidade celular em 59% na maior concentração testada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Concentrações mais baixas desta amostra proporcionaram maior viabilidade das células Vero, resultando em CC_{50} de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, o SB apresentou 74% de viabilidade celular na maior concentração testada, apresentando uma CC_{50} superior na maior concentração testada ($\text{CC}_{50} > 500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

De acordo com testes de citotoxicidade relatados na literatura científica, feitos em células de adenocarcinoma pulmonar humano e em PN2TA (linhagem celular normal da próstata humana) por exemplo, os polissacarídeos sulfatados demonstraram valores de citotoxicidade diretamente proporcionais ao seu grau de substituição, ou seja, polissacarídeos sulfatados com baixo DS possuíam menor citotoxicidade (CARDOZO et al., 2013; WAN-MOHTAR et al., 2016). No presente trabalho, e conforme relatado anteriormente por Wouk et al., (2022), essa relação não foi observada. Nossos resultados demonstraram que a amostra sulfatada SB (DS=0,82) apresentou menor citotoxicidade que o sulfatado SP (DS=0,49), mas maior que a BOT não derivatizada (nativa), que não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Aparentemente, a introdução de grupos sulfônicos na posição C-6 das unidades de glucose (SB) causou menor interferência na viabilidade celular, pois a amostra derivada via branda (SB) possuía maior teor de sulfato. Além disso, fatores que podem ter mudado ao longo das diferentes rotas sintéticas, como ramificação das cadeias e características intrínsecas das estruturas sulfatadas, podem ter contribuído para as diferenças de citotoxicidade observadas.

Na avaliação da atividade antiviral, nenhum dos compostos sulfatados demonstrou atividade anti-DENV-2. Porém, quando avaliada contra HSV-1, no ensaio simultâneo e nas diferentes concentrações, a amostra SB demonstrou uma inibição dose-dependente, com %IV de 71,0% a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguida de 67,7% em $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, 62,7% em $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, 60,5% em $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 51,7% em $6 \mu\text{g mL}^{-1}$, como mostrado na Figura 20. O IC_{50} encontrado foi de $4,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, resultando em SI $>113,6$ (Tabela 7). Curiosamente, quando a amostra SP foi testada contra HSV-1, foi observada uma inibição muito fraca (menos de 5%) apenas nas concentrações mais elevadas de SP testadas. Por esta razão, o IC_{50} desta amostra não pôde ser calculado. Estes resultados demonstram claramente que a amostra de SB, sulfatada regioseletivamente nas posições C-6, exibiu a melhor atividade anti-herpética. O ensaio simultâneo foi escolhido por abranger um número maior de etapas da infecção que os compostos testes poderiam atuar.

Figura 20- Atividade anti-herpética, em células Vero, dos derivados sulfatados de botriosferana, SB e SP, adicionados simultaneamente à infecção por HSV-1.



Fonte: o próprio autor

Tabela 7- Citotoxicidade em células Vero e atividade antiviral, pelo ensaio simultâneo, de derivados de botriosferana, SB e SP, contra HSV-1.

Amostras	HSV-1			
	DS	CC ₅₀	IC ₅₀	SI
SB	0.82	> 500	4,4	>113,6
SP	0.49	250	>200	--
ACV*	-	>500	0,1	>5000

DS = Grau de substituição;

CC₅₀ = concentração citotóxica a 50% em células Vero (µg mL⁻¹);

IC₅₀ = concentração inibitória a 50% (µg mL⁻¹);

SI = Índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀);

ACV = Aciclovir; * Controle positivo de atividade anti-HSV-1.

Fonte: o próprio autor

Assim como descrito na literatura científica, nossos estudos apontam para a relação em que o grau de sulfatação é diretamente relacionado à atividade

antiviral, especialmente pela inibição da infecção através da interação entre cargas negativas (maior em SB) e positivas do envelope viral. Nesse caso, duas hipóteses são sugeridas envolvendo i) as glicoproteínas do envelope de HSV, que são essenciais para a ligação do vírus à célula e subsequente fusão com a membrana do hospedeiro, permitindo a entrada na célula; e ii) os componentes celulares, como heparan sulfato (HS) da superfície da célula hospedeira, ou formas sulfatadas de glicosaminoglicanos, sendo relatados como essenciais para os estágios iniciais da infecção (HIDARI et al., 2012). Assim, compostos que interfiram diretamente na partícula viral (efeito virucida) e/ou com componentes da membrana celular que atuam como receptores para a adsorção e entrada nas células hospedeiras são estratégias interessantes para prevenir a infecção viral e controlar a disseminação.

A botriosferana aleatoriamente sulfatada, conforme demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi ativa contra vírus envelopados e parece funcionar por meio do mecanismo de bloqueio da entrada dos vírus. Sacchelli et al., (2019) sulfatou aleatoriamente a botriosferana com um DS de 1,1, que apresentou IC_{50} de $2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já quando primeiramente carboximetilada e posteriormente sulfatada (LOPES et al., 2021), apresentou um IC_{50} de $12,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um DS de 0,1. Quando submetida a oxidação e posteriormente a sulfatação (Flávia Deduch, artigo de publicação em redação), a botriosferana apresentou IC_{50} de $10,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um DS de 0,3. Em todos esses estudos, a botriosferana nativa foi utilizada como material de comparação, entretanto esta amostra não demonstrou atividade significativa e/ou apresentou menos potencial que as amostras modificadas.

Já no trabalho aqui relatado, a presença de grupos sulfato na posição C-6 das unidades de glucose na botriosferana sulfatada (amostra SB) foi substancialmente mais importante do que nas outras posições (por exemplo, na amostra SP) para o desenvolvimento da atividade antiviral. Uma vez que a botriosferana é uma biomacromolécula de alta massa molecular ($>1 \times 10^6$ Da), o acesso aos grupos sulfato em C-6 é menos impedido do que aqueles presentes nas posições C-2 ou C-4. Esse fato, aliado ao maior grau de substituição da amostra SB, explica a maior diferença na atividade anti-herpética em relação à amostra SP. A simples diferença no DS das duas amostras não pode ser considerada como o único fator que explica a enorme diferença na atividade antiviral. Cabe mencionar que a IC_{50} de um derivado sulfatado aleatoriamente por Sacchelli et al (2019), com DS de 0,4, foi de $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto a amostra SP, com DS de 0,49, foi quase inativa contra o

HSV-1. Adicionalmente, cabe salientar que o heparan sulfato, receptor do hospedeiro para o vírus, similarmente também possui grupos sulfato em posições C-6, das unidades de glucosamina.

Além disso, para associar com o envelope viral, a conformação aleatória dos monômeros constituintes da amostra SB pode mudar para que os grupos sulfato carregados negativamente (em C-6) interajam de maneira ideal com os locais carregados positivamente nas glicoproteínas do vírus (ou seja, eles são menos impedidos), como Zhang et al., (2003) sugere, assumindo uma conformação de caráter de cadeia flexível expandida. Estes resultados indicam que é possível desenvolver uma relação estrutura-atividade com botriosferanas regioseletivamente sulfatadas e a inibição do vírus da Herpes simples. Atualmente, não há relatos na literatura de estudos avaliando a relação da regioquímica dos grupos sulfato em β -glucanas com a atividade anti-herpética.

A inatividade contra o vírus DENV-2 pelas amostras relatadas neste estudo indica que este vírus foi mais resistente à inibição por β -glucanas sulfatadas quando comparado ao HSV-1. Estudos previamente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (SACHELLI et al., 2019), demonstraram que botriosferanas sulfatadas aleatoriamente (C-2, -4, -6) apresentaram atividade antiviral contra DENV-3 (IC_{50} : 66,5 - 78,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), entretanto sendo necessário concentrações mais elevadas para inibição, que para a atividade anti-herpética. No mesmo estudo, foi possível verificar que a atividade anti-DENV não apresentou uma relação DS-dependente, em que maior DS gerou maior grau de inibição viral. Assim, o padrão de substituição e o DS dos derivados de BOT sulfatados podem desempenhar um papel importante na inibição viral.

A sulfatação regioseletiva em BOT, direcionada especificamente para a posição C-6, ou C-2/-4, e o grau de substituição inferior a 0,8, ou mesmo o sinergismo entre essas características, não parecem ser adequados para a inibição do vírus da dengue. Além disso, é importante destacar que cada polissacarídeo, devido à sua diferente composição monomérica, conformação e substituintes e sua frequência de ramificação ao longo da cadeia polimérica, também pode exercer diferentes capacidades de atividade biológica, por exemplo, carragenanas de algas (DIOGO et al., 2015; F-TISCHER et al., 2006) contra herpes e dengue vírus, galactanas (CHATTOPADHYAY et al., 2007; KIM et al., 2022) frente herpes e SARS-CoV-2, e outros glucanas (AHMAD et al., 2021; SOUSA et al., 2022) contra dengue e

zika vírus. No caso de biomacromoléculas derivatizadas quimicamente, o grau de sulfatação pode influenciar diretamente nessa capacidade, pois um DS maior pode otimizar suas atividades biológicas. Deve-se notar que o BOT, que possui pequenas ramificações (resíduos únicos de glucose e gentiobiose) em frequência média de 5 unidades de glucose ao longo da cadeia principal ligada β -(1→3) (BARBOSA et al., 2003; DE LOURDES CORRADI DA SILVA et al., 2005), pode ter sua interação dificultada devido ao distanciamento de sua cadeia principal e, conseqüentemente, dos grupos sulfato, do envelope viral. Ainda assim, a IC_{50} encontrada para o derivado SB ($4,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) encontra-se dentro da faixa de atividade anti-herpética de potentes polissacarídeos sulfatados relatados na literatura (1 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (WOUK et al., 2022).

Em um estudo desenvolvido por Queiroz et al., (2014), tais pesquisadores utilizaram a ressonância magnética nuclear combinada com dinâmica molecular para entender melhor a relação estrutura-função de oligossacarídeos fucanas sulfatadas (formados por resíduos de L-fucose). Em suas pesquisas verificaram que as cadeias dissulfatadas nas posições 4-axiais e 2-equatoriais sofreram forças eletrostáticas repulsivas e impedimento estérico, devido à especial proximidade desses grupos. Além disso, nos oligossacarídeos fucanas substituídos apenas na posição C-2, estes exibiram uma dinâmica fortemente regulada por ligações de hidrogênio. Dessa forma, fica mais fácil entender os resultados alcançados em nosso estudo. Por exemplo, a amostra SP, sulfatada regioseletivamente nas posições C-2/C-4, pode sofrer as mesmas forças repulsivas e impeditivas, restringindo sua mobilidade e limitando sua atividade biológica. A amostra SB, sulfatada regioseletivamente na posição C-6, ao contrário, não apresentaria tais impedimentos, podendo formar melhores interações com os respectivos alvos (HSV-1).

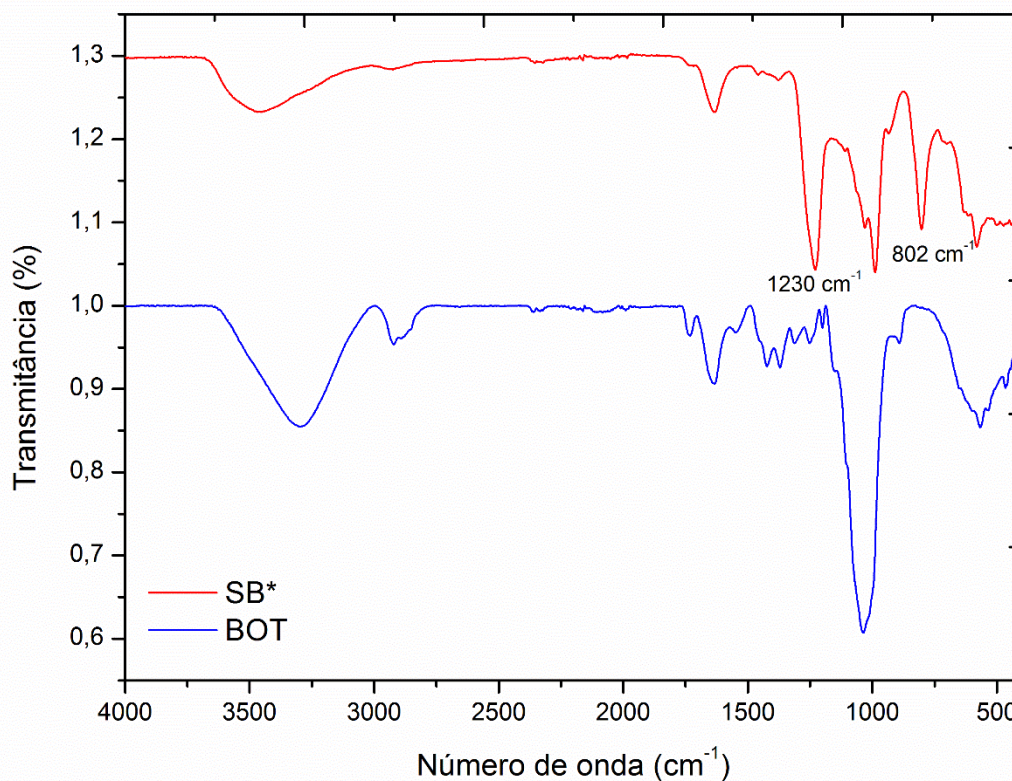
5.6 OBTENÇÃO DE AMOSTRA SULFATADA (SB*) E CARACTERIZAÇÃO PARA PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Com os primeiros objetivos do estudo cumpridos, foi possível estabelecer a relação estrutura-atividade entre as botriosferanas sulfatadas regioseletivamente e a atividade anti-herpética. Dessa forma, agora com a amostra mais promissora (SB), demos continuidade ao desenvolvimento de produtos

nanoestruturados, um hidrogel e um gel-creme.

Para a produção das formulações foi necessário, primeiramente, realizar a síntese de mais quantidade de botriosferana sulfatada pela via branda (SB). Procedeu-se com o mesmo protocolo descrito no tópico 4.2.1, o qual rendeu uma botriosferana sulfatada via branda (SB*) com DS um pouco maior de 1,1, o que significa uma média de aproximadamente um grupo sulfato por unidade de glucose. Além disso, a derivatização foi confirmada via infravermelho (Figura 21), onde é possível observar as bandas características da substituição por sulfatação em 1230 cm^{-1} (vibração assimétrica S=O) e 802 cm^{-1} (vibração simétrica das ligações C-O-S associada ao grupo C-O-SO₃⁻) (SACCHELLI et al., 2019).

Figura 21- Espectros FT-IR de BOT e seu derivado sulfatado pela rota sintética via branda SB* (com DS de 1,1).



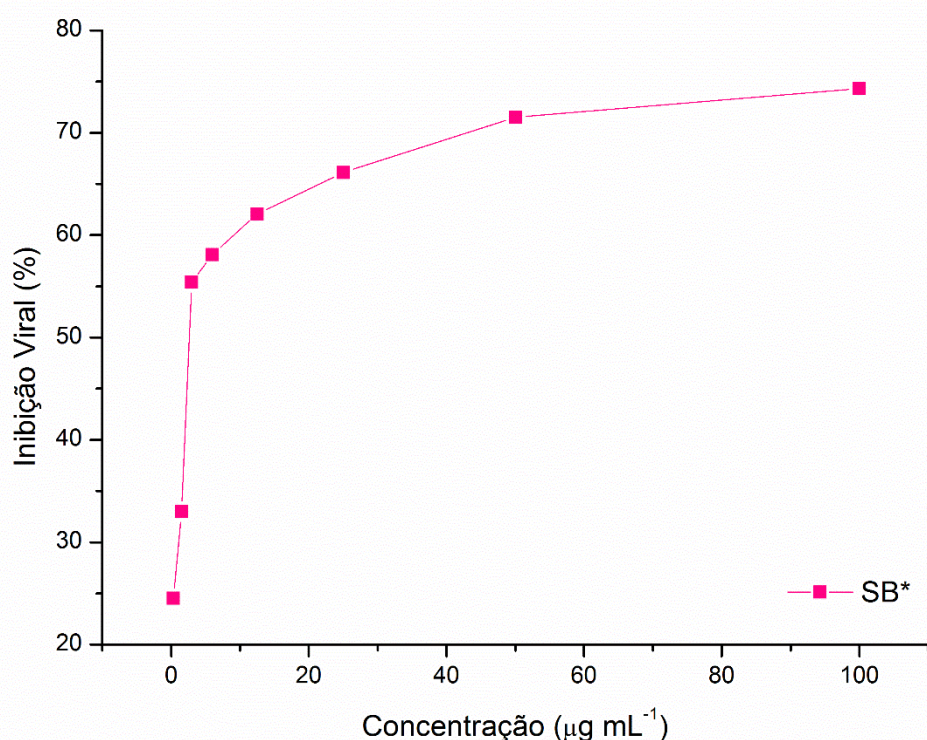
Fonte: o próprio autor

Dessa forma, como uma amostra com um novo DS foi gerada, a triagem *in vitro* se fez necessária. Na avaliação da atividade antiviral *in vitro* contra HSV-1 a amostra SB* demonstrou inibição dose-dependente nas concentrações testadas, sendo de 74,3% em 100 µg mL⁻¹, seguida de 71,5% em 50 µg mL⁻¹, 66,1 % em 25 µg mL⁻¹, 62,1% em 12,5 µg mL⁻¹, 58,1% em 6 µg mL⁻¹, 55,4% em 3 µg mL⁻¹, 33,0% em 1,5 µg mL⁻¹ e 24,5% em 0,32 µg mL⁻¹ (Figura 22). O IC₅₀ encontrado foi de 2,52 µg mL⁻¹ e SI > 79, com um CC₅₀ > 200 µg mL⁻¹. Estes resultados demonstram que a amostra SB*, com maior DS (1,1), demonstrou maior atividade anti-herpética, revelando que amostras sulfatadas regioseletivamente na posição C-6, com maiores graus de sulfatação, têm a capacidade de melhorar a atividade anti-herpética, ou seja, serem DS-dependentes. Além disso, o aumento do grau de substituição pode ter contribuído para a diferença na citotoxicidade da amostra, quando comparada com a SB. Cumpre ressaltar que o DS de 1,1 indica a sulfatação de todas as posições C-6,

bem como a sulfatação residual de algumas posições C-2/C-4. Todavia, como observado pela atividade antiviral da amostra, este fato não prejudicou a sua capacidade inibitória contra o HSV-1.

Assim, como observado anteriormente para derivados de botriosferanas sulfatadas aleatoriamente (SACCHELLI et al., 2019), no qual revelam que pequenas diferenças em suas atividades anti-herpéticas quando comparadas com seus graus de substituição (IC_{50} de $2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para um DS de 1,1 e $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para um DS de 0,4), são suficientes para explicar diferenças na atividade antiviral. Da mesma forma Wouk et al., (2022) relataram em seu estudo a atividade antiviral de uma (1→6)- β -D-glucana linear quimicamente sulfatada (lasiodiplodana) contra o HSV-1. Os autores apontaram que a β -glucana com um maior grau de sulfatação (1,61) exibiu um maior grau de inibição ($6,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) contra o vírus Herpes simplex, seguido de $53,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para um DS de 1,02 e $>125 \mu\text{g mL}^{-1}$ para um DS de 0,18.

Figura 22- Atividade anti-herpética do derivado sulfatado de botriosferana, SB* (DS: 1,1) frente a HSV-1.



Fonte: o próprio autor

Os efeitos de SB* contra HSV-1 KOS são destacados na Figura 23. O ensaio simultâneo (0h) é amplamente utilizado como triagem para a atividade antiviral de um composto. Ao adicionar este composto simultaneamente com o vírus à célula,

a inibição da infecção pode ocorrer por um ou mais mecanismos de ação, como efeito virucida, inibição da ligação do vírus ao receptor celular, interações com receptores celulares diversos que alteram a maquinaria enzimática da célula e consequentemente impedem a replicação viral em alguma etapa posterior à adsorção. Dessa forma, quando SB* foi adicionado simultaneamente à infecção, manteve uma inibição dose-dependente de 71% ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), 66% ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), 62% ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 58% ($6 \mu\text{g mL}^{-1}$), com diferenças estatísticas e semelhante a SB, com porcentagens de inibição viral acima de 50%, até a menor concentração testada. Dessa forma, a ação de SB* também foi avaliada em algumas etapas específicas da replicação viral - efeito virucida e tempo de adição de SB* pré (-3h) e pós (+3h) infecção, com o objetivo de inferir o possível mecanismo de ação antiviral, em células Vero.

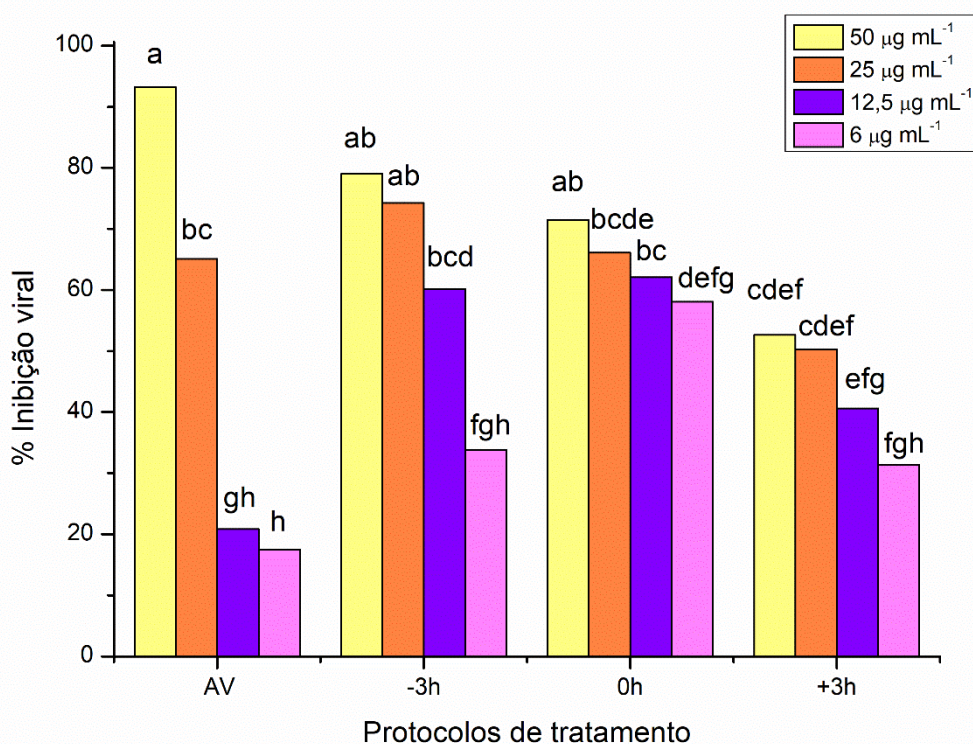
Ao pré-tratar as células Vero com SB* 3 h antes da inoculação do vírus (pré-tratamento, -3 h), a botriosferana sulfatada demonstrou a capacidade de prevenir a infecção por HSV-1 de maneira dose-dependente, com inibições virais de 79% ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), 74% ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), 60% ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 34% ($6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Nessa fase, visto que a amostra (SB*) é inicialmente aplicada nas células Vero, sendo após 3 h retirada por lavagem para posterior inoculação viral, observa-se que a amostra também pode ser capaz de estabelecer interações, em certo grau, com as células do hospedeiro, impedindo a replicação viral.

De forma semelhante, ao realizar o tratamento com SB* após 3 h da infecção (pós-tratamento, +3 h), também se observou inibição viral, porém em menor grau (53% para $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, 50% para $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, 41% para $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 31% para $6 \mu\text{g mL}^{-1}$), com diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem um efeito terapêutico do composto, possivelmente por interações celulares que comprometem a permissividade da célula na produção dos vírions. O efeito residual do composto, mantido durante as 72 h seguintes de incubação, também pode ser sugerido, comprometendo assim a disseminação viral (efeito virucida e inibição da adsorção) nas células adjacentes. Por outro lado, apesar do tamanho e características da molécula em permanecer no meio extracelular, a capacidade de penetrar na célula para inibir a replicação viral não deve ser descartada. Entretanto, testes adicionais seriam necessários para comprovar esse mecanismo.

Dentre os mecanismos de ação avaliados, o ensaio virucida, que é a inibição direta na partícula viral, mostrou maior inibição com 93,2% na concentração

de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e redução da atividade em concentrações menores (65,1%, 20,9%, 17,5% para 25, 12,5 e $6 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Esse resultado corrobora com a atividade de interação entre cargas dos polissacarídeos sulfatados e o envelope viral, sugerido anteriormente (HIDARI et al., 2012; WOUK et al., 2022).

Figura 23- Efeito inibitório da SB* contra HSV-1 KOS em diferentes estágios da infecção viral: atividade virucida (AV) e tempos variados de adição de SB* no pré (-3 h), durante (0 h) e pós (+3 h) infecção. As letras (a, b, c, d, e, f, g e h) representam as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas para cada ensaio ($p < 0,05$).



Fonte: o próprio autor

Wouk et al., (2022) investigaram o tempo de adição de uma lasiodiplodana sulfatada com um DS de 1,61 em relação às cepas de HSV-1 KOS (sensível ao aciclovir) e AR (cepa resistente ao aciclovir). Essa macromolécula, quando avaliada contra a cepa KOS em diferentes etapas da replicação, mostrou melhor efeito virucida (100% de inibição), comparado aos protocolos de pré (-3 h e -1 h) e pós (+3 h) infecção. Os resultados foram semelhantes ao serem testados contra a cepa AR, mostrando uma resposta dose-dependente em todos os protocolos

avaliados.

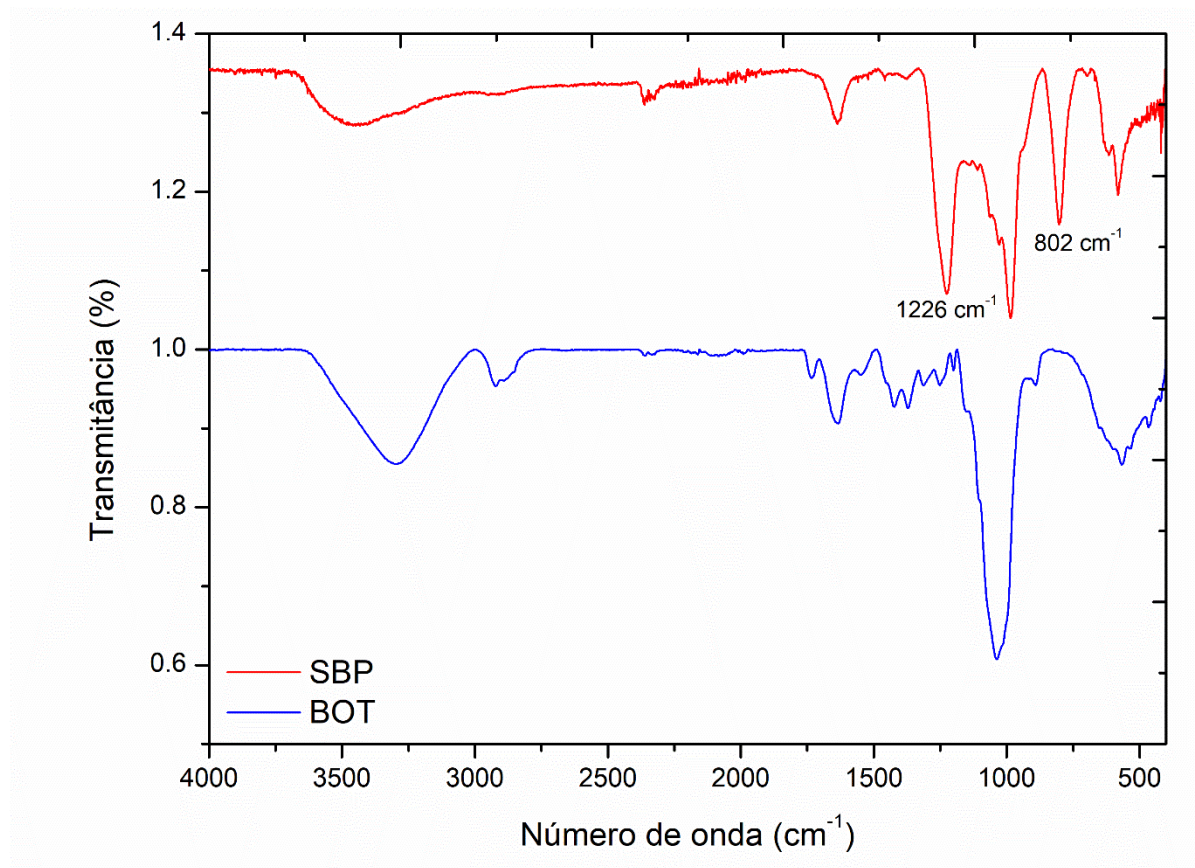
Considerando que SB* apresentou melhor efeito virucida para a maior concentração testada, seguido de efeito de pré-tratamento, possivelmente impedindo a adsorção viral, sugere-se que SB* atue principalmente nas etapas iniciais da infecção viral, sendo um composto promissor no desenvolvimento de formulação tópica.

5.6.1 Persulfatação

Com o objetivo de obter uma botriosferana sulfatada com o maior número possível de sítios substituídos, no caso as três posições possíveis (C-2, -4 e -6), realizou-se a derivatização química por persulfatação (amostra SPer). Nesta reação, seguiu-se o mesmo procedimento reacional descrito no tópico 4.2.1, referente à sulfatação branda (SB). Contudo, as proporções reacionais empregadas foram distintas e mais drásticas, incluindo 48 equivalentes de agente sulfatante por unidade de glucose ($\text{SO}_3\text{-Py}$), 14 horas de reação, uma temperatura reacional de 40 °C e realização de 2 ciclos de sulfatação.

Apesar da aplicação dessas proporções, o grau de sulfatação obtido foi de 1,2, não diferindo substancialmente do alcançado pela amostra SB (1,1), o que significa uma média de aproximadamente doze grupos sulfato a cada dez unidades de glucose. A derivatização foi confirmada via infravermelho (Figura 24), onde é possível observar as bandas características da substituição por sulfatação em 1226 cm^{-1} (vibração assimétrica S=O) e 802 cm^{-1} (vibração simétrica das ligações C-O-S associada ao grupo C-O-SO₃) (SACCHELLI et al., 2019).

Figura 24- Espectros FT-IR de BOT e seu derivado exaustivamente sulfatado pela rota sintética via persulfatação SPer (com DS de 1,2).



Fonte: o próprio autor

Apesar do rendimento reacional ter sido satisfatório, de 75,7%, não alcançamos a substituição nas três posições pretendidas. O elevado número de equivalentes por unidade de glucose introduzidos na reação não foi suficiente para derivatizar as posições disponíveis para substituição. Também, não se pode descartar a possibilidade da temperatura ou tempo de reação não terem sido suficientes para promover a persulfatação. Além disso, pode ter ocorrido a geração de impedimento estérico pelos próprios grupos sulfato, o que dificulta grandemente o avanço da derivatização. Diante disso, para dar continuidade à produção das formulações, optamos por utilizar a amostra SB*, obtida através da reação de sulfatação branda, visto que além de termos para essa amostra uma caracterização estrutural, foi realizada uma triagem biológica antiviral. E ainda, a diferença entre o DS de SB* e SPer foi considerada irrelevante.

5.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA BOTRIOSFERANA NATIVA E SULFATADA

Uma vez que os ativos se destinam ao uso tópico em feridas causadas pela herpes simples, as amostras sintetizadas neste estudo foram avaliadas quanto à atividade anticoagulante, medindo-se o tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). Os valores de referência para o índice de R (razão entre o tempo de coagulação de uma amostra, em segundos, e o tempo médio de amostras normais) do PT e APTT situam-se entre 0,8 e 1,2, enquanto o tempo de coagulação de referência para o APTT varia de 24 a 38 segundos. Portanto, quando esses valores excedem os limites de referência, indicam um prolongamento no tempo de coagulação.

As amostras BOT, SB (DS=0,82), SP (DS=0,49) e SA (DS= 0,65) não demonstraram atividade anticoagulante em nenhuma das concentrações testadas e em nenhuma das metodologias (PT e APTT). Por outro lado, a amostra persulfatada (SPer), que possui um DS (1,2) muito próximo ao DS da amostra SB* (1,1), a qual foi incorporada nas formulações, exibiu atividade anticoagulante para o APTT em concentrações mais elevadas, com R=1,65 e t= 48 s ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e R= 2,84 e t=84 s ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O método de avaliação de anticoagulação PT avalia o tempo necessário para a formação de coágulos através da via extrínseca da coagulação, ou seja, aquela que é iniciada pela lesão vascular e envolve fatores como teciduais e fatores VII, X, V e II, como a protombina, além de ser sensível ao anticoagulante varfarina e a antagonistas da vitamina K. Já o método APTT, avalia a via intrínseca da coagulação, que é iniciada pelo contato do sangue com uma superfície carregada negativamente e envolve fatores como o fator XII, XI, IX e VII, X, U e II, além disso, é sensível ao anticoagulante heparina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Dessa forma, pode-se perceber o porquê nossa amostra ser sensível e demonstrar atividade no método APTT. Como estamos avaliando polissacarídeos sulfatados, a estrutura é muito semelhante a heparina, anticoagulante sensível ao método. Além disso, tais estruturas são carregadas negativamente, que interagem com o sangue, mais especificamente as estruturas carregadas positivamente presentes no sangue, formando complexos ternários entre antitrombina, trombina e heparina/polissacarídeos sulfatados (LI et al., 2004).

Em relação aos derivados, é possível observar que o grau de

substituição é um fator que influencia diretamente nesta atividade. Apenas a amostra com maior grau de substituição (DS de 1,2) apresentou atividade anticoagulante, entretanto somente nas concentrações mais elevadas.

Liang et al., (2018) verificaram que polissacarídeos de abóbora modificados por sulfatação apresentaram maiores atividades anticoagulantes nos métodos de PT, APTT e tempo de trombina (TT), quando o grau de substituição permanecia maior. Tais autores observaram que a amostra com DS de 0,45 apresentou atividade de APTT com um tempo de 70,1 segundos, de PT com 18,6 s e de TT com 48,7 s, resultando em um tempo maior que as demais amostras.

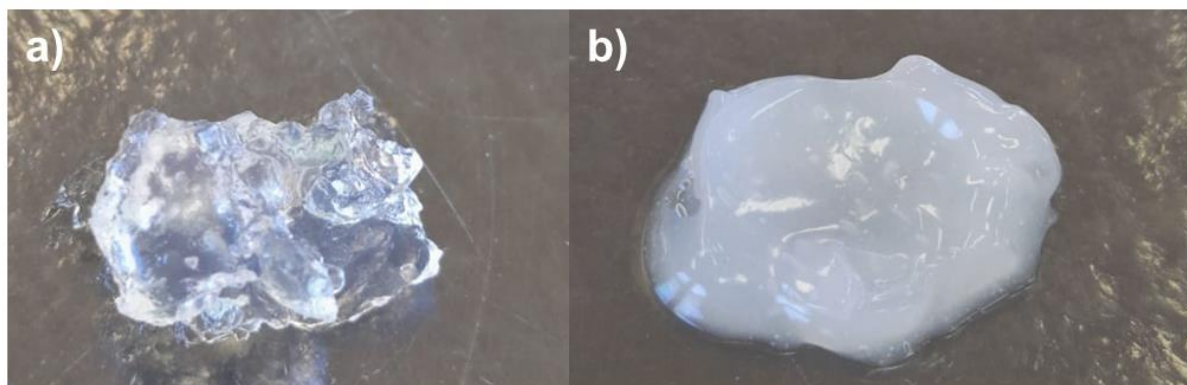
Além disso, vale ressaltar que esta atividade anticoagulante é considerada baixa, dessa forma não impacta no desenvolvimento dos produtos tópicos aqui estudados. Entretanto, isso não cessa a possibilidade de estudos futuros.

5.8 OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE BOT SULFATADA A BASE DE LAPONITA E LECIGEL®

As formulações que foram objeto de estudo deste trabalho foram preparadas segundo procedimentos descritos nos itens 4.4 e 4.5.

Ambas as formulações produzidas, a base de Laponita e LECIGEL®, apresentadas na Figura 25, são destinadas para aplicação tópica, visto que se destinam ao tratamento de lesões herpéticas, dessa forma, precisam ser além de tudo de fácil aplicação, agradáveis, não causando desconforto.

Figura 25- Aspecto das formulações a base de (a) Laponita e (b) LECIGEL®.



Fonte: o próprio autor

Como pode-se perceber, o hidrogel a base de Laponita (Figura 25 a)

apresenta-se em um aspecto transparente e mais rígido quando comparado com a formulação de LECIGEL®. Quando aplicado em uma superfície, demonstrou ser de agradável espalhabilidade, com uma secagem rápida e viscosidade que o impede de escorrer. Já o gel-creme a base de LECIGEL® (Figura 25 b) apresentou-se com características opacas e de coloração esbranquiçada. É possível perceber que é um produto mais emoliente quando comparado à outra formulação. Quando feita sua aplicação, também foi de rápida absorção, sem possibilidade de escorrimento, agradável espalhabilidade e sensação de hidratação. É importante mencionar que a amostra de botriosferana sulfatada SB* foi incorporada diretamente nas formulações, não resultando em diferenças nos aspectos acima apresentados.

Tais características sensoriais são justificadas e esperadas devido aos ingredientes adicionados em cada formulação. Com LECIGEL® há a formação de uma emulsão, pois há a incorporação do silicone volátil que atua como um emoliente e por isso confere à formulação uma fase oleosa, além disso é também adicionada a glicerina que atua no sistema como um umectante que confere à formulação uma fase aquosa. Dessa forma, quando misturados todos os ingredientes, há a formação de uma emulsão com todas essas características sensoriais apontadas acima. Já o hidrogel de Laponita é formado apenas na fase aquosa, não apresentando tantas características sensoriais hidratantes quando comparado com a outra formulação.

A partir desse momento, foram avaliados os quatro produtos, ou seja: a base do hidrogel de Laponita (Base LAP), a base do gel-creme de LECIGEL® (Base LECI), e as formulações já com o ativo SB em sua formulação (Hidrogel de Laponita – HID LAP, e gel-creme de Lecigel – HID LECI), de modo a verificar que os próprios componentes das formulações, ou seja, as bases, possam atuar como um padrão, confirmando que esses não são os responsáveis por possíveis resultados e interferências que possam surgir.

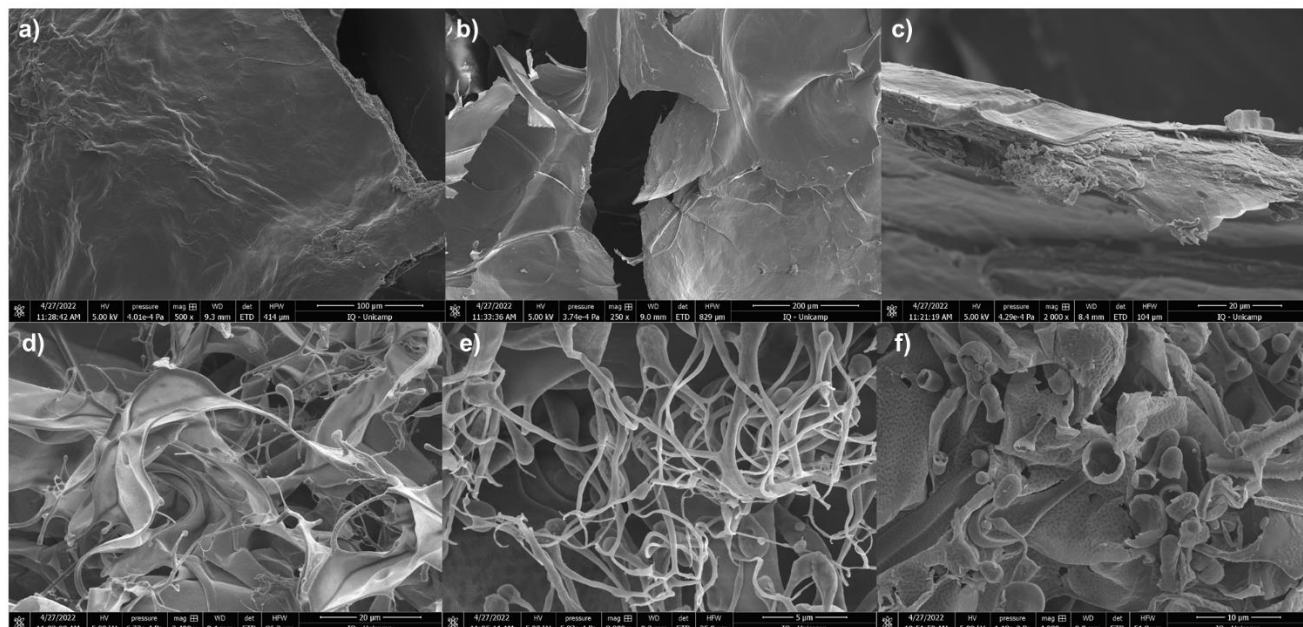
5.8.1 Caracterização físico-química das formulações

5.8.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Inicialmente, foram caracterizadas a botriosferana nativa (BOT) e a amostra sulfatada selecionada para produção das formulações (SB*) por MEV. Tais

micrografias estão apresentadas na Figura 26.

Figura 26- Micrografias da BOT (a, b, c) e da amostra sulfatada SB* (d, e, f) por MEV.



Fonte: o próprio autor

Pelas micrografias apresentadas acima, é possível verificar que a botriosferana nativa (BOT) apresenta uma superfície plana, evidenciado na Figura 26a, semelhante a placas, com bordas irregulares com torções ao longo de sua extensão (Figura 26 b). Além disso, na Figura 26 c, observa-se a seção transversal de uma dessas placas, na qual seu interior é organizado na forma de lâminas. Da mesma forma, Theis et al., (2017) observaram que uma β -glucana linear (lasiodiplodana) apresentou uma macroestrutura irregular também lembrando placas irregulares.

Por outro lado, em estudo desenvolvido por Kagimura et al., (2015b), as micrografias de amostras de lasiodiplodana nativa (β -glucana linear), evidenciaram a presença de grânulos esféricos em toda a superfície das placas que compunham a macroestrutura do polímero. Tal diferença pode ser justificada pela forma em que se deu o cultivo submerso. Kagimura et al., (2015b) conduziu a fermentação em biorreator de bancada com condições fermentativas diferentes daquelas utilizadas no presente estudo e também por Theis et al., (2017).

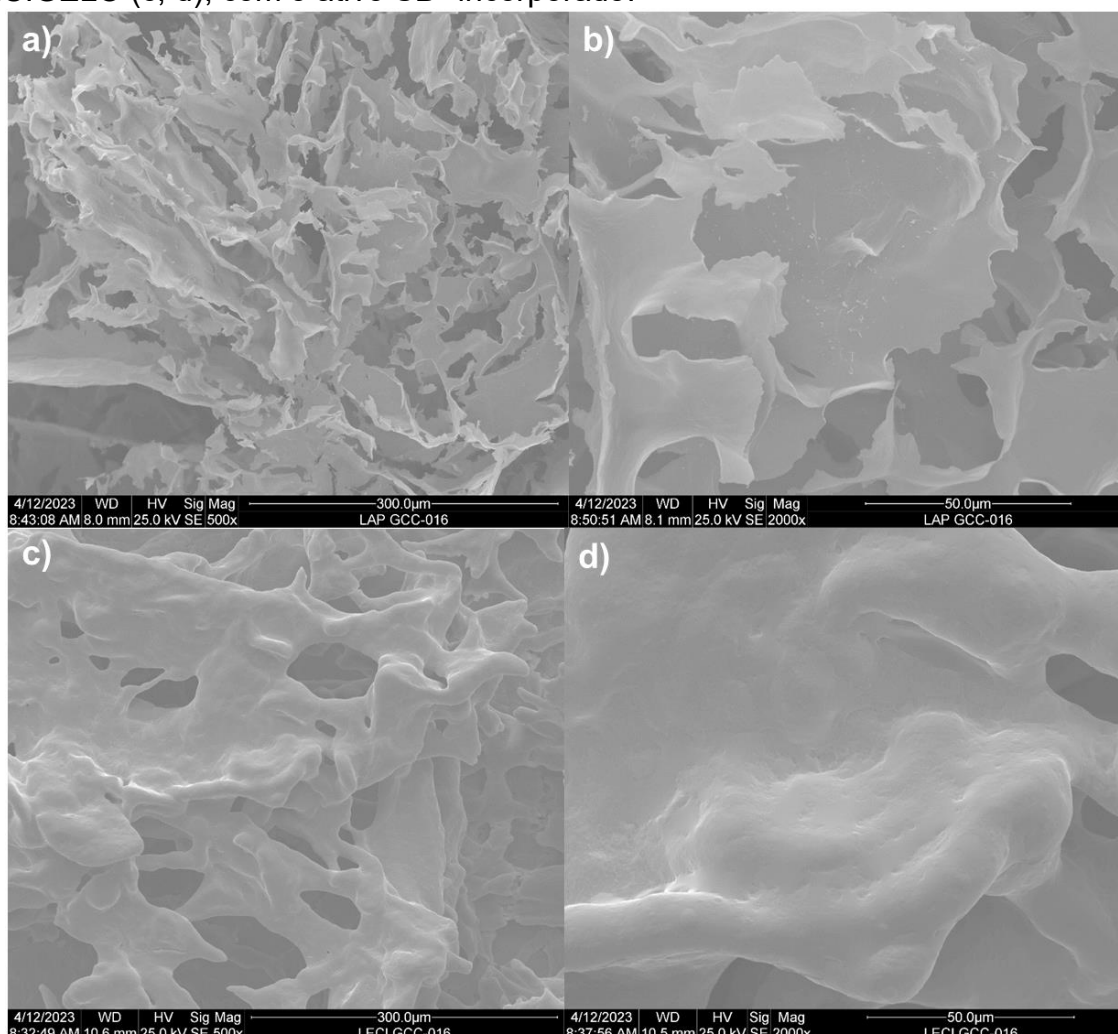
A sulfatação promoveu mudanças morfológicas na superfície do biopolímero levando ao surgimento de estruturas fibrilares e aleatórias. Ainda ao longo da superfície, é possível ver alguns pontos onde as placas ainda permaneceram após

a sulfatação, entretanto, muito menos recorrentes, mais finas, com mais dobras e torções (Figura 26 d). Tal observação pode ser justificada pelo fato da sulfatação não ter ocorrido de forma completa em toda extensão e regiões do polissacarídeo. Na Figura 26e, é possível observar com mais clareza o agrupamento das estruturas fibrilares e finas. Já na Figura 26f, a micrografia evidencia que muitas dessas estruturas na forma de fibras finas possuem espaços ocos em seu interior, que podem ser promissores para processos de nanoencapsulamento. Sugere-se que estas características tenham contribuído para a maior solubilidade em água observada para os derivados sulfatados da BOT em comparação com a BOT nativa.

Calegari et al., (2017), reportaram intensas mudanças na área superficial de amostras de lasiodiplodana sulfatada com DS de 0,24, comparadas à amostra não derivatizada. Similarmente, Wang et al., (2005), também relataram mudanças morfológicas na superfície de uma (1→3)-β-D-glucana sulfatada com DS de 0,36, observando rupturas na área superficial e o surgimento de fibras ao longo da sua extensão.

Em seguida, as formulações foram submetidas à caracterização por MEV. As micrografias das HID LAP e HID LECl estão apresentadas na Figura 27.

Figura 27- Micrografias (MEV) das formulações a base de Laponita (a, b), e LECIGEL® (c, d), com o ativo SB* incorporado.



Fonte: o próprio autor

As micrografias do hidrogel de Laponita (Figura 27 a, b) apresentam uma estrutura na forma de folhas finas, com bordas irregulares. Já no gel-creme a base de LECIGEL® (Figura 27 c, d), as folhas mostraram-se mais espessas, quando comparadas com as de Laponita.

Por outro lado, Becher et al., (2019) demonstraram em suas micrografias que os hidrogéis a base Laponita apresentaram-se em uma estrutura uniforme com poros. Tal diferença pode ser justificada pelo método de secagem. Em nossa pesquisa, as formulações foram secas por liofilização antes de serem submetidas para análise, das quais foi retirada toda a água presente em sua estrutura, preservando ainda a sua rede tridimensional; já no estudo desenvolvido por Becher et al., (2019) apenas foi reduzida a pressão do equipamento a 130 Pa.

Em contrapartida, Li et al., (2023a) desenvolveram um nanocompósito de hidroxiapatita/laponita/alginate, no qual em suas micrografias, o hidrogel de Laponita se apresentou em um padrão escamoso, muito semelhante ao encontrado em nosso estudo.

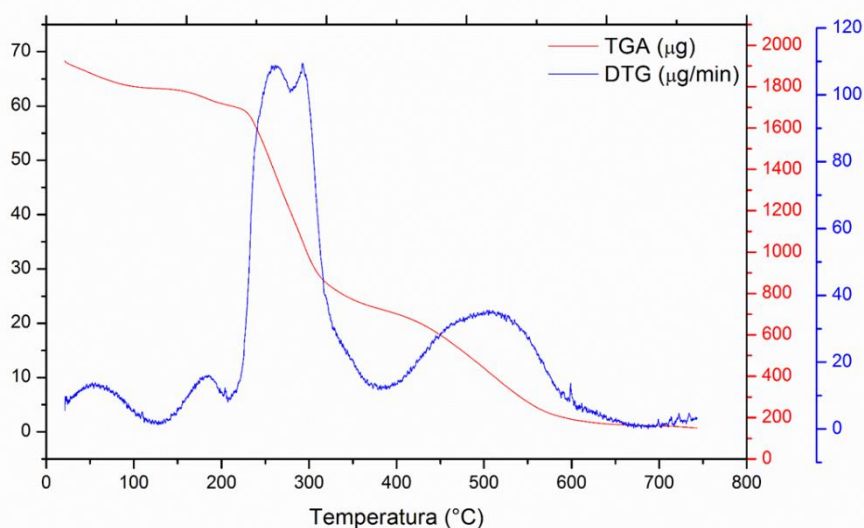
Ao avaliar a organização microscópica tridimensional dessas formulações e relacionarmos com possíveis atividades biológicas, como a atividade anti-herpética deste trabalho, uma maior área superficial influenciaria de maneira mais efetiva a uma possível inibição do HSV, por exemplo. Além disso, o hidrogel de Laponita, por se apresentar na forma de folhas finas, e sua estrutura química em uma forma mais ordenada como em “camadas ou pilhas” ou ainda em “*House of Cards*”, contém espaços disponíveis para esse contato e preenchimento dessas lacunas, podendo de certa forma haver um sequestro das partículas virais presentes no meio.

5.8.1.2 Análise térmica

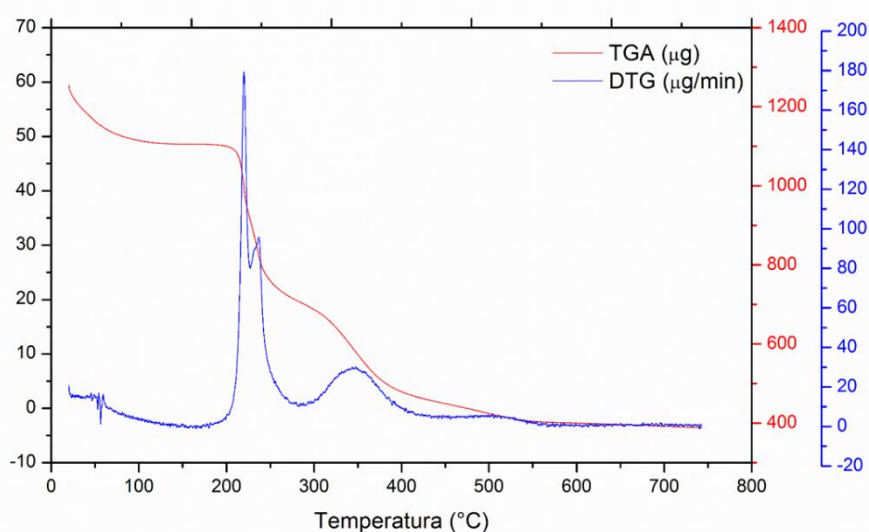
Os perfis térmicos das amostras de BOT nativa e da amostra sulfatada SB* estão descritos na Figura 28, nas curvas termogravimétrica (TGA) e termogravimétrica derivada (DTG).

Figura 28- Curvas dos perfis térmicos (TGA e DTG) das amostras de BOT nativa (a) e sulfatada SB* (b).

a)



b)



Fonte: o próprio autor

A BOT apresentou três estágios de perda de massa conforme pode ser observado nas curvas de TGA e DTG (Figura 28a). A primeira perda de massa ocorreu até 128 °C, correspondendo à eliminação de água de hidratação. O segundo estágio de perda de massa iniciou com um pequeno declínio em aproximadamente 146 °C, tendo um pico máximo entre 260 °C e 293 °C (curva DTG), ponto em que a massa variou mais rapidamente, o qual corresponde à etapa de decomposição térmica da amostra. O terceiro e último pico, situado na faixa entre 381 °C e 678 °C é

atribuído à decomposição final, etapa de carbonização da amostra.

A sulfatação da botriosferana promoveu mudanças no perfil térmico da amostra SB* (Figura 28b). A amostra SB* também apresentou três estágios de perda de massa. O primeiro estágio, típico da eliminação de água, ocorreu até 140 °C, sendo esta faixa superior à temperatura de eliminação de água da amostra não sulfatada (128 °C). Tal fenômeno pode ser atribuído à redução da hidrofobicidade da macromolécula após a introdução dos grupamentos sulfônicos (O-SO₃H) pela sulfatação.

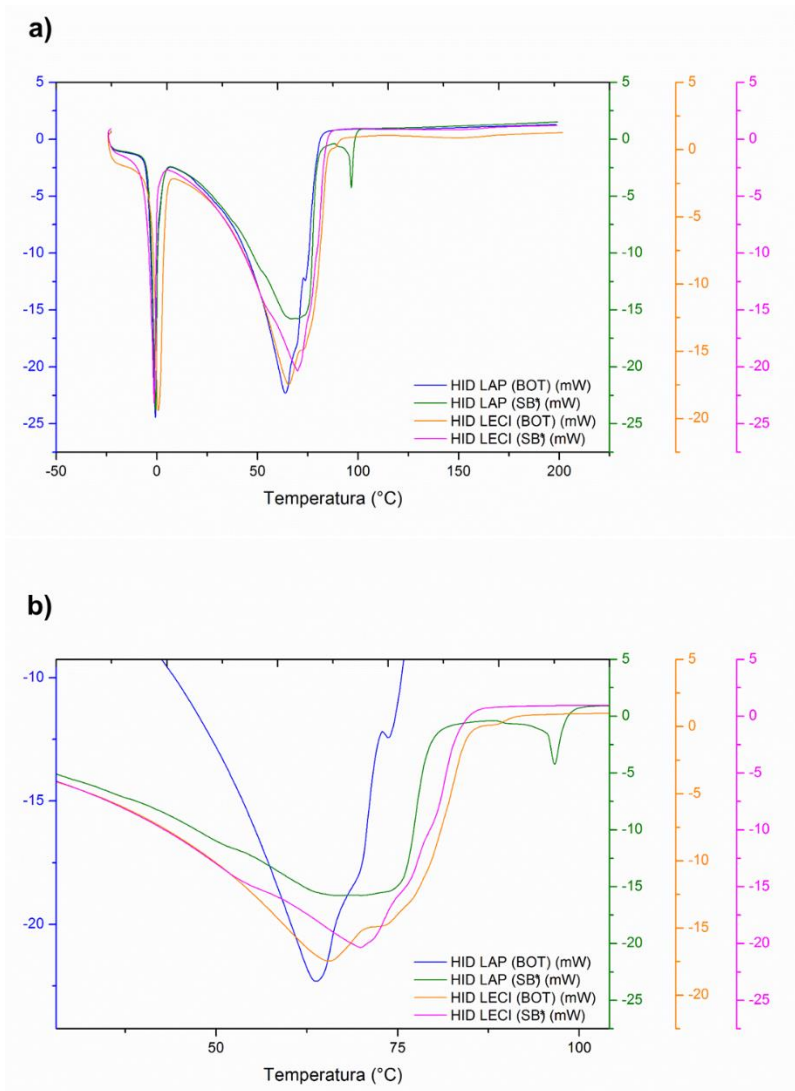
O segundo estágio ocorreu entre 190 °C a 280 °C, com um pico máximo na curva de DTG em 220 °C, onde a perda de massa variou mais rapidamente, correspondendo à decomposição térmica da amostra. O último evento térmico, característico da etapa de decomposição final, ou seja, carbonização da amostra, finalizou em 573 °C. Apesar do primeiro evento ter mostrado a maior resistência térmica da amostra sulfatada, com as duas últimas decomposições foi possível observar que a amostra sulfatada apresentou diminuição na estabilidade térmica.

Estudos desenvolvidos por De Moura Neto et al., (2011) avaliaram o perfil térmico de amostras de polissacarídeos extraídos de cajueiros e derivatizados por sulfatação. Neste trabalho, os autores também observaram que a amostra permanecia estável termicamente até aproximadamente 200 °C, e verificaram três estágios de perda de massa.

Zhang et al., (2016) avaliou o perfil térmico de um exopolissacarídeo microbiano, produzido por *Streptococcus thermophilus* GST-6 e seu derivado sulfatado (DS 0,26). Estes autores reportaram a presença de apenas dois estágios de perda de massa e destacam uma pequena diminuição da estabilidade térmica da amostra sulfatada.

Na sequência foram analisados os perfis térmicos das formulações pelas curvas de DSC, que estão apresentados na Figura 29.

Figura 29- Curvas dos perfis térmicos (DSC) das formulações nas faixas de (a) -20 a 200 °C e (b) 25 a 100 °C.



Fonte: o próprio autor

As curvas de DSC de -22 a 200 °C apresentam em geral dois eventos térmicos, ambos representados por picos endotérmicos (Figura 29a). O primeiro em aproximadamente 0 °C para todas as amostras, que pode ser caracterizado pela temperatura de fusão das amostras, visto que ambas as formulações são em grande parte constituídas por água. O segundo evento térmico, ocorreu na faixa de temperatura de 63 a 70 °C, que pode ser indicativo de desidratação das amostras.

Além disso, é possível observar na Figura 29b, que a incorporação do ativo botriosferana sulfatada SB* parece ter auxiliado levemente no aumento da estabilidade térmica das formulações, tanto nos produzidos com Laponita, quanto os com LECIGEL®, devido ao fato das curvas das amostras HID LAP (SB*) (linha em

verde) e HID LECI (SB*) (linha em rosa) estarem mais deslocados para a direita, em relação às formulações com a botriosferana nativa (BOT).

5.8.2 Estabilidade preliminar

Estudos de estabilidade são de grande importância no desenvolvimento de novos produtos, principalmente os destinados a utilização/consumo humano. Tais análises são descritas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a fim de estabelecer critérios sobre prazos de validade, condições e materiais de armazenamento, além de assegurar a qualidade física, química, microbiológica e toxicológica de tais produtos. Além disso, é imprescindível que os produtos desenvolvidos tenham suas propriedades sensoriais adequadas para sua finalidade, para que então o produto final tenha aceitação e adesão dos consumidores.

Os resultados obtidos na análise da estabilidade preliminar dos produtos estão apresentados na Tabela 8.

As quatro formulações desenvolvidas apresentaram-se estáveis (nenhuma mudança - N) quando submetidas às condições de estresse térmico durante os 15 dias, não sendo identificados sinais de instabilidade em relação às propriedades organolépticas como a aparência, cor, odor e homogeneidade. A aparência se manteve intacta, sem formação de qualquer tipo de colônias ou de contaminação ou alteração da turbidez dos produtos. Em relação à cor, os hidrogéis de Laponita se mantiveram transparentes e os géis-creme de LECIGEL® esbranquiçados, característicos dos ingredientes utilizados na formulação. Ambas as amostras não apresentaram odor característico de contaminação microbiológica, nem após imediata produção, nem após estresse térmico de 15 dias. Não houve separação de fases com o teste de centrifugação (Figura 30).

Em relação à densidade, é possível perceber que todos os valores de densidade, tanto pré quanto pós estresse térmico são muito próximos ao valor de densidade da água, visto que é seu componente majoritário. Além disso, tanto a incorporação do ativo (SB*), quanto a variação de temperatura, não demonstraram interferir nesta propriedade.

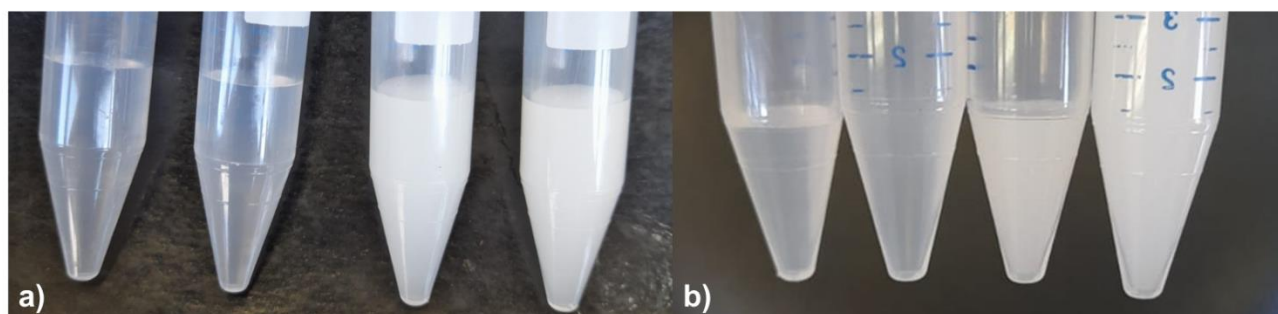
Tabela 8- Resultados dos testes de estabilidade preliminar com as formulações de Laponita e LECIGEL® (bases e com amostra SB* incorporada).

Testes	Amostras							
	Base LAP		HID LAP		Base LECI		HID LECI	
	0 dias	15 dias	0 dias	15 dias	0 dias	15 dias	0 dias	15 dias
Aparência	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N
Centrifugação	N	N	N	N	N	N	N	N
Densidade (g/cm³)	1,019	1,06	1,018	1,02	1,019	1,004	1,021	1,004
pH	8,89	8,38	8,21	8,35	7,24	7,25	6,98	7,09

N: nenhuma mudança;
L: ligeiramente modificado;
M: modificado;
F: fortemente modificado.

Fonte: o próprio autor

Figura 30- Resultados do teste de centrifugação (a) pré-estabilidade e (b) após 15 dias.



(a) amostras da esquerda para direita – Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI; (b) amostras da esquerda para direita – Base LAP, HID LAP, Base LECI e HID LECI.

Fonte: o próprio autor

O pH é um fator muito importante para produtos labiais, visto que este trabalho visa desenvolver produtos para combater o herpes labial. Costa et al., (2022) relatam que o pH ideal de compatibilidade com a saliva e lábios humanos é entre 6,0-7,0. Segundo resultados obtidos, é possível verificar que os géis-creme a base LECIGEL® (tanto pré, quanto pós estresse térmico) se encontram mais próximos a essa faixa. De fato, esse produto é de uso específico para formulações dermocosméticas, não apresentando nenhum imprevisto em todo seu processo de utilização, como em relação ao pH ou qualquer outro aspecto técnico, no qual todas

as especificações atendem os requisitos de análise de produtos como hidrogéis labiais (pH e características organolépticas, por exemplo).

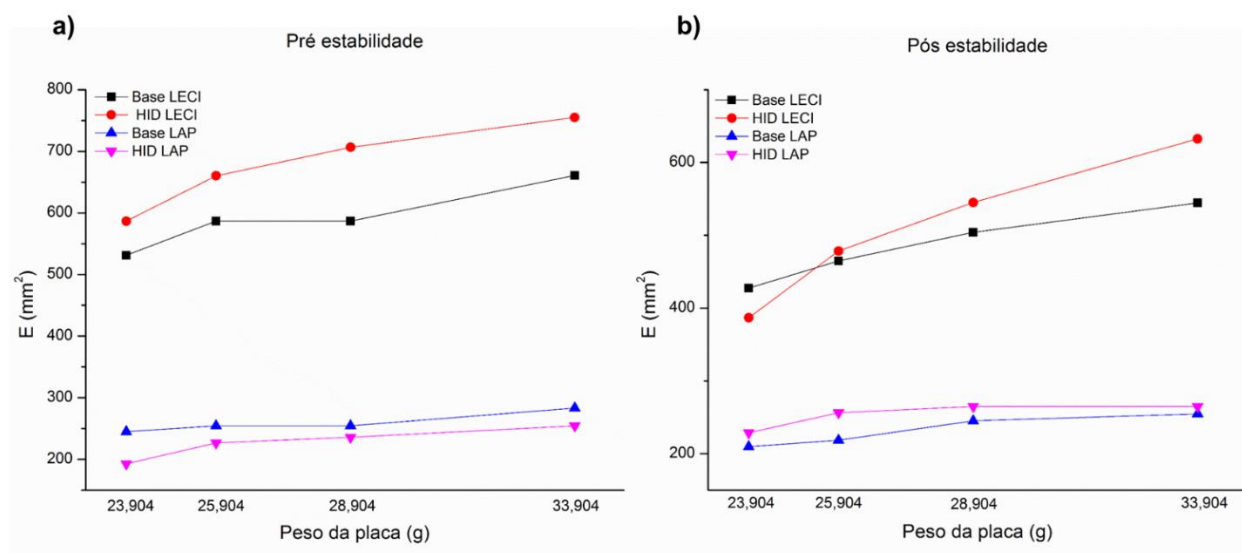
Já em relação aos hidrogéis de Laponita, o pH mostrou-se acima do valor ideal. Como mencionado em tópicos anteriores (3.5.1), a Laponita por si só em solução apresenta um pH de 8,5, não suportando pH inferior a 7,0, pois se degrada, entretanto, apesar de todos esses fatores, esse produto não apresenta citotoxicidade. Durante o processo de desenvolvimento dos hidrogéis de Laponita, o pH foi reduzido a 7,0 com uma solução de ácido cítrico a 20%, entretanto, foi observado que após alguns dias o pH voltava a aumentar.

Destaca-se que sabonetes em barra comumente apresentam $\text{pH} > 8,0$ (VOLOCHTCHUK et al., 2000), dessa forma sugere-se uma certa segurança em se fazer uso de produtos com tais características, desde que outros aspectos de segurança estejam de acordo, como é o fato da capacidade de irritação dérmica, que será relatada nos próximos tópicos.

O perfil de espalhabilidade das amostras pré e pós 15 dias de estresse térmico está apresentado na Figura 31. A espalhabilidade indica a área na qual uma formulação tópica se espalha durante sua aplicação. Um baixo valor de espalhabilidade pode resultar em uma distribuição desigual do produto, afetando a dose de aplicação e por consequência uma possível eficiência dos ativos (MONTENEGRO et al., 2015). Além disso, produtos com baixa espalhabilidade não possuem boa aceitação pelos consumidores.

É possível verificar que os géis-creme produzidos com LECIGEL® apresentaram, em geral, valores maiores de espalhabilidade, permanecendo todos na área superior dos gráficos da Figura 31, tanto pré quanto pós estresse térmico de 15 dias. O máximo valor obtido de espalhabilidade foi de 754,9 mm² com o gel-creme produzido com LECIGEL® já com o ativo incorporado (SB*) durante a pré estabilidade (HID LECI), quando o peso da placa de 33,904 g foi utilizado. Os dados das análises demonstraram, em geral, que ocorreu um aumento constante no perfil da espalhabilidade dos géis-creme com LECIGEL® na medida do aumento dos pesos. Além disso, a sua espalhabilidade foi superior aos resultados com Laponita, demonstrando que a formulação do primeiro apresenta maior capacidade de espalhabilidade. Isso pode ser justificado pelos ingredientes que compõem a sua formulação, como o silicone volátil que torna o produto mais emoliente, além do próprio LECIGEL®.

Figura 31- Perfil de espalhabilidade das amostras (Base LECI, HID LECI, Base LAP e HID LAP) (a) pré e (b) pós estresse térmico de 15 dias.



Fonte: o próprio autor

Ainda sobre a formulação dos géis-creme de LECIGEL®, todas elas apresentaram resultados melhores antes da aplicação do estresse térmico de 15 dias, como mostrado na Figura 31a. Tal observação sugere que o aquecimento e resfriamento podem ter causado pequenas mudanças morfológicas no produto, afetando a sua capacidade de espalhabilidade. Além disso, a incorporação do ativo SB* parece ter melhorado a espalhabilidade dos géis-creme produzidos com LECIGEL®, visto que as amostras HID LEC Pré est. (754,9 mm²) e HID LEC Pós est. (632,4 mm²) apresentaram melhores resultados quando comparadas com as bases (Base LECI Pré est. 660,7 mm², Base LEC Pós est. 544,5 mm²), por exemplo, sob peso de 33,904 g. Pela análise estatística, observa-se que somente a comparação entre os conjuntos pós-tratamento térmico da Base LECI e HID LECI não apresentou diferença estatisticamente significativa; todas as demais comparações demonstraram diferenças estatísticas.

Já em relação aos hidrogéis de Laponita, não é possível estabelecer nenhuma relação na espalhabilidade entre o conjunto de Base e HID pré e pós estresse térmico. Tais valores apresentaram-se intercalados em todos os pontos sob aplicação de peso. Além disso, o ativo incorporado (SB*), parece não ter interferido

na espalhabilidade dos hidrogéis.

Por fim, em relação à embalagem, acredita-se que para futura comercialização a melhor seria do tipo bisnaga opaca, como demonstrado na Figura 32. Dessa forma, o produto torna-se de fácil aplicação, diretamente com a própria embalagem sem necessidade do contato com as mãos do consumidor final.

Figura 32- Embalagem para comercialização futura das formulações, como produtos antivirais.



Fonte: o próprio autor

5.9 ANÁLISES BIOLÓGICAS DAS FORMULAÇÕES

5.9.1 Citotoxicidade e atividade antiviral *in vitro* das formulações

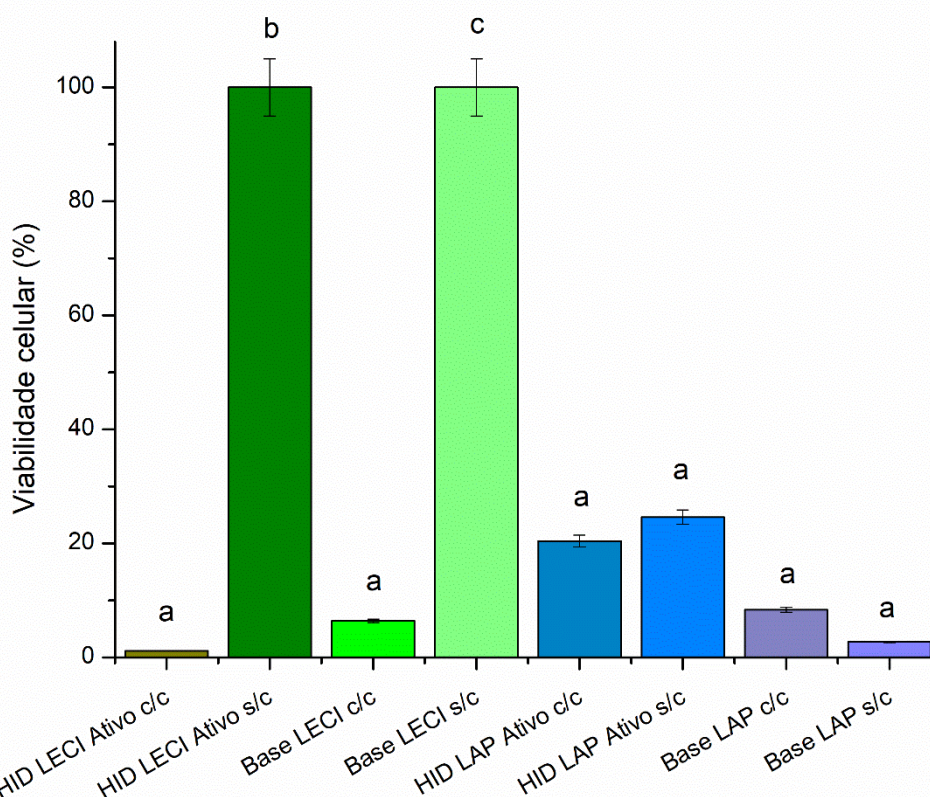
Com as formulações já desenvolvidas, caracterizadas físico-quimicamente e realizadas as análises de estabilidade, o próximo passo foi avaliar a sua eficácia biológica. Para isso, as formulações inicialmente foram submetidas à avaliação citotóxica pelo teste MTT. Com este teste é possível verificar a capacidade das substâncias, ou neste caso, dos produtos desenvolvidos, de causar alterações às células.

Os resultados da atividade citotóxica das formulações estão apresentados na Figura 33. É possível observar no gráfico que os géis-creme produzidos com LECIGEL® sem adição de conservante não exerceram citotoxicidade em nenhum grau, ou seja, mantiveram a viabilidade celular em 100%. Tais produtos são os únicos que diferiram estatisticamente entre si e das demais amostras. Já os géis-creme também produzidos com LECIGEL® porém com a adição de conservante, resultaram em viabilidade celular reduzida, ou seja, menor quantidade de células viáveis, (HID LECl c/c: 1,16% e Base LECl c/c: 6,41%), como já era o esperado. O uso de conservantes é justificado em formulações farmacêuticas, visto que seu uso e concentrações utilizadas são recomendadas e não influenciam no produto final. Além disso, tais resultados servirão de comparação em resultados mais à frente.

Em relação ao hidrogel a base de Laponita, é possível verificar que os produtos já incorporados com o ativo (SB*) apresentaram uma melhor viabilidade celular quando em comparação com as bases (HID LAP Ativo c/c: 20,42%; HID LAP Ativo s/c: 24,61%; Base LAP c/c: 8,37%; e Base LAP s/c: 2,72%), mostrando que a botriosferana sulfatada, nesse caso, aparenta proteger de alguma forma a integridade celular.

Quando comparamos os dois produtos desenvolvidos às bases de LECIGEL® e Laponita, é clara a menor citotoxicidade dos primeiros em comparação aos segundos, mesmo assim, ambos os produtos seguiram para teste *in vitro*, para avaliação da atividade antiviral.

Figura 33- Atividade citotóxica das formulações desenvolvidos (HID LECI, Base LECI, HID LAP e Base LAP).



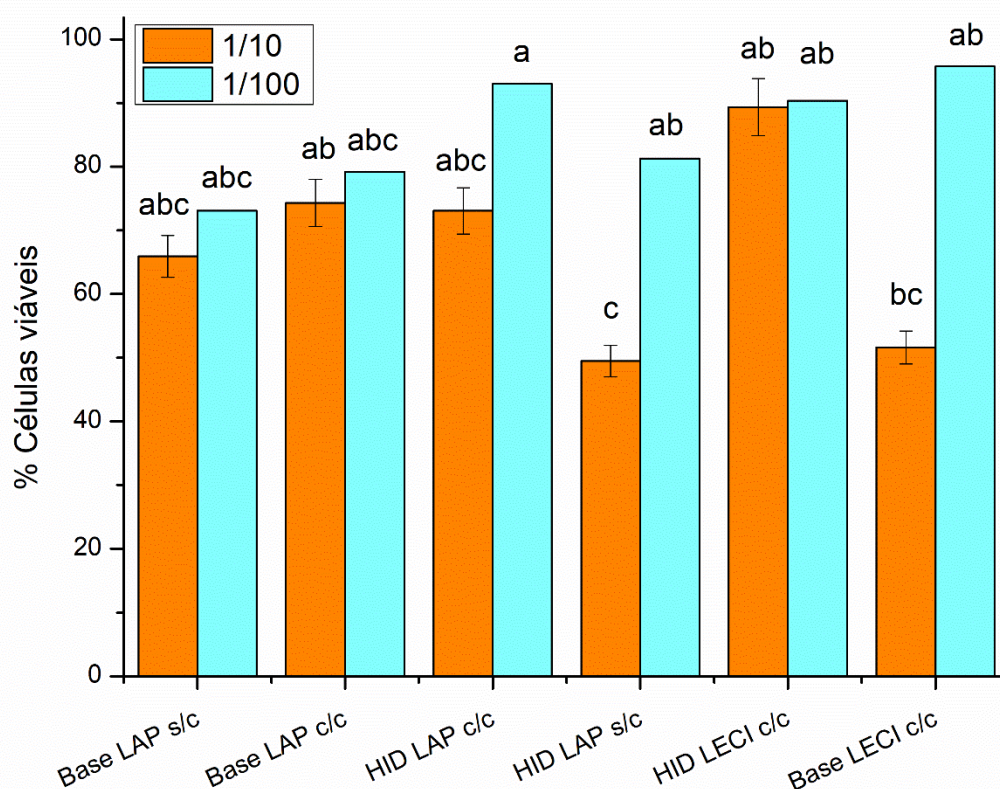
s/c: sem conservante; c/c: com conservante.

As letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas reais.

Fonte: o próprio autor

É crucial ressaltar que a diminuição na viabilidade celular, conforme evidenciado na Figura 33, não sugere, necessariamente, que o produto seja tóxico para uso humano durante sua aplicação final. Isso ocorre devido à menor densidade celular na cultura *in vitro* em comparação com o tecido humano. Entretanto, para realização do teste de eficácia antiviral e a característica de dependência das células pelos vírus, faz-se necessário a determinação da maior concentração não citotóxica do produto *in vitro*. Dessa forma, os produtos desenvolvidos foram avaliados também quanto a citotoxicidade das formulações diluídas 10 e 100 vezes, a partir da concentração de uso (Figura 34).

Figura 34- Citotoxicidade (% de células viáveis) em células Vero, após 72 h de contato com as formulações, nas diluições (1/10 e 1/100).



s/c: sem conservante; c/c: com conservante.

As letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas reais.

Fonte: o próprio autor

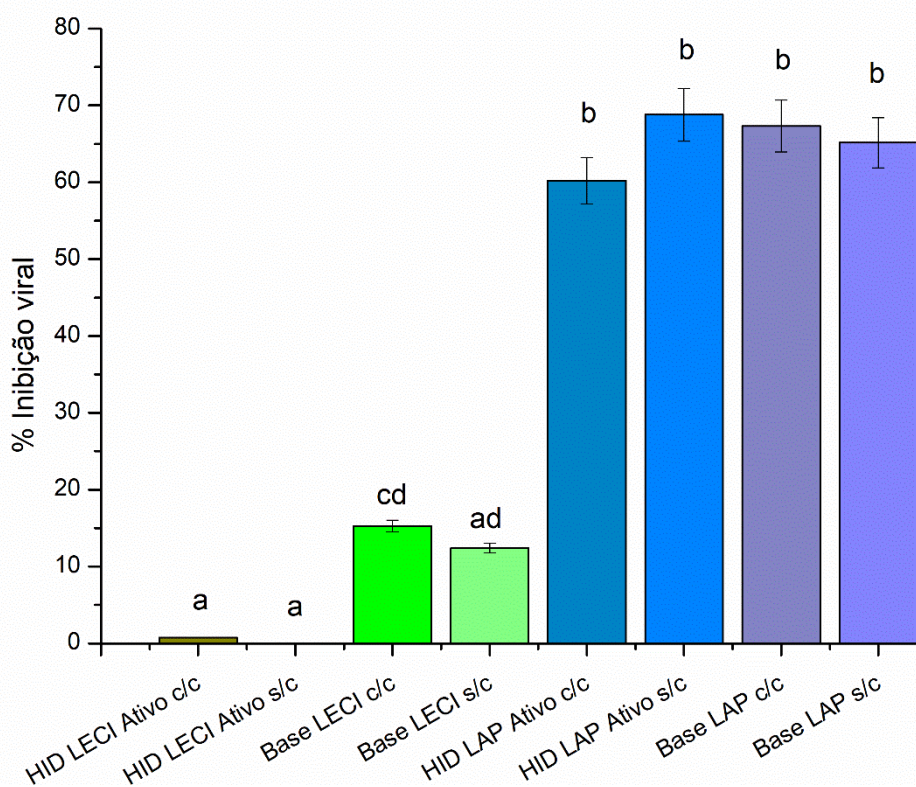
Nos hidrogéis desenvolvidos com Laponita, as bases (c/c e s/c) na diluição 1/100, exibiram 79,2% e 73,0% de células viáveis, respectivamente. Resultado semelhante foi observado com os hidrogéis incorporados com botriosferana sulfatada (1/100), cujas porcentagens de células viáveis foram de 93,0% (c/c) e 81,3% (s/c). A alta porcentagem de células viáveis também foi mantida para os géis-creme produzidos com LECIGEL®, de 95,7% para base com conservante e de 90,3% para o gel-creme incorporado com o ativo. Como a diluição 1/100 não foi citotóxica para todos os produtos, essa diluição foi a escolhida para ser adicionada à célula, após o teste virucida.

Com o objetivo de confirmar a eficácia das formulações-teste contendo SB*, estas foram primeiramente avaliadas *in vitro*, através do ensaio virucida frente à HSV-1 KOS (Figura 35). É possível observar que as amostras que apresentaram melhores resultados, ou seja, uma atividade virucida, foram todas as amostras do hidrogel desenvolvido a base de Laponita. Os melhores resultados são

apresentados pela amostra HID LAP incorporada com ativo (SB*) sem adição de conservante s/c (68,8%), seguida da Base LAP com adição de conservante c/c (67,3%), Base LAP s/c (65,2%) e por fim HID LAP Ativo c/c (60,2%). Neste teste, fica claro que a adição ou não do conservante não interfere na atividade antiviral dos produtos.

A atividade antiviral do gel-creme a base de LECIGEL® nos testes *in vitro* apesar de ser pouco satisfatória não cessa a avaliação deste produto, visto que este produto, quando incorporado da botriosferana sulfatada, forneceu no teste de citotoxicidade alguma proteção a nível celular. Dessa forma, tais resultados, tanto dos géis-creme de LECIGEL® quanto de Laponita, devem e foram avaliados sob perspectivas de matrizes biológicas, ou seja, em sistemas vivos como camundongos. Dessa forma, quando submetidos a essas análises, há outros interferentes no sistema, e assim pudemos avaliar se houve alteração de parte ou de quase toda a interpretação destes resultados *in vitro*.

Figura 35- Atividade antiviral *in vitro* das formulações desenvolvidos (HID LECI, Base LECI, HID LAP e Base LAP).



c/c: com conservante; s/c: sem conservante;

As letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas reais.

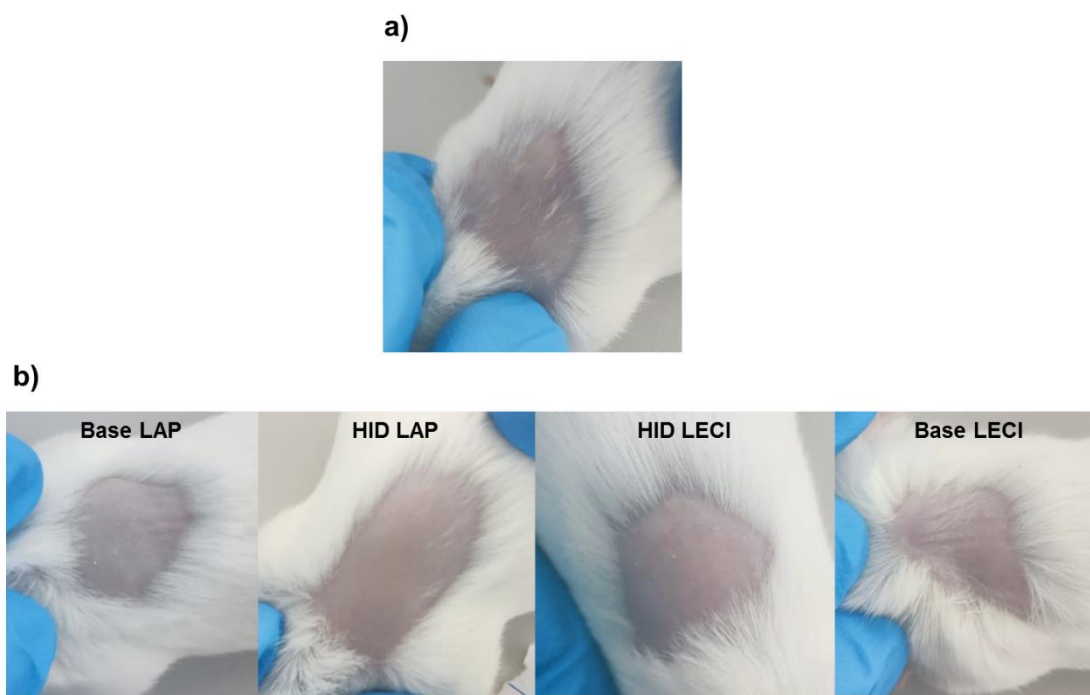
Fonte: o próprio autor

5.9.2 Avaliação antiviral *in vivo* das formulações

Produtos farmacêuticos de uso tópico devem sempre ser avaliados quanto ao seu potencial de irritabilidade e alergênico. Esses testes são realizados inicialmente em animais de experimentação, com a aprovação de um comitê de ética, e em uma próxima fase em voluntários humanos. Neste estudo, avaliamos inicialmente a capacidade de irritação dérmica das formulações aqui desenvolvidas (HID LAP, Base LAP, HID LECI e Base LECI).

Nenhuma das formulações avaliadas apresentou qualquer nível de irritação dérmica na pele dos camundongos, até o 7º dia de observação, como mostrado na Figura 36. Mesmo o hidrogel a base de Laponita, cuja formulação apresentou um pH de 8,6 em média, não provocou irritação dérmica, demonstrando o uso seguro de todos os produtos. Vale ressaltar que tal resultado para irritação dérmica pode ser justificado ao fato dos componentes, principalmente da Laponita, não serem tóxicos, e de sua aplicação para tratamento cutâneo anti-herpético durar em média sete dias (aqui neste estudo), ou seja, não ter um uso prolongado.

Figura 36- Resultados da irritação dérmica após sete dias de observação (a) grupo controle e (b) aplicação das formulações teste.



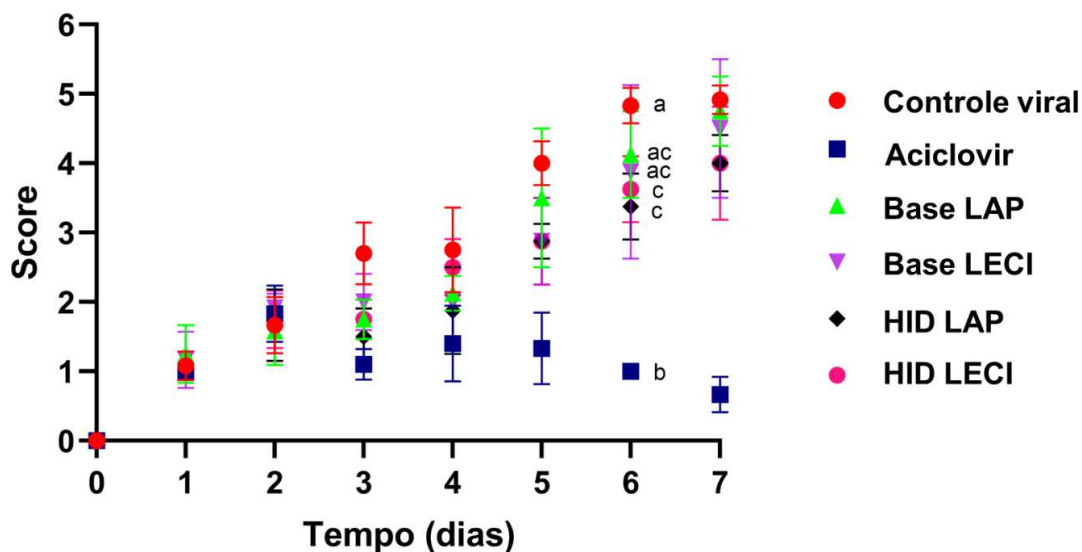
Fonte: o próprio autor

Em relação à atividade anti-HSV-1 *in vivo* dos tratamentos com as formulações, os resultados estão apresentados na Figura 37. É possível observar que apenas no terceiro e sexto dia o controle viral mostrou-se estatisticamente diferente frente aos tratamentos com HID LAP e HID LECI (Figura 38). Nos demais dias do experimento, não se obteve diferenças estatísticas entre as formulações contendo a glucana sulfatada SB* (HID LAP e HID LECI) e as formulações base (Base LAP e Base LECI) com o controle viral (Figura 37). Além disso, a porcentagem de ativo incorporado em ambas as formulações (0,03-1,25%) pode justificar a ausência de uma diferença estatística entre ambas. A formulação de referência aciclovir (ACV) inibiu a infecção desde o terceiro dia, resultando desde então estatisticamente diferente. Apesar das formulações a base de Laponita terem apresentado resultados promissores na atividade antiviral *in vitro*, as formulações a base de LECIGEL, no teste *in vivo*, demonstraram resultados muito próximos. Isso pode ser justificado pelo fato da infecção por HSV-1 ser uma infecção tópica, assim quando adicionada uma barreira física ou ainda produtos que auxiliem a manter a hidratação sobre as feridas (neste estudo o hidrogel e o gel-creme), pode ter contribuído para manter a infecção em um mesmo nível de *score*. Além disso, a composição, ou seja, o sinergismo dos

componentes das formulações pode ter mascarado a presença do ativo incorporado, e ter prejudicado em algum nível a sua atividade biológica. Dessa forma, por enquanto, podemos dizer que ambos os produtos são capazes de manter a infecção viral sob controle.

Durante a análise *in vivo* (Figura 39), foram observadas as lesões provocadas por herpesvirus ao longo do experimento, incluindo a formação de erosões e ulcerações vesiculares. Notavelmente, nos grupos submetidos aos tratamentos com as formulações (Laponita e LECIGEL®), as lesões apareceram de maneira mais concentrada e localizada. Esses resultados sugerem que os tratamentos podem ter exercido sua influência somente quando o vírus foi liberado das células já destruídas. Quando o vírus infecta uma célula hospedeira, seu ciclo de multiplicação ocorre até que a célula seja destruída, liberando milhares de novos vírus (disseminação) com o objetivo de continuar a infecção em novas células. Considerando que o tratamento foi iniciado quatro horas após a inoculação, ou seja, quando o vírus já estava em processo de multiplicação dentro das células hospedeiras, as formulações incorporadas com botriosferana sulfatada parecem agir principalmente contra os vírus já replicados, sem impedir as lesões iniciais. Isso ocorre porque as células que serviram como hospedeiras para a multiplicação viral já foram destruídas, desencadeando as lesões observadas. Porém, considerando a infecção herpética como permanente e latente, nosso experimento mimetizou a condição de infecção *in vivo*. Convém salientar ainda que o mecanismo proposto para a inibição por derivados sulfatados de BOT descreve um bloqueio na adsorção das partículas virais às células hospedeiras. Tal mecanismo é observado no meio extracelular. É importante destacar que esta análise por escores é uma análise visual e qualitativa.

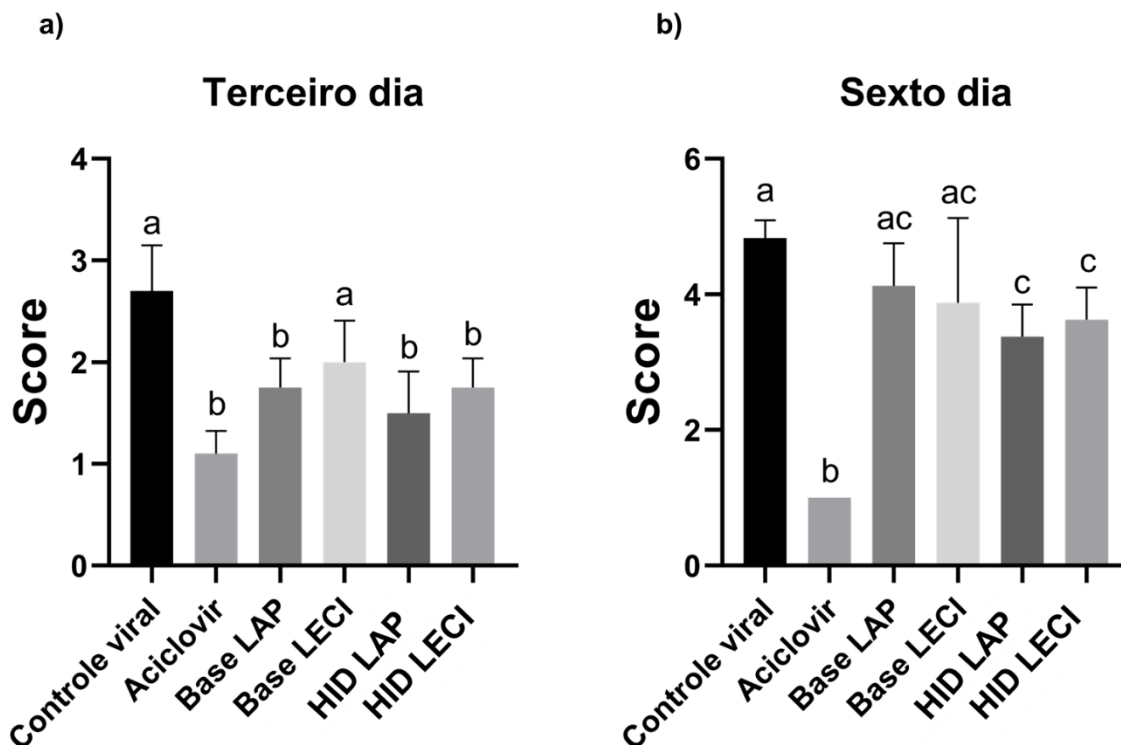
Figura 37- Resultados de escore da análise *in vivo*, referentes a todos os dias de experimento, aplicando as formulações testadas.



As letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas reais.

Fonte: o próprio autor

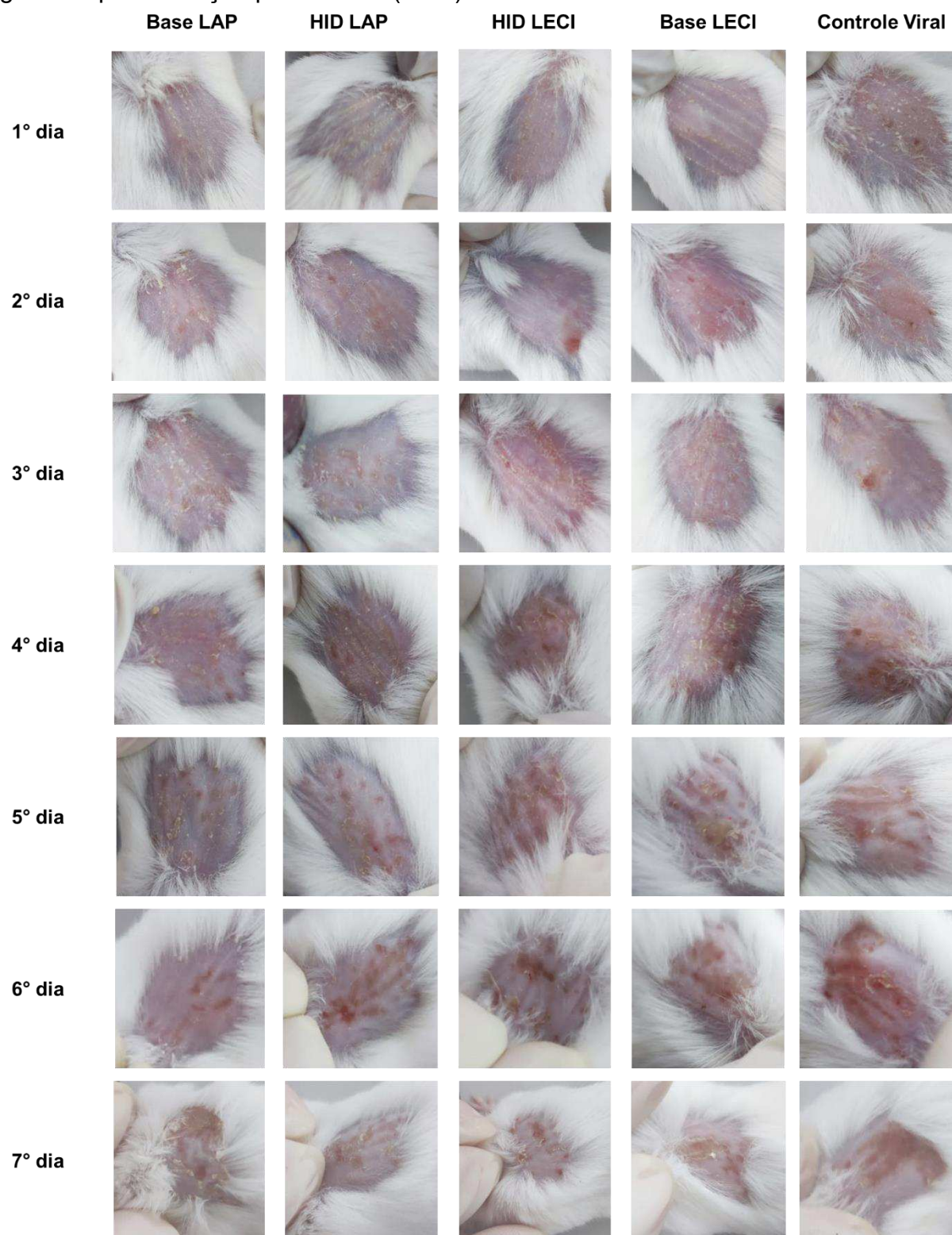
Figura 38- Resultado da atividade antiviral *in vivo* do (a) terceiro e (b) sexto dia, aplicando as formulações testadas.



As letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas reais.

Fonte: o próprio autor

Figura 39- Resultados da análise *in vivo* durante todos os dias de aplicação das formulações testadas (Base LAP, HID LAP, HID LECI e Base LECI) em feridas geradas pela infecção pelo HSV-1 (KOS).

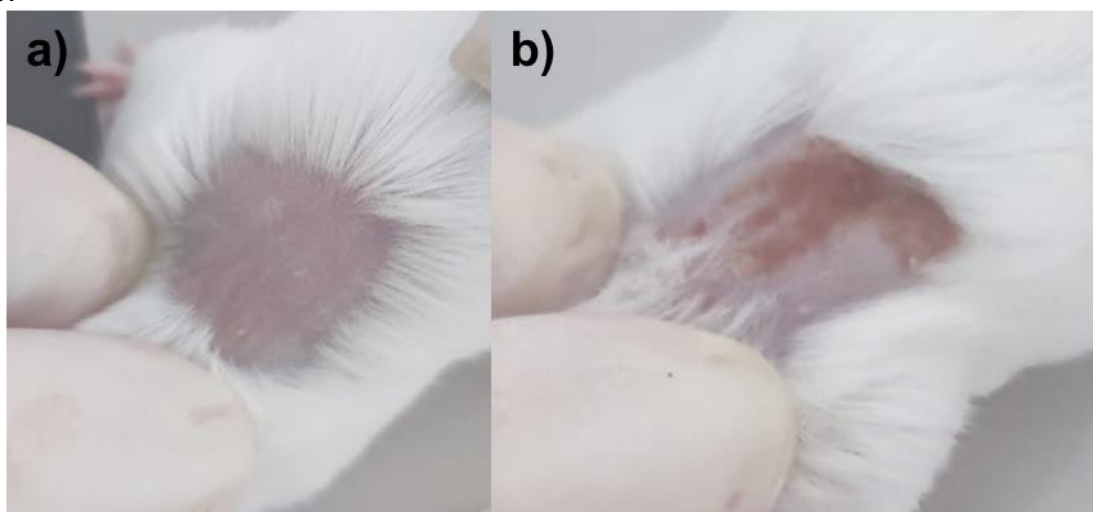


Fonte: o próprio autor

O grupo de controle positivo, ou seja, sem nenhum tratamento, chegou ao 7° dia de observação com escore 5 de lesões, apresentando lesões

zosteriformes severas. Já o grupo controle negativo, com tratamento de aciclovir (CIMED Indústria S.A. Lote 2215009), ao final do último dia apresentou uma média de escore 0,5, ou seja, alguns animais já não apresentavam lesões visíveis, enquanto outros possuíam poucas ou quase nenhuma vesícula (Figura 40 a e b). A cepa de HSV-1 (KOS) usada nos testes *in vivo* é sensível ao aciclovir.

Figura 40 - Resultados dos controles (a) negativo e (b) positivo da análise antiviral *in vivo*.



Fonte: o próprio autor

Não há na literatura científica estudos *in vivo* desenvolvidos sobre formulações a base de Laponita ou LECIGEL® para tratamento tópico de infecções causadas por herpesvírus. Entretanto, há trabalhos com tais compostos no desenvolvimento de novos biomateriais para atuar frente a outras doenças.

Li et al., (2023a) desenvolveram em sua pesquisa um nanocompósito de hidroxiapatita/Laponita/alginato injetável para tratamento de aumento ósseo microinvasivo. Tais autores realizaram testes *in vitro* e *in vivo*, a fim de avaliar o perfil de inchaço, comportamento de degradação, propriedades mecânicas, morfologias de superfície, citocompatibilidade e atividade de indução óssea desses hidrogéis. Como resultados, verificaram que os hidrogéis promoveram significativamente a diferenciação osteogênica *in vitro* e aumento ósseo *in vivo*, revelando sua potencial aplicabilidade no aumento ósseo microinvasivo subperiosteal.

Shao et al., (2023) estudaram a produção de um novo hidrogel antibacteriano composto por quitosana, ϵ -polilisina e reticulado com glutaraldeído e Laponita, com o objetivo de atuação em adesivos clínicos para cicatrização de feridas.

Tal hidrogel demonstrou propriedades antibacterianas eficazes e excelente biocompatibilidade. Com os testes *in vivo*, as feridas tratadas com o hidrogel exibiram o processo de cura significativamente mais rápida em comparação com o grupo controle, onde já no 3º dia de tratamento, as feridas já se apresentavam com boa aparência, e no final do experimento (12º dia) quase completamente cicatrizadas.

Alvarenga, (2018) desenvolveu em seu trabalho uma pomada para tratamento de psoríase (dermatite induzida por imiquimode) composta por óleo de semente de maracujá *in natura* 20% e LECIGEL® 2%. O tratamento *in vivo* foi realizado durante 15 dias consecutivos, no qual foi possível observar que o quadro inflamatório induzido por imiquimode nas orelhas dos camundongos foi consideravelmente reduzido. Além disso, pela análise imuno-histoquímica na epiderme, observou-se um aumento na formação de corpos apoptóticos, diminuição da hiperplasia epitelial e redução do infiltrado inflamatório, demonstrando que a pomada desenvolvida é promissora para o tratamento anti-inflamatório da psoríase induzida por imiquimode.

5.9.3 Avaliação histológica do experimento *in vivo*

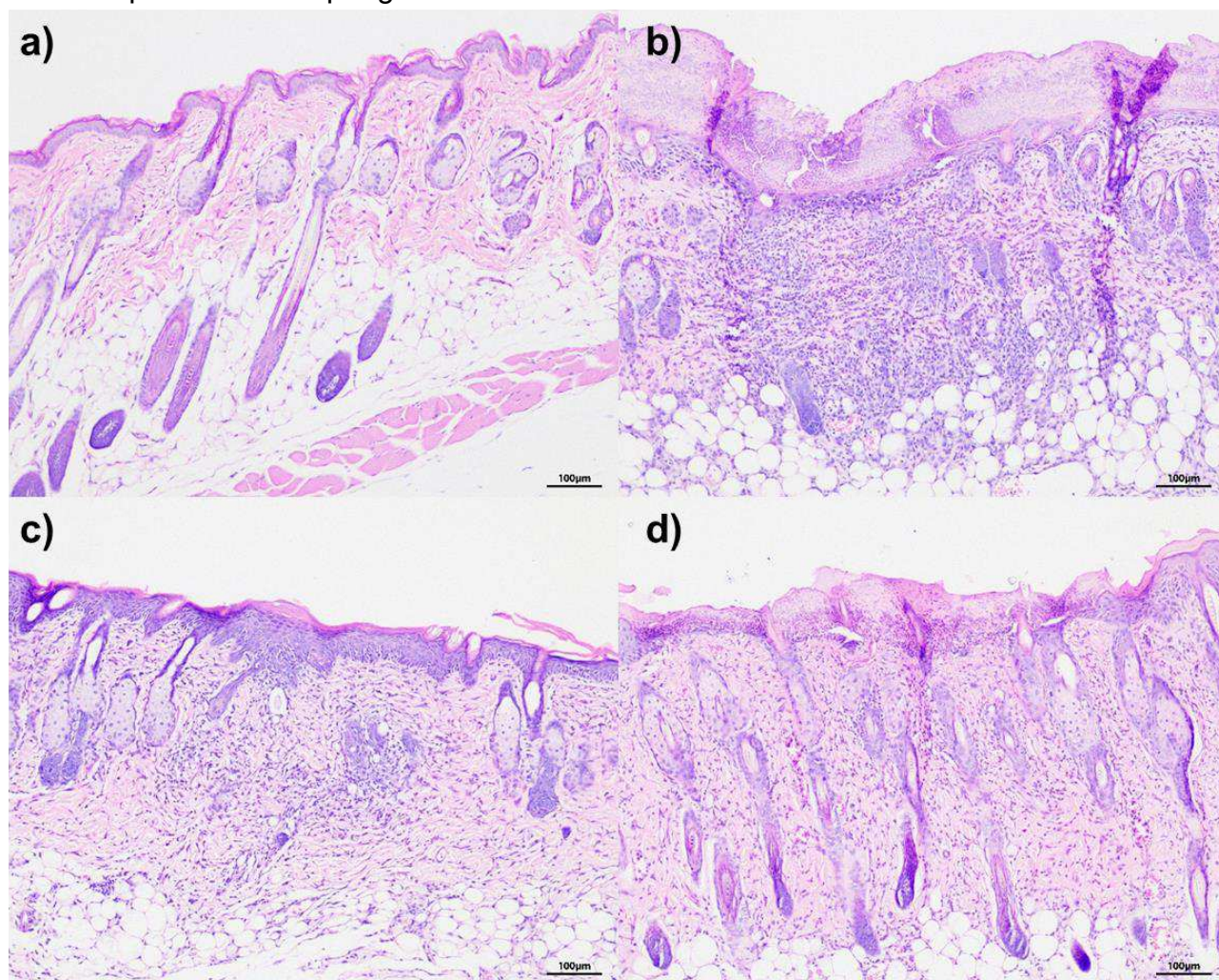
Pela análise histológica, não foram observadas alterações importantes no grupo controle negativo (escarificação). No grupo controle viral, a infecção por herpesvirus resultou principalmente em alterações inflamatórias na epiderme, derme e hipoderme; proliferativas (hiperceratose e hiperplasia); degenerativas (espongiose discreta) e necróticas epidérmicas. O tratamento com aciclovir foi eficaz em reduzir qualitativamente as alterações morfológicas quando comparado ao controle viral, resultando em espongiose, hiperplasia epidérmica e inflamação dérmica discretas com inflamação epidérmica discreta a moderada.

Nos grupos de avaliação da irritação dérmica HID LAP, Base LAP, HID LECI e Base LECI havia alterações proliferativas discretas como hiperkeratose e hiperplasia epidérmica, entretanto, não houve lesões relevantes que indiquem citotoxicidade do produto.

Nos grupos de tratamento envolvendo infecção viral, o tratamento com Base LAP e HID LAP apresentou discreta redução nas alterações morfológicas, entretanto, o escore final foi maior em relação ao grupo tratado com aciclovir (ACV),

como pode ser observado na Figura 41. O mesmo comportamento foi observado nos grupos tratados com Base LECI e HID LECI. Todavia, a intensidade e extensão das lesões observadas para os grupos HID LAP e Base LECI foram paradoxalmente mais severas quando comparadas ao controle viral. As alterações histológicas e escore dos animais analisados individualmente encontram-se na Tabela 9.

Figura 41- Fotomicrografias das lesões observadas. a) Grupo escarificação, sem alterações histopatológicas. b) Grupo controle viral, há moderada hiperqueratose, hiperplasia epidérmica e necrose epidérmica. O infiltrado inflamatório é moderado a acentuado e composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raros neutrófilos que expandem a derme e invadem a epiderme. c) Grupo base LAP, observa-se alterações proliferativas moderadas (hiperqueratose e hiperplasia epidérmica) com discreta espongiose e infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos na derme. d) Grupo HID-LAP, há discreta hiperqueratose, inflamação em derme, necrose epidérmica e espongiose.



Fotomicrografias da pele de camundongo (H.E., 100x, barra: 100µm)

Fonte: o próprio autor

Tabela 9- Resultados histológicos da pele dos animais avaliados contendo os critérios do escore tecidual e seu fator de severidade. A intensidade e extensão das lesões foram classificadas em ausente (0 – verde); discreta (1 – amarelo); moderada (2 – laranja); e acentuada (3- vermelho).

		Hiperkeratose (x1)	Hiperplasia epidérmica (x1)	Esgoiose (x1)	Inflamação epidérmica (x2)	Inflamação dérmica (x2)	Inflamação hipodérmica (x2)	Necrose epidérmica (x3)	Necrose dérmica (x3)	Soma	Escore	Média por grupo
Escarificação	Esc - 58									0	0	
	Esc - 57		1							1	1	0,3
	Esc - 55									0	0	
Controle viral	CV - 30	2	1	1	2	3	2	1		14	26	
	CV - 31	1	1	1	2	2	2	1		6	9	15,0
	CV - 27	1	1	1	2	2	2	1		5	10	
Aciclovir	ACV - 40	1	1	1	1	1	1	1		1	1	
	ACV - 41	1	1	1	2	1	1	1		5	8	5,0
	ACV - 38	1	1	1	1	1	1	1		4	6	
HID LAP (irritação dérmica)	F1- ID - 2	1	1	1	1	1	1	1		1	1	
	F1- ID - 6	1	1	1	1	1	1	1		2	2	1,7
	F1- ID - 1	1	1	1	1	1	1	1		2	2	
Base LAP (irritação dérmica)	F1B - 17	1	1	1	1	1	1	1		2	2	
	F1B - 22	1	1	1	1	1	1	1		2	2	1,7
	F1B - 29	1	1	1	1	1	1	1		1	1	
Base LAP (tratamento)	F1BV - 15	1	1	1	2	2	2	1		4	6	
	F1BV - 16	2	2	2	2	2	2	1		8	11	11,7
	F1BV - 18	3	2	2	2	2	2	1		13	18	
HID LAP (tratamento)	F1TV - 48	2	2	2	3	3	3	2		13	27	
	F1TV - 42	2	2	2	2	2	2	1		9	13	18,7
	F1TV - 47	2	2	2	2	2	2	1		10	16	
HID LECl (irritação dérmica)	F2- ID - 8	1	1	1	1	1	1	1		1	1	
	F2- ID - 9	1	1	1	1	1	1	1		2	2	2,3
	F2- ID - 10	1	1	1	1	1	1	1		3	4	
Base LACl (irritação dérmica)	F2B - 44	1	1	1	1	1	1	1		1	1	
	F2B - 39	1	1	1	1	1	1	1		2	2	1,7
	F2B - 35	1	1	1	1	1	1	1		2	2	
Base LECl (tratamento)	F2BV - 21	3	3	3	3	3	3	2		18	33	
	F2BV - 26	2	2	2	2	2	2	1		11	18	26,3
	F2BV - 23	3	2	2	2	2	2	1		16	28	
HID LECl (tratamento)	F2TV - 53	1	1	1	2	2	2	1		9	15	
	F2TV - 50	1	1	1	2	2	2	1		7	10	12,0
	F2TV - 54	1	1	1	2	2	2	1		8	11	

Fonte: o próprio autor

Os resultados da avaliação histológica da pele dos camundongos dos grupos submetidos ao experimento *in vivo*, apesar de mostrarem alguns paradoxos (escore superior ao controle viral para alguns grupos tratados com as formulações), indicam que as formulações desenvolvidas podem ajudar no controle das lesões causadas pela infecção pelo HSV-1. Entretanto, percebe-se que a eficácia do

medicamento de referência (ACV) ainda é nitidamente superior.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a sulfatação regioseletiva de uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana (botriosferana) foi realizada, gerando dois produtos com DS de 0,82 (SB) e 0,49 (SP). A diferença de DS de uma amostra para a outra pode ser atribuída principalmente ao impedimento estérico gerado pelo grupo protetor presente na síntese da amostra SP. Bandas de absorção no infravermelho características de sulfatação foram observadas nos espectros de ambas as amostras. A partir dos espectros de RMN, a posição da sulfatação foi deduzida em C-6 para SB e C-2/C-4 para SP, confirmando o sucesso das derivatizações regioseletivas.

Tais derivados não apresentaram citotoxicidade relevante em células Vero. A avaliação da atividade antiviral mostrou que a amostra sulfatada na posição C-6 (SB) exibiu notável inibição contra o HSV-1 (IC_{50} : $4,4 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto, ao contrário, a amostra SP mostrou-se pouco ativa. Assim, torna-se possível estabelecer uma relação estrutura-atividade para β-glucanas (pelo menos para a botriosferana), em que a presença de grupos sulfato, especialmente na posição C-6, é crucial para a atividade antiviral contra o HSV-1. Por outro lado, os derivados foram inativos contra o vírus da dengue, confirmando a menor suscetibilidade deste vírus a glucanas sulfatadas. E ainda, conclui-se que estas amostras não possuem atividade anticoagulante. Somente a amostra sulfatada com maior DS (SPer) demonstrou uma leve atividade anticoagulante na maior concentração testada (APTT, R = 1,65 e t=48 s).

Em um segundo momento, foi possível desenvolver duas formulações, uma a base de Laponita e outra a base de LECIGEL®, incorporadas com botriosferana sulfatada (SB*), nas quais tal inserção da amostra sulfatada melhorou a estabilidade térmica de ambos os produtos. Para a preparação destas formulações, uma nova produção de botriosferana sulfatada foi realizada (SB*), obtendo-se uma amostra com um DS um pouco superior (1,1) e com um IC_{50} de $2,52 \mu\text{g mL}^{-1}$, confirmando que maiores DSs contribuem para maiores atividades anti-herpéticas. Além disso, com essa amostra, observou-se que a botriosferana sulfatada age através do mecanismo de ação viral de efeito virucida, possivelmente pela inibição da adsorção do vírus nas células hospedeiras, alcançando uma inibição viral de 93% na maior concentração testada.

As formulações apresentaram-se estáveis, com características

sensoriais em geral semelhantes, entretanto o HID LECI mostrou-se com uma melhor espalhabilidade. Além disso, apresentaram-se homogêneas, não causando irritações dérmicas e de fácil uso e aplicação. Tais formulações não apresentaram citotoxicidade em células Vero. A avaliação de atividade antiviral *in vitro* mostrou maior inibição viral para HID LAP (68,8%). Quando avaliados *in vivo*, observou-se diferença estatística entre controle viral e as formulações com ativo no terceiro e sexto dias, indicando que tais produtos auxiliam no controle da replicação viral. Quando avaliamos a nível celular, pode-se perceber que o hidrogel de Laponita com o ativo e a Base de LECIGEL® apresentaram discreta redução nas alterações morfológicas. Ainda assim, a eficácia destas formulações foi inferior ao medicamento de referência (ACV). O desenvolvimento de formulações contendo glucanas sulfatadas inibidoras da infecção pelo HSV-1 seguirá na busca de produtos otimizados com eficácia superior.

Tais formulações e atividades biológicas desses produtos proporcionaram o depósito de uma patente (Anexo B).

REFERÊNCIAS

- ABDESHAHIAN, P. et al. Utilization of sugarcane straw for production of β -glucan biopolymer by *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 in batch fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 314, p. 123716, 2020.
- ACOSTA, S. B. P. et al. Valorization of Soybean Molasses as Fermentation Substrate for the Production of Microbial Exocellular β -Glucan. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 8, p. 2149–2160, 2020.
- AHMAD, F. et al. International Journal of Biological Macromolecules *Ganoderma lucidum*: A potential source to surmount viral infections through β -glucans immunomodulatory and triterpenoids antiviral properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 769–779, 2021.
- ALI, B. H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 1–8, 2009.
- ALUTA, U. P. et al. Chemical characterisation of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Centroceras clavulatum* and their in vitro immunostimulatory and antioxidant properties. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 3, p. 100135, 2023.
- ALVARENGA, A. C. M. **Efeitos do óleo da semente do maracujá na psoríase experimental**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2018.
- ANGELIN, M. et al. Qdenga® - A promising dengue fever vaccine; can it be recommended to non-immune travelers? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 54, p. 10–12, 2023.
- ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos - séries temáticas**. [s.l.: s.n.]. v. 1
- ARAÚJO, C. A. et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–491, 2013.
- ARLOV, Ø. et al. Engineered Sulfated Polysaccharides for Biomedical Applications.

Advanced Functional Materials, v. 31, n. 19, p. 1–52, 2021.

BAERT, L. et al. 3-O sulfation of syndecan-1 mediated by the sulfotransferase HS3ST3a1 enhances myeloma aggressiveness. **Matrix Biology**, v. 120, p. 60–75, 2023.

BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: A (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691–1698, 2003.

BECHER, T. B. et al. The structure-property relationship in LAPONITE® materials: From Wigner glasses to strong self-healing hydrogels formed by non-covalent interactions. **Soft Matter**, v. 15, n. 6, p. 1278–1289, 2019.

BECHER, T. B.; ORNELAS, C. Nonswellable Injectable Hydrogels Self-Assembled Through Non-Covalent Interactions. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 10, p. 3009–3013, 2017.

BEDINI, E. et al. A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1224–1239, 2017.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Development and evaluation of physical stability from O/W lotions containing sunscreens. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 531–537, 2006.

BUDDANA, S. K.; VARANASI, Y. V. N.; SHETTY, P. R. Fibrinolytic, anti-inflammatory and anti-microbial properties of alpha-(1-3)-glucans produced from *Streptococcus mutans* (MTCC 497). **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 152–159, 2015.

CALEGARI, G. C. et al. Sulfonation of (1→6)-β-D-glucan (Iasiodiplodan) and its antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2017.

CARDOZO, F. T. G. S. et al. In vivo anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivative of *agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2541–2549, 2013.

CASARINI, T. P. A. et al. Innovative hydrogel containing polymeric nanocapsules loaded with phloretin: Enhanced skin penetration and adhesion. **Materials Science and Engineering C**, v. 120, 2021.

CASTILLO-MACÍAS, A.; SALINAS-CARMONA, M. C.; TORRES-LÓPEZ, E. Immunology of viral infections with a high impact in Mexico: Dengue, Chikungunya, and Zika. **Medicina Universitaria**, p. 1–10, 2018.

CHATTOPADHYAY, K. et al. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. **Phytochemistry**, v. 68, n. 10, p. 1428–1435, 2007.

COSTA, E. M. et al. Development of a Multifunctional Lipstick With Sophorolipids Produced By *Starmerella Bombicola*. **International Journal of Health Science**, v. 2, n. 44, p. 2–10, 2022.

CUI, Y. et al. Effects of different sources of β -glucan on pasting, gelation, and digestive properties of pea starch. **Food Hydrocolloids**, v. 135, p. 108172, 2023.

CUMMINS, H. Z. Liquid, glass, gel: The phases of colloidal Laponite. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 353, n. 41–43, p. 3891–3905, 2007.

CUNHA, M. A. A. DA et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- β -D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–1188, 2012.

DANGI, D. et al. Synthesis and characterization of galactomannan polymer hydrogel and sustained drug delivery. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 4, p. 100230, 2022.

DAS, S. S. et al. Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 4, p. 424–443, 2019.

DE LOURDES CORRADI DA SILVA, M. et al. Purification and structural characterisation of (1→3;1→6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: A comparative study.

Carbohydrate Polymers, v. 61, n. 1, p. 10–17, 2005.

DE MOURA NETO, É. et al. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1953–1960, 2011.

DEKKER, R. F. H. et al. **Botryosphaeran – A Fungal Exopolysaccharide of the (1→3)(1→6)-β-D-Glucan Kind: Structure and Biological Functions**. [s.l.: s.n.].

DENG, C. et al. Physicochemical and biological properties of phosphorylated polysaccharides from Dictyophora indusiata. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 894–899, 2015.

DIGHE, S. N. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Recent update on anti-dengue drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 431–455, 2019.

DIOGO, J. V. et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. **Research in Veterinary Science**, v. 98, p. 142–144, 2015.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106–110, 1962.

DOU, X. et al. Effects of dietary β-glucan on growth rate, antioxidant status, immune response, and resistance against *Aeromonas hydrophila* in genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, v. 29, 2022, p. 101480, 2023.

F-TISCHER, P. C. S. et al. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 4, p. 459–465, 2006.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 951–962, 2017.

GEOGHEGAN, I.; STEINBERG, G.; GURR, S. The Role of the Fungal Cell Wall in the Infection of Plants. **Trends in Microbiology**, p. 1–11, 2017.

GERALDELLI, D. et al. Tumor development in rats and cancer cachexia are reduced by treatment with botryosphaeran by increasing apoptosis and improving the metabolic profile. **Life Sciences**, v. 252, p. 117608, 2020.

GIESE, E. C. et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 125–130, 2015.

GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Posttranslational modification of proteins. **Comprehensive Natural Products III**, p. 528–559, 2020.

GU, S. et al. Thermosensitive nanocomposite hydrogel composed of PVPylated poly(D,L-alanine) and laponite as an injectable and bioactive biomaterial. **Chemical Engineering Journal**, v. 466, p. 143128, 2023.

GUO, H. et al. Oat β -glucan ameliorates diabetes in high fat diet and streptozotocin-induced mice by regulating metabolites. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 113, p. 109251, 2023.

GUO, J.; YE, X. S. Protecting groups in carbohydrate chemistry: Influence on stereoselectivity of glycosylations. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7235–7265, 2010.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Archives of Virology**, v. 158, n. 7, p. 1445–1459, 2013.

HALSTEAD, S. B.; DANS, L. F. Review Dengue infection and advances in dengue vaccines for children. **The Lancet child and Adolescent Health**, v. 4642, n. 19, 2019.

HAN, W. et al. Preparation and structural characterization of regioselective 4-O/6-O-desulfated chondroitin sulfate. **Carbohydrate Research**, v. 460, p. 8–13, 2018.

HAN, X. et al. Research progress on natural β -glucan in intestinal diseases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 219, p. 1244–1260, 2022.

HANTZ, S.; ALAIN, S. Infecciones por el virus del herpes simple. **EMC - Pediatría**, v. 53, n. 2, p. 1–13, 2018.

HIDARI, K. I. P. J. et al. 3-O-sulfated glucuronide derivative as a potential anti-dengue virus agent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 424, n. 3, p. 573–578, 2012.

HIERHOLZER, J. C.; KILLINGTON, R. A. Virus isolation and quantitation. **Virology Methods Manual**, p. 25–46, 1996.

HUO, X. et al. Astragalus polysaccharide or β -glucan combined with inactivated vaccine markedly prevent CyHV-2 infection in *Carassius auratus gibelio*: APS and β -glucan improve immune effect of inactivated vaccine. **Aquaculture and Fisheries**, 2023.

HUSSAIN, P. R.; RATHER, S. A.; SURADKAR, P. P. Structural characterization and evaluation of antioxidant, anticancer and hypoglycemic activity of radiation degraded oat (*Avena sativa*) β -glucan. **Radiation Physics and Chemistry**, p. 0–1, 2017.

IOANNOU, E.; LABROU, N. E. Development of Enzyme-Based Cosmeceuticals: Studies on the Proteolytic Activity of *Arthrospira platensis* and Its Efficient Incorporation in a Hydrogel Formulation. **Cosmetics**, v. 9, n. 5, 2022.

JABBARI-FAROUJI, S. et al. Multiple nonergodic disordered states in Laponite suspensions: A phase diagram. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 78, n. 6, p. 1–10, 2008.

JAYAMANO HAR, J. et al. Characterization of α -D-glucan produced by a probiont *Enterococcus hirae* KX577639 from feces of south Indian Irula tribals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1667–1675, 2018.

JI, Y.-B. et al. Optimization of Synthesis of Seleno- *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. Polysaccharide by Response Surface Methodology, Its Characterization, and Antioxidant Activity. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

JING, Q.; WANG, M. Dengue epidemiology. **Journal of Global Health**, v. 3, n. 2, p. 37–45, 2019.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, n. 2015, p. 588–598, 2015a.

KAGIMURA, F. Y. et al. Carboxymethylation of (1,6)- β -glucan (Iasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015b.

KAZACHENKO, A. et al. Sulfation of Diethylaminoethyl-Cellulose: QTAIM Topological Analysis and Experimental and DFT Studies of the Properties. **ACS Omega**, v. 6, n. 35, p. 22603–22615, 2021.

KIM, S. B. et al. Fractionation of sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* separates its anticoagulant and anti-SARS-CoV-2 properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 5, p. 1–17, 2022.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of β -carrageenan by ^1H NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 9, p. 1619–1629, 2004.

KRICHEN, F. et al. Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, n. 2015, p. 283–289, 2015.

KRISHNAN, R.; JANG, Y. S.; OH, M. J. Beta glucan induced immune priming protects against nervous necrosis virus infection in sevenband grouper. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 121, p. 163–171, 2022.

LEI, S.; EDMUND, T. F. Polysaccharides, microbial. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 660–678, 2019.

LI, S. et al. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 237–250, 2016.

LI, S.; DAI, S.; SHAH, N. P. Sulfonation and Antioxidative Evaluation of Polysaccharides from Pleurotus Mushroom and Streptococcus thermophilus Bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 282–294, 2017.

LI, S.; SHAH, N. P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from Pleurotus eryngii and Streptococcus thermophilus ASCC 1275. **Food Chemistry**, v. 165, p. 262–270, 2014.

LI, W. et al. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 11, n. 9, p. 857–862, 2004.

LI, Y. et al. Minimally invasive bone augmentation through subperiosteal injectable hydroxylapatite/laponite/alginate nanocomposite hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 231, p. 123232, 2023a.

LI, Z. et al. Interactions between structure and function of resistant glucans for alleviating type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its complications in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 231, 2023b.

LIANG, L. et al. Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (Cucurbita pepo, Lady Godiva) polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 447–455, 2018.

LIAO, Y. et al. A β -glucan from Aureobasidium pullulans enhanced the antitumor effect with rituximab against SU-DHL-8. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 1356–1367, 2022.

LIU, Y. et al. Anti-angiogenic activity and mechanism of a chemically sulfated natural glucan from Phellinus ribis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2475–2483, 2017.

LOPES, L. et al. Sulfonated and Carboxymethylated β -Glucan Derivatives with Inhibitory Activity against Herpes and Dengue Viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 11013, 2021.

LOPES, N. et al. Green seaweed *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta, Ulvaceae) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 605–612, 2017.

LORON, A. et al. Chitosan for eco-friendly control of mycotoxinogenic *Fusarium graminearum*. **Food Hydrocolloids**, v. 134, 2023.

LU, Y. et al. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 180–186, 2008.

LUPPE, M. J. et al. Yellow fever (YF) vaccination does not increase dengue severity : A retrospective study based on 11,448 dengue notifications in a YF and dengue endemic region. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 0–1, 2019.

MA, L. et al. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 371–378, 2012.

MA, X. et al. Effects of ultrasound-assisted H₂O₂ on the solubilization and antioxidant activity of yeast β -glucan. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 90, 2022.

MAGALHÃES, L. S. S. M. et al. Nanocomposite Hydrogel Produced from PEGDA and Laponite for Bone Regeneration. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 13, n. 2, 2022.

MALINI, M. et al. Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1→3)(1→6)- β -D-glucan in human lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 214–221, 2015.

MATTOS, G. J. et al. Laccase stabilized on β -D-glucan films on the surface of carbon black/gold nanoparticles: A new platform for electrochemical biosensing. **Bioelectrochemistry**, v. 129, p. 116–123, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias**. [s.l.: s.n.].

MIRANDA-NANTES, C. C. B. O. et al. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in diabetes-induced and

hyperlipidemia conditions in rats. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 187–193, 2011.

MODHIRAN, N. et al. Dual targeting of dengue virus virions and NS1 protein with the heparan sulfate mimic PG545. **Antiviral Research**, v. 168, p. 121–127, 2019.

MOHAN, K. et al. Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 287, p. 119349, 2022.

MONTENEGRO, L. et al. Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E. **Cosmetics**, v. 2, n. 1, p. 35–47, 2015.

MORENO-MENDIETA, S. et al. Potential of glucans as vaccine adjuvants : A review of the alpha-glucans case. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 103–114, 2017.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 6, n. 80, p. 76600–76613, 1983.

MUKHERJEE, S. et al. Synthesis, molecular features and biological activities of modified plant polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 289, p. 119299, 2022.

MURRY, J. P. et al. Sulfonation pathway inhibitors block reactivation of latent HIV-1. **Virology**, v. 471, p. 1–12, 2014.

MUSCHIN, T. et al. Chemically sulfated natural galactomannans with specific antiviral and anticoagulant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 415–420, 2016.

NYAGUTHII, K. C.; OMWAMBA, M.; NDUKO, J. M. Gum arabic and soy protein concentrate as binding agents on quality and nutritional properties of mushroom-based sausage analogues. **Food and Humanity**, v. 1, p. 1627–1636, 2023.

O'DONNELL, C. D. et al. Expanding the role of 3-O sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. **Virology**, v. 397, n. 2, p. 389–398, 2010.

ORTEGA, M. J. E. Herpes virus. **Obstetrics and Gynecology**, v. 53, n. 4, p. 536, 2019.

PEASURA, N. et al. Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 912–919, 2015.

PERVEEN, S. et al. β -1,3-Glucan from *Euglena gracilis* as an immunostimulant mediates the antiparasitic effect against *Mesanothryx* sp. on hemocytes in marine swimming crab (*Portunus trituberculatus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 114, p. 28–35, 2021.

PRASAD, N. et al. Industrial Crops & Products Gum arabic – A versatile natural gum : A review on production , processing , properties and applications. **Industrial Crops & Products**, v. 187, p. 115304, 2022.

PRZEKORA, A. et al. Osteoclast-mediated acidic hydrolysis of thermally gelled curdlan component of the bone scaffolds : Is it possible ? **Carbohydrate Polymers**, v. 295, p. 119914, 2022.

QIN, T. et al. Selenylation modification can enhance immune-enhancing activity of *Chuanminshen violaceum* polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, n. 1, p. 302–311, 2013.

QUEIROZ, E. A. I. F. et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 67, n. 1, p. 14–24, 2015.

QUEIROZ, I. N. et al. Impact of sulfation pattern on the conformation and dynamics of sulfated fucan oligosaccharides as revealed by NMR and MD. **Glycobiology**, v. 25, n. 5, p. 535–547, 2014.

REED, L. J.; MUENCH, H. Journal of hygiene. **THE AMERICAN JOURNAL OF HYGIENE**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

REIS, M. E. et al. Effect of supplementation with algae β -glucans on performance, health, and blood metabolites of Holstein dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 10, p. 7998–8007, 2022.

RIZZI, J. et al. Chemical structure and biological activity of the (1 → 3)-linked β -D-glucan isolated from marine diatom *Conticribra weissflogii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 224, p. 584–593, 2023.

RODRIGUES-SOUZA, I. et al. Protective potential of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds against alkylating- and oxidizing-induced genotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 211, p. 524–534, 2022.

SACCHELLI, B. A. L. et al. Botryosphaeran and sulfonated derivatives as novel antiviral agents for herpes simplex and dengue fever. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 334–339, 2019.

SAHRANESHIN-SAMANI, F. et al. Regioselective sulfated chitosan produces a biocompatible and antibacterial wound dressing with low inflammatory response. **Biomaterials Advances**, v. 139, p. 213020, 2022.

SARTESHNIZI, R. A. et al. LWT - Food Science and Technology Optimization of prebiotic sausage formulation : Effect of using β -glucan and resistant starch by D-optimal mixture design approach. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–7, 2014.

SCREMIN, J. et al. Application of botryosphaeran as a carbon black adherent on a glassy carbon electrode for the electrochemical determination of cyclobenzaprine. **Electrochimica Acta**, v. 379, p. 138176, 2021.

SHAHIN, A.; JOSHI, Y. M. Irreversible aging dynamics and generic phase behavior of aqueous suspensions of laponite. **Langmuir**, v. 26, n. 6, p. 4219–4225, 2010.

SHAO, Q. et al. Laponite stabilized endogenous antibacterial hydrogel as wet-tissue adhesive. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 145, p. 106009, 2023.

SHI, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 37–48, 2016.

SILVA-SENA, G. G. et al. In vivo antimutagenic and antiatherogenic effects of the

(1 → 3)(1 → 6)-β-D- glucan botryosphaeran. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 826, p. 6–14, 2018.

SILVA, A. Z. et al. Botryosphaeran reduces obesity, hepatic steatosis, dyslipidaemia, insulin resistance and glucose intolerance in diet-induced obese rats. **Life Sciences**, v. 211, p. 147–156, 2018.

SONG, Y. et al. Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (*Cucurbita pepo*, lady godiva). **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 686–691, 2013.

SOUSA, F. T. G. DE et al. Sulfated β-glucan from *Agaricus subrufescens* inhibits flavivirus infection and nonstructural protein 1-mediated pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 203, 2022.

SOUZA, D. M. DE; GARCIA-CRUZ, C. H. Fermentative production of exocellular polysaccharides by bacteria. v. 25, p. 331–340, 2004.

SUN, K. et al. An exopolysaccharide isolated from a coral-associated fungus and its sulfated derivative activates macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 387–394, 2016.

SUN, Z. et al. Sulfation of (1,3)-B-d-glucan from the fruiting bodies of *Russula virescens* and antitumor activities of the modifiers. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 628–633, 2009.

SUTERIO, N. et al. Laponite® gel formulation containing simvastatin for melanoma treatment. **Applied Clay Science**, v. 228, 2022.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. International Journal of Infectious Diseases Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 84, p. S80–S86, 2019.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, n. 1–2, p. 61–71, 1991.

THEIS, T. V. et al. Exocellular (1→6)-β-D-glucan (lasiodiplodan): Carboxymethylation,

thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activity. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 19–33, 2017.

TOMÁS, H.; ALVES, C. S.; RODRIGUES, J. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 7, p. 2407–2420, 2018.

TONG, X. K. et al. WSS45, a sulfated α -D-glucan, strongly interferes with Dengue 2 virus infection in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 5, p. 585–592, 2010.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1→6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908–1914, 2013.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular B-(1→6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908–1914, 2013.

VOGEL, H. . A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42–47, 1956.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 276–284, 2008.

VOLOCHTCHUK, O. M. et al. Variações do pH dos sabonetes e indicações para sua utilização na pele normal e na pele doente. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 75, n. 6, p. 697–703, 2000.

WAN-MOHTAR, W. A. A. Q. I. et al. Antimicrobial Properties and Cytotoxicity of Sulfated (1,3)- β -D-Glucan from the Mycelium of the Mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 999–1010, 2016.

WANG, J. et al. Regioselective sulfation of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharide: Characterization of chemical structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 320–327, 2015a.

WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate**

Research, v. 344, n. 1, p. 105–112, 2009.

WANG, Y. et al. Purification, structure identification and immune activity of a neutral polysaccharide from *Cynanchum Auriculatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 237, n. 130, p. 124142, 2023.

WANG, Y. J. et al. A novel process for preparation of (1,3)-B-D-glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 1, p. 93–99, 2005.

WANG, Z. et al. Sulfated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* reduce H₂O₂-induced oxidative stress in RAW264.7 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, n. 2015, p. 410–417, 2015b.

WANG, Z. J. et al. Carboxymethylation of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* and their characterization and antioxidant properties evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, n. 2016, p. 988–994, 2016.

WOUK, J. et al. Sulfonated (1 → 6)-β- D -Glucan (Lasiodiplodan): A Promising Candidate against the Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Strain. **Biomacromolecules**, v. 1, 2022.

XIAO, R.; GRINSTAFF, M. W. Chemical Synthesis of Polysaccharides and Polysaccharide Mimetics. **Progress in Polymer Science**, p. 1–132, 2017.

XIAO, S. et al. Fine tuning of the pH-sensitivity of laponite-doxorubicin nanohybrids by polyelectrolyte multilayer coating. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 348–356, 2016.

XIE, W. et al. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 1, p. 35–40, 2002.

XIN, Y. et al. Immune-enhancing effect of water-soluble beta-glucan derived from enzymatic hydrolysis of yeast glucan. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 30, p. 101256, 2022.

XU, J. et al. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n.

2, p. 227–234, 2009.

XU, L. et al. Rheological behaviors of microbial polysaccharides with different substituents in aqueous solutions: Effects of concentration, temperature, inorganic salt and surfactant. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 162–171, 2019.

XU, P.; ERDEM, T.; EISER, E. A Facile Approach to Prepare Self-Assembled, Nacre-Inspired Clay/Polymer Nano-Composites. **Soft Matter**, v. 16, p. 1–24, 2018.

YE, M. et al. Phosphorylation and anti-tumor activity of exopolysaccharide from *Lachnum YM120*. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 690–694, 2013.

YUAN, C. et al. Extraction and prebiotic potential of β -glucan from highland barley and its application in probiotic microcapsules. **Food Hydrocolloids**, v. 139, 2023.

YUAN, L. et al. Biomacromolecular affinity: Interactions between lysozyme and regioselectively sulfated chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 346–350, 2009.

ZANG, Y. et al. Effects of highland barley β -glucan on blood glucose and gut microbiota in streptozotocin-induced, diabetic, C57BL/6 mice on a high-fat diet. **Nutrition**, v. 107, p. 111882, 2023.

ZHANG, B. et al. Structural characterization of a water-soluble and antimicrobial β -glucan secreted by *Rhizobium pusense*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 134, n. 4, p. 318–325, 2022a.

ZHANG, J. et al. Physicochemical characteristics and bioactivities of the exopolysaccharide and its sulphated polymer from *Streptococcus thermophilus* GST-6. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 368–375, 2016.

ZHANG, M. et al. Chain conformation of sulfated derivatives of β -glucan from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 24, p. 2863–2870, 2003.

ZHANG, T. et al. Comprehensive review in moisture retention mechanism of polysaccharides from algae, plants, bacteria and fungus. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, p. 104163, 2022b.

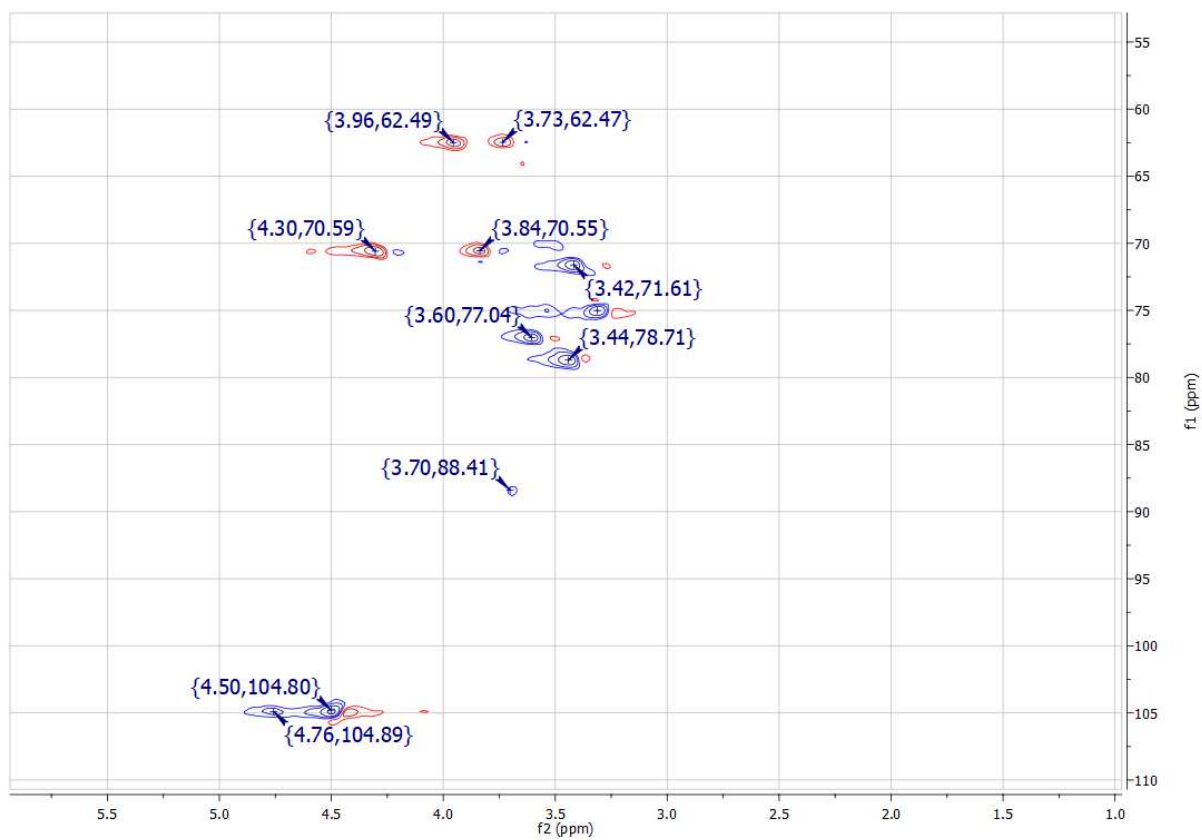
ZHANG, Y. et al. Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1084–1090, 2011.

ZHANG, Z. et al. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1124–1129, 2010.

ZHANG, Z. et al. Regioselective sulfation of β -glucan from *Ganoderma lucidum* and structure-anticoagulant activity relationship of sulfated derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 470–478, 2020.

ZHU, W. et al. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against Herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9–10, p. 695–701, 2006.

ANEXOS

ANEXO A - ESPECTRO DE HSQC (^1H - ^{13}C) DE BOTRIOSFERANA NATIVA (BOT).

ANEXO B – PATENTE: BR 10 2024 004565 3



870240019612
07/03/2024 15:47

29409162315219651

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 004565 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS
UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Depositante 2 de 2**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 46068425000133**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Cidade Universitária Zeferino Vaz, Distrito de Barão Geraldo**Cidade:** Campinas**Estado:** SP**CEP:** 13083-592**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:** invencoes@inova.unicamp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS

Resumo: A presente invenção apresenta o desenvolvimento de dois hidrogéis com atividade anti-herpética, contendo botriosferana, uma (1 α 3)(1 α 6)- β -D-glucana, a qual foi quimicamente modificada por sulfatação. A sulfatação foi realizada utilizando o complexo trióxido de enxofre-piridina como agente sulfatante. Após a caracterização e avaliação da atividade antiviral in vitro (IC₅₀=2,52 μ g mL⁻¹, SI=79) da botriosferana sulfatada, tal molécula foi incorporada aos hidrogéis. Os hidrogéis, produzidos à base de nanoargila sintética de laponita (HLAP) e copolímero de acrilato de sódio e lecitina (HLEC), foram formulados de maneira apropriada e integrados com o composto sintetizado. Posteriormente, foram submetidos a uma caracterização biológica, incluindo testes de citotoxicidade e atividade antiviral in vitro e in vivo frente ao herpes vírus simples tipo 1 (HSV-1). Os resultados evidenciaram a ausência de citotoxicidade dos hidrogéis, indicando serem adequados para uso, além de revelarem um potencial no combate e controle do HSV-1, no qual o HLAP apresentou cerca de 69% de viabilidade celular nos testes in vitro, e o HLEC com uma menor atividade (aproximadamente 15%). Já nos testes in vivo ambos os hidrogéis demonstraram controlar a replicação viral até o final do experimento. Dessa forma, ambas as formulações desenvolvidas apresentam aplicações promissoras nos setores farmacêutico e medicinal, sendo especialmente destinados ao consumidor final para o uso tópico no tratamento de lesões cutâneas causadas pelo HSV-1.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7**Nome:** ALEXANDRE ORSATO**CPF:** 03691994997**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Eurico Hummig 255**Cidade:** Londrina**Estado:** PR**CEP:** 86050-464**País:** BRASIL**Telefone:** (43) 337 15812**Fax:****Email:** aintecsec@uel.br**Inventor 2 de 7****Nome:** GABRIELLE CRISTINA CALEGARI**CPF:** 09265594942**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação**Endereço:** Rua Espírito Santo, 1276**Cidade:** Londrina**Estado:** PR**CEP:** 86020-420**País:** BRASIL**Telefone:** (43) 337 15812**Fax:****Email:** aintecsec@uel.br**Inventor 3 de 7**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Nome: LIGIA CARLA FACCIN GALHARDI

CPF: 00794613950

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Rosani Muniz Silva, nº 120

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86047-580

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 4 de 7

Nome: CÁTIA CRISTINA CAPÊLO ORNELAS MEGIATTO

CPF: 23598340885

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Hermantino, 691

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13087-500

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 5 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Nome: AUDREY ALESANDRA STINGHEN GARCIA LONNI

CPF: 58577050963

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA ERNANI LACERDA DE ATHAYDE 115 - AP 0102

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-630

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 6 de 7

Nome: BRIANI GISELE BIGOTTO

CPF: 42503210880

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Joaquim Lacerda, 60, apartamento 502, Bela Vista

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86015-260

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Nome: CAROLYNE BRUSTOLIN BRAGA

CPF: 06225282971

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Hermantino Coelho, 841

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13087-500

Pais: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecsec@uel.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Resumo	1969_RESUMO_FINAL.pdf
Relatório Descritivo	1969_RELATÓRIO_FINAL.pdf
Reivindicação	1969_REIVINDICAÇÃO_FINAL.pdf
Documento de Cessão	Alexandre - Declaração inventores (1).pdf
Documento de Cessão	Audrey - Declaração inventores.docx.pdf
Documento de Cessão	Briani_- Declaração inventores.docx- 1assinado.pdf
Documento de Cessão	Carolyne - Declaração inventores_assinado.pdf
Documento de Cessão	Gabrielle - Declaração inventores.docx (1).pdf
Documento de Cessão	Lígia Carla Faccin Galhardi- Declaração inventores.docx (1).pdf
Documento de Cessão	Catia.pdf
Procuração	1969_Procuração UEL e UNICAMP_22_02_24_3663615.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em
07/03/2024 às 15:47, Petição 870240019612

1/1

RESUMO**HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS**

A presente invenção apresenta o desenvolvimento de dois hidrogéis com atividade anti-herpética, contendo botriosferana, uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana, a qual foi quimicamente modificada por sulfatação. A sulfatação foi realizada utilizando o complexo trióxido de enxofre-piridina como agente sulfatante. Após a caracterização e avaliação da atividade antiviral in vitro (IC₅₀=2,52 µg mL⁻¹, SI=79) da botriosferana sulfatada, tal molécula foi incorporada aos hidrogéis. Os hidrogéis, produzidos à base de nanoargila sintética de laponita (HLAP) e copolímero de acrilato de sódio e lecitina (HLEC), foram formulados de maneira apropriada e integrados com o composto sintetizado. Posteriormente, foram submetidos a uma caracterização biológica, incluindo testes de citotoxicidade e atividade antiviral in vitro e in vivo frente ao herpes vírus simples tipo 1 (HSV-1). Os resultados evidenciaram a ausência de citotoxicidade dos hidrogéis, indicando serem adequados para uso, além de revelarem um potencial no combate e controle do HSV-1, no qual o HLAP apresentou cerca de 69% de viabilidade celular nos testes in vitro, e o HLEC com uma menor atividade (aproximadamente 15%). Já nos testes in vivo ambos os hidrogéis demonstraram controlar a replicação viral até o final do experimento. Dessa forma, ambas as formulações desenvolvidas apresentam aplicações promissoras nos setores farmacêutico e medicinal, sendo especialmente destinados ao consumidor final para o uso tópico no tratamento de lesões cutâneas causadas pelo HSV-1.

RELATÓRIO DESCRITIVO

HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS

CAMPO DE INVENÇÃO

[001] A infecção por herpes vírus é uma condição sem cura, caracterizada pela sua capacidade de estabelecer latência em gânglios nervosos, resultando em recorrentes episódios ao longo da vida do paciente.

[002] Embora seja uma enfermidade controlável por antivirais específicos, atualmente existem apenas três medicamentos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration, EUA) para esse fim: aciclovir e seus análogos, valaciclovir e fanciclovir, os quais atuam inibindo a replicação do DNA viral.

[003] Contudo, o uso prolongado desses medicamentos pode levar à diminuição da eficácia e ao surgimento de cepas resistentes.

[004] Nesse contexto, a síntese de novas moléculas destinadas a combater a infecção pelo herpes vírus e o desenvolvimento de novos produtos representam uma necessidade crucial nos dias atuais.

[005] Assim, os hidrogéis desenvolvidos com a incorporação de botriosferana sulfatada surgem como alternativas de moléculas, produtos e opções terapêuticas para enfrentar infecções cutâneas por herpes. Além disso, esses produtos exibem baixa citotoxicidade e aplicabilidade agradável, oferecendo abordagens terapêuticas mais eficazes e bem toleradas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[006] O tratamento para infecção por herpes vírus envolve o uso de antivirais específicos, sendo o aciclovir o medicamento de primeira escolha, juntamente com seus análogos, valaciclovir e fanciclovir, que atuam inibindo a replicação do DNA viral (ORTEGA, 2019).

2/12

[007] Pesquisas envolvendo o desenvolvimento de vacinas contra o herpes estão em andamento e têm apresentado resultados promissores, mas ainda não se encontram disponíveis comercialmente.

[008] É relevante destacar, entretanto, que o aciclovir começou a ser produzido na década de 70. O uso prolongado desse fármaco, quando realizado de maneira indiscriminada, contribui para o aumento da proliferação do vírus e o surgimento de cepas resistentes. Essa prática, decorrente de um uso não criterioso, resultou em eficácia limitada em alguns casos, levando à necessidade de múltiplas aplicações.

[009] Ademais, foram encontradas anterioridades, pertinentes de explicações, que serão demonstradas neste documento a fim de conhecimento e exposição dos diferenciais inventos da invenção pleiteada.

[010] Compositions and methods for the treatment of skin diseases and disorders using antimicrobial peptide sequestering compounds (CA2790682C): A invenção consiste em uma composição tópica que compreende um sal de zinco, cafeína, glicerina e um ou mais compostos sequestrantes de peptídeos antimicrobianos para o tratamento de rosácea, psoríase, acne, dermatite atópica ou dermatite seborreica em um paciente. Esses sequestrantes de peptídeos antimicrobianos são (poli)ssacarídeos (poli)sulfatados aniônicos que sequestram ou se ligam ao peptídeo antimicrobiano por interações eletrostáticas.

[011] Gel de botriosferana combinada com aciclovir para uso genital com ação anti-herpética (hsv-2) (BR102021012874A2): A invenção consiste em uma formulação tópica de uso genital, na forma de gel com atividade antiviral para o auxílio no controle de infecções genitais pelo vírus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2). A formulação contém o exopolissacarídeo botriosferana em combinação com aciclovir comercial.

[012] Creme de botriosferana com ação anti-herpética (BR 10 2019 017356 4 A2): A invenção consiste em formulação tópica, na forma de emulsão cremosa não iônica do tipo O/A, contendo a botriosferana nativa, com atividade antiviral para o auxílio no controle de infecções pelo vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) com cepa sensível e resistente ao aciclovir, droga de referência.

3/12

[013] Composition for treating or preventing Herpes virus infection (KR101779375B1): A invenção consiste em uma composição para prevenir ou tratar um vírus do herpes, compreendendo 1,3-glucano sulfatado, que é preparado sulfatando polissacarídeos lineares preparados a partir de um *Agrobacterium* sp, tal composto contém β -1,3-glucano sulfatado, sulfato de lamarina, curdlana-S, sulfato de curdlana, aciclovir, β -D-arabinofuranosídeo, sulfato de dextrano e polissulfato de pentosano.

[014] Producing glucan that stimulates secretion of tumor necrosis factor alpha, useful e.g. for treating tumors and viral infections, comprises culturing *Rhodococcus fascians* in presence of sugar (DE10227155A1): A invenção consiste em um método para produzir um glucano que estimula a secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNFa) compreende a cultura de fâscias de *Rhodococcus* DSM 12916 em meio padrão contendo açúcar ou álcool de açúcar, e diversas atividades biológicas, dentre elas virucida, e anti-inflamatório.

[015] Derivatives of amyris alcohols and eudesmol for treating cold sores and herpes (WO2008131260A1): A invenção consiste em formulações tópicas compreendendo um álcool Amyris e/ou derivados de éster de álcool Amyris que podem ser usadas para o tratamento de doenças, incluindo infecção por vírus herpes (por exemplo, HSV-I, HSV-2), carcinoma epidermóide, herpes labial e papilomavírus humano.

[016] Compositions comprising hyaluronic acid and beta-glucan for topical applications in oral cavity (EP3056195A1): A invenção consiste em composições compreendendo ácido hialurônico, beta-glucano e opcionalmente pululano, com aplicações cosméticas para uso em higiene bucal. Além disso, a invenção refere-se às composições como composições farmacêuticas para utilização na aplicação tópica no tratamento ou profilaxia de afecções inflamatórias, irritações, hipersensibilidades ou infecções virais da cavidade oral.

[017] Novel medicaments for anti-herpes virus treatments (US2009176733A1): A invenção consiste na utilização de um polissacarídeo sulfatado, laminarina PS3 sulfatada, ou fosfatada, para a preparação de um medicamento para o tratamento de

4/12

doenças mediadas pelo vírus do herpes, mais particularmente mediadas pelos vírus alfa-herpes, e em particular pelo HSV-1 e HSV-2, bem como por cepas desses vírus que são resistentes a agentes antivirais conhecidos.

[018] Compositions comprising sulfated polysaccharides and uses thereof (EP3204016A1): A invenção consiste em uma composição para aplicação intravaginal e/ou na mucosa interna, compreendendo uma quantidade eficaz de um polissacarídeo sulfatado, um polímero quaternário natural, um composto molecular quaternário, um inibidor de metaloproteinase, um ou mais agentes anti-inflamatórios, um sistema tampão de controle de pH ácido ou qualquer combinação destes, e um veículo farmacologicamente aceitável.

[019] Composiciones mucoadhesivas líquidas orales (PE20000861- A1): A invenção consiste em uma composição farmacêutica líquida mucoadesiva peroral, oral ou intranasal, composta por partículas coloidais de argila, incluindo Laponita®. Tal formulação pode ser útil para prevenir ou tratar sintomas de infecções do trato respiratório superior ou irritação ou danos ao tecido do trato respiratório.

[020] Composição cosmética reparadora (BR102021019891 - A2): A invenção consiste em uma composição cosmética reparadora para uso diário ou após os procedimentos estéticos que compreende um complexo regenerador e um veículo farmacologicamente aceitável, sendo que o complexo regenerador é composto por oligossacarídeo alfa-glucan; niacinamida; alfa-bisabolol; dexpanthenol; ácido hialurônico de baixo e alto peso molecular e vitamina E.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[021] A presente invenção baseia-se no uso de botriosferana sulfatada para o desenvolvimento de dois hidrogéis anti-herpéticos, um deles à base de nanoargila sintética de laponita, uma nanoestrutura, e o outro à base de copolímero de acrilato de sódio e lecitina (um copolímero de acrilato de sódio e lecitina), um gel-creme. O uso dessas formulações produzidas agrega propriedades antivirais, não sendo tóxicos, sem oferecer risco à saúde, além de ser um produto

5/12

biodegradável sustentável. Assim, a invenção apresenta grande potencial de inovação pela associação de várias áreas do conhecimento para aplicações em indústrias farmacêuticas e médicas.

[022] A formulação desenvolvida tem como objetivo combater principalmente o vírus herpes simplex na cavidade oral, sendo destinada às indústrias farmacêuticas e médicas. Os anti-herpéticos de primeira escolha, como o aciclovir, ao serem usados de maneira indiscriminada, podem levar ao desenvolvimento de resistência da cepa que afeta o paciente. Nesse cenário, a síntese e o desenvolvimento de novas moléculas e produtos eficazes para o tratamento de herpes vírus continuam a ser uma ferramenta promissora, capaz de introduzir mudanças essenciais no desenvolvimento de estratégias a antivirais inovadores.

[023] O ineditismo de hidrogéis incorporando botriosferana sulfatada em sua composição torna essa invenção valiosa ao processo de pesquisa e inovação em medicamentos anti-herpéticos. Sua obtenção se inicia pela síntese orgânica, utilizando o processo de sulfatação de polissacarídeos, e no desenvolvimento dos hidrogéis de interesse. A inclusão de botriosferana sulfatada representa uma inovação significativa para a indústria farmacêutica e médica, contribuindo para a criação de moléculas e produtos capazes de combater lesões cutâneas causadas pelo herpes vírus.

[024] A sulfatação é uma reação que envolve a substituição nucleofílica nos grupos hidroxilas presentes nas unidades monoméricas, resultando na introdução de grupamentos sulfônicos ($-SO_3H$). Essas modificações químicas têm se destacado por conferir atividades antivirais e anticoagulantes às moléculas. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a botriosferana aleatoriamente sulfatada é ativa contra vírus envelopados, atuando por meio do bloqueio da infecção viral.

[025] Outras modificações, como a carboximetilação seguida de sulfatação (LOPES et al., 2021), resultaram em um IC_{50} de $12,4 \mu g mL^{-1}$ (HSV-1) com um DS de 0,1. Além disso, as terapias atuais de referência no mercado, como o uso do medicamento aciclovir, agem pela inibição da DNA polimerase viral, uma enzima

6/12

necessária para a replicação do DNA do vírus (ORTEGA, 2019).

[026] O aciclovir é convertido em sua forma ativa, apenas dentro das células infectadas. Já os antivirais sulfatados, como os polissacarídeos sulfatados aqui relatados, atuam na inibição da adsorção ou entrada do vírus nas células hospedeiras, onde os grupos sulfato interagem através de ligações eletrostáticas com os sítios de ligação da glicoproteína C, na superfície do vírus, que fornece cargas positivas (O'DONNELL et al., 2010).

[027] Dessa forma, a inibição da infecção ocorre antes do vírus entrar na célula hospedeira, vantagem em relação aos métodos convencionais já estabelecidos. Uma vez que o mecanismo de inibição viral é distinto daquele dos medicamentos de referência, esta invenção pode inclusive ser utilizada como uma alternativa aos pacientes acometidos por vírus resistentes a estes medicamentos.

[028] Destaca-se que não há registros do uso de nanoargila sintética de laponita e copolímero de acrilato de sódio e lecitina como agentes formadores de hidrogéis em produtos antivirais incorporados com botriosferana sulfatada. Portanto, essa inovação apresenta novos produtos capazes de superar limitações existentes e deficiências nesse setor da indústria e do mercado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[029] A invenção foi desenvolvida em 03 etapas, sendo:

[030] Etapa 1: Modificação química por sulfatação da botriosferana; Etapa 2: Desenvolvimento das formulações dos hidrogéis e avaliação da sua estabilidade preliminar; Etapa 3: Avaliação biológica das moléculas e dos hidrogéis.

[031] **Etapa 1:** Inicialmente, 100 mg de botriosferana nativa (BARBOSA et al., 2003) foi solubilizada em 50 mL de dimetilformamida anidra (DMF) sob atmosfera inerte (nitrogênio) por 48 horas.

[032] Foram adicionados 0,78 – 4,71 g de complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-Py) (8-48 equivalentes/unidade de glucose) e 0,22 mL trietilamina (Et₃N), que foram agitados a temperatura ambiente durante 7 horas.

7/12

[033] Após este tempo, a mistura foi neutralizada com a adição de bicarbonato de sódio saturado, seguida pela adição de 33 mL de solução de tampão fosfato 0,025 mol L⁻¹ (Na₂HPO₄, pH 7,0).

[034] A mistura foi dialisada contra solução de NaCl 1 mol L⁻¹ (24h) e água destilada (96 h) e então liofilizada (ARAÚJO et al., 2013).

[035] As amostras foram armazenadas em dessecador para as caracterizações estruturais e físico-químicas de infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear bidimensional e análise térmica.

[036] Tais caracterizações levaram à interpretação que o produto final consistia em uma botriosferana sulfatada, com inserção dos grupamentos sulfato nas unidades de glucose do polissacarídeo, resultando ainda em um aumento na estabilidade térmica da molécula quando comparada com a botriosferana nativa.

[037] **Etapa 2:** Foram desenvolvidas duas formulações de hidrogéis contendo a botriosferana sulfatada. A primeira é uma formulação à base de nanoargila sintética de laponita:

[038] Tabela 1: Formulação à base de nanoargila sintética de laponita

Formulação	Função	Concentração (%; p/v)
Laponita®	Formador do gel	5,00%
Poliacrilato de sódio	Formador do gel	0,05%
Água ultrapura	Veículo	q.s.p 100,00
PBS (10x) (tampão fosfato de sódio)	Tampão	10,00%
Botriosferana sulfatada	Ativo	0,10-5,00%
Metilsotiasolinona e fenoxietanol	Conservante	0,50%

[039] Tabela 2: Formulação do segundo hidrogel, à base de copolímero de acrilato de sódio e lecitina:

Formulação	Função	Concentração (%; p/v)
Água destilada	Veículo	q.s.p 100,00
LECIGEL® (Copolímero de acrilato de sódio e lecitina)	Formador do gel creme	2,00%
Glicerina	Umectante	1,00%
Ciclometicone	Emoliente	1,00%
Botriosferana sulfatada	Ativo	0,10-5,00%

8/12

Metilsotiasolinona	e Conservante	0,50%
fenoxietanol		

[040] A estabilidade preliminar das formulações foi avaliada em um período de 15 dias, onde aproximadamente 10 g de cada amostra foram submetidos a condições de estresse para acelerar o aparecimento de possíveis sinais de instabilidade na formulação. As amostras, acondicionadas em frascos brancos opacos, foram submetidas a ciclos de 24 horas de aquecimento em estufa a 45 °C e resfriamento a 4°C (ANVISA, 2004).

[041] As formulações foram avaliadas segundo as características organolépticas de aparência (límpida), cor (transparente no caso da nanoargila sintética de laponita, e esbranquiçada no caso do copolímero de acrilato de sódio e lecitina) e odor (sem odor de contaminação microbiológica), sendo classificadas como: nenhuma mudança, ligeiramente modificado, modificado ou fortemente modificado, tanto no início quanto ao final do tempo de experimento.

[042] Além disso, propriedades como densidade (próximo a 1,00), espalhabilidade (neste caso acima de 300 mm²), pH (6,00-7,00) e teste de centrifugação (sem separação de fases) também foram realizados.

[043] Através de tais caracterizações, foi possível verificar que ambos os hidrogéis apresentaram-se estáveis (nenhuma mudança - N) quando submetidos às condições de estresse térmico durante os 15 dias, não sendo identificados sinais de instabilidade em relação às propriedades organolépticas como a aparência, cor, odor e homogeneidade.

[044] Não houve separação de fases com o teste de centrifugação, apresentaram densidade muito próxima à da água, visto que é o componente majoritário em ambas as formulações. A espalhabilidade e pH mostraram-se satisfatórios (6,00-7,00), entretanto com melhores resultados para o hidrogel à base de copolímero de acrilato de sódio e lecitina .

[045] **Etapa 3:** Análise citotóxica: A citotoxicidade dos derivados de botriosferana sulfatados foi determinada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,6-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983).

9/12

[046] Culturas confluentes de células Vero foram cultivadas em microplacas de 96 poços (1×10^4 células mL⁻¹) e então expostas a diferentes concentrações (15,6 - 500 µg mL⁻¹) da botriosferana sulfatada.

[047] Em seguida, o reagente MTT (1,25 mg mL⁻¹) foi adicionado às células (10 µL), as quais foram adicionalmente incubadas por 2 h a 37 °C.

[048] Em seguida, foi adicionado o agente solubilizante MTT (90 µL) e a mistura foi agitada por 15 min.

[049] A absorvância a 570 e 690 nm foi determinada usando um leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, ELX800, EUA).

[050] A porcentagem de viabilidade celular (CV%) (59 -74%) foi calculada a partir da equação abaixo:

$$CV\% = [100 - \left(\frac{A_t}{A_c}\right) \times 100]$$

[051] Onde At e Ac referem-se à absorvância da amostra de botriosferana sulfatada testada e ao controle (células não tratadas, contendo apenas meio de cultivo), respectivamente.

[052] A concentração citotóxica a 50% (CC50) (250-500 µg mL⁻¹) foi calculada por análise de regressão linear como a concentração da amostra de botriosferana sulfatada necessária para reduzir a viabilidade das células Vero em 50%.

[053] As amostras de hidrogel também foram submetidas a estas análises:

[054] *Análise antiviral in vitro*: Para avaliar a atividade contra a cepa HSV-1 KOS, as células Vero foram previamente cultivadas em microplacas de 96 poços a 37 °C, sob 5% de CO₂, até a confluência (1×10^4 células mL⁻¹).

[055] Posteriormente, o meio de manutenção foi substituído por uma mistura do vírus (HSV-1) e diferentes concentrações da amostra de botriosferana sulfatada (variando de 1,5 a 400 µg mL⁻¹) adicionadas simultaneamente às células (multiplicidade de infecção 1, MOI 1).

[056] O controle viral (CV) e o controle celular (CC) foram analisados pela adição de DMEM (100 µL) contendo suspensões virais na ausência das substâncias teste, ou apenas DMEM, respectivamente.

10/12

[057] As microplacas foram então incubadas novamente nas mesmas condições de temperatura e CO₂. A atividade anti-herpética foi avaliada pelo procedimento de ensaio MTT, conforme descrito na anterior e de acordo com TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, (1991). A porcentagem de inibição viral (%IV) (15-64%) foi determinada a partir da equação abaixo:

$$IV(\%) = \left[\frac{\left(\frac{At_{570nm}}{At_{690nm}} \right) / \left(\frac{ACV_{570nm}}{ACV_{690nm}} \right)}{\left(\frac{Acc_{570nm}}{Acc_{690nm}} \right)} - (A_{CV_{570nm}} - A_{CV_{690nm}}) \right] \times 100$$

[058] Onde At refere-se à absorbância média das células inoculadas com vírus e tratadas com botriosferana sulfatada, e Acv e Acc referem-se às respectivas absorbâncias médias de CV e CC.

[059] A concentração capaz de reduzir a infecção viral em 50% (IC50) (4,4 -2,52 µg mL⁻¹) foi determinada por análise de regressão linear e o índice de seletividade (SI) pela razão: CC50/IC50.

[060] Aciclovir (ACV — Novafarma Ind. Farmac., Brasil, 10 µg mL⁻¹) foi utilizado como controle positivo para HSV-1. As amostras de hidrogel também foram submetidas a estas análises. As formulações foram inicialmente colocadas em contato com vírus por 01 h na concentração padrão de uso, em seguida, foi realizada a diluição em concentração não citotóxica e então colocadas em contato com a célula para realização das análises.

[061] *Análise antiviral in vivo*: Camundongos BALB/c, com peso variando de 17,8-25,5 g, passaram 2 dias para ambientalização no biotério, após o transporte, mantendo-se um ciclo claro-escuro de 12 h e 22±2 °C.

[062] Em relação à dieta foi mantida ração Nuvilab – CR1 (fabricante Nuvital) e água sem restrições. Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) via intraperitoneal. Após a verificação da anestesia, os pelos da região lombar dos animais foram retirados manualmente e a pele foi riscada com o auxílio de uma agulha de calibre 27 (escarificação), obtendo-se uma área aproximada de 2 cm².

[063] Foram utilizados 6 camundongos da linhagem BALB/c para cada grupo de experimento, conforme CARDOZO et al., (2013). Para avaliar a toxicidade das formulações, foi realizado o ensaio de irritação dérmica, de acordo com a norma

11/12

descrita no guia OECD nº 404 (2002). Para o ensaio antiviral, na região escarificada aconteceu a inoculação de 50 µL de vírus (HSV-1 KOS).

[064] Após 4 h da inoculação viral, os animais receberam diferentes tratamentos durante 7 dias (período do tratamento), 3 vezes ao dia.

[065] Os camundongos foram alocados em grupos de acordo com o tratamento a ser utilizado, como demonstrado na abaixo:

[066] Tabela 3: Grupos de camundongos e tratamentos utilizados:

	Grupos	Vírus	Tratamento	Nº de animais
01	Controle escarificação	-	-	04
02	Irritação dérmica	-	Formulação teste Laponita®	06
03	Irritação dérmica	-	Formulação base Laponita®	03
04	Irritação dérmica	-	Formulação teste LECIGEL®	06
05	Irritação dérmica	-	Formulação base LECIGEL®	03
06	Controle positivo	KOS	-	06
07	Controle negativo	KOS	Aciclovir	06
08	Formulação base	KOS	Formulação base Laponita®	06
09	Formulação teste	KOS	Formulação teste Laponita®	06
10	Formulação base	KOS	Formulação base LECIGEL®	06
11	Formulação teste	KOS	Formulação teste LECIGEL®	06

[067] As alterações foram observadas diariamente de acordo com o desenvolvimento das lesões na pele, sendo classificadas como: 0 - sem lesões visíveis; 1 - presença de vesículas; 2 - erosão ou ulceração da vesícula; 3 - lesões zosteriformes leves; 4 - lesões zosteriformes moderadas; 5 - lesões zosteriformes severas (CARDOZO et al., 2013).

[068] Ao final do experimento (7º dia) os camundongos de cada grupo foram pesados e eutanasiados por meio de inalação com isoflurano e deslocamento cervical.

[069] Animais que apresentaram outras alterações gerais (físicas, comportamentais, etc) não relacionadas à infecção herpética cutânea foram imediatamente eutanasiados, evitando sofrimento.

12/12

[070] A partir das análises biológicas mencionadas acima, pode-se observar que a molécula de botriosferana sulfatada exibiu um $CC50 > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ no teste de citotoxicidade, considerado satisfatório e muito superior ao seu $IC50$.

[071] Em relação à atividade antiviral contra o HSV-1, a amostra demonstrou uma inibição viral dose-dependente, variando entre 74-24% ($100-0,32 \mu\text{g mL}^{-1}$), com um $IC50$ de $2,52 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um índice de seletividade (SI) de 79.

[072] No que diz respeito aos hidrogéis, a análise de citotoxicidade (nenhuma citotoxicidade observada) revelou que os produtos que já continham o ativo (botriosferana sulfatada) exibiram uma melhor viabilidade celular em comparação com as formulações-base.

[073] Pela análise antiviral in vitro dos hidrogéis, observou-se que o hidrogel produzido com nanoargila sintética de laponita apresentou melhores resultados de inibição viral (cerca de 69%). Além disso, quando avaliados sob uma matriz biológica (testes in vivo), ambos os hidrogéis mostraram-se seguros para o uso, não apresentando qualquer nível de irritação dérmica.

[074] Neste teste, os grupos que receberam os tratamentos com os hidrogéis incorporados com a botriosferana sulfatada, demonstraram manter a infecção em um mesmo nível de score, revelando que são capazes de manter a infecção viral sob controle.

REIVINDICAÇÕES

1) HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS, caracterizado pelo desenvolvimento de dois hidrogéis com atividade anti-herpética, contendo botriosferana, (1→3) (1→6)-β-D-glucana, a qual foi quimicamente modificada por sulfatação; sendo desenvolvido em 3 etapas sendo:

- I. Etapa 1: Modificação química por sulfatação da botriosferana;
- II. Etapa 2: Desenvolvimento das formulações dos hidrogéis e avaliação da sua estabilidade preliminar;
- III. Etapa 3: Avaliação biológica das moléculas e dos hidrogéis;

2) HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a etapa 1 partir da obtenção da botriosferana sulfatada envolver:

- A solubilização de 100 mg de botriosferana nativa em 50 mL de dimetilformamida anidra, seguida pela adição controlada de 0,78 – 4,71 g (preferencialmente 2,4 g) do complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-Py) e 0,22 mL de trietilamina;
- A reação ocorre sob atmosfera inerte (nitrogênio) por 7 horas a temperatura ambiente (25 °C);
- Após a reação, a mistura é neutralizada com bicarbonato de sódio saturado e tampão fosfato 0,025 mol L⁻¹ (pH 7,0);
- A mistura resultante é submetida à diálise contra solução de NaCl 1 mol L⁻¹ (24h) e água destilada (96 h), seguida de liofilização;

3) HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS, de acordo com a reivindicação 1, a etapa 2, envolve o desenvolvimento de dois hidrogéis contendo a botriosferana sulfatada:

2/3

- A primeira formulação à base de nanoargila sintética de laponita (5,00%), Poliacrilato de sódio (0,05%), água ultrapura (q.s.p. 100,00), PBS 10x (10%), botriosferana sulfatada (0,10-5,00%) e Metilsotiasolinona e fenoxietanol (0,5,0%);
- A segunda formulação à base de copolímero de acrilato de sódio e lecitina um polímero de acrilato de sódio e lecitina, água destilada (q.s.p 100,00), copolímero de acrilato de sódio e lecitina (2,00%), glicerina (1,00%), ciclometicone (1,00%), botriosferana sulfatada (0,10-5,00%) e Metilsotiasolinona e fenoxietanol (0,5,0%);

4) HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS, de acordo com a

reivindicação 1, caracterizado por na etapa 2 as amostras foram submetidas a:

- Ciclos de 24 horas de aquecimento a 45 °C e resfriamento a 4 °C;
- As formulações foram avaliadas quanto a características organolépticas, como aparência (límpida), cor (transparente no caso da nanoargila sintética de laponita, e esbranquiçada no caso do copolímero de acrilato de sódio e lecitina) e odor (sem odor de contaminação microbiológica), classificadas como nenhuma mudança (N), ligeiramente modificado, modificado ou fortemente modificado;
- Adicionalmente, foram realizados testes de densidade (próximo a 1,00), espalhabilidade (neste caso acima de 300 mm²), pH (6,00-7,00) e teste de centrifugação (sem separação de fases);

5) HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS, de acordo com a

reivindicação 1, caracterizado por na etapa 3:

- Conduzida por meio do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio);

3/3

- Culturas de células Vero, mantidas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células mL⁻¹, foram expostas a concentrações variadas (15,6 - 500 µg mL⁻¹) da botriosferana sulfatada;
- Posteriormente, o reagente MTT (1,25 mg mL⁻¹) foi adicionado às células em uma quantidade de 10 µL, seguido por uma incubação adicional de 2 horas a 37 °C;
- O agente solubilizante MTT (90 µL) foi então adicionado, e a mistura foi agitada por 15 minutos. A absorbância a 570 e 690 nm foi medida utilizando um leitor de microplacas;
- A porcentagem de viabilidade celular (CV%) foi calculada usando a fórmula $CV\% = [100 - (A_t/A_c) \times 100]$, onde A_t e A_c representam a absorbância da amostra de botriosferana sulfatada testada e do controle (células não tratadas, apenas com meio de cultivo), respectivamente;
- A concentração citotóxica a 50% (CC50) foi determinada por análise de regressão linear, representando a concentração da botriosferana sulfatada necessária para reduzir a viabilidade das células Vero em 50%;



DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR

CONSIDERANDO o art. 2º da Lei de Inovação Paranaense n. 20.541 de 20/04/2021 apresenta as seguintes definições:

- Criador: pessoa física que seja inventora, obtentor ou autora de criação;
- Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ou qualquer outro desenvolvimento tecnológico, obtidos por um ou mais criadores, que gere ou possa gerar novo processo, produto, serviço ou aperfeiçoamento incremental;

CONSIDERANDO, o Capítulo IV art. 6º Parágrafo Único da Política de Inovação Institucional da UEL, prevê que qualquer criação ou inovação que tenha sido resultado das atividades da UEL ou obtidas por meio de seus recursos poderá ser protegida por meio de direitos de propriedade intelectual, no qual a Universidade irá atuar como titular da criação e a pessoa física que atuou no seu desenvolvimento será reconhecido como criador, nos termos da referida portaria;

CONSIDERANDO, no que couber, o art. 88 da Lei de Propriedade Industrial que dispõe sobre a titularidade da patente ser exclusivamente do empregador (Universidade Estadual de Londrina - UEL) quando a invenção ou modelo de utilidade decorrer de atividade de contrato de trabalho;

Alexandre Orsato, pesquisador(a), docente, brasileiro(a), inscrito(a) no CPF n. 036.919.949-97, residente e domiciliado à Rua Eurico Hummig 255, apto 1001 torre 4, Gleba Fazenda Palhano, Londrina - PR, 86050-464, sendo criador(a) do(a) patente, intitulado “HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”, declara para os devidos fins que tendo conhecimento da proteção da propriedade intelectual feita ou a ser feita em nome da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**, autarquia estadual, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid s/n, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina – PR, CEP 86057-970, inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53, com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, na qualidade de autarquia, nos termos da Lei Estadual n. 21.352/2023, denominada **UEL** e da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, doravante denominada **UNICAMP**. declara para os devidos fins que nada tem a opor e dá pleno consentimento a **UEL** e a **UNICAMP** para reivindicar a proteção legal que couber, no Brasil e no exterior, conforme sua melhor conveniência, comprometendo-se a fornecer as informações necessárias para assegurar o reconhecimento e proteção dos direitos de propriedade intelectual associados a esta criação. No mais, cede todo e qualquer direito referente à criação a **UEL** e a **UNICAMP**, ressalvados o direito de reconhecimento como criador e dos ganhos econômicos, quando for o caso, previstos na Política de Inovação institucional.

Londrina, 23 de Fevereiro de 2024.

Alexandre Orsato
036.919.949-97





DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR

CONSIDERANDO o art. 2º Lei de Inovação Paranaense n. 20.541 de 20/04/2021 apresenta as seguintes definições:

- Criador: pessoa física que seja inventora, obtentora ou autora de criação;
- Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ou qualquer outro desenvolvimento tecnológico, obtidos por um ou mais criadores, que gere ou possa gerar novo processo, produto, serviço ou aperfeiçoamento incremental;

CONSIDERANDO, o Capítulo IV art. 6º Parágrafo Único da Política de Inovação Institucional da UEL, prevê que qualquer criação ou inovação que tenha sido resultado das atividades da UEL ou obtidas por meio de seus recursos poderá ser protegida por meio de direitos de propriedade intelectual, no qual a Universidade irá atuar como titular da criação e a pessoa física que atuou no seu desenvolvimento será reconhecido como criador, nos termos da referida portaria;

CONSIDERANDO, no que couber, o art. 88 da Lei de Propriedade Industrial que dispõe sobre a titularidade da patente ser exclusivamente do empregador (Universidade Estadual de Londrina - UEL) quando a invenção ou modelo de utilidade decorrer de atividade de contrato de trabalho;

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, pesquisador(a), Docente, brasileiro(a), inscrito(a) no CPF n. 585.770.509-63, residente e domiciliado à Rua Ernani Lacerda de Athayde, 115, apto 102, Gleba Palhano, sendo criador(a) do(a) patente, intitulado “HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”, declara para os devidos fins que tendo conhecimento da proteção da propriedade intelectual feita ou a ser feita em nome da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**, autarquia estadual, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid s/n, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina – PR, CEP 86057-970, inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53, com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, na qualidade de autarquia, nos termos da Lei Estadual n. 21.352/2023, denominada **UEL** e da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, doravante denominada **UNICAMP**. declara para os devidos fins que nada tem a opor e dá pleno consentimento a **UEL** e a **UNICAMP** para reivindicar a proteção legal que couber, no Brasil e no exterior, conforme sua melhor conveniência, comprometendo-se a fornecer as informações necessárias para assegurar o reconhecimento e proteção dos direitos de propriedade intelectual associados a esta criação. No mais, cede todo e qualquer direito referente à criação a **UEL** e a **UNICAMP**, ressalvados o direito de reconhecimento como criador e dos ganhos econômicos, quando for o caso, previstos na Política de Inovação institucional.

Londrina, 23 de Fevereiro de 2024.

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni
585.770.509-63



DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR

CONSIDERANDO o art. 2º Lei de Inovação Paranaense n. 20.541 de 20/04/2021 apresenta as seguintes definições:

- Criador: pessoa física que seja inventora, obtentora ou autora de criação;
- Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ou qualquer outro desenvolvimento tecnológico, obtidos por um ou mais criadores, que gere ou possa gerar novo processo, produto, serviço ou aperfeiçoamento incremental;

CONSIDERANDO, o Capítulo IV art. 6º Parágrafo Único da Política de Inovação Institucional da UEL, prevê que qualquer criação ou inovação que tenha sido resultado das atividades da UEL ou obtidas por meio de seus recursos poderá ser protegida por meio de direitos de propriedade intelectual, no qual a Universidade irá atuar como titular da criação e a pessoa física que atuou no seu desenvolvimento será reconhecido como criador, nos termos da referida portaria;

CONSIDERANDO, no que couber, o art. 88 da Lei de Propriedade Industrial que dispõe sobre a titularidade da patente ser exclusivamente do empregador (Universidade Estadual de Londrina - UEL) quando a invenção ou modelo de utilidade decorrer de atividade de contrato de trabalho;

Briani Gisele Bigotto, pesquisador(a), discente, brasileiro(a), inscrito(a) no CPF n.425.032.108-80, residente e domiciliado à Rua Joaquim Lacerda, nº 60, Boa vista/ Londrina - PR, sendo criador(a) do(a) patente, intitulado “HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”, declara para os devidos fins que tendo conhecimento da proteção da propriedade intelectual feita ou a ser feita em nome da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**, autarquia estadual, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid s/n, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina – PR, CEP 86057-970, inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53, com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, na qualidade de autarquia, nos termos da Lei Estadual n. 21.352/2023, denominada **UEL** e da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, doravante denominada **UNICAMP**. declara para os devidos fins que nada tem a opor e dá pleno consentimento a **UEL** e a **UNICAMP** para reivindicar a proteção legal que couber, no Brasil e no exterior, conforme sua melhor conveniência, comprometendo-se a fornecer as informações necessárias para assegurar o reconhecimento e proteção dos direitos de propriedade intelectual associados a esta criação. No mais, cede todo e qualquer direito referente à criação a **UEL** e a **UNICAMP**, ressalvados o direito de reconhecimento como criador e dos ganhos econômicos, quando for o caso, previstos na Política de Inovação institucional.

Londrina, 23 de Fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
BRIANI GISELE BIGOTTO
 Data: 23/02/2024 16:56:26-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Briani Gisele Bigotto
 425.032.108-80



DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR

CONSIDERANDO o art. 2º Lei de Inovação Paranaense n. 20.541 de 20/04/2021 apresenta as seguintes definições:

- Criador: pessoa física que seja inventora, obtentora ou autora de criação;
- Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ou qualquer outro desenvolvimento tecnológico, obtidos por um ou mais criadores, que gere ou possa gerar novo processo, produto, serviço ou aperfeiçoamento incremental;

CONSIDERANDO, o Capítulo IV art. 6º Parágrafo Único da Política de Inovação Institucional da UEL, prevê que qualquer criação ou inovação que tenha sido resultado das atividades da UEL ou obtidas por meio de seus recursos poderá ser protegida por meio de direitos de propriedade intelectual, no qual a Universidade irá atuar como titular da criação e a pessoa física que atuou no seu desenvolvimento será reconhecido como criador, nos termos da referida portaria;

CONSIDERANDO, no que couber, o art. 88 da Lei de Propriedade Industrial que dispõe sobre a titularidade da patente ser exclusivamente do empregador (Universidade Estadual de Londrina - UEL) quando a invenção ou modelo de utilidade decorrer de atividade de contrato de trabalho;

Carolyne Brustolin Braga, pesquisador(a), pesquisadora, brasileiro(a), inscrito(a) no CPF n. 062.252.829.71, residente e domiciliado à Rua Hermantino Coelho, 841 – apto 23, bloco B – Mansões Santo Antônio – CEP 13087-500 – Campinas/SP, sendo criador(a) do(a) patente, intitulado “HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”, declara para os devidos fins que tendo conhecimento da proteção da propriedade intelectual feita ou a ser feita em nome da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**, autarquia estadual, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid s/n, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina – PR, CEP 86057-970, inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53, com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, na qualidade de autarquia, nos termos da Lei Estadual n. 21.352/2023, denominada **UEL** e da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, doravante denominada **UNICAMP**, declara para os devidos fins que nada tem a opor e dá pleno consentimento a **UEL** e a **UNICAMP** para reivindicar a proteção legal que couber, no Brasil e no exterior, conforme sua melhor conveniência, comprometendo-se a fornecer as informações necessárias para assegurar o reconhecimento e proteção dos direitos de propriedade intelectual associados a esta criação. No mais, cede todo e qualquer direito referente à criação a **UEL** e a **UNICAMP**, ressalvados o direito de reconhecimento como criador e dos ganhos econômicos, quando for o caso, previstos na Política de Inovação institucional.

Londrina, 23 de Fevereiro de 2024.

Carolyne Brustolin Braga

Carolyne Brustolin Braga
062.252.829.71



DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR

CONSIDERANDO o art. 2º Lei de Inovação Paranaense n. 20.541 de 20/04/2021 apresenta as seguintes definições:

- Criador: pessoa física que seja inventora, obtentora ou autora de criação;
- Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ou qualquer outro desenvolvimento tecnológico, obtidos por um ou mais criadores, que gere ou possa gerar novo processo, produto, serviço ou aperfeiçoamento incremental;

CONSIDERANDO, o Capítulo IV art. 6º Parágrafo Único da Política de Inovação Institucional da UEL, prevê que qualquer criação ou inovação que tenha sido resultado das atividades da UEL ou obtidas por meio de seus recursos poderá ser protegida por meio de direitos de propriedade intelectual, no qual a Universidade irá atuar como titular da criação e a pessoa física que atuou no seu desenvolvimento será reconhecido como criador, nos termos da referida portaria;

CONSIDERANDO, no que couber, o art. 88 da Lei de Propriedade Industrial que dispõe sobre a titularidade da patente ser exclusivamente do empregador (Universidade Estadual de Londrina - UEL) quando a invenção ou modelo de utilidade decorrer de atividade de contrato de trabalho;

Gabrielle Cristina Calegari, pesquisador(a), Discente de pós graduação, brasileiro(a), inscrito(a) no CPF n. 092.655.949-42, residente e domiciliado à Rua Espírito Santo, 1276 - Londrina/PR, criador(a) do(a) patente, intitulado “HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”, declara para os devidos fins que tendo conhecimento da proteção da propriedade intelectual feita ou a ser feita em nome da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**, autarquia estadual, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid s/n, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina – PR, CEP 86057-970, inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53, com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, na qualidade de autarquia, nos termos da Lei Estadual n. 21.352/2023, denominada **UEL** e da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, doravante denominada **UNICAMP**, declara para os devidos fins que nada tem a opor e dá pleno consentimento a **UEL** e a **UNICAMP** para reivindicar a proteção legal que couber, no Brasil e no exterior, conforme sua melhor conveniência, comprometendo-se a fornecer as informações necessárias para assegurar o reconhecimento e proteção dos direitos de propriedade intelectual associados a esta criação. No mais, cede todo e qualquer direito referente à criação a **UEL** e a **UNICAMP**, ressalvados o direito de reconhecimento como criador e dos ganhos econômicos, quando for o caso, previstos na Política de Inovação institucional.

Londrina, 23 de Fevereiro de 2024.

Gabrielle Cristina Calegari
092.655.949-42



DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR

CONSIDERANDO o art. 2º da Lei de Inovação Paranaense n. 20.541 de 20/04/2021 apresenta as seguintes definições:

- Criador: pessoa física que seja inventora, obtentora ou autora de criação;
- Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ou qualquer outro desenvolvimento tecnológico, obtidos por um ou mais criadores, que gere ou possa gerar novo processo, produto, serviço ou aperfeiçoamento incremental;

CONSIDERANDO, o Capítulo IV art. 6º Parágrafo Único da Política de Inovação Institucional da UEL, prevê que qualquer criação ou inovação que tenha sido resultado das atividades da UEL ou obtidas por meio de seus recursos poderá ser protegida por meio de direitos de propriedade intelectual, no qual a Universidade irá atuar como titular da criação e a pessoa física que atuou no seu desenvolvimento será reconhecido como criador, nos termos da referida portaria;

CONSIDERANDO, no que couber, o art. 88 da Lei de Propriedade Industrial que dispõe sobre a titularidade da patente ser exclusivamente do empregador (Universidade Estadual de Londrina - UEL) quando a invenção ou modelo de utilidade decorrer de atividade de contrato de trabalho;

Ligia Carla Faccin Galhardi, pesquisador(a), Docente, brasileiro(a), inscrito(a) no CPF n. 007.946.139-50, residente e domiciliado à Rua Rosanis Muniz Silva, 120. CEP 86047-580, Londrina – PR, criador(a) do(a) patente, intitulado “HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”, declara para os devidos fins que tendo conhecimento da proteção da propriedade intelectual feita ou a ser feita em nome da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**, autarquia estadual, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid s/n, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina – PR, CEP 86057-970, inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53, com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, na qualidade de autarquia, nos termos da Lei Estadual n. 21.352/2023, denominada UEL e da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, doravante denominada **UNICAMP**. declara para os devidos fins que nada tem a opor e dá pleno consentimento a **UEL e a UNICAMP** para reivindicar a proteção legal que couber, no Brasil e no exterior, conforme sua melhor conveniência, comprometendo-se a fornecer as informações necessárias para assegurar o reconhecimento e proteção dos direitos de propriedade intelectual associados a esta criação. No mais, cede todo e qualquer direito referente à criação a **UEL e a UNICAMP**, ressalvados o direito de reconhecimento como criador e dos ganhos econômicos, quando for o caso, previstos na Política de Inovação institucional.

Londrina, 23 de Fevereiro de 2024.


 Ligia Carla Faccin Galhardi
 007.946.139-50



DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR

CONSIDERANDO o art. 2º Lei de Inovação Paranaense n. 20.541 de 20/04/2021 apresenta as seguintes definições:

- Criador: pessoa física que seja inventora, obtentora ou autora de criação;
- Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ou qualquer outro desenvolvimento tecnológico, obtidos por um ou mais criadores, que gere ou possa gerar novo processo, produto, serviço ou aperfeiçoamento incremental;

CONSIDERANDO, o Capítulo IV art. 6º Parágrafo Único da Política de Inovação Insitucional da UEL, prevê que qualquer criação ou inovação que tenha sido resultado das atividades da UEL ou obtidas por meio de seus recursos poderá ser protegida por meio de direitos de propriedade intelectual, no qual a Universidade irá atuar como titular da criação e a pessoa física que atuou no seu desenvolvimento será reconhecido como criador, nos termos da referida portaria;

CONSIDERANDO, no que couber, o art. 88 da Lei de Propriedade Industrial que dispõe sobre a titularidade da patente ser exclusivamente do empregador (Universidade Estadual de Londrina - UEL) quando a invenção ou modelo de utilidade decorrer de atividade de contrato de trabalho;

Cátia Cristina Capêlo Ornelas Megiatto, pesquisador(a), docente, brasileiro(a), inscrito(a) no CPF n. 235.983.408-85, residente e domiciliado à Rua Hermantino Coelho 691, apt 11, Mansões Santo Antônio, sendo criador(a) do(a) patente, intitulado “HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”, declara para os devidos fins que tendo conhecimento da proteção da propriedade intelectual feita ou a ser feita em nome da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**, autarquia estadual, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid s/n, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina – PR, CEP 86057-970, inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53, com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, na qualidade de autarquia, nos termos da Lei Estadual n. 21.352/2023, denominada **UEL** e da **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, doravante denominada **UNICAMP**, declara para os devidos fins que nada tem a opor e dá pleno consentimento a **UEL** e a **UNICAMP** para reivindicar a proteção legal que couber, no Brasil e no exterior, conforme sua melhor conveniência, comprometendo-se a fornecer as informações necessárias para assegurar o reconhecimento e proteção dos direitos de propriedade intelectual associados a esta criação. No mais, cede todo e qualquer direito referente à criação a **UEL** e a **UNICAMP**, ressalvados o direito de reconhecimento como criador e dos ganhos econômicos, quando for o caso, previstos na Política de Inovação institucional.

Londrina, 23 de Fevereiro de 2024.

Cátia Cristina Capêlo Ornelas Megiatto
235.983.408-85

1/2

PROCURAÇÃO**OUTORGANTE**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, autarquia estadual em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, neste ato representada por seu **Reitor Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles**, doravante denominada **UNICAMP**.

OUTORGADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA - UEL, pessoa jurídica de direito público interno, constituída sob a forma de autarquia, nos termos da Lei nº 9.663 de 16 de julho de 1991 e Lei Estadual nº 21.352 de 01 de janeiro de 2023, com sede na cidade de Londrina, Estado do Paraná, no campus universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km. 380, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 78.640.489/0001-53, neste ato representada na forma de suas normativas internas, por sua Magnífica Reitora, Prof.^a Dra. Marta Regina Gimenez Favaro, nomeada pelo Decreto Estadual nº 11322/2022 e no uso das competências que lhe são atribuídas no Estatuto e Regimentos da UEL, brasileira, professora universitária, portadora do Registro Geral (RG) nº 4.043.909-9 e inscrita no CPF nº 869.949.999-04, residente e domiciliada na cidade de Londrina, Estado do Paraná.

PODERES

O outorgante constitui e nomeia pelo presente instrumento seu bastante procurador para requerer, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI, em seu nome e de acordo com a Lei 9.279/96 (Lei da Propriedade Industrial), os atos normativos, as portarias e as resoluções baixadas pelo INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL, a patente intitulada **“HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA HERPES SIMPLEX VÍRUS”** de propriedade da Universidade Estadual de Londrina - UEL, e da Universidade Estadual De

2/2

Campinas, para o que ficam outorgados à Universidade Estadual de Londrina - UEL amplos e ilimitados poderes, exclusivamente para atender a todas as formalidades legais e regulamentares relacionadas exclusivamente a este mandato, em especial para registrar a patente, assinar documentos, retificar, juntar, retirar documentos e requerimentos, anotar transferências, realizar alterações de nome e de sede, apresentar ou recorrer de oposição, recurso, revisão administrativa, cumprir ou contestar exigências, requerer prorrogações, acompanhar o andamento de processos, desistir e requerer a retirada do pedido e praticar os demais atos que se fizerem necessários à fiel execução deste mandato junto ao referido órgão durante o período em que o processo estiver vigente.

Esta procuração terá vigência de 10 (dez) anos, a partir da data de sua assinatura, que corresponderá à data da realização da assinatura digital.

Campinas, 23 de fevereiro de 2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles
Reitor

Documento assinado eletronicamente por **ANTONIO JOSÉ DE ALMEIDA MEIRELLES, REITOR**, em 06/03/2024, às 15:11 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
71ABB003 135B46C6 93C2431B 7CFC437E

